

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOL·LECULAR

DETERMINANTES DE LA OSTEOPOROSIS
POSMENOPÁUSICA: ASPECTOS GENÉTICOS E
INMUNOLÓGICOS Y MODULACIÓN POR DIFERENTES
TRATAMIENTOS.

BEGOÑA PINEDA MERLO

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 1 d'octubre de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. José Antonio Riancho Moral
- Dra. M^a Dolores Moltó Ruiz
- Dr. Francesc Xavier Nogués Solán
- Dr. Francisco Quereda Seguí
- Dra. Eulalia Alonso Iglesias

Va ser dirigida per:

Dr. Antonio Cano Sánchez

Dr. Miguel Ángel García Pérez

©Copyright: Servei de Publicacions
Begoña Pineda Merlo

Dipòsit legal: V-4113-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-8066-6

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

VNIVERSITAT D VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**DETERMINANTES DE LA OSTEOPOROSIS
POSMENOPÁUSICA: ASPECTOS GENÉTICOS
E INMUNOLÓGICOS Y MODULACIÓN POR
DIFERENTES TRATAMIENTOS.**

TESIS DOCTORAL
Begoña Pineda Merlo

Valencia, 2010

D. Antonio Cano Sánchez, Catedrático del Departamento de
Pediatria, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia

D. Miguel Ángel García Pérez, Doctor en Ciencias Biológicas por
la Universidad de Valencia

CERTIFICAN:

Que Dña. Begoña Pineda Merlo, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección la presente Tesis Doctoral titulada “Determinantes de la osteoporosis posmenopáusicas: Aspectos genéticos e inmunológicos y modulación por diferentes tratamientos” para la obtención del título de Doctora en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación:

Fdo. Antonio Cano Sánchez

Fdo. Miguel Ángel García Pérez

Fdo. Begoña Pineda Merlo

AGRADECIMIENTOS

Ha pasado mucho tiempo desde que se inició este trabajo y hoy, echando la vista atrás, me doy cuenta de todas las personas que han formado parte de mi vida durante todo este tiempo y con las que compartido tantos momentos. A todas ellas, quiero agradecerles todo el apoyo, ayuda y confianza que me han prestado.

Sin embargo, no puedo dejar de dedicar este trabajo a toda mi familia, por el apoyo incondicional que me han mostrado en todo momento. Y como no, a mi novio, Jorge, agradecerle su infinita paciencia, ayuda y comprensión, por ayudarme a superar los malos momentos y enseñarme a disfrutar de los buenos.

Y para finalizar, dedico este trabajo, con un cariño especial, a mis padres, a los que tengo tantas cosas que agradecer. Gracias por enseñarme a caminar por la vida, por alentarme siempre en mis decisiones y por todo el sacrificio que habéis hecho durante vuestras vidas por mí, porque sólo gracias a vosotros he conseguido llegar hasta aquí.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	17
RESUMEN.....	23
1. INTRODUCCIÓN.....	
1.1. FISILOGIA DEL HUESO.....	27
1.1.1. El tejido óseo y sus funciones.....	29
1.1.2. Tipos de hueso y estructura.....	29
1.1.3. Formación del hueso.....	33
1.1.4. Composición del hueso.....	34
1.1.4.1. Matriz extracelular.....	34
1.1.4.1.1. Componente orgánico.....	34
1.1.4.1.2. Componente inorgánico.....	36
1.1.4.2. Componente celular.....	37
1.1.4.2.1. Osteoblastos.....	38
1.1.4.2.2. Osteocitos.....	47
1.1.4.2.3. Células de revestimiento.....	49
1.1.4.2.4. Osteoclasto.....	50
1.1.5. Remodelado óseo.....	56
1.1.5.1. Regulación del remodelado óseo.....	59
1.1.5.1.1. Regulación sistémica del remodelado óseo..	59
1.1.5.1.2. Regulación local del remodelado óseo.....	63
1.1.5.1.3. Sistema RANK-RANKL-OPG.....	65
1.1.5.1.4. Regulación del sistema OPG/RANKL.....	67
1.1.6. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo.....	68
1.1.6.1. Marcadores de formación ósea.....	69
1.1.6.2. Marcadores de resorción ósea.....	71
1.1.6.3. Variabilidad de los marcadores de remodelado	
óseo.....	72
1.1.6.4. Utilidad clínica de los marcadores bioquímicos	
de remodelado óseo en osteoporosis.....	73
1.1.7. Densidad mineral ósea (DMO).....	74
1.2. OSTEOPOROSIS.....	78
1.2.1. Definición de osteoporosis.....	78
1.2.2. Epidemiología.....	79

1.2.3. Etiopatogenia, factores de riesgo y clasificación de la osteoporosis.....	79
1.2.4. Diagnóstico y tratamientos.....	82
1.2.4.1. Ranelato de estroncio.....	82
1.2.4.2. Bifosfonatos.....	83
1.2.4.3. Estrógenos.....	84
1.2.4.4. Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs).....	85
1.2.4.5. Fitoestrógenos y <i>Cimicífuga racemosa</i>	85
1.3. OSTEOPOROSIS Y DEFICIENCIA ESTROGÉNICA.....	87
1.3.1. Pérdida ósea y edad.....	87
1.3.2. Pérdida ósea y deficiencia estrogénica.....	88
1.3.2.1. Alteración en la síntesis de citoquinas (IL-1, IL-6 y TNF α)	89
1.4. OSTEOPOROSIS Y SISTEMA INMUNE: OSTEOINMUNOLOGÍA.....	92
1.5. OSTEOPOROSIS Y FACTORES GENÉTICOS.....	94
1.5.1. Factores ambientales y genéticos determinantes en la masa ósea.....	94
1.5.2. Estudios de asociación a DMO de polimorfismos (SNPs) en genes candidatos	96
1.5.2.1. <i>RUNX2</i>	101
1.5.2.2. <i>OCIL</i>	101
1.5.2.3. <i>CD40</i> y <i>CD40L</i>	102
1.5.3. Estudios de asociación de genoma completo (GWAs)..	103
2. OBJETIVOS.....	105
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	109
3.1. ESTUDIOS EN HUMANOS.....	111

3.1.1. Población de estudio.....	111
3.1.2. Población para el estudio del efecto de un extracto isopropanólico de <i>Cimicífuga racemosa</i> (CRI) (Remifemin) sobre el metabolismo óseo y sistema cardiovascular.....	113
3.1.3. Datos antropométricos y bioquímicos.....	114
3.1.4. Obtención y procesamiento de las muestras.....	115
3.1.5. Determinaciones séricas	116
3.1.6. Determinaciones en orina.....	117
3.1.7. Determinación de la densidad mineral ósea	117
3.1.8. Obtención de células.....	118
3.1.9. Obtención de ADN.....	119
3.1.10. Cultivo de células MC3T3-E1 para la diferenciación osteoblástica.....	119
3.1.11. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina....	121
3.1.12. Tasa de expresión de genes relacionados con la diferenciación y función osteoblástica.....	122
3.1.13. Cultivo de células endoteliales para la producción de prostaciclina.....	124
3.1.14. Elección de genes candidatos y selección y priorización de los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs).....	126
3.1.14.1. <i>RUNX2</i> (Cbfa1).....	127
3.1.14.2. <i>OCIL</i> (Osteoclast inhibitory lectin).....	128
3.1.14.3. <i>CD40</i> y <i>CD40L</i>	129
3.1.15. Genotipado.....	131
3.1.16. Secuenciación de variantes raras en el dominio polyQ/polyA de <i>RUNX2</i>	137
3.2 ESTUDIO EN MODELO ANIMAL.....	138
3.2.1. Ratones.....	138
3.2.2. Ovariectomía.....	138
3.2.3. Administración de tratamientos.....	139

3.2.4. Obtención de los tejidos y cultivos celulares.....	140
3.2.5. Parámetros séricos.....	141
3.2.6. Proliferación celular y análisis de viabilidad.....	143
3.2.7. Subpoblaciones celulares en bazo y médula ósea mediante citometría de flujo.....	144
3.2.8. Extracción de ARN y RT-PCRs semicuantitativas.....	144
3.2.9. Análisis de la microarquitectura trabecular y cortical en 3D mediante microtomografía computerizada (μ -TC).....	147
3.2.10. Determinación de la densidad mineral ósea volumétrica (vBMD) mediante imágenes de micro-TC.....	150
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	151
4. RESULTADOS.....	155
4.1. ESTUDIOS EN HUMANOS.....	157
4.1.1. Descripción de la población de mujeres participantes en los estudios de asociación.....	157
4.1.2. Efecto del tipo de menopausia.....	159
4.1.3. Asociación entre parámetros clínicos, óseos y bioquímicos.....	161
4.1.4. Asociación de genotipos en <i>RUNX2</i> y estado óseo.....	164
4.1.5. Variantes raras en el exón 2 del gen <i>RUNX2</i> y DMO.....	171
4.1.6. El gen <i>OCIL</i> (Osteoclast Inhibitory Lectin) y masa ósea.....	174
4.1.7. Polimorfismo en <i>CD40</i> y estado óseo.....	182
4.1.8. Descripción de una interacción génica entre los genes <i>CD40</i> y <i>CD40L</i>	187
4.1.9. Descripción de la población de mujeres participantes en el estudio del efecto de CRi sobre el metabolismo óseo y sistema cardiovascular.....	197

4.1.10. Efecto del CRi sobre el metabolismo óseo.....	198
4.1.11. Efecto del CRi sobre la diferenciación de células pre-osteoblástica (MC3T3-E1) y expresión génica.....	200
4.1.12. Efecto del CRi sobre el perfil lipídico y los niveles de IL6.....	202
4.1.13. Efecto del CRi sobre la producción de prostaciclina en células HUVEC.....	204
4.2. ESTUDIOS EN MODELO ANIMAL.....	205
4.2.1. Efecto de la ovariectomía y de la administración de agonistas del receptor de estrógenos sobre el sistema inmune y sobre el metabolismo óseo en el ratón.....	205
4.2.1.1. Efecto sobre parámetros físicos.....	205
4.2.1.2. Efecto sobre parámetros séricos.....	207
4.2.1.3. Efecto sobre la proliferación celular.....	208
4.2.1.4. Efecto sobre las subpoblaciones celulares de bazo y de médula ósea.....	210
4.2.1.5. Efecto sobre la expresión génica.....	215
4.2.2. Efecto de la ovariectomía y de la administración de agonistas del receptor de estrógenos sobre la microestructura ósea en al ratón.....	216
4.2.2.1. Efecto sobre el hueso trabecular.....	216
4.2.2.2. Efectos sobre el hueso cortical.....	219
4.2.2.3. Efecto sobre la densidad mineral ósea volumétrica (vDMO).....	221
5.DISCUSIÓN.....	225
5.1. Breve descripción de la población.....	227
5.2. <i>RUNX2</i> y masa ósea.....	229
5.3. <i>OCIL</i> y masa ósea.....	237
5.4. Polimorfismo en la secuencia Kozak del gen <i>CD40</i> y estado óseo.....	242
5.5. Interacción génica entre <i>CD40</i> y <i>CD40L</i> y estado óseo..	246
5.6. Estudio del efecto del extracto isopropanólico de	

<i>Cimicífuga racemosa</i> (CRi) (Remifemin) sobre el metabolismo óseo y el sistema cardiovascular.....	251
5.7. Efecto de la ovariectomía y la administración de agonistas del receptor de estrógenos sobre el sistema inmune y óseo del ratón.....	258
5.8. Efecto de la ovariectomía y de la administración de agonistas del receptor de estrógenos sobre la microestructura ósea del ratón.....	267
6. CONCLUSIONES.....	273
7. BIBLIOGRAFÍA.....	279
8. DOCUMENTOS ADJUNTOS.....	315

ABREVIATURAS

ADM: Años Desde la Menopausia
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
AINE: Antinflamatorios no esteroideos
ANCOVA: Análisis de la covarianza
ANOVA: Análisis de la varianza
ARN: Ácido ribonucleico
B.Ar: Área de hueso media de las secciones transversales
BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*): Proteínas morfogénicas óseas
BMU (*Bone Multicellular Units*): Unidades básicas de remodelado
BSA (*Bovine Serum Albumine*): Seroalbúmina bovina
BSP (*Bone sialoproteins*): Sialoproteínas del hueso
BV: Volumen de hueso trabecular
Ca/Cr: Calcio/Creatinina
Ca: Calcio
Cbfa1 (*Core-binding factor a1*)
CF: Cuello Femoral
CL: Columna Lumbar
Clec2d (*C-type lectin domain family 2, member D*)
COL1A1: Colágeno tipo 1-alfa-1
CR: *Cimicifuga racemosa*
CRi: Extracto isopropanólico de *Cimicifuga racemosa*
Cs.Th: Grosor de la sección transversal
CSF (*Colony Stimulating Factor*): Factor estimulante de colonias
Ct.Pe.Pm: Perímetro cortical periostal
CTX: segmento carboxi-terminal del colágeno (C-telopéptido)
DA: Grado de anisotropía
DE: Desviación Estándar
DEPC: Dietil Pirocarbonato
Dkk-1 (*Dickkopf-1*)
DMO: Densidad Mineral Ósea
DMOe: Densidad Mineral Ósea Estandarizada
DMSO: Dimetilsulfóxido
Dpy: Deoxipiridinolina
DXA: Absorciometría dual de rayos X
E2: 17 β -estradiol
EDTA: Ácido Etilen-Diamino-Tetra-Acético
ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*): Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EBM-2 (*Endothelial basal medium 2*): medio específico para células endoteliales humanas

EGM-2 (*Endothelial cells growth medium*): medio específico para células endoteliales humanas

FA: fosfatasa alcalina

FAO: Fosfatasa Alcalina Ósea

FBS (*Fetal Bovine Serum*): Suero bobino fetal

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (fluorocromo)

FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*): Hormona folículo estimulante

GAPDH: Gliceraldehído 3'-fosfato deshidrogenasa

GEN: Genisteína

GH (*Growth Hormone*): Hormona de crecimiento

Gla: Ácido carboxiglutámico

GWAs (*Genome-Wide Association Studies*): Estudios de asociación de genoma completo

HDL (*High Density Lipoprotein*): Lipoproteína de alta densidad

HERS (*Heart and Estrogen/progestin Replacement Study*)

HPLC (*High performance liquid chromatography*): Cromatografía líquida de alta eficacia

HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*): Células de vena de cordón umbilical humano

HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg

Ig- : Inmonoglobulina

IGF- (*Insulin-like Growth Factor*): Factor de crecimiento insulínico

IL- : Interleuquina

IMC: Índice de Masa Corporal.

INF γ : Interferón γ

LDL (*Low Density Lipoprotein*): Lipoproteína de baja densidad

LDL (*Low DensityLlipoprotein*): Lipoproteína de baja densidad

LLT1 (*Lectin Like Transcript-1*)

LMI: Longitud media interceptada

LPS: Lipopolisacárido

LRP5 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 5*)

M-CSF (*Macrophage Colony Stimulant Factor*): Factor estimulante de colonias de macrófagos

MMI: Media del momento polar de inercia

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*): Centro nacional de información biotecnológica

NK: Células Natural Killer
NTx: segmento amino-terminal del colágeno tipo I (N-telopéptido)
OC: Osteocalcina
OCIL (*Osteoclast Inhibitory Lectin*): Lectina inhibidora de osteoclastos
OMS: Organización Mundial de la Salud
OPG: Osteoprotegerina
OPN: Osteopontina
OSN: Osteonectina
OVX: Ovariectomía, ovariectomizado
PBS (*Phosphate Buffered Saline*): tampón fosfato salino
PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Reacción en cadena de la polimerasa
PCR: Proteína C reactiva
PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*): Polimorfismos de longitud del fragmento de restricción
PE: Ficoeritrina (fluorocromo)
PHA: Fitohematoglutinina
PICP: pro-péptidos carboxi-terminales del colágeno tipo I
PINP: pro-péptidos amino-terminales del colágeno tipo I
PMA: Forbol miristato acetato
PTH: Parathormona
Pyr: Piridinolina
RAL: Raloxifeno
RANK (*Receptor Activator for Nuclear Factor κ B*): Receptor del activador del factor nuclear kappa-B
RANKL (*Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*): Ligando del receptor del activador del factor nuclear kappa-B
ROI: Región de interés establecida
RT-PCR: Retrotranscripción
RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*): Factor de transcripción 2 con dominio runt
RVD: Receptor de la Vitamina D
SERMs (*Selective Estrogen Receptors Modulators*): Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos
SHAM: Animales falsamente operados
SMI: Índice de modelo estructural

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*): Polimorfismos de nucleótido simple

SPSS: Paquete Estadístico para Ciencias Sociales

Tb.N: Número de trabéculas

Tb.Pf: Factor de patrón de hueso trabecular

Tb.Sp: Separación trabecular

Tb.Th: Grosor trabecular

TBE: Tampón TBE (Tris, Borato y EDTA)

TE: Tampón TE (Tris-EDTA)

THS: Terapia Hormonal Sustitutiva

TNF α (*Tumoral Necrosis Factor α*): Factor de necrosis tumoral α

TRAF6 (*TNF Receptor-Associated Factor 6*): Receptor del factor de necrosis tumoral-6

TRAP (*Tartrate Resistant Acid Phosphatase*): Fosfatasa ácida tartrato resistente

TV: Volumen total ocupado por el ROI

UTR: Partes no traducidas de cada gen,

vBMDc: Densidad mineral ósea volumétrica cortical

vBMDt: Densidad mineral ósea volumétrica total

vBMDtrab: Densidad mineral ósea volumétrica trabecular

WHI: estudio Women's Health Initiative

XTT (*tetrazolium salt*): Sales de tetrazolio

α -MEM (*alpha-modified minimum essential medium*): Medio de cultivo

μ -TC: Microtomografía computerizada

RESUMEN

La pérdida ósea acelerada puede desencadenar en osteoporosis, una enfermedad esquelética caracterizada por una menor resistencia ósea y riesgo aumentado de fractura. Es la enfermedad metabólica más prevalente entre la población femenina ya que afecta al 35% de las mujeres españolas mayores de 50 años, y por lo tanto es un problema de salud pública muy importante.

El tipo de osteoporosis más frecuente es la osteoporosis posmenopáusica, una enfermedad multigénica que se inicia con la retirada de la protección estrogénica. No obstante, a pesar de que todas las mujeres aceleran su tasa de pérdida ósea con la menopausia, no todas desarrollarán osteoporosis en el futuro. La causa hay que buscarla en el pico de masa ósea alcanzado por cada mujer y que está determinado principalmente por factores genéticos. Históricamente, los factores genéticos se han buscado en genes que regulan el metabolismo óseo y en genes de diversas citoquinas. Recientemente, se ha descrito la relación que existe entre el sistema inmune con la pérdida ósea, debida a la deficiencia estrogénica, y con la regulación ósea basal. De hecho, se ha relacionado la participación de células T, células B, monocitos, incluso de células dendríticas, con la osteoporosis. En este trabajo de Tesis Doctoral se ha estudiado la asociación a masa ósea de genes importantes en el metabolismo óseo, como *RUNX2*, y otros genes relacionados con el sistema inmune, como *OCIL*, *CD40* y *CD40L*, en una población de mujeres posmenopáusicas.

Debido a que la principal causa de la osteoporosis es la deficiencia estrogénica, el tratamiento más utilizado para esta patología ha sido

terapia hormonal sustitutiva (THS) mediante la administración de estrógenos. Pese a los efectos beneficiosos de la THS en el hueso, se ha descrito diversos efectos adversos, como el aumento en el riesgo de cáncer de mama o alteraciones cardiovasculares, que han llevado a la búsqueda de alternativas terapéuticas a la THS. Entre las alternativas terapéuticas utilizadas actualmente, encontramos compuestos agonistas del receptor de estrógenos, como los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (raloxifeno) y fitoestrógenos (genisteína), y también extractos vegetales (*Cimicífuga racemosa*).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha estudiado, comparativamente, el efecto sobre la pérdida de hueso y microestructura ósea, mediante micro-TC, de la administración del estradiol, el raloxifeno y la genisteína en el ratón ovariectomizado como modelo animal de pérdida ósea. Asimismo, también se ha evaluado en una población pequeña de mujeres posmenopáusicas, el efecto sobre el metabolismo óseo de un extracto isopropanólico vegetal de *Cimicífuga racemosa* (Remifemin).

1. INTRODUCCIÓN

1.1.FISIOLOGIA DEL HUESO

1.1.1. El tejido óseo y sus funciones

El tejido óseo es un tejido firme, duro y resistente que, junto con el cartílago, forma el esqueleto de los vertebrados. El tejido óseo desempeña tres funciones (Cohen, Jr. 2006):

1. Mecánica: mantiene el peso corporal y funciona como apoyo y lugar de las inserciones musculares para la locomoción. Multiplica la fuerza de los músculos que mueven al esqueleto.

2. Protectora: resguarda a órganos vitales de traumatismos y alberga al sistema hematopoyético (médula ósea).

3. Metabólica: actúa como reserva de iones y minerales, especialmente fosfato y calcio, para el mantenimiento de la homeostasis sérica, que es imprescindible para la vida.

1.1.2. Tipos de hueso y estructura

Como órgano, en el esqueleto pueden distinguirse dos tipos de huesos según su forma: los huesos planos (huesos del cráneo, escápula, mandíbula e ilion) y los huesos largos (tibia, fémur, húmero, etc.). Estos dos tipos de huesos se originan a partir de dos tipos distintos de desarrollo, intramembranoso y endocondral, aunque el desarrollo y el crecimiento de los huesos largos en realidad implica ambos tipos de procesos.

La exploración externa de un hueso largo pone de manifiesto dos extremos más anchos o epífisis, un tubo más o menos cilíndrico en el medio llamado diáfisis, que contiene la cavidad medular donde se

aloja la médula ósea hematopoyética, y una zona de desarrollo entre ambos sectores llamada metáfisis (figura 1.1) (Clarke 2008). En un hueso largo en desarrollo, la epífisis y la metáfisis, que se originan en dos centros de osificación independientes, están separadas por una capa de cartílago, la placa epifisaria (también denominada cartílago de crecimiento), que se trata de una capa de células proliferativas y matriz cartilaginosa en expansión responsable del crecimiento longitudinal de los huesos; se calcifica y se reestructura completamente y es sustituida por hueso al final del período de crecimiento.

Existen dos superficies óseas en las que el hueso está en contacto con las partes blandas: una superficie externa llamada periostio, que rodea a la superficie del hueso, y una superficie interna o endostio, una membrana que tapiza a la cavidad medular y que contiene a las células osteoprogenitoras (Figura 1.1) (Clarke 2008).

Los huesos poseen zonas con diferente densidad de tejido óseo que se diferencian macroscópica y microscópicamente en áreas de hueso más compacto, conocido como hueso cortical, y zonas de hueso más esponjoso, conocido como hueso trabecular (Figura 1.1) (Clarke 2008).

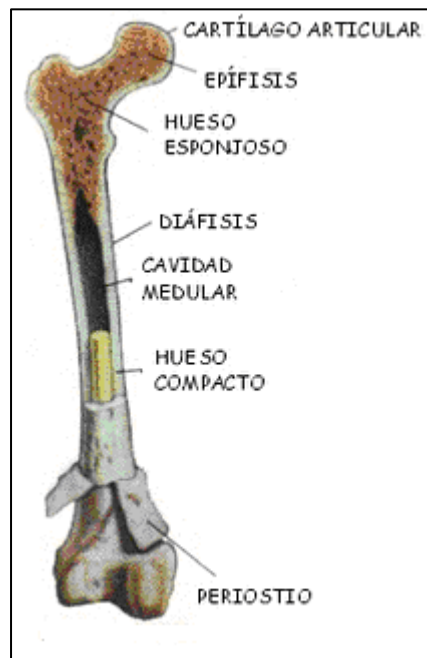


Figura 1.1. Representación esquemática de un corte longitudinal de un hueso

El hueso cortical está formado por una capa espesa y densa de tejido calcificado. Constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos así como la parte externa de todos los huesos del cuerpo. El hueso cortical o compacto se forma mediante canales vasculares que invaden el hueso desde las superficies perióstica y endóstica. La unidad estructural es la osteona o sistema harvesiano que consta de laminillas óseas dispuestas de forma cilíndrica que rodean al canal vascular o canal harvesiano (Figura 1.2) (Clarke 2008; Proff & Romer

2009). Las osteonas se conectan con las adyacentes mediante unos canales transversales llamados canales de Volkman. La diáfisis contiene la cavidad medular donde se aloja la médula ósea hematopoyética. A medida que el hueso cortical se acerca a la metáfisis y la epífisis, se va haciendo cada vez más fino y el espacio interno pasa a estar ocupado por una red de trabéculas finas calcificadas; se trata del hueso trabecular. Las trabéculas se disponen formando múltiples celdas en forma de panal (Figura 1.2) y los espacios contenidos en estas trabéculas finas también están ocupados por médula ósea hematopoyética y son adyacentes a la cavidad medular de la diáfisis. Las trabéculas se orientan predominantemente de forma perpendicular a las fuerzas externas para dar soporte estructural (Clarke 2008; Proff & Romer 2009). Las superficies óseas de las epífisis que forman parte de la articulación están cubiertas por una capa de cartílago articular que no se calcifica.

El hueso cortical y el hueso trabecular están compuestos por las mismas células y los mismos elementos matriciales, pero presentan diferencias estructurales y funcionales. La principal diferencia estructural es cuantitativa: el 80-90 % del volumen de hueso cortical está calcificado, mientras que sólo lo está el 15-25 % del hueso trabecular estando el resto ocupado por médula ósea, vasos sanguíneos y tejido conjuntivo. El resultado es que el 70-85 % de la superficie de contacto con las partes blandas se halla en la superficie ósea endostal, lo que lleva a la principal diferencia funcional entre ambos tipos de hueso; el hueso cortical desempeña principalmente, aunque no de

forma exclusiva, una función mecánica y protectora, mientras que el hueso trabecular realiza principalmente una función metabólica.

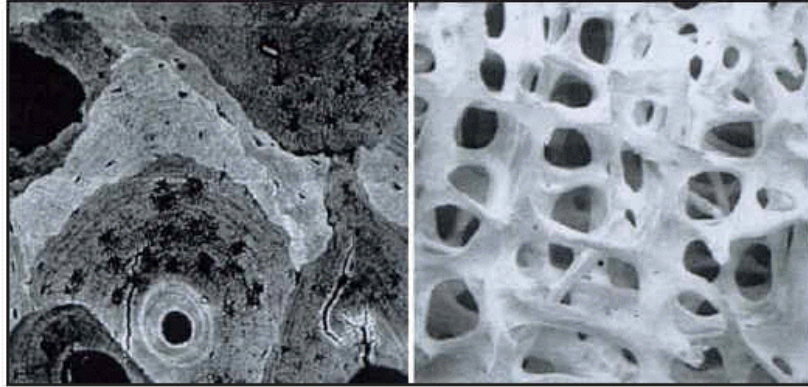


Figura 1.2. Microfotografías electrónicas del hueso cortical (izquierda) y trabecular (derecha)

El concepto de microarquitectura describe en el hueso trabecular el entramado de trabéculas y en el cortical su porosidad.

1.1.3. Formación del hueso

Durante la embriogénesis, el hueso se forma por dos vías diferentes: osificación intramembranosa y osificación endocondral. En ambos casos son los osteoblastos los encargados de la formación ósea (ver más adelante). En la osificación intramembranosa, los osteoblastos se diferencian directamente de las células mesenquimales. En la osificación endocondral las células mesenquimales se diferencian primero en condrocitos que terminarán formando

cartílago. Después de esta diferenciación, y una vez los condrocitos han madurado, las células mesenquimales circundantes se diferencian en osteoblastos, que terminarán formando hueso (Cohen, Jr. 2006).

1.1.4. Composición del hueso

El hueso es un órgano muy dinámico. Está formado principalmente por tejido óseo, un tipo de tejido conjuntivo especializado que está formado por una matriz extracelular, con gran actividad metabólica, y por elementos celulares. Las cualidades biomecánicas del hueso dependen de la calidad y organización espacial de estos componentes (Moro *et al.* 2000).

1.1.4.1. Matriz extracelular

La matriz extracelular es especialmente abundante en este tejido y está formada por un componente orgánico (proteínas) y un componente inorgánico (sales minerales). Aunque todos los huesos no son iguales en tamaño y forma, su composición química es similar siendo de un 25% de agua, un 45% de sales minerales y un 30% de materia orgánica.

1.1.4.1.1. Componente orgánico

El principal componente orgánico de la matriz extracelular es el colágeno tipo I, que supone aproximadamente el 90% de la matriz ósea orgánica. Además de colágeno, dentro del componente orgánico de la matriz también encontramos proteínas no colágenas (10%), que

son principalmente glucoproteínas y proteoglicanos. Algunas de estas proteínas no colágenas destacables son la osteonectina (OSN), osteocalcina (OC), osteoprotegerina (OPG), osteopontina (OPN) y sialoproteínas (BSP) (Young 2003; Gundberg 2003; Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil *et al.* 2006). Estas proteínas son extremadamente aniónicas por lo que tienen una gran capacidad de fijar aniones y se cree que desempeñan un papel importante en el proceso de calcificación de la matriz.

Colágeno

Es la proteína más importante de la matriz ósea. Es sintetizado por los osteoblastos en forma de procolágeno, que se transformará en colágeno tipo I para formar fibrillas que se entrecruzarán entre sí para conferir resistencia al estrés mecánico.

Osteonectina (OSN)

Es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. Se cree que interviene en la regulación de la adhesión entre la matriz y las células. En el hueso es necesaria para la mineralización normal.

Osteocalcina (OC)

Es una proteína no colágena de gran importancia en la formación de hueso nuevo. Su síntesis es dependiente de las Vitaminas K y D. Presenta afinidad por el calcio y capacidad reguladora durante la mineralización. Es sintetizada por el osteoblasto, por lo que sus niveles séricos sirven como indicador de la actividad de estas células. También se sintetiza por el osteocito al ser sometido a fuerzas mecánicas que estimulan la remodelación ósea.

Osteopontina (OPN)

Se trata de una glicoproteína capaz de unirse al calcio y que tiene una elevada afinidad hacia la hidroxiapatita. Juega un papel importante en la mineralización del hueso y en calcificación.

Sialoproteínas del hueso (BSP)

Las BSPs están involucradas en la mineralización del nuevo hueso y la calcificación del tejido esquelético.

1.1.4.1.2. Componente inorgánico

La matriz ósea posee abundantes sales minerales en forma cristalizada, en particular, en forma de cristales de hidroxiapatita o fosfato cálcico ($3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$), algo de carbonato cálcico y pequeñas cantidades de magnesio, flúor y sodio (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil *et al.* 2006). Todas estas sales se encuentran distribuidas a lo largo de la retícula que forma el colágeno

y se disponen en la misma dirección que éstas. El proceso por el que estas sales se depositan y cristalizan se denomina calcificación. Ésta es una propiedad que hay que destacar ya que, a diferencia de otros tejidos conjuntivos, la matriz del tejido óseo tiene la capacidad de calcificarse.

Aunque la dureza del hueso se debe a sus componentes minerales, sin la existencia de la red de colágeno el hueso sería frágil. Las fibras de colágeno y otras proteínas no colágenas de la matriz aportan flexibilidad y resistencia a la tensión. Si faltan las fibras de colágeno, o éstas fueran defectuosas, se producen enfermedades como la osteogénesis imperfecta (huesos de cristal). Si, por el contrario, se eliminaran las sales minerales del hueso, éste resultaría una estructura flexible y esponjosa.

1.1.4.2. Componente celular

El tejido óseo es un tejido dinámico formado por una población de células funcionalmente diferenciadas que son necesarias para mantener la estructura ósea, la mecánica del hueso y la homeostasis mineral. El hueso está sometido durante toda su vida a una continua renovación, es decir, experimenta un proceso continuo de resorción y formación ósea y las células que participan en este proceso son los osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento superficial y osteoclastos. La mayor parte de la actividad celular se encuentra en las superficies óseas, sobre todo, en el endostio, donde el hueso está en contacto con la médula ósea.

1.1.4.2.1. Osteoblastos

El osteoblasto es la célula responsable de la producción de los componentes de la matriz (colágeno y sustancia fundamental) y se localiza en las superficies óseas (Mackie 2003). También se encarga de controlar la generación y actividad de los osteoclastos (ver más adelante).

Morfológicamente, el osteoblasto activo presenta un núcleo redondo grande situado en la base de la célula hacia el lado opuesto de la superficie ósea. Se caracteriza por tener un aparato de Golgi prominente, situado entre el núcleo y el ápice de la célula, y un retículo endoplasmático grande, lo que refleja la alta actividad biosintética y secretora de esta célula. Los osteoblastos presentan unas prolongaciones citoplasmáticas en la cara secretora de la célula que se extienden hasta el fondo de la matriz y sirven de sistema de comunicación entre células. La membrana plasmática del osteoblasto se caracteriza por ser rica en fosfatasa alcalina. Este enzima es uno de los primeros marcadores del fenotipo osteoblástico y es por ello por lo que la concentración de fosfatasa alcalina en suero se utiliza como índice de la formación ósea. Además, los osteoblastos también expresan en su membrana receptores para la parathormona (PTH), receptores para las prostaglandinas, receptores estrogénicos y receptores para la vitamina D3 (Yamaguchi *et al.* 2000), factores que, entre otros, actuarán estimulando al osteoblasto (ver apartado de remodelado óseo). Por el contrario, otras moléculas actuarán como inhibidores del osteoblasto, como es el caso de los corticoides (Figura

1.3). Los osteoblastos también expresan varias moléculas de adhesión (integrinas) y receptores para citoquinas. En su membrana también expresan citoquinas propias, como el factor estimulante de colonias (CSF) y el ligando del receptor del activador del factor nuclear kappa-B (RANKL) que, como se verá más adelante, es un factor imprescindible para la diferenciación de los osteoclastos (células encargadas de destruir hueso). También segregan osteoprotegerina (OPG), un receptor señuelo de RANKL capaz de inhibir la formación de osteoclastos (ver en remodelado óseo) (Yamaguchi *et al.* 2000). Así pues, los osteoblastos se caracterizan por la expresión de proteínas de matriz, como el colágeno, por tener una elevada actividad fosfatasa alcalina, y por su respuesta a factores osteotrópicos (hormonas y citoquinas). Todos estos factores relacionados con el osteoblasto son característicos del fenotipo osteoblástico y su expresión varía a medida que las células progenitoras se diferencian, maduran y sintetizan matriz (ver más adelante).

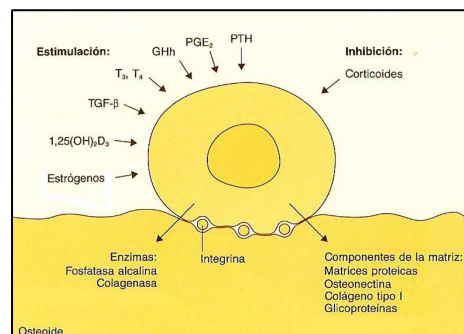


Figura 1.3. Representación esquemática de un osteoblasto. Factores que actúan estimulando o inhibiendo al osteoblasto.

Introducción

Como ya se ha comentado, los osteoblastos son células secretoras encargadas de sintetizar matriz ósea no mineralizada denominada tejido osteoide. Este tejido suele durar unos 10 días aproximadamente, tiempo que transcurre desde que el osteoblasto sintetiza la matriz hasta que sucede el proceso de calcificación. Los osteoblastos actúan siempre sintetizando matriz tras un proceso de resorción ósea (ver remodelado óseo) y nunca van solos sino que actúan en conjunto, es decir, forman grupos de células sobre la superficie del hueso (100-400 células por lugar de formación ósea). Normalmente, alrededor del osteoblasto se suelen encontrar células mesenquimales activadas o preosteoblastos. Cuando el osteoblasto finaliza su actividad secretora, podrá seguir dos vías: transformarse en célula de revestimiento o en osteocito (Manolagas 2000c)(ver más adelante).



Figura 1.4. Imagen de un osteoblasto al microscopio (tinción de hematoxilina- eosina)

Introducción

Los osteoblastos se originan a partir de células madre mesenquimales (Komori 2003) (células madre estromales de la médula ósea o células madre mesenquimales del tejido conjuntivo). Estas células progenitoras, adquieren el compromiso de diferenciarse hacia una determinada estirpe celular debido a la influencia de estímulos. Los estímulos actúan como mediadores del compromiso de las células madre progenitoras, de modo que dependiendo de qué estímulo reciban estas células, se podrán diferenciar hacia estirpes diferentes como osteoblastos, condrocitos, adipocitos, mioblastos, células estromales o fibroblastos (Katagiri & Takahashi 2002)

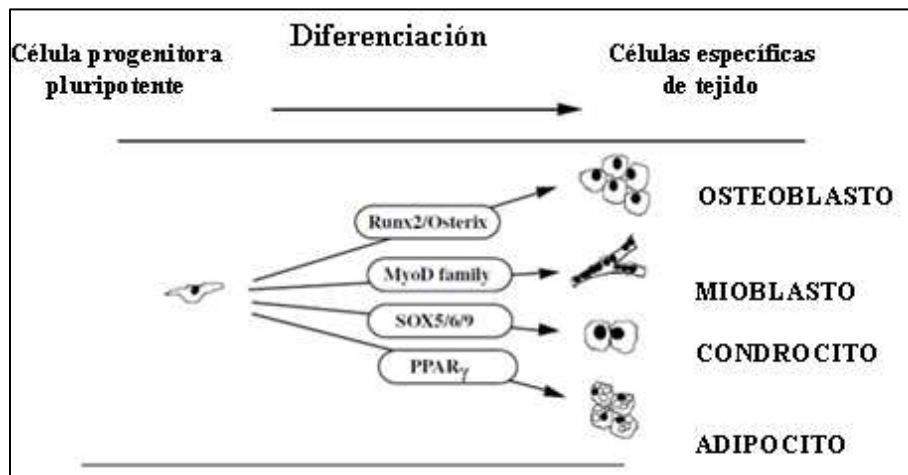


Figura 1.5. Esquema de la diferenciación de las células progenitoras mesenquimales a células específicas de tejido según el estímulo recibido.

En el caso de los osteoblastos, las células progenitoras adquieren el compromiso de diferenciarse hacia la estirpe osteogénica debido a la influencia de factores de crecimiento locales como las proteínas morfogénicas óseas (BMP), factores de transcripción como Runx2 y Osterix, las proteínas Wnt y expresión de RANKL, que actuarán como factores de diferenciación osteoblástica induciendo la proliferación de las células precursoras (preosteoblastos) y su diferenciación a osteoblastos maduros.

Proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs)

En el proceso de diferenciación de los osteoblastos existen diversos factores de crecimiento involucrados. Uno de ellos son las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs). Estas proteínas pertenecen a la familia del TGF β (Miyazono *et al.* 2010) cuyos miembros son factores implicados en la proliferación, diferenciación y muerte de algunos tejidos. Las BMPs se encuentran en la matriz ósea no calcificada y se cree que los responsables de su síntesis son los propios osteoblastos. En vertebrados, estas proteínas son los únicos factores de crecimiento capaces de inducir la formación de hueso. En concreto, las BMPs regulan la diferenciación osteoblástica ya que inducen la expresión de factores de transcripción involucrados en la diferenciación del osteoblasto como, por ejemplo, Runx2, Osterix y proteínas Wnt (ver más adelante). La señal de las BMPs se inicia a través de su unión a receptores transmembrana de los osteoblastos. Esta unión desencadena la fosforilación de unas proteínas del

citoplasma, llamadas Smad, que se encargan de la transducción de la señal de las BMPs hacia el núcleo y, consecuentemente, se produce la activación de los factores de transcripción relacionados con la diferenciación del osteoblasto (Wrana 2000; Katagiri & Takahashi 2002). Prueba de la importancia de esta familia de proteínas es que los ratones deficientes en BMPs presentan anomalías en la estructura y en el desarrollo del esqueleto.

Runx2 y Osterix

Runx2 (*runt-related transcription factor 2*), también llamado Cbfa1 (*Core-binding factor a1*), es el factor de transcripción más importante para la diferenciación de los osteoblastos. Como ya se ha visto, las encargadas de estimular la expresión de Runx2 en el osteoblasto son las BMPs. Runx2 induce la expresión de diferentes genes diana implicados no solo en formación ósea como el gen de la fosfatasa alcalina, osteopontina, sialoproteínas, colágeno y osteocalcina, sino también genes implicados en el recambio óseo como RANKL, OPG y colagenasa. Runx2 cumple todos los requisitos de un factor de transcripción implicado en la diferenciación osteoblástica, entre ellos, el expresarse tempranamente en células de la estirpe osteoblástica (Ducy 2000). En esta fase, las células tienen el potencial de diferenciarse en osteoblastos o en condrocitos, aunque poco a poco la capacidad de diferenciarse en condrocitos se va perdiendo y finalmente se impone la diferenciación a osteoblastos gracias a la acción de Runx2. Experimentos realizados con células

mesenquimales de ratones deficientes en Runx2, mantienen su potencial para diferenciarse espontáneamente en adipocitos y condrocitos (Kobayashi *et al.* 2000; Komori 2006). También se ha demostrado que ratones deficientes en Runx2 presentan falta de osificación tanto endocondral como intramembranosa debido a una deficiencia en la diferenciación de osteoblastos (Mundlos *et al.* 1997; Otto *et al.* 1997; Komori *et al.* 1997b). Todo ello indica claramente que Runx2 es esencial para la diferenciación de las células precursoras en osteoblastos e inhibe su potencial para diferenciarse en adipocitos o condrocitos. Hay que decir también que mutaciones en este gen provocan la aparición de displasia cleidocraneal, una enfermedad autosómica dominante que se caracteriza por anomalías a nivel esquelético y alteraciones en densidad mineral ósea (Mundlos *et al.* 1997).

Tras Runx2, existe otro factor de transcripción llamado Osterix (Osx), cuya actividad es esencial para la diferenciación osteoblástica. Al igual que Runx2, la inactivación de Osx en ratones provoca letalidad perinatal debido a ausencia completa de osteoblastos y formación ósea (Nakashima *et al.* 2002; Karsenty 2008). Curiosamente, Runx2 se expresa en células mesenquimales de ratones deficientes en Osterix, mientras que Osterix no se expresa en células deficientes en Runx2. Esto demuestra que la expresión de Osterix está regulada por Runx2 en la cascada de diferenciación osteoblástica (Nishio *et al.* 2006), por tanto, Osterix es el segundo factor de transcripción esencial para la diferenciación osteoblástica tras Runx2.

Todo parece indicar que Runx2 es necesario para dirigir a las células mesenquimales progenitoras al estadio de preosteoblasto, inhibiendo su diferenciación a condrocitos y adipocitos, mientras que Osterix actuaría dirigiendo a los preosteoblastos hacia la fase de osteoblasto inmaduro, eliminando completamente el potencial de diferenciación hacia condrocitos o adipocitos (Mundlos *et al.* 1997; Komori 2006). Las células mesenquimales de ratones deficientes en Osterix, también se diferencian en condrocitos. A diferencia de los ratones deficientes en Runx2, cuyo esqueleto está totalmente no mineralizado, los ratones deficientes en Osterix presentan mineralización sólo en huesos formados por osificación endocondral. Esto demuestra que Osterix no es necesario para la formación de condrocitos.

Por tanto, Runx2 y Osterix son dos elementos clave en la diferenciación osteoblástica ya que contribuyen al proceso de diferenciación mediante la activación de genes que se expresan en el osteoblasto maduro.

Wnt

Las proteínas Wnt pertenecen a una familia de proteínas que participan en procesos de embriogénesis y organogénesis entre otros. Actualmente se sabe que desempeñan un papel muy importante en la osteoblastogénesis y formación de hueso (Westendorf *et al.* 2004; Yavropoulou & Yovos 2007; Kubota *et al.* 2009). Estas proteínas, se unen a receptores de membrana, como por ejemplo, LRP5 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 5*), desencadenando una

cascada de señalización intracelular que lleva a la síntesis de factores de transcripción los cuales activan la expresión de diferentes genes implicados en diversos eventos celulares, como la osteoblastogénesis, entre otros. La β catenina es una de las moléculas implicadas en la cascada de señalización que induce la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en la osteoblastogénesis (Yavropoulou & Yovos 2007). Se han descrito mutaciones en receptores de la vía Wnt asociados a cambios en la densidad mineral ósea y fracturas. Por ejemplo, mutaciones en el receptor LRP5 que implican pérdida de función, causan osteoporosis, mientras que mutaciones que inducen una ganancia de función, conducen a fenotipos de ganancia de hueso (Richards *et al.* 2008; Kubota *et al.* 2009). Se han encontrado factores que inhiben la vía Wnt, como por ejemplo Dickkopf-1 (Dkk-1), que interfiere en la vía Wnt uniéndose directamente al receptor LRP5 e impidiendo, por tanto, la unión de Wnt al receptor (Yavropoulou & Yovos 2007). También se sabe que los osteocitos secretan una proteína llamada esclerostina que bloquea la acción de Wnt en la membrana resultando en la inhibición de la osteoblastogénesis (Yavropoulou & Yovos 2007; Milat & Ng 2009).

El proceso de formación del osteoblasto se puede dividir en tres fases: proliferación, diferenciación y maduración, y mineralización. En cada fase se produce la expresión de diferentes factores característicos del fenotipo osteoblástico como fosfatasa alcalina, que es un marcador precoz de los preosteoblastos por lo que estará

aumentado en las fases iniciales de proliferación y disminuirá durante la diferenciación; el colágeno, que también se expresa durante la etapa de proliferación hasta la fase de maduración, disminuyendo su expresión en la fase de mineralización; la osteopontina, que alcanza una concentración máxima durante la diferenciación y otra durante la mineralización; las sialoproteínas, que se expresan en los osteoblastos maduros; osteocalcina, que se expresa en la fase de mineralización (Nakashima & de 2003; Cohen, Jr. 2006; Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil *et al.* 2006).

1.1.4.2.2. Osteocitos

Los osteoblastos, como ya se ha visto, sintetizan matriz o tejido osteoide que tras unos días mineralizará. Esta matriz ósea calcificada no es inerte desde el punto de vista metabólico. Presenta unas células llamadas osteocitos que se encuentran incrustadas en el fondo del hueso, situadas en pequeñas lagunas osteocíticas (Knothe Tate *et al.* 2004).

Originariamente, eran células formadoras de hueso (osteoblastos), que se quedaron atrapadas en la matriz ósea que ellas mismas produjeron y luego se calcificaron (Manolagas 2000c; Knothe Tate *et al.* 2004). No obstante, pese a ser antiguos osteoblastos, expresan algunas proteínas de membrana específicas.

Estas células presentan una morfología característica; poseen numerosas prolongaciones celulares largas que están en contacto con prolongaciones celulares de otros osteocitos y también con células que

revisten la superficie ósea (osteoblastos o células de revestimiento) (Noble & Reeve 2000). Estas prolongaciones se organizan durante la formación de la matriz y antes de su calcificación; forman una red de conductillos finos que están presentes en toda la matriz ósea y cuya función es la comunicación intercelular.

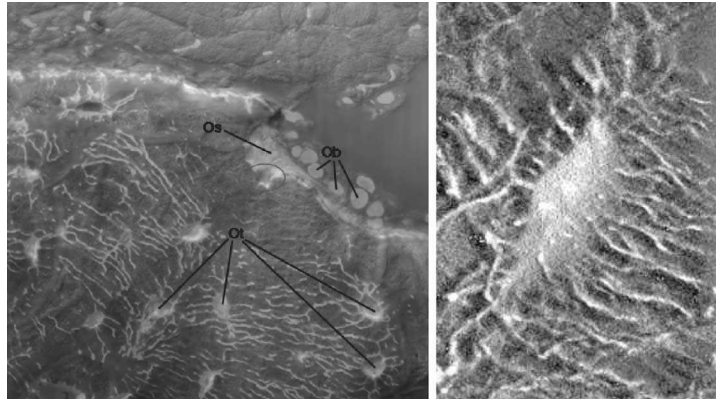


Figura 1.6. A la izquierda, imagen al microscopio de la superficie de un hueso. Se observa a los osteoblastos (Ob) sintetizando osteoide (Os) y como los osteocitos (Ot) quedan incrustados en la matriz ósea. A la derecha, reconstrucción tridimensional de un osteocito in situ en una sección de hueso.

Todos los datos aportados hasta la fecha sugieren que cuando existe alguna “lesión” en el hueso, son los osteocitos los encargados de comunicarlo a los osteoblastos a través de estas prolongaciones para así, iniciar el proceso de formación ósea (Henriksen *et al.* 2009).

Entre la membrana plasmática del osteocito y la propia matriz ósea se encuentra el espacio periosteocítico. Este espacio existe tanto en las

lagunas osteocíticas como en la red de conductillos, y está relleno de líquido extracelular que está relacionado con el flujo de iones calcio desde el hueso.

La morfología de los osteocitos varía según su edad y su actividad funcional. Un osteocito joven posee la mayoría de las características ultraestructurales del osteoblasto del que proviene, pero ha experimentado una reducción del volumen celular y de la importancia de los orgánulos implicados en la síntesis de proteínas (retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi). Un osteocito más viejo, situado a mayor profundidad en el hueso calcificado, presenta estas reducciones todavía más acentuadas y, además, presenta una acumulación de glucógeno en el citoplasma (Knothe Tate *et al.* 2004; Hadjidakis & Androulakis 2006). Se ha demostrado que estas células pueden sintetizar matriz ósea nueva en la superficie de las lagunas osteocíticas, que posteriormente puede calcificarse. Aunque históricamente se han considerado capaces de reabsorber el hueso calcificado de la misma superficie, esto se ha cuestionado recientemente. El destino de los osteocitos es ser fagocitados y digeridos junto con los otros componentes del hueso, durante la resorción ósea osteoclástica, o sufrir apoptosis (Knothe Tate *et al.* 2004).

1.1.4.2.3. Células de revestimiento

Tras el periodo secretor, el osteoblasto puede convertirse en osteocito (matriz calcificada) o en una célula de revestimiento.

En el caso de las células de revestimiento, los osteoblastos adquieren una forma aplanada y se disponen en forma de monocapa sobre superficies óseas inactivas recubiertas por matriz colágena no calcificada que ellos mismos sintetizan. Estas células de revestimiento tienen función de protección de las superficies óseas. Formarán el endostio, que separa la superficie ósea y la médula, o bien quedarán directamente debajo del periostio en las superficies mineralizadas.

Las células de revestimiento también facilitan el trabajo a las células encargadas de la resorción ósea llamadas osteoclastos (Manolagas 2000c) (ver más adelante). Los osteoclastos son incapaces de degradar la matriz colágena no calcificada, y se cree que son las células de revestimiento las que sintetizan colagenasa y degradan esta matriz antes de que los osteoclastos actúen (Manolagas 2000c). Las células de revestimiento limpian los restos de colágeno que dejan los osteoclastos tras su actuación, e inician la formación de hueso depositando una fina capa de matriz colágena no mineralizada.

1.1.4.2.4. Osteoclastos

El osteoclasto es la célula responsable de la resorción ósea y se encuentra en las superficies óseas calcificadas y dentro de unas estructuras llamadas lagunas de Howship que se forman como resultado de su propia actividad resortiva.

El osteoclasto es una célula gigante multinucleada (contiene de 4 a 20 núcleos). Los núcleos varían dentro de la misma célula (Figura 1.7 y figura 1.8); algunos son redondos y eucromáticos, y otros tienen

un contorno irregular y son heterocromáticos. El citoplasma tiene un aspecto “espumoso” y contiene muchas vacuolas. En estas células destacan abundantes aparatos de Golgi que quedan dispuestos alrededor de los núcleos de manera característica. También poseen abundantes mitocondrias y vesículas de transporte cargadas de enzimas lisosómicas.

La zona de la membrana plasmática del osteoclasto en contacto con la superficie ósea, presenta unos pliegues profundos que dan un aspecto de borde rugoso y que recibe el nombre de borde en cepillo (Figura 1.7). El borde rugoso que queda en el centro está rodeado de un anillo de actina que sirve para unir la célula a la superficie ósea y crear una zona de cierre hermético formándose así el compartimento de resorción ósea. La unión de la célula a la matriz se realiza mediante receptores de integrinas (Figura 1.7) del osteoclasto que se unen a secuencias específicas de las proteínas de la matriz. La membrana plasmática de la zona del borde rugoso contiene proteínas que también se encuentran en la membrana de los lisosomas y organelas, una ATPasa de protones y un canal de cloro específico responsable de la acidificación del compartimento extracelular de resorción ósea. La membrana plasmática basolateral del osteoclasto es rica en bombas de sodio-potasio, intercambiadores de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ e intercambiadores de Na^+/H^+ , además de varios canales iónicos (Vaananen *et al.* 2000).

Los osteoclastos también expresan en su membrana RANK y el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), que son dos factores implicados en la diferenciación de los

Introducción

osteoclastos (ver más adelante), además del receptor de la calcitonina, que es capaz de inactivar rápidamente al osteoclasto. Además, también expresan receptores para diversos factores que actúan bien estimulando al osteoclasto, como la PTH, la IL-1, el TNF α , entre otros, o bien inhibiéndolo, como los estrógenos y la calcitonina, entre otros (Figura 1.7).

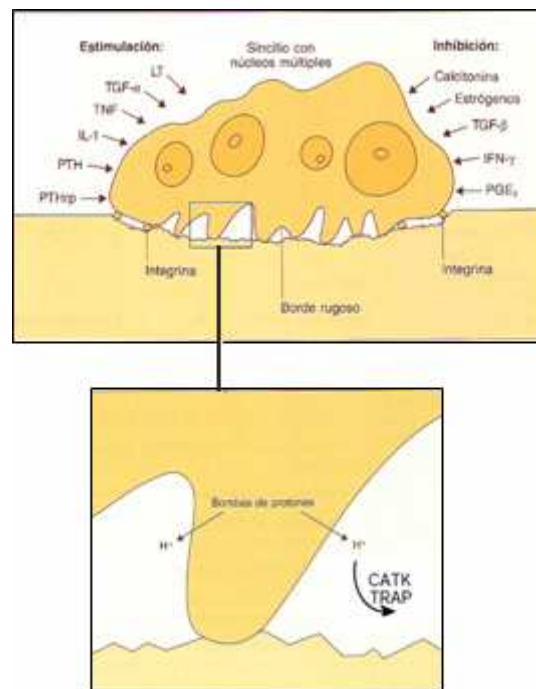


Figura 1.7. Imagen superior: Representación esquemática de un osteoclasto y factores que actúan estimulando o inhibiendo a la célula ósea. Imagen inferior: Detalle del borde rugoso del osteoclasto y enzimas sintetizados (CATK: cathepsina K; TRAP: fosfatasa ácida tartrato resistente) para iniciar la resorción.

Introducción

Es posible encontrar hasta cuatro o cinco osteoclastos en la misma zona de resorción, pero habitualmente sólo hay uno o dos. El osteoclasto inicia la resorción sintetizando enzimas lisosómicas (Figura 1.7) como la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), la catepsina K (CATK), la colagenasa, etc., que se encuentran en el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y muchas vesículas de transporte. Estos enzimas se segregan a través del borde rugoso al compartimento extracelular de resorción ósea. El osteoclasto acidifica el compartimento extracelular mediante la secreción de protones a través de la membrana del borde rugoso (mediante bombas de protones) y así, ya puede iniciar su actividad.



Figura 1.8. Imagen al microscopio de varios osteoclastos resorbiendo hueso

Durante el proceso de resorción, en primer lugar, los cristales de hidroxiapatita se movilizan por la hidrólisis de su enlace con el colágeno (proteínas no colágenas) y se disuelven por el medio ácido. Posteriormente, las fibras colágenas residuales se digieren por la activación de la colagenasa inactiva o de las catepsinas en un pH ácido. Las enzimas, ahora en un pH óptimo, degradan los componentes de la matriz; los residuos de esta digestión extracelular se interiorizan, se transportan a través de la célula y se liberan en la región basolateral, o se liberan durante los períodos de recaída de la zona de cierre hermético.

Como consecuencia de la actividad del osteoclasto se liberan a la circulación muchos productos procedentes de la degradación del hueso. Estos productos se utilizan clínicamente como medidas indirectas de la resorción ósea en los seres humanos (ver más adelante en *Marcadores bioquímicos de remodelado óseo*).

El osteoclasto proviene de células madre hematopoyéticas de la estirpe mononuclear/fagocítica (Boyle *et al.* 2003). Su diferenciación exige los factores de transcripción PU-1 y MiTf en las fases iniciales, lo que compromete a las células precursoras a la estirpe mielocítica. Después, se necesita la presencia del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), sintetizado por células estromales, para atraer a las células a la estirpe monocítica y que puedan proliferar y expresar en la superficie celular el receptor RANK, un factor clave para la diferenciación del osteoclasto. Una vez los preosteoclastos han expresado RANK, necesitarán la presencia de otra citoquina, RANKL,

que como ya hemos visto, es producida por las células estromales/osteoblastos y que se trata de un factor imprescindible para la diferenciación del osteoclasto. La unión RANKL-RANK provoca en el preosteoclasto una serie de cambios como reestructuración del citoesqueleto, formación de uniones estrechas entre la membrana basal y la superficie ósea y la creación del compartimento de resorción, que lo llevarán a iniciar el proceso de resorción ósea. En esta fase también se exige la expresión del factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral-6 (TRAF6), factor nuclear kappa-B (NFkB) y *c-Fos*, todos ellos transductores de la señal de RANK en el interior de la célula. Por tanto, RANK, RANKL y M-CSF son, claramente, tres factores clave para la diferenciación del osteoclasto ya que serán los encargados de asegurar el compromiso de las células precursoras hacia la estirpe osteoclástica y hacia su diferenciación final.

Pese a provenir de la línea mononuclear/fagocítica, los osteoclastos han perdido la expresión de algunos receptores de membrana aunque mantienen la expresión de algunos otros, además de expresar receptores específicos (RANK y calcitonina). Estas células también presentan receptores estrogénicos. Actualmente se cree que el osteoclasto experimenta apoptosis después de un ciclo de resorción, proceso favorecido por la deficiencia estrógenica y que posiblemente explica la mayor resorción ósea después de una gonadectomía o de la menopausia.

1.1.5. Remodelado óseo

El esqueleto es un órgano metabólicamente activo que se encuentra sometido a una continua renovación a lo largo de toda la vida (Hadjidakis & Androulakis 2006). Este fenómeno denominado remodelado óseo (Frost 1990), consiste básicamente en la sustitución de hueso viejo por hueso nuevo en el mismo lugar anatómico, y se produce tanto en el hueso cortical como en el hueso trabecular. El remodelado óseo se lleva a cabo por unas estructuras anatómicas llamadas “unidades básicas de remodelado” (BMU). Estas unidades están formadas por un frente de osteoclastos que actúan degradando el hueso viejo, seguido de un grupo de osteoblastos que actúan sintetizando hueso nuevo u osteoide. La vida media de las BMU es de entre seis y nueve meses y pueden existir varias BMU activas al mismo tiempo en diferentes localizaciones del esqueleto. De hecho, se cree que en el adulto existen entre 3-4 millones de BMU en funcionamiento en un determinado momento.

Las principales funciones del fenómeno de remodelado óseo son sustituir el tejido óseo envejecido o lesionado por tejido nuevo para conservar la integridad estructural, y mantener la homeostasis mineral asegurado los niveles de calcio en sangre necesarios para el correcto funcionamiento celular.

El remodelado óseo es un proceso cíclico que consta de cuatro fases sucesivas (activación, resorción, inversión y formación), en las que son necesarias las interacciones entre osteoblastos y osteoclastos.

La fase de activación se cree que se inicia con la aparición de una lesión en el hueso (microfractura) o a partir de algún tipo de estrés (Raisz 1999; Clarke 2008; Henriksen *et al.* 2009) mecánico o químico, que provoca la muerte de los osteocitos en la zona del hueso afectada generando una serie de señales osteoclastogénicas (RANK-L y MCSF) que provocarán la aparición de la BMU. El proceso de activación de la BMU se inicia con el reclutamiento de los precursores de los osteoclastos desde la circulación hacia el hueso. Allí proliferarán y se diferenciarán hasta fusionarse y formar grandes células multinucleadas que constituyen los osteoclastos maduros. Estos osteoclastos maduros se anclarán a la superficie del hueso e iniciarán la fase de resorción mediante la secreción de iones H^+ y de enzimas lisosomales, como TRAP, catepsina K o colagenasa, que degradarán la matriz ósea. Ante la presencia de los osteoclastos, las células de revestimiento de la superficie del hueso sufrirán una retracción para facilitar el acceso de los osteoclastos hacia el hueso. Como resultado final de la resorción osteoclástica, se generan unas cavidades en el hueso que reciben el nombre de lagunas Howship, en el caso del hueso trabecular, o canal Harvesiano en el caso del hueso cortical. El proceso de resorción suele durar entre 2 y 4 semanas y finaliza con la apoptosis de los osteoclastos. Una vez finalizada la resorción, se produce una fase inversa en la cual la superficie ósea queda cubierta por células mononucleares y osteocitos que se encargaran de limpiar los restos de hueso que queden en las cavidades, además de sintetizar proteoglicanos con el fin de crear la línea de cementación sobre la que

Introducción

se depositará el hueso nuevo. Por tanto, esta fase se trata básicamente de una etapa de transición o acoplamiento entre la fase resorción y la fase de formación ósea. En esta última fase del proceso de remodelado óseo los precursores de los osteoblastos, inducidos por factores como IGF-1, BMPs, Runx2, entre otros, se diferenciarán en osteoblastos y actuarán sobre las cavidades de resorción depositando láminas de hueso nuevo no mineralizado llamado osteoide, que tras una semana sufrirá el proceso de mineralización. Una vez finalizada la fase de formación, una gran parte de los osteoblastos sufrirán apoptosis mientras que el resto se transformarán en células de revestimiento o en osteocitos.

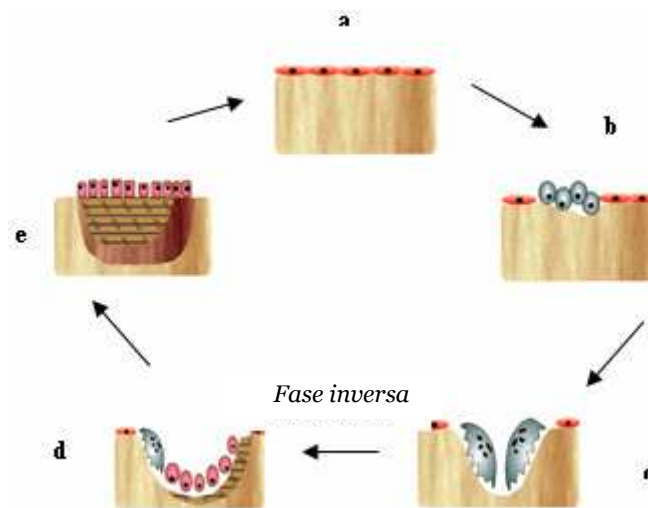


Figura 1.9. Fases del remodelado óseo: a) hueso en reposo; b) fase de activación; c) fase de resorción; d) fase de formación; e) fase de mineralización

1.1.5.1. Regulación del remodelado óseo

El remodelado óseo es el proceso encargado de asegurar la renovación del hueso manteniendo el equilibrio entre los fenómenos de resorción-formación ósea y conservando así la integridad estructural del hueso y la homeostasis mineral del organismo. Se sabe que alteraciones en este equilibrio pueden derivar en enfermedades óseas como osteoporosis (ver más adelante) u osteopenia, por tanto, es necesaria la existencia de un sistema de regulación que se encargue de mantener el balance entre ambos procesos. Así pues, podemos encontrar dos tipos de regulación del remodelado óseo: uno a nivel sistémico, encargado de controlar las funciones metabólicas del hueso, y otro a nivel local, encargado del control de las funciones estructurales del hueso

1.1.5.1.1. Regulación sistémica del remodelado óseo

Las funciones metabólicas del esqueleto están controladas por una serie de hormonas entre las que destacan las hormonas calciotropas como la paratohormona (PTH), la 1,25dihidroxitamina D3 o calcitriol y la calcitonina, las hormonas sexuales, las hormonas tiroideas, hormonas de crecimiento y los glucocorticoides.

PTH

Es el regulador más importante en la homeostasis del calcio. Esta hormona es secretada por la glándula tiroidea cuando se produce un descenso en los niveles de calcio en el organismo con el fin de actuar

sobre los depósitos de calcio que existen en el hueso y disminuir la pérdida de calcio renal e intestinal. En el riñón la PTH induce la reabsorción de calcio, la eliminación de fósforo y estimula la síntesis de calcitriol o 1,25 dihidroxivitamina D3 (forma activa de la vitamina D) el cuál, al mismo tiempo, inducirá la absorción de calcio intestinal a través de unas bombas de calcio dependientes de vitamina D3 (o calcitriol o vitamina D3). En el caso del hueso, la PTH activa la resorción ósea por los osteoclastos de forma indirecta estimulando a los osteoblastos quienes, en presencia de la hormona, expresan RANKL y otras citoquinas disparando la diferenciación osteoclástica y, por tanto, la resorción ósea (Grey *et al.* 1999; Morony *et al.* 1999; Lee & Lorenzo 1999; Manolagas 2000c; Henriksen *et al.* 2009) Se sabe que una administración de PTH de forma continuada induce la resorción ósea de acuerdo con lo que se acaba de describir. Sin embargo, la administración de forma intermitente de PTH induce la formación de hueso, por lo que en la actualidad se considera a la PTH un posible agente anabólico (Rubin *et al.* 2002). Este doble comportamiento de la PTH refleja la complejidad del mecanismo de acción de la hormona.

1,25 dihidroxivitamina D3 o calcitriol

Se trata de la forma activa de la vitamina D. La mayor fuente de síntesis de calcitriol en el organismo es el riñón. A parte del riñón, el organismo también sintetiza calcitriol a partir de elementos procedentes de la dieta en forma de provitaminas que sufrirán una

serie de transformaciones en el hígado y en el riñón hasta dar la forma activa de la vitamina D. A nivel cutáneo también existe una producción de calcitriol. Los rayos ultravioleta de la luz solar actúan sobre las provitaminas induciendo su transformación en calcitriol.

El calcitriol será el encargado de regular la reabsorción del calcio a nivel renal e intestinal y, en el hueso, estimula la resorción ósea ya que promueve la diferenciación de los osteoblastos y la maduración de los osteoclastos. Todas estas funciones las realiza en colaboración con la PTH. También estimula la expresión de IL-6 e IL-11 por las células estromales y osteoblásticas (Manolagas 2000c).

Calcitonina

De forma contraria a la PTH y al calcitriol, que se sintetizan ante un descenso de calcio en el organismo, la calcitonina es una hormona que será secretada por la glándula tiroidea ante unos niveles elevados de calcio en el organismo. La calcitonina actúa de forma directa sobre los receptores de los osteoclastos inhibiendo la resorción ósea inducida por la PTH. Asimismo, esta hormona actúa inhibiendo la reabsorción de calcio en el riñón. De este modo la calcitonina consigue ejercer un efecto hipocalcemiante.

Estrógenos

Los estrógenos desempeñan un papel fundamental en el metabolismo del hueso. Tanto los osteoblastos como los osteoclastos son células dotadas de receptores estrogénicos por lo que los

estrógenos ejercen un efecto directo sobre estas células. Se sabe que los estrógenos actúan sobre los osteoclastos inhibiendo su diferenciación, mientras que en los osteoblastos estimulan su proliferación y disminuyen su apoptosis (Hadjidakis & Androulakis 2006). Con la instauración de la menopausia, debido a la deficiencia estrogénica, se produce una activación del remodelado óseo en la que prevalece la resorción frente a la formación, derivando en una considerable pérdida ósea (ver más adelante en *Osteoporosis y deficiencia estrogénica*). Estos hechos confirman que los estrógenos ejercen un efecto antirresortivo sobre el hueso.

Hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas actúan sobre el metabolismo del hueso activando el remodelado óseo tanto a nivel de la resorción como de la formación ósea. La pérdida ósea se producirá dependiendo de la eficacia en la respuesta de los osteoblastos. Cuando existe alguna alteración en los niveles de estas hormonas, como es el caso del hipertiroidismo, el remodelado óseo conduce a una pérdida ósea por aumento en los niveles de citoquinas resorptivas (Lakatos *et al.* 1997; Raisz 1999).

Hormonas de crecimiento

Tanto la hormona de crecimiento (GH) como el factor de crecimiento insulínico (IGF-1) son dos factores importantes en la formación del hueso. En la edad adulta regulan tanto la resorción

como la formación ósea por lo que son determinantes para el mantenimiento de la masa ósea (Raisz 1999; Hadjidakis & Androulakis 2006). Pese al importante papel que desempeñan en el hueso, su mecanismo de acción no está totalmente aclarado. Se sabe que IGF-1 estimula la diferenciación osteoblástica (Manolagas 2000c) y se relaciona con la fase de acoplamiento en el remodelado óseo.

Glucocorticoides

Los glucocorticoides son necesarios para la diferenciación de las células óseas durante el desarrollo (Reid 1998). Sin embargo, tras el nacimiento, la función de estas hormonas revierte centrándose en la inhibición de la formación ósea por lo que favorecerán la pérdida ósea (Advani *et al.* 1997).

Además, los glucocorticoides pueden inducir indirectamente la resorción ósea mediante inhibición de la absorción de calcio a nivel intestinal.

1.1.5.1.2. Regulación local del remodelado óseo

En la regulación local del remodelado óseo intervienen un elevado número de factores que se encargan de controlar las funciones estructurales del remodelado óseo. La mayoría de ellos son citoquinas y factores de crecimiento que actúan sobre las células del hueso estimulando sus funciones.

Entre los factores estimuladores de los osteoclastos cabe destacar una gran variedad de citoquinas como la IL-1, que es un factor

activador de los osteoclastos maduros; la IL-3, que estimula la diferenciación de los precursores osteoclasticos; IL-4, 13 y 10 que inhiben la maduración osteoclástica; IL-6 estimula precursores hematopoyéticos; IL-11 estimula la producción de RANKL por los osteoblastos; IL-12 e IL-18 inhiben la formación de osteoclastos.

Además de estas citoquinas, otros dos factores a destacar son el factor de necrosis tumoral (TNF α), que está implicado en la diferenciación de los precursores monocíticos en preosteoclastos, y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), que atrae a las células hacia la estirpe monocítica para que puedan proliferar y expresar RANK, que será el último factor clave para la diferenciación del osteoclasto. A parte de todos estos factores inductores de la osteoclastogénesis, hay otros factores que inhiben la formación de los osteoclastos como es el caso de INF γ (Grey *et al.* 1999; Katagiri & Takahashi 2002).

Entre los factores estimuladores de los osteoblastos hay que destacar a las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) y al TGF- β . Las BMPs, como ya se ha visto, regulan la diferenciación osteoblástica ya que inducen la expresión de factores de transcripción involucrados en la diferenciación del osteoblasto como, por ejemplo, Runx2, Osterix y proteínas Wnt. En cuanto al TNF- β , se trata de un factor implicado en la inhibición de la apoptosis osteoblástica y, además, estimula la apoptosis de los osteoclastos por lo que favorece la formación ósea.

1.1.5.1.3. Sistema RANK-RANKL-OPG

A pesar de todos estos factores involucrados en la regulación del remodelado óseo (citoquinas y factores de crecimiento), recientemente se ha descubierto un sistema de citoquinas propio del hueso que es vital para la homeostasis esquelética; estas citoquinas son RANKL, RANK, y la osteoprotegrina (OPG) (Manolagas 2000b; García-Pérez & Cano 2003; Jarry *et al.* 2003; Wuttke *et al.* 2003a; Wuttke *et al.* 2003b; Seidlova-Wuttke *et al.* 2003b)

RANKL (*receptor activator of nuclear factor KB ligand*) es una proteína de membrana que se expresa en osteoblastos y células del estroma en respuesta a inductores de resorción ósea como los glucocorticoides, IL-1, TNF, PTH, etc. La expresión de RANKL por los osteoblastos coordina el remodelado óseo ya que inhibe la apoptosis de los osteoclastos y estimula su diferenciación y activación induciendo así la resorción ósea. Se trata, por tanto, de un promotor de la diferenciación y activación del osteoclasto. Gran parte del conocimiento sobre la función de RANKL se ha obtenido a partir de estudios con animales. Así, la administración de RANKL al ratón induce un aumento en el número de osteoclastos y una notable pérdida ósea. Por el contrario, ratones deficientes en RANKL presentan una ausencia de osteoclastos, osteopetrosis y problemas en el sistema inmune (Lacey *et al.* 1998).

RANK (*receptor activator of nuclear factor KB*) es un receptor de membrana que se expresa en preosteoclastos y en osteoclastos maduros. Es el único receptor de señalización para RANKL. La unión

de RANKL con RANK, junto con M-CSF, es una señal necesaria y suficiente para generar osteoclastos (Figura 1.10) (Manolagas 2000b; García-Pérez & Cano 2003). En el caso de los preosteoclastos, la unión RANK-RANKL induce su diferenciación a osteoclastos maduros, mientras que en los osteoclastos maduros induce la activación y la prolongación de su supervivencia. Estudios con ratones han puesto de manifiesto como la deficiencia en RANK induce osteopetrosis provocada por una ausencia total de osteoclastos y de resorción ósea. Todos estos datos demuestran que RANKL y RANK son dos citoquinas clave para la diferenciación de los osteoclastos y para que se inicie la resorción ósea, por tanto, la interacción entre ambos tipos celulares, osteoblastos y preosteoclastos, será esencial en el proceso de diferenciación.

En el hueso, la osteoprotegerina (OPG) es una proteína soluble perteneciente a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR). Es producida por los osteoblastos y células del estroma (Figura 1.10) en respuesta a factores antirresortivos (TGF β , BMP, etc.), aunque actualmente se cree que la mayor fuente de síntesis de OPG en la medula ósea son las células B (Boyce & Xing 2008). Esta proteína no permanece unida a la membrana del osteoblasto sino que es secretada. Funciona como un receptor señuelo para RANKL, compitiendo con RANK en la unión a RANKL. Por tanto, la OPG es un potente inhibidor de la formación de osteoclastos. El balance entre RANKL y OPG representa el principal determinante del número y de la actividad osteoclástica. Estudios con ratones han

demostrado como la sobreexpresión de OPG induce osteopetrosis mientras que su deficiencia induce osteoporosis (Lacey *et al.* 1998; Theill *et al.* 2002; Boyce & Xing 2008).

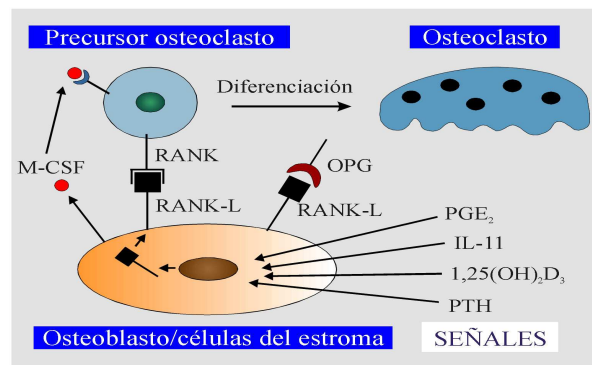


Figura 1.10. Sistema RANK-RANKL-OPG: el osteoblasto expresa RANKL en respuesta a inductores de resorción ósea (IL-11, PTH...). RANKL se une a RANK (expresado por el osteoclasto) y, en presencia de M-CSF, inducirá la diferenciación del osteoclasto iniciando la resorción ósea. La OPG, sintetizada por el osteoblasto, se unirá a RANKL para impedir su unión a RANK e inhibir la resorción ósea.

1.1.5.1.4. Regulación del sistema OPG/RANKL

Existen numerosos factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y fármacos que actúan modulando la expresión de RANKL y/o OPG en las células óseas (Theoleyre *et al.* 2004). La expresión de RANK sin embargo, se ve mínimamente afectada por estos factores y se cree que realmente es controlada por los niveles de RANKL y OPG.

Muchas de estas moléculas modulan el sistema RANKL-OPG activando la expresión de RANKL y disminuyendo, en casi todos los casos, la expresión de OPG. Así, la mayoría de las hormonas calciotropas y citoquinas resortivas (calcitriol, PTH, IL-1, IL-6, TNF α) activan la expresión de RANKL en los osteoblastos y disminuyen la expresión de OPG, favoreciendo por tanto la osteoclastogénesis y la resorción ósea. Sin embargo, esta situación puede ser revertida por la OPG cuya expresión se verá favorecida por la acción de citoquinas antiresortivas (INF γ , IL-4, etc.) y actuará inhibiendo la osteoclastogénesis inducida por RANKL (Kearns *et al.* 2008). Por tanto el ratio OPG/RANKL será un factor determinante en el metabolismo óseo.

El sistema RANKL-OPG también es modulado por los estrógenos y por el sistema inmune (ver más adelante en *Osteoporosis y deficiencia estrogénica* y en *Osteoporosis y sistema inmune: Osteoinmunología*).

1.1.6. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo

Como resultado de la actividad conjunta del osteoblasto y del osteoclasto durante el remodelado óseo, se generan una serie de metabolitos y productos bioquímicos que pasan a la circulación sanguínea. Son los llamados marcadores de remodelado óseo. Estos marcadores son de gran utilidad ya que mediante su determinación se puede evaluar la tasa de resorción y formación ósea y, por tanto, reflejan el proceso de remodelado óseo en su conjunto (Riggs &

Melton, III 1986; Riggs *et al.* 1998). Los marcadores se clasifican normalmente en marcadores de resorción o de formación ósea, dependiendo de si son metabolitos generados en el proceso de resorción o producidos durante la síntesis de hueso nuevo, o bien enzimas o proteínas secretadas por los osteoclastos o por osteoblastos.

1.1.6.1. Marcadores de formación ósea

Estos marcadores son reflejo de la actividad osteoblástica de formación de hueso nuevo. Entre éstos cabe mencionar a la fosfatasa alcalina total (FA), un enzima localizado en la parte exterior de la membrana celular de los osteoblastos. Aunque se expresa en varios tejidos, su actividad total sérica representa fundamentalmente la suma de las actividades del hueso, del hígado y, en menor medida, del intestino. Hay varios factores que afectan a la FA total, como el sexo, la edad y el estado hormonal. Tanto en el hombre como en la mujer la FA total se incrementa sobre los 50 años, presentando niveles más altos en mujeres postmenopáusicas que en premenopáusicas (Schiele *et al.* 1983). Sin embargo, se ha descrito que, si no hay incremento en la isoenzima hepática a causa de un proceso patológico, la FA total mantiene un valor aceptable para evaluar el recambio óseo (Weaver *et al.* 1997; Minisola *et al.* 1998), y que existe una alta correlación entre la FA total y la específica de hueso (Takahashi *et al.* 1997). Por ello, en la actualidad se prefiere utilizar el isoenzima óseo, la FA específica de hueso (FA ósea), un enzima osteoblástico que participa en la formación y mineralización del hueso, durante los cuales es vertida a

la circulación. Los nuevos inmunoensayos para la FA ósea casi no poseen reacción cruzada con el enzima hepático, por lo que la FA ósea aparece como un marcador sensible del aumento del remodelado óseo postmenopáusico.

La síntesis de la osteocalcina (OC) se incrementa con la mineralización y con la diferenciación osteoblástica, y se correlaciona altamente con formación ósea (Charles *et al.* 1985). Se trata de una pequeña proteína específica del osteoblasto, con tres residuos de ácido γ -carboxiglutámico (Gla) que le proporcionan una avidéz elevada por el calcio, siendo la proteína no colágena más abundante del hueso. Tras su síntesis, dependiente de vitamina K, una parte se incorpora a la matriz ósea, pero otra pasa a la circulación donde puede determinarse mediante inmunoensayo (Brown *et al.* 1984). La OC sérica es mayor en niños que en adultos, correlacionándose con la velocidad de crecimiento. La OC posee una vida media muy corta y su eliminación renal es muy rápida, por lo que los valores séricos también se ven incrementados cuando existe fallo renal (Cheung *et al.* 1983).

Recordar que el colágeno tipo I, el mayoritario en el hueso, se forma por la asociación de tres cadenas polipeptídicas que constituyen la molécula de procolágeno, sintetizada por los osteoblastos. Esta molécula, tras ser liberada, sufre una escisión en sus extremos amino y carboxiterminal, dando como resultado la formación de la molécula de colágeno y de los pro-péptidos amino y carboxi-terminales del colágeno tipo I (PINP y PICP, respectivamente). Estos metabolitos generados durante los procesos de formación del hueso, y que luego

pasan a la circulación sanguínea, constituyen un índice de actividad osteoblástica.

1.1.6.2. Marcadores de resorción ósea

Durante el proceso de resorción ósea y como consecuencia de la rotura del colágeno óseo tipo I, se genera una serie de metabolitos que pasan a la circulación. Algunos de estos metabolitos son aminoácidos modificados libres como la hidroxiprolina, la galactosil-hidroxilisina, la deoxipiridinolina (Dpy) y la piridinolina (Pyr), o unidos a péptidos, ya sea al segmento amino-terminal del colágeno (N-telopéptido, NTx) o carboxi-terminal (C-telopéptido, CTX).

La piridinolina (Pyr) y la deoxipiridinolina (Dpy) son vertidas a la circulación cuando se resorbe hueso. Dpy es relativamente específica de hueso, mientras que Pyr también se encuentra en varios tejidos (ligamentos y tendones). Estas estructuras se filtran por el riñón sin degradarse, ya que no son metabolizadas (Riggs *et al.* 1998), excretándose en la orina unidas a proteínas (60%) o en forma libre (40%). Se han venido determinando mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) aunque los nuevos enzimoimmunoensayos de las piridinolinas entrecruzadas sustituyen y mejoran esta técnica y están disponibles para la determinación de Pyr y Dpy libres o unidas a péptidos como el CTx y el NTx, tanto en suero como en orina (Bonde *et al.* 1994) . Estudios cinéticos de calcio sobre formación y resorción ósea muestran que estos dos metabolitos entrecruzados se correlacionan altamente con la resorción (Weaver *et al.* 1997).

La fosfatasa ácida es un enzima lisosomal que se encuentra en hueso, aunque también en próstata, plaquetas, eritrocitos, etc. Recientemente se ha descubierto una isoforma sérica del enzima, TRAP 5b, que es secretada solamente por el osteoclasto, habiéndose observado en estudios recientes una correlación negativa entre niveles séricos de TRAP 5b y densidad mineral ósea (DMO) (Halleen *et al.* 1999).

1.1.6.3. Variabilidad de los marcadores de remodelado óseo

Las condiciones que debería presentar un marcador de remodelado óseo para ser considerado idóneo (ser específico de hueso, reflejar el estado de todo el esqueleto, correlacionarse con medidas de los cambios en DMO, y no depender de variables como los ritmos circadianos, la dieta, la edad, el sexo, el ciclo menstrual, la función hepática y la tasa de aclaramiento renal) no son cumplidas en su totalidad por ningún marcador. Los diferentes marcadores presentan distintos grados de variabilidad intra e interindividual en los diferentes estudios llevados a cabo, variabilidad en la que también influyen las diferencias entre las poblaciones estudiadas, el tamaño de la muestra, las características del ensayo y la duración del estudio (Delmas *et al.* 1997; Hannon & Eastell 2000). Por todo ello, todas las posibles fuentes de variabilidad y su impacto sobre resultados individuales deben ser tenidas en cuenta antes de evaluar su uso clínico.

Diversos estudios indican que el recambio óseo se encuentra elevado durante la menopausia (Ebeling *et al.* 1996; Riggs *et al.* 1998;

Garnero & Delmas 1999). Los telopéptidos del colágeno parecen ser los marcadores que mejor discriminan entre mujeres pre- y postmenopáusicas (Ebeling *et al.* 1996; Gorai *et al.* 1997; Hoshino *et al.* 2000).

1.1.6.4. Utilidad clínica de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo en osteoporosis

La determinación de los marcadores de remodelado óseo en suero u orina presenta como ventaja que, además de ser fácil de realizar, es barata y no supone riesgo para el paciente. Los niveles de estos marcadores reflejan el estado del metabolismo óseo en un momento determinado por lo que se pueden considerar como factores predictivos de alteraciones en el metabolismo óseo como es el caso de la osteoporosis. También informan sobre los efectos de las terapias, por lo que proporcionan una información útil a corto plazo sobre la eficacia de los tratamientos (Christiansen *et al.* 1990). Pese a ello, estos marcadores no tienen la suficiente fuerza para determinar el estado de la masa ósea ni para el diagnóstico de la osteoporosis.

En la última década se está dedicando un importante esfuerzo a desarrollar y mejorar indicadores bioquímicos de remodelado óseo para identificar a la población con riesgo de sufrir osteoporosis (Slemenda *et al.* 1987; Johansen *et al.* 1988; Hansen *et al.* 1991; Garnero & Delmas 1997), realizar un diagnóstico temprano, y monitorizar el efecto de las terapias de una forma rápida y cómoda (Garnero *et al.* 1994; Chesnut, III *et al.* 1995).

1.1.7. Densidad mineral ósea (DMO)

Además de los marcadores bioquímicos utilizados para evaluar el estado del metabolismo óseo, el estudio de la densidad mineral ósea (DMO) nos ayuda a evaluar el estado de la masa ósea. Se trata del parámetro que refleja la cantidad de masa ósea por volumen de un individuo. La DMO está determinada por el pico de masa ósea alcanzado sobre la tercera década de vida y por la tasa de pérdida ósea. Actualmente se considera como el estándar de oro para el diagnóstico de la osteoporosis y el riesgo de fractura ya que una masa ósea baja supone uno de los factores más importantes para la aparición de fracturas por fragilidad del hueso (Cauley *et al.* 2005). También es útil para la monitorización de un tratamiento y evaluar su eficacia en la ganancia de masa ósea.

La técnica más utilizada para la medición de la DMO es la absorciometría dual de rayos X (DXA) que se basa en la obtención de una imagen digitalizada del hueso en función de la atenuación que sufren los rayos X al atravesar el tejido óseo. Se caracteriza por ser una técnica no invasiva y ofrecer una evaluación precisa del estado óseo. El inconveniente que presenta es que es una técnica lenta en revelar cambios, ya que refleja variaciones en la densidad ósea ocurridas durante años y no muestra el recambio óseo en un determinado momento, a diferencia de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo

En la práctica clínica, la DMO se suele medir en dos localizaciones anatómicas donde asientan la mayoría de fracturas

Introducción

osteoporóticas, columna lumbar y fémur proximal (Blake & Fogelman 2009). La medición en la columna se suele realizar entre las vértebras L2 a L4, mientras que en el fémur se suelen realizar mediciones en el cuello femoral, en el trocánter y en el triángulo de Ward.

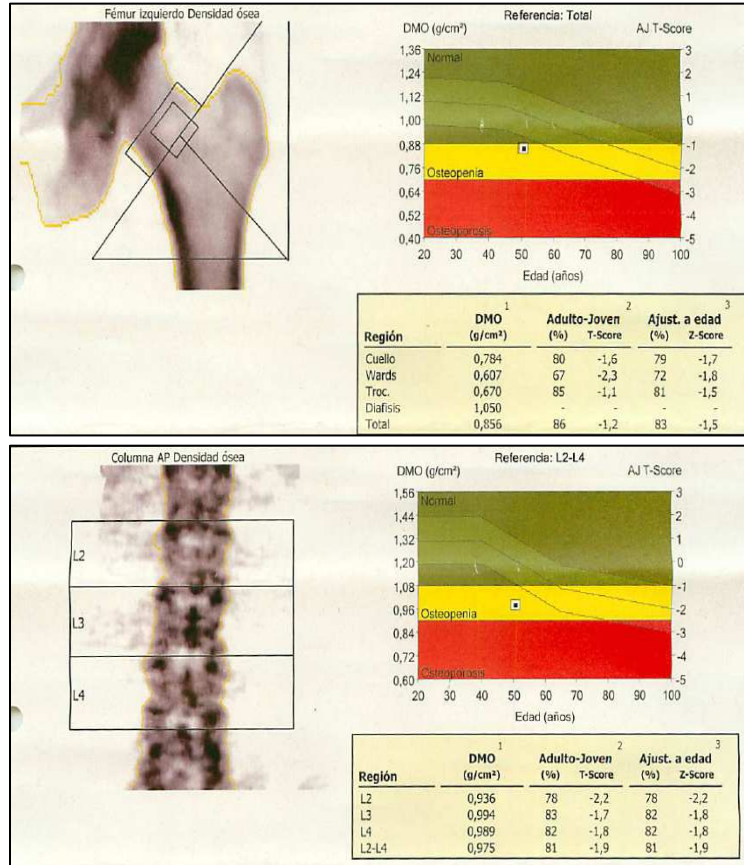


Figura 1.11. Resultados de una densitometría a nivel de cadera y a nivel de columna lumbar.

Una vez obtenidos los valores hay que interpretarlos. Para ello se hace una comparación de los valores de DMO obtenidos con el valor medio de DMO en la población de la misma edad y sexo, estableciendo el número de desviaciones estándar que se aleja del valor medio tanto en sentido positivo (por encima del valor medio) como en sentido negativo (por debajo del valor medio). Es lo que se conoce como Z-score (Blake & Fogelman 2009).

Uno de los objetivos del estudio de la masa ósea es conocer el riesgo de fractura que tiene un individuo. Hay que tener en cuenta que este riesgo aumenta con la edad, por lo que de algún modo hay que introducir este factor cuando se realiza una densitometría. Para ello se utiliza otro parámetro, la T-score, que compara la DMO obtenida con otro valor de referencia, el valor medio que presenta la población adulta joven del mismo sexo, estableciendo, del mismo modo que la Z-score, las desviaciones que se presentan con respecto a ese valor de referencia (Blake & Fogelman 2009).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido un valor umbral de DMO para mujeres de raza blanca basado en el valor T-score a partir del cual se establecen los siguientes diagnósticos desitométricos (Blake & Fogelman 2009):

T-score mayor de -1 **Normal**

T-score entre -1 y $-2,5$ **Osteopenia**

T-score menor o igual a $-2,5$ **Osteoporosis**

Hay que tener en cuenta que, aunque todos los densitómetros del mercado están basados en el mismo sistema, existen variaciones específicas entre unos y otros que pueden crear alteraciones en el valor de la medición de la masa ósea. Debido a ello, se han creado formulas de conversión que permiten dar valores de DMO estandarizada con el objetivo de unificar los valores de DMO obtenidos con diferentes sistemas (Hui *et al.* 1997; Lu *et al.* 2001).

Actualmente, la aplicación de la densitometría se limita a casos clínicos de alto riesgo y para la monitorización de la respuesta terapéutica. Según la OMS, las indicaciones de medición de la masa ósea serían:

- Mujeres mayores de 65 años
- Situaciones clínicas de alto riesgo (menopausia precoz, enfermedades crónicas asociadas a osteoporosis, corticoterapia crónica o hiperparatiroidismo)
- Deformidades vertebrales y osteopenia radiológica
- Historia de fracturas no traumáticas
- Monitorización de respuesta terapéutica

En todas estas situaciones, a excepción de los casos en los que existan circunstancias asociadas a pérdidas rápidas de masa ósea, no se recomienda realizar mediciones de la masa ósea en periodos de tiempo inferiores a un año ya que durante ese intervalo las variaciones que se puedan producir en la masa ósea no son detectables y serían

equivalentes al porcentaje de variación implícito en la propia técnica (1-2%) (Patel *et al.* 2000).

Por tanto, a partir de los datos densitométricos, y con la información adicional proporcionada por los marcadores bioquímicos de remodelado óseo, podemos evaluar el estado de la masa ósea de un individuo (normal, osteopenia u osteoporosis) al igual que el riesgo de fractura y la eficacia de un tratamiento.

1.2 OSTEOPOROSIS

Como ya se ha visto en apartados anteriores, el hueso es un tejido dinámico sujeto a un continuo remodelado óseo que tiene como objetivo renovar el esqueleto dañado. Este proceso debe estar controlado de forma que exista un equilibrio entre resorción y formación ósea. Cuando este equilibrio se rompe, aparecen condiciones patológicas como es el caso de la osteoporosis.

1.2.1. Definición de osteoporosis

Por consenso, la osteoporosis se define como una enfermedad esquelética caracterizada por una resistencia ósea disminuida que predispone a una persona a un riesgo aumentado de fractura (Ammann & Rizzoli 2003). La resistencia ósea refleja fundamentalmente la integración de densidad y calidad óseas. La densidad ósea viene expresada como gramos de mineral por área o volumen, y en un individuo concreto viene determinada por el pico de masa ósea y por la cantidad de pérdida ósea. La calidad ósea se refiere a la

arquitectura, recambio, cúmulo de lesiones (microfracturas) y mineralización. Cuando a un hueso que tiene afectada su resistencia se le aplica una fuerza inductora, aparece la fractura; por tanto, la osteoporosis es un factor determinante en el riesgo de fractura.

1.2.2. Epidemiología

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más frecuente. Afecta tanto a hombres como a mujeres, aunque el riesgo es más elevado en mujeres. Según criterios de la OMS, su prevalencia se estima en un 30% en mujeres caucásicas y en un 8% en varones caucásicos mayores de 50 años, y asciende hasta un 50% en mujeres de más de 70 años (Hermoso de Mendoza 2003; Lane 2006). Por tanto, según estos hechos, es lógico encontrar un mayor índice de fracturas osteoporóticas en mujeres que en varones.

1.2.3. Etiopatogenia, factores de riesgo y clasificación de la osteoporosis

La etiopatogenia de la osteoporosis es desconocida, si bien diversos estudios epidemiológicos han identificado una serie de factores de riesgo para esta patología (Tabla 1.1) (Carranza-Lira *et al.* 2002).

Tabla 1.1. Factores de riesgo para la osteoporosis

Modificables	No modificables
Actividad física escasa: sedentarismo	Edad
Escasa ingestión de calcio	Sexo (mujer)
Dieta hiperproteica	Genética
Tabaco	Menopausia
Abuso de alcohol	Hipogonadismo
Abuso de café	Enfermedades Endocrinas
Corticoides	Enfermedades Reumatológicas
Inmunosupresores	Enfermedades Nutricionales
Anticoagulantes	Enfermedades Digestivas
IMC: índice de masa corporal.	Neoplasias

Así pues, según la causa productora de la osteoporosis, podemos diferenciar dos tipos de osteoporosis (Hermoso de Mendoza 2003):

1. Osteoporosis primaria o involutiva.
2. Osteoporosis secundaria.

1. Osteoporosis primaria o involutiva

Es el grupo de osteoporosis más frecuente. Existen tres tipos de osteoporosis involutiva:

- Osteoporosis idiopática juvenil y osteoporosis del adulto joven: Afecta a niños o adultos jóvenes de ambos sexos con función gonadal normal. La osteoporosis idiopática juvenil es un trastorno raro, que se inicia generalmente entre los 8 y los 14 años con la aparición brusca

de dolor óseo y de fracturas con traumatismos mínimos. El trastorno remite espontáneamente en un periodo corto de tiempo. La osteoporosis idiopática del adulto joven se observa en varones jóvenes y mujeres premenopáusicas en las que no se observa ningún factor etiológico. La evolución en este caso es variable aunque no suele producir un fuerte deterioro en el paciente.

- Osteoporosis posmenopáusica o tipo I: se produce en la mujer como consecuencia de la deficiencia estrogénica y conlleva una pérdida ósea acelerada que afecta principalmente al hueso trabecular. Existe un aumento en el riesgo de fractura, sobre todo a nivel de vértebras y extremidad distal del brazo (Riggs & Melton, III 1986).

- Osteoporosis senil o tipo II: se produce en ambos sexos como consecuencia de la pérdida de masa ósea que se produce por el proceso de envejecimiento. Es un proceso de pérdida ósea más lento y afecta tanto a hueso trabecular como cortical. Las fracturas más frecuentes se producen a nivel de la cadera (Riggs & Melton, III 1986).

2. Osteoporosis secundarias

Este tipo de osteoporosis viene derivada por algún otro tipo de alteración como puede ser enfermedades (hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, anorexia nerviosa, hipogonadismo masculino, o malabsorción, etc.) o tratamientos (glucocorticoides).

1.2.4. Diagnóstico y tratamientos

La osteoporosis es una enfermedad asintomática hasta la aparición de complicaciones (fracturas), por lo que resulta difícil diagnosticarla en estadios anteriores a la aparición de la fractura. La única técnica que existe actualmente para el diagnóstico de la enfermedad antes de que se manifiesten sus complicaciones es la densitometría (véase epígrafe 1.1.7). Como ya se ha comentado con anterioridad, la OMS ha establecido un valor umbral de DMO para mujeres de raza blanca basado en el valor de T-score a partir del cual se establece el diagnóstico desitométrico de la osteoporosis cuando el paciente presenta un valor T-score menor o igual a $-2,5$ desviaciones estándar del valor umbral (Blake & Fogelman 2009).

Una vez diagnosticada la osteoporosis, la administración de un tratamiento adecuado para cada paciente tendrá como objetivo evitar o prevenir la aparición de fracturas (Kleerekoper 2006). Entre los tratamientos disponibles en la actualidad, cabe destacar: el ranelato de estroncio, los bifosfonatos, los estrógenos o terapia hormonal sustitutiva (THS), los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs) y los fitoestrógenos y extractos vegetales.

1.2.4.1. Ranelato de estroncio

El ranelato de estroncio es un fármaco anabolizante que actúa, por un mecanismo aún desconocido, incrementando la formación e inhibiendo la resorción ósea. Varios estudios preliminares han demostrado que produce una reducción de riesgo de nuevas fracturas

tanto vertebrales como de cadera, y un incremento en la densidad mineral ósea. Se emplea a dosis de 2 g/día en administración única nocturna, antes de acostarse (Kleerekoper 2006).

1.2.4.2. Bifosfonatos

El mecanismo de acción de los bifosfonatos es complejo, pero predomina sobre todo la inhibición de la actividad osteoclástica. Son, por lo tanto, potentes antirresortivos. Los bifosfonatos tienen una absorción débil por vía oral. Tomados por la mañana, después de ayunar toda la noche, su biodisponibilidad es inferior al 1%. Aunque actualmente existen varios bifosfonatos en fase de desarrollo, los más utilizados en la actualidad son Alendronato, Risedronato e Ibandronato; el Alendronato tiene efecto positivo sobre la DMO lumbar y femoral, y disminuye el riesgo de fracturas vertebral, no vertebral y de cadera. Deben seguirse estrictamente las normas de administración para evitar lesiones esofágicas, y porque su baja absorción intestinal hace que sea muy importante su administración en ayunas; Risedronato también tiene efecto positivo sobre la DMO lumbar y femoral. Asimismo, disminuye el riesgo de fractura vertebral, no vertebral y de fémur. Se debe administrar también en ayunas. La eficacia terapéutica de ambos fármacos es similar; en cuanto al Ibandronato, además de reducir la aparición de fracturas vertebrales, tiene la posibilidad de su administración mensual, lo cual podría aumentar la adherencia al tratamiento por parte del paciente (Kleerekoper 2006; Delaney 2006).

1.2.4.3. Estrógenos

La deficiencia estrogénica es un importante factor de riesgo para la osteoporosis (ver más adelante en *Osteoporosis y deficiencia estrogénica*), y por ello durante muchos años los expertos han recomendado la utilización de la terapia hormonal sustitutiva (THS), con estrógenos solos o asociados a gestágenos, como un tratamiento de primera línea para prevenir la pérdida de hueso en la mujer posmenopáusica (Kleerekoper 2006). Los estrógenos actúan en un principio aumentando y después manteniendo la masa ósea, reduciendo la incidencia de fracturas (Cauley *et al.* 1995). Pese a los beneficios que supone la administración de estrógenos sobre el hueso, la publicación de varios artículos provenientes de los estudios HERS II y, sobre todo, del WHI, cuestionaron la seguridad de la THS (Rossouw *et al.* 2002). Precisamente, en el estudio WHI se observó que la THS produce una reducción del riesgo de fracturas (cuando se analizaban éstas en su totalidad, es decir, vertebral y de cadera), pero en el mismo artículo se indicaba un aumento en el riesgo de padecer cáncer de mama y enfermedades cardiovasculares. Por ello, en la actualidad, ha cambiado radicalmente su perfil de prescripción y no es aconsejable prolongar el mencionado tratamiento hasta más de tres años después de la menopausia, siendo su indicación fundamental el control del síndrome climatérico, y no el tratamiento de la osteoporosis. Después de la publicación de estos estudios, se ha observado una importante reducción de la prescripción de la THS

buscando alternativas terapéuticas como es el caso de los SERMs, de los fitoestrógenos y de otros extractos de origen vegetal.

1.2.4.4. Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs)

Son compuestos con una elevada afinidad por los receptores de estrógenos, actuando como agonistas o antagonistas de los estrógenos dependiendo del tejido diana (Riggs & Hartmann 2003). Así, en los receptores localizados en útero y mama ejercen un efecto antagonista, protegiendo del cáncer de mama y endometrio, mientras que en los receptores del hueso tienen un efecto agonista y, por tanto, antiresortivo, así como en el perfil lipídico, siendo también protector cardiovascular. Por tanto, se trata de un tratamiento idóneo para prevenir la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. Actualmente disponemos únicamente del raloxifeno, aunque muchos otros se encuentran en fase de estudio. El raloxifeno tiene efectos positivos sobre la masa ósea lumbar y femoral, y disminuye el riesgo de fractura vertebral y no vertebral, aunque no ha demostrado eficacia en la prevención de fracturas de cadera (Kleerekoper 2006).

1.2.4.5. Fitoestrógenos y extractos vegetales (*Cimicífuga racemosa*)

Se trata de un grupo de sustancias de origen vegetal que presentan una estructura química similar a la del estradiol (estrógeno endógeno). Esa similitud estructural permite su unión a receptores de estrógenos y ejercer así funciones estrogénicas o antiestrogénicas (Usui 2006).

Existen tres tipos de fitoestrógenos: isoflavonas, cumestanos y lignanos, aunque los más conocidos son las isoflavonas. La genisteína y la daidzeína son las isoflavonas más estudiadas.

Debido a los efectos beneficiosos que ejercen los fitoestrógenos a nivel del sistema cardiovascular, a nivel del hueso y de los síntomas climatéricos, y también debido a su baja toxicidad, actualmente los fitoestrógenos son una alternativa terapéutica a la THS.

Además de los fitoestrógenos, existe otros compuestos basados en extractos vegetales como los derivados de *Cimicífuga racemosa* (Remifemin®), entre otros (Geller & Studee 2006). El Remifemin es un fármaco basado en el extracto isopropanólico de *Cimicífuga racemosa* (CRi). Se presenta como tratamiento natural alternativo a la terapia hormonal ya que existen estudios que han demostrado que no presenta efectos adversos sobre útero o mama y que reduce los síntomas climatéricos de forma tan eficiente como los estrógenos (Jarry *et al.* 2003; Wuttke *et al.* 2003a; Wuttke *et al.* 2003b; Seidlova-Wuttke *et al.* 2003b). La terapia basada en extractos de *Cimicífuga racemosa* (CR) es nueva en nuestro medio pero viene siendo usada desde hace muchos años en otros países como Canadá, donde se encuentra registrada por las autoridades sanitarias y de donde la *Cimicífuga racemosa* es originaria.

La mayoría de los pacientes con osteoporosis no padecen otras enfermedades que pueden derivar en esta patología, sino que la pérdida ósea se produce, principalmente, debido a dos de los factores que se han nombrado anteriormente: la menopausia y el

envejecimiento. Hay que destacar que en los últimos años, el sistema inmunológico y los factores genéticos relacionados con la osteoporosis han adquirido gran importancia en el ámbito de esta patología (ver más adelante en *Osteoporosis y sistema inmune: Osteoinmunología* y en *Osteoporosis y factores genéticos*).

1.3 OSTEOPOROSIS Y DEFICIENCIA ESTROGÉNICA

1.3.1. Pérdida ósea y edad

El aumento de la masa ósea en humanos se produce desde la infancia hasta la pubertad y está relacionado con el crecimiento óseo y el incremento en las hormonas sexuales. El pico máximo de masa ósea se alcanza alrededor de los 20-30 años. A partir de esta edad, tanto en hombres como en mujeres, se inicia una etapa de remodelado óseo en la que, gracias al equilibrio entre resorción y formación ósea, se mantienen constantes los niveles de masa ósea. La pérdida del equilibrio en el remodelado óseo se produce en torno a los 50 años y provocará una clara disminución en los niveles de masa ósea (Looker *et al.* 1998) (Figura 1.12.).

Según estudios epidemiológicos, esta pérdida ósea asociada a la edad se produce, inicialmente, a nivel de hueso trabecular, mientras que la pérdida de hueso cortical se produce más tarde.

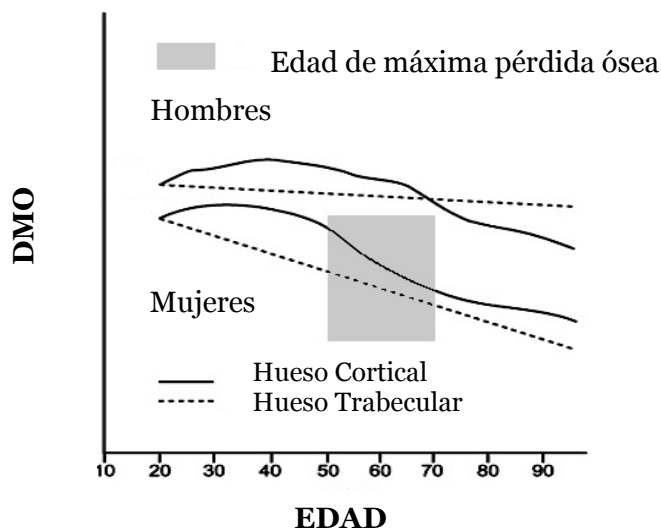


Figura 1.12. Variación de la DMO con la edad.

1.3.2. Pérdida ósea y deficiencia estrogénica

En el caso de las mujeres, la pérdida ósea experimenta una fuerte caída, respecto a los hombres, tras la menopausia debido a la disminución en los niveles de estrógenos, afectando principalmente al hueso trabecular y desencadenando así la aparición de la osteoporosis posmenopáusica y un aumento en el riesgo de fractura (Figura 1.12.).

La disminución de la DMO que se produce con la deficiencia estrogénica en la menopausia (natural o quirúrgica) y el efecto protector de los estrógenos sobre la pérdida de masa ósea y la incidencia de fracturas, demuestran claramente la relación que existe

entre la deficiencia estrogénica y la pérdida ósea (Riggs *et al.* 1998; Compston 2001; Balasch 2003). Sin embargo, el mecanismo preciso de acción de los estrógenos sobre el hueso no se conoce todavía.

El descubrimiento de receptores de estrógenos en las células del hueso (osteoblastos y osteoclastos) sugirió una posible vía de actuación directa de los estrógenos sobre el hueso (Seeman 2002). La deficiencia estrogénica provoca un desequilibrio en el remodelado óseo con un predominio de la resorción ósea. En la última década se ha propuesto que los efectos directos que ejerce la deficiencia de estrógenos sobre el hueso se deben a cambios en la síntesis de determinadas citoquinas y factores reguladores por las propias células del hueso (Manolagas & Jilka 1995; Pacifici 1996).

1.3.2.1. Alteración en los niveles de citoquinas (IL-1, IL-6 y TNF α)

La principal consecuencia de un aumento en los niveles de citoquinas en el microambiente del hueso, debido a la deficiencia estrogénica, es un incremento en el número de osteoclastos y una mayor tasa de osteoclastogénesis, una mayor actividad de los osteoclastos maduros y un aumento del tiempo de vida media de estas células (Pacifici 1998). Además, este incremento en el número de citoquinas también induce una mayor actividad osteoblástica con el objetivo de intentar compensar la pérdida ósea que se está produciendo.

Entre todas las citoquinas reguladas por estrógenos hay que destacar a IL-1, IL-6 y TNF α . Estas tres citoquinas inducen resorción

ósea y diversos estudios han demostrado que su expresión disminuye con la administración de estrógenos (Manolagas 2000c). La IL-1 y el TNF α son dos citoquinas con un elevado poder resortivo a nivel local y, además, actúan como inhibidores de la formación ósea (Pacifci 1996). Ya en 1987, Pacifci y colaboradores demostraron que cultivos de monocitos de mujeres con OTP poseen niveles de IL-1 aumentados (Pacifci *et al.* 1987; Manolagas 2000c). También se demostró una producción aumentada de IL-1 y TNF α por monocitos de mujeres ovariectomizadas, y que estos niveles disminuían si se les administraban estrógenos (Manolagas 2000c). En ratones ovariectomizados, también se producía un aumento en los niveles de IL-1 y TNF α y, tras el tratamiento con inhibidores de la IL-1 y TNF α , disminuía de la pérdida ósea inducida por la ovariectomía (Kitazawa *et al.* 1994; Ammann *et al.* 1997). Ambas citoquinas dirigen la formación de osteoclastos ya que estimulan la proliferación de los precursores osteoclastogénicos. Además, inducen la expresión de otras citoquinas que regulan la diferenciación de los precursores osteoclastogénicos en osteoclastos maduros como RANKL (Hofbauer *et al.* 1999), IL-6 y M-CSF. Por tanto, IL-1 y TNF α son dos factores necesarios para inducir la secreción de factores de diferenciación de los osteoclastos, por lo que pequeños cambios en los niveles de estas citoquinas provocarán grandes cambios a nivel de la producción de osteoclastos.

En cuanto a la IL-6, se trata de un potente factor osteoclastogénico sintetizado por las células estromales y osteoblásticas en la deficiencia

estrogénica. Actúa a través de sus receptores (IL-6R) estimulando la osteoclastogénesis de las células precursoras tanto en humanos como en ratones (Pacifci 1998). Diversos estudios han demostrado como la administración de estrógenos disminuye la síntesis de esta citoquina en células estromales u osteoblastos de medula ósea de ratón (Spelsberg *et al.* 1999). Además, la utilización de anticuerpos neutralizantes de IL-6 previenen la osteoclastogénesis inducida por la deficiencia estrogénica en ratas ovariectomizadas (Jilka *et al.* 1992). Ratones ovariectomizados deficientes en IL-6 no sufren pérdida ósea debida a la deficiencia estrogénica.

Por tanto, según los numerosos estudios realizados, se puede concluir que IL-1, IL-6 y TNF α son tres factores clave implicados en la osteoclastogénesis y en la resorción ósea asociadas a la deficiencia estrogénica.

Además de las citoquinas que acabamos de ver, la OPG es otra citoquina cuya expresión también se ve regulada por los niveles de estrógenos. Como ya se ha visto, la OPG es un fuerte inhibidor de la osteoclastogénesis ya que al actuar como receptor señuelo de RANKL impide su unión a RANK inhibiendo así la diferenciación de los osteoclastos y la resorción ósea. Existen estudios que han demostrado que los estrógenos inducen un aumento en la expresión de OPG en cultivos de osteoblastos humanos y como este efecto desaparece con la administración de antagonistas estrogénicos.

Así pues, se puede concluir que los estrógenos desarrollan un papel muy importante en la homeostasis ósea y que su deficiencia está asociada a la aparición de la osteoporosis posmenopáusica.

1.4 OSTEOPOROSIS Y SISTEMA INMUNE: OSTEOINMUNOLOGÍA

La principal causa de osteoporosis es la deficiencia de estrógenos (Osteoporosis involutiva tipo I) que ocurre en la menopausia (Riggs *et al.* 1998). Como ya se ha visto, esta deficiencia induce un aumento en la actividad de los osteoclastos como consecuencia de aumentos en los niveles de citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α).

Desde hace tiempo se sabe que algunos estados de inflamación se acompañan de pérdida ósea. Sin embargo, ha sido en los últimos años cuando se ha descubierto que algunos miembros del sistema inmune, como la célula T, están implicados en este proceso de pérdida ósea, sintetizando citoquinas resorptivas como RANKL (Theill *et al.* 2002) o TNF α , entre otras. No obstante, las células T también secretan citoquinas que inhiben este proceso tales como IFN- γ , IL-12, IL-18 y TGF- β . Aunque la mayor parte de los estudios se han realizado en el ratón y no en el humano, todos estos hechos muestran una clara relación entre el sistema inmune y el metabolismo óseo, por lo que recientemente se ha acuñado el término “osteoinmunología” para reflejar este nexo de unión entre ambos sistemas (Arron & Choi 2000). Respecto a las células B, también se sabe que expresan RANK en su membrana (Theill *et al.* 2002).

Se sabe que los estrógenos también regulan al sistema inmune y a las células T. Sin embargo, hace relativamente pocos años que los investigadores han encontrado una relación entre el sistema inmune y la pérdida ósea por deficiencia estrogénica. La deficiencia de estrógenos induce un aumento en los niveles de IFN- γ sintetizado por la célula T que provoca al mismo tiempo una mayor presentación antigénica y un incremento en la activación de las células T. Estas células T activadas secretan RANKL, que activa directamente al osteoclasto, y TNF α , que induce la expresión de RANKL por las células estromales y osteoblastos, por lo que esta situación desembocará finalmente en un aumento en la osteoclastogénesis y en la pérdida ósea (Weitzmann & Pacifici 2006). Apoyando este modelo está el hecho de que el ratón deficiente en células T no pierde hueso tras la ovariectomía (Cenci *et al.* 2000). No obstante, quedan por contestar cuestiones referentes a los aumentos en los niveles de células T y de IFN- γ descritos ya que hay datos que no apoyan estos resultados (Arron & Choi 2000; Takayanagi *et al.* 2000; García-Pérez *et al.* 2006b). A pesar de que el modelo es válido en el ratón, todavía hay que demostrar su validez en el humano (Weitzmann & Pacifici 2006).

1.5. OSTEOPOROSIS Y FACTORES GENÉTICOS

1.5.1. Factores ambientales y genéticos determinantes en la masa ósea

A pesar de que la menopausia o la ovariectomía aceleran la pérdida de masa ósea en todas las mujeres por los mecanismos ya vistos, hay que preguntarse por qué unas mujeres desarrollan osteoporosis y otras no. Ya en 1989 se conocía que las hijas de mujeres osteoporóticas poseen menor masa ósea y que probablemente la osteoporosis posmenopáusica ocurre, preferentemente, en las mujeres que no han adquirido mucha masa ósea en su juventud (Seeman *et al.* 1989). La respuesta a la pregunta es que, además de los procesos descritos anteriormente desencadenados por el déficit de estrógenos, el pico máximo de masa ósea alcanzado en torno a la tercera década de vida es determinante en esta patología una vez que falla la función ovárica.

Existen diversos factores ambientales determinantes en la masa ósea de un individuo ya que influyen tanto en el pico máximo de masa ósea como en la tasa de pérdida ósea. Algunos de estos factores son:

- Hábitos nutricionales: los hábitos dietéticos son muy importantes prevenir pérdida ósea. Dos de los micronutrientes más importantes son el calcio y la vitamina D (Nieves 2005) . La ingesta de lácteos y derivados es muy importante para el hueso ya que son la fuente principal de calcio. Una ingesta escasa de calcio, tanto en la edad juvenil como en la posmenopausia, se

asocia a una mayor prevalencia de osteoporosis y/o fracturas. Alteraciones nutricionales en personas que presentan anorexia nerviosa, desnutrición o con problemas de malabsorción provocan una mayor prevalencia de fracturas.

- Actividad física: el ejercicio físico guarda una relación directa con la masa ósea. Aunque se desconoce el mecanismo parece ser que el estrés mecánico aumenta la masa ósea. Las primeras evidencias se obtuvieron de los problemas osteoporóticos que sufrían los astronautas debido a la falta de actividad física por la ingravidez. La actividad física también influye en el alcance del pico de masa ósea en la infancia y adolescencia (Kroger *et al.* 1993) . Parece ser que también contribuye a una menor pérdida ósea en la menopausia (Uusi-Rasi *et al.* 1998).
- Consumo de tabaco: es un factor de riesgo para la osteoporosis ya que se ha demostrado que inhibe la actividad osteoblástica. Además, los fumadores suelen ser personas delgadas lo cual influye también a nivel de la masa ósea (Yuhara *et al.* 1999).
- El alcohol: a dosis elevadas es la causa más frecuente de osteoporosis secundaria en el varón, y en los alcohólicos existe un mayor riesgo a padecer cualquier fractura (además de la osteoporosis, en ellos son más frecuentes las caídas y los accidentes de todo tipo) (Sampson 2002) .

- Fármacos: se han asociado varios fármacos a alteraciones del metabolismo mineral óseo. Entre ellos destacan los glucocorticoides, la causa más frecuente de osteoporosis secundaria a fármacos. Otros medicamentos que pueden afectar al hueso son las sales de litio, los anticonvulsivos, la heparina, la vitamina A y, posiblemente, incluso la sobredosificación de antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Por el contrario, las tiazidas ejercen un efecto protector sobre el metabolismo óseo.

Pese al efecto de todos estos factores ambientales, el pico de masa ósea que se alcanza sobre los 25-30 años de edad está claramente controlado por factores genéticos, por lo que la osteoporosis es claramente una enfermedad multifactorial. Estudios en gemelos han demostrado que el 60-85% del pico de masa ósea puede ser explicada por factores hereditarios (Peacock *et al.* 2002).

1.5.2. Estudios de asociación a DMO de polimorfismos (SNPs) en genes candidatos

Raramente la osteoporosis (o la osteopetrosis) es el resultado de mutaciones en genes únicos, aunque hay algunos ejemplos como en la osteogénesis imperfecta (Ralston 2003; Baldock & Eisman 2004). La variación genética normal en los rasgos complejos como la DMO generalmente no es debida a mutaciones deletéreas sino a polimorfismos comunes que producen cambios sutiles en la función o

expresión de un gen. Ello implica que deben existir “genes de DMO” cuyas variaciones determinarían las diferencias interindividuales en la DMO. Dichas diferencias pueden manifestarse de diversa forma; por ejemplo, como diferencias en el pico de DMO alcanzado tras completar el período de crecimiento, o como diferencias en la velocidad de pérdida de masa ósea con la edad. Por tanto, los factores genéticos representan un papel determinante en la regulación de la estructura del esqueleto y en la DMO (Ralston 2002) de manera que los diferentes fenotipos estarán determinados por los efectos de varios genes junto con el efecto de los factores ambientales.

Se han realizado numerosos estudios con el fin de encontrar genes susceptibles de regular la masa ósea. La identificación de genes asociados a fenotipos complejos como la osteoporosis es complejo a pesar de que la DMO posee una heredabilidad elevada. Estudios de ligamiento a lo largo del genoma humano han identificado varios loci génicos que muestran ligamiento a la DMO de cadera o de columna como 2p23–24, 14q31–34, 22q12–13 1p36, 2p23, 1q21, 11q12–13 o 6p11 (Ralston 2002; Zelzer & Olsen 2003). Sin embargo, estas regiones son muy grandes (aproximadamente 50 cM) y contienen entre 20 y 70 megabases de ADN con varios centenares de genes, por lo que el estudio de cada una de ellas requiere muchos recursos.

La mayor parte de los estudios han consistido en estudios de asociación a DMO de polimorfismos en genes candidatos, es decir, de genes relacionados en vías clave del metabolismo óseo. Los genes más estudiados han sido los que regulan el metabolismo óseo y los genes

de las citoquinas que acabamos de describir. De hecho los más estudiados hasta la fecha son el gen para el receptor de la vitamina D (RVD), el gen para el receptor de estrógenos, y el gen para el colágeno tipo 1-alfa-1 (COL1A1). Los más ampliamente usados son el polimorfismo Sp1 de COL1A1, Fok1 y BmsI del gen RVD (Efstathiadou *et al.* 2001; Braga *et al.* 2002; Khosla *et al.* 2004). Otros genes estudiados son el gen para el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1), el gen para el receptor del péptido relacionado con la PTH (prPTH), el gen de la IL-6, el del TGF- β 1, el gen para el receptor de andrógenos, el gen de la apolipoproteína E, el gen de la aromatasa (cyp19), los genes para las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), el gen de la calcitonina y para su receptor, el gen para el receptor de leptina, el de la osteoprotegerina, etc. (Ralston 2002; Ralston 2003; Zelzer & Olsen 2003; Baldock & Eisman 2004) (Tabla 1.2.)

Clasificación Biológica	Gen Candidato	Localización cromosómica
Hormonas calcitrópicas y receptores	VDR	12q12-14
	ER- α	6q25
	ER- β	14q22-24
	CT	11p15
	CTR	7q21
	PTH	11p15
	PTHR1	3p22-21
	CYP19	15q21
	GCCR	5q31
	CASR	3q13-21
	AR	Xq11-12
	Citoquinas, factores de crecimiento y receptores	TGF- β 1
IL-6		7p21
IGF-1		12q22-24
IL-1RA		2q14
OPG		8q24
TNF- α		6p21
TNFR2		1p36

Clasificación Biológica	Gen Candidato	Localización cromosómica
Proteínas de la matriz ósea	COL1A1	17q21-22
	COL1A2	7q22
	BGP	1q25-31
	MGP	12p13-12
	AHSG	3q27
Miscelánea	ApoE	19q13
	MTHFR	1p36
	P57(KIP2)	11p15
	HLA-A	6p21
	PPAR- γ	3p25
	FRA-1	11q13
	RUNX-2	6p21
	Klotho gene	13q12
	WRN (Werner syndrome gene)	8p12-11

Tabla 1.2. Genes candidatos más estudiados para la asociación con DMO

Hay que señalar que hay muchos más genes por analizar como genes implicados en la diferenciación, activación y apoptosis del osteoblasto y osteoclasto, proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), factores de transcripción, etc., y que hasta la fecha no se han relacionado con DMO ni fractura (Zelzer & Olsen 2003).

El número tan elevado de genes candidatos hace que se tengan que definir estrategias de búsqueda. En la presente tesis se estudió la asociación a DMO de diferentes genes relacionados con el

metabolismo óseo y el sistema inmune. Estos genes fueron *RUNX2*, *OCIL*, *CD40* y *CD40L*.

1.5.2.1. RUNX2

El gen *RUNX2* (*Runt-related transcription factor 2*) fue seleccionado porque, como ya se ha dicho anteriormente, codifica para un factor de transcripción involucrado en la diferenciación osteoblástica por lo que, variaciones genéticas en este gen podrían inducir cambios en la DMO. Además, mutaciones en este gen provocan la aparición de displasia cleidocraneal, una enfermedad autosómica dominante que se caracteriza por anomalías a nivel esquelético y alteraciones en densidad mineral ósea (Mundlos *et al.* 1997).

1.5.2.2. OCIL

El gen *OCIL* (*Osteoclast Inhibitory Lectin*), también llamado *LLT1* (*Lectin Like Transcript-1*) y cuyo nombre oficial es *Clec2d* (*C-type lectin domain family 2, member d*) fue seleccionado para el estudio de asociación a DMO porque codifica para una lectina que inhibe la diferenciación osteoclástica *in vitro*. Además, este gen está relacionado con el sistema inmune ya que esta lectina se expresa en células B y en osteoblastos y su expresión en células B inhibe la producción de $IFN\gamma$ por las células NK (Kartsogiannis *et al.* 2008; Rosen *et al.* 2008).

1.5.2.3. CD40 y CD40L

CD40 y *CD40L* son dos genes implicados en una amplia variedad de respuestas inmunes e inflamatorias. *CD40* es una proteína que se expresa en las células B y en otras células presentadoras de antígenos como macrófagos o células dendríticas. *CD40L*, es el ligando de *CD40* y se expresa temporalmente en las células T activadas. Estos dos genes se seleccionaron para el estudio de su asociación a osteoporosis debido a su relación con el sistema inmune y por los datos existentes previamente en la literatura en los que se describe una relación entre el sistema *CD40* y *CD40L* con el metabolismo óseo. Estos datos describen a la célula B como principal fuente de OPG en la médula ósea. Además, se describió que ratones deficientes en células B presentan menor DMO y peor microarquitectura que ratones normales, elevados niveles de resorción ósea y una menor síntesis de OPG, rompiéndose el equilibrio RANKL-OPG a favor de RANKL. La misma situación se producía en ratones deficientes en *CD40* o *CD40L*. Por otro lado, los datos obtenidos de estudios en humanos describen como los niños afectados por el síndrome Hiper IgM, una inmunodeficiencia primaria causada por mutaciones en el gen *CD40L*, presentan osteopenia. Además, las células T de estos niños, no expresan *CD40L* y tienen un elevado poder osteoclastogénico pese a tener una producción normal de RANKL (López-Granados *et al.* 2007; Li *et al.* 2007).

1.5.3. Estudios de asociación de genoma completo (GWAs)

Hasta hace relativamente poco tiempo, los estudios de asociación han estado limitados a pequeñas regiones del genoma que contienen genes candidatos o que han sido identificados en estudios familiares de ligamiento. Gracias a los avances del HapMap (2003), a las nuevas técnicas de genotipado y a la recolección de cohortes más amplias y mejor caracterizadas, se han podido desarrollar los estudios de asociación de genoma completo (*Genome-Wide Association Studies (GWAS)*). Los GWAs se pueden definir como estudios a lo largo de todo el genoma humano de polimorfismos con el fin de identificar asociaciones entre ciertos fenotipos o enfermedades con variaciones genéticas específicas. En el caso de la osteoporosis, los GWAs se están basando en la búsqueda de variantes en genes asociados a DMO y a fractura ósea (Richards *et al.* 2008; Styrkarsdottir *et al.* 2008; Styrkarsdottir *et al.* 2009). Pese a la revolución que ha implicado la aplicación de este tipo de estudios en el campo de la genética, los estudios GWAs presentan un bajo poder estadístico y raramente alcanzan a explicar su pequeño efecto sobre la variación de la DMO aunque pueden proporcionar nuevos datos dentro del complejo mundo de la osteoporosis.

Así pues, se puede decir que la identificación y caracterización de genes implicados en la osteoporosis y fenotipos asociados, no sólo contribuirá a un mejor conocimiento de la fisiopatología de la osteoporosis, sino también al desarrollo de diagnósticos mejores, a la prevención y a diseñar mejores estrategias de tratamiento para esta

patología. Una consecuencia inmediata de la investigación genética sobre la osteoporosis es el descubrimiento de genes nuevos o inesperados y de su implicación en los mecanismos biológicos que determinan la masa ósea. Aunque la traslación a la clínica de los resultados de los estudios sobre genética de la osteoporosis aún está en sus fases incipientes, es de esperar su aplicación en dos áreas principales: predicción de la respuesta al tratamiento, sobre todo los polimorfismos relacionados con las enzimas que metabolizan los fármacos antirresortivos o formadores y fundamentalmente, la identificación de sujetos en riesgo, mediante la creación de algoritmos que incluyan desde factores ambientales (edad, tabaquismo, etc.), marcadores bioquímicos de remodelado óseo (NTx, CTx, FA etc.) y como no, varios polimorfismos genéticos fuertemente asociados a DMO.

2. OBJETIVOS

Los objetivos generales de esta Tesis Doctoral son, por una parte, la identificación de nuevos genes implicados en la fisiopatología de la osteoporosis en general y de la posmenopáusica en particular, y por otra evaluar el efecto, en distintos modelos, de tratamientos (agonistas del receptor de estrógenos o extractos vegetales) sobre la microestructura ósea, sobre el metabolismo óseo, el sistema cardiovascular y el sistema inmune.

Son objetivos específicos:

1. Estudio de la asociación de polimorfismos en genes candidatos, seleccionados del sistema inmune (*CD40*, *CD40L*, *OCIL*) y óseo (*RUNX2*), con la calidad ósea determinada mediante densitometría mineral ósea, en una cohorte de mujeres de Valencia, la mayoría de las cuales son mujeres posmenopáusicas.
2. Efecto de un extracto isopropanólico de *Cimicífuga racemosa* (Remifemin) sobre el metabolismo óseo y el sistema cardiovascular en mujeres posmenopáusicas.
3. Efecto de varios tratamientos agonistas del receptor de estrógenos (estradiol, raloxifeno y genisteína) sobre el metabolismo óseo y sistema inmune en el ratón ovariectomizado (OVX).
4. Efecto de varios tratamientos agonistas del receptor de estrógenos (estradiol, raloxifeno y genisteína) sobre la microestructura ósea en el ratón OVX mediante microtomografía axial computerizada (micro-TAC)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

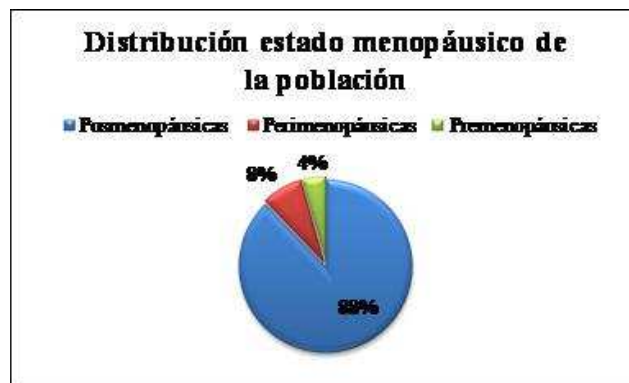
3.1. ESTUDIOS EN HUMANOS

3.1.1. Población de estudio

Los distintos estudios de la presente Tesis Doctoral muestran pequeñas variaciones en cuanto al tamaño muestral, especialmente en los estudios genéticos de asociación a calidad ósea en nuestra cohorte de mujeres. Esto es debido a que, durante la realización del trabajo experimental de la presente Tesis, se han estado incorporando nuevas participantes en la cohorte. De esta forma, dentro de los estudios de asociación, el de menor tamaño poblacional es el del gen *OCIL* con un tamaño de 500 mujeres (Pineda *et al.* 2008a), mientras que el de mayor tamaño corresponde al del estudio sobre la interacción génica entre *CD40* y *CD40L* (N=811). En cuanto al estudio del efecto de un extracto isopropanólico de *Cimicífuga racemosa* (CRi) (Remifemin) sobre el metabolismo óseo y el sistema cardiovascular se realizó con un tamaño muestral de 82 mujeres. La descripción de la población del presente epígrafe corresponde a la población final de las 811 mujeres.

La cohorte de mujeres que se ha estudiado en la presente Tesis Doctoral se ha formado de entre las mujeres atendidas entre los años 2005-2009 en la Unidad de Menopausia del Hospital Clínico Universitario de Valencia, un centro que cubre un área urbana de clase media, y que aceptaron participar en el estudio. En general, las mujeres acudían a la consulta de menopausia por problemas relacionados con el climaterio. En todos los casos se trataba de mujeres sanas, de acuerdo a una exploración física rutinaria y a una analítica general básica, de origen español, no bebedoras y

generalmente sedentarias. Los criterios de inclusión para las mujeres con menopausia natural fueron un mínimo de un año de amenorrea y niveles de FSH superiores a 40 UI/ml en mujeres mayores de 40 años, mientras que en el caso de mujeres con menopausia quirúrgica fue ser sometidas a ooforectomía bilateral como mínimo un año antes de entrar en el estudio. Hay que indicar que en el estudio de la interacción entre *CD40* y *CD40L* y su asociación a calidad ósea también se incluyeron mujeres pre- y perimenopáusicas con el fin de aumentar el tamaño poblacional y, por tanto, el poder estadístico, y de establecer si la asociación detectada entre genotipos de los genes *CD40* y *CD40L* con DMO, se daba también en este colectivo de mujeres.



En este caso, se definió la premenopausia como el periodo reproductivo anterior a la menopausia en el que la menstruación es regular, y la perimenopausia, como el tiempo anterior a la

menopausia, cuando comienzan los eventos endocrinológicos, biológicos y clínicos de aproximación a la menopausia, y el primer año después de la menopausia.

Los criterios de exclusión fueron presentar algún tipo de inmovilidad parcial o total, padecer enfermedades metabólicas que cursen con osteoporosis secundaria como artritis reumatoide, cáncer, malabsorción, etc., la toma de medicamentos que afecten al metabolismo óseo, como corticoides o anticonvulsivos, o la denegación del consentimiento informado. La toma de suplementos de calcio y de vitamina D3 no se consideró un criterio de exclusión.

A todas las mujeres aptas para el estudio, se les informaba del tipo de estudio y se les pidió que leyeran y firmaran un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia y la Fundación para la Investigación del mismo Hospital.

3.1.2. Población para el estudio del efecto de un extracto isopropanólico de *Cimicífuga racemosa* (CRi) (Remifemin) sobre el metabolismo óseo y sistema cardiovascular

Como ya se ha comentado, para estudiar el efecto de un extracto isopropanólico de *Cimicífuga racemosa* (CRi) (Remifemin) sobre el metabolismo óseo y sistema cardiovascular, se utilizó una muestra poblacional de 82 mujeres. Parte de las mujeres (N =45) sometidas al estudio recibían 40 mg/día del CRi (Remifemin) vía oral, mientras que

el resto de mujeres (N = 37) no recibían tratamiento. El seguimiento se realizó durante un periodo de tiempo de seis meses.

3.1.3. Datos antropométricos y bioquímicos

Una vez que las mujeres aceptaban participar en el estudio, se las citaba nuevamente en ayunas y se les realizaba una breve historia clínica básica incluyendo diferentes datos antropométricos, así como una analítica rutinaria de sangre y orina. En la historia clínica se reflejaba el estado menopáusico (pre, peri, o posmenopausia), la edad de la menarquia, la edad y el tipo de menopausia (natural/quirúrgica), los años desde la menopausia (ADM), el número de gestaciones y partos, el consumo de tabaco y de alcohol, y si se les había administrado terapia hormonal, y la duración de ésta, antes de realizarse el estudio densitométrico. Asimismo, se las pesaba y medía para calcular el índice de masa corporal (IMC) como el cociente entre el peso (Kg) y la altura² (m).

A las mujeres participantes se les tomó una muestra de sangre al inicio del estudio (basal) para la obtención de ADN, para realizar distintas determinaciones bioquímicas incluyendo hormonas (estradiol, FSH, etc.), marcadores bioquímicos como calcio, fosforo, CTx, FA, etc. y otros más generales (lípidos, glucosa, etc.) y para realizar estudios *in vitro* utilizando el suero de las mujeres.

Coincidiendo con la época de la obtención de las muestras sanguíneas, a las mujeres se les realizó un estudio densitométrico de

cuello femoral y/o columna lumbar mediante absorciometría fotónica dual de rayos X (DXA, ver más adelante).

En el caso de las mujeres a las que se les administró el extracto isopropanólico de *Cimicífuga racemosa* (Remifemin) para estudiar su efecto sobre el metabolismo óseo y el sistema cardiovascular, y al grupo de mujeres sin tratamiento alguno, se les volvió a extraer sangre al cabo de 3 y 6 meses de haber iniciado o no la terapia para poder realizar las determinaciones bioquímicas oportunas y para realizar estudios *in vitro* utilizando el suero obtenido de las mujeres.

3.1.4. Obtención y procesamiento de las muestras

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por venipunción, entre las 8 y las 10 de la mañana tras un período de tiempo en ayunas de mínimo 12 horas. Se obtuvieron dos tubos de sangre por cada participante: uno con anticoagulante (EDTA sódico) destinado al aislamiento de células nucleadas para la obtención de ADN y otro sin anticoagulante para la obtención del suero para las distintas determinaciones bioquímicas y estudios *in vitro*. Los tubos se centrifugaron en una centrífuga clínica (Labofuge Ae, Heraeus Sepatech, Alemania) a 3000 rpm durante 5 minutos, para la separación del suero y plasma. Posteriormente, las muestras séricas se alicuotaron en tubos eppendorf y se congelaron a -80°C hasta el momento de su utilización en los distintos ensayos. Las células recuperadas del tubo anticoagulado se destinaron a la obtención de ADN. Las muestras de orina se obtuvieron a partir de la recogida, en tubos estériles, de la

segunda orina de la mañana, el mismo día que se realizó la extracción sanguínea.

3.1.5. Determinaciones séricas

En suero se determinaron, mediante métodos de rutina automatizados, los siguientes marcadores bioquímicos de metabolismo óseo y de perfil lipídico: fósforo inorgánico total (mg/dl), calcio total (mg/dL), fosfatasa alcalina total (FA, U/L), glucosa (mg/dL), LDL (mg/dL), HDL (mg/dL), colesterol (mg/dL), triglicéridos (mg/dL), por métodos espectrofotométricos mediante analizador automático (OLYMPUS 5400). La PCR de alta sensibilidad (mg/l) se determinó mediante inmunonefelometría (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania). Los niveles de fosfatasa alcalina ósea (FAO, $\mu\text{g/l}$) se determinaron mediante inmunoensayo por quimioluminiscencia (DiaSorin, Inc.; Stillwater, MN, USA). Los niveles de los telopéptidos carboxi-terminales del colágeno tipo I (CTx, ng/ml), de 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-vitamina-D3, ng/ml), de estradiol (pg/ml), de insulina ($\mu\text{U/mL}$), de osteocalcina (ng/ml), de TSH ($\mu\text{U/mL}$), testosterona (ng/ml), de PTH intacta (pg/ml) y de progesterona (mg/l) se determinaron mediante electroquimioluminiscencia (autoanalizador E170 Modular Analyser; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los niveles de osteoprotegerina (OPG) se ensayaron mediante un ELISA instantáneo (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria). Los coeficientes de

variación intra e inter-ensayo para estos métodos fueron menores del 8%.

3.1.6 Determinaciones en orina

En orina, se determinaron los niveles de los fragmentos aminoterminal del colágeno tipo I, los llamados telopéptidos aminoterminal entrecruzados del colágeno tipo I (NTx), mediante ensayo inmunoenzimático (Osteomark, Ostex International Seattle, WA). Los valores obtenidos en el análisis fueron corregidos para la dilución urinaria mediante la determinación de la creatinina urinaria mediante autoanalizador OLYMPUS AV 600 (Olympus AV 600, Tokyo). Los niveles de NTx se expresaron en nmoles de equivalentes de colágeno óseo por mmol de creatinina (nmol ECO/mmol Cr) (García-Pérez *et al.* 2003).

3.1.7. Determinación de la densidad mineral ósea

La densidad mineral ósea (DMO) de la columna lumbar (L2-4) y del fémur proximal se determinó por absorciometría fotónica dual por fuente de rayos-x (DXA) usando un aparato Norland XR-36 (Norland Medical Systems Inc; Fort Atkinson, WI) o un aparato Lunar DPX (GE Lunar Corporation, Madison, WI, USA). Los resultados de DMO que proporcionan ambos equipos (calculados por un software propio) no son valores densitométricos de masa por volumen (g/cm^3), sino de masa por superficie (g/cm^2), pero la correlación con los valores reales es muy buena, según se desprende de los estudios de exactitud

realizados (1 a 2% de error). El software también muestra los valores de T- y Z-score. La T-score es el número de desviaciones estándar que una determinada medida difiere de la media de la población adulta del mismo sexo. La Z-score es el número de desviaciones estándar que una determinada medida difiere con respecto a la media de la población de su misma edad y sexo. Para poder comparar las DMO obtenidas a partir de los dos densitómetros utilizados, en este trabajo hemos calculado una DMO estandarizada (DMOe) de acuerdo a algoritmos publicados previamente (Hui *et al.* 1997; Lu *et al.* 2001).

	DENSITÓMETRO	
	Norland	Lunar
DMOe		
Cadera =	$0.006 + (0.985 \times \text{DMO})$	$-0.023 + (0.939 \times \text{DMO})$
Columna =	$0.9743 \times (\text{DMO} - 0.969) + 1.0436$	$0.9683 \times (\text{DMO} - 1.100) + 1.0436$

3.1.8. Obtención de células

En este trabajo se obtuvieron células de sangre periférica para la obtención de ADN. Para ello se aislaron células nucleadas de sangre periférica a partir de sangre total tras la lisis de los hematíes mediante cloruro amónico (KHCO₃ 10 mM, NH₄Cl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4) y dos lavados posteriores con PBS (tampón fosfato salino 0.01M, pH=7.4) mediante centrifugación (1200 rpm, 5 minutos) en centrífuga clínica (García-Pérez *et al.* 2006b).

3.1.9. Obtención de ADN

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de células nucleadas aisladas de sangre periférica (ver apartado anterior 3.1.8) mediante un kit de extracción de ADN genómico (RealPure Extracción ADN genómico, REAL, Durviz, Valencia, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, este método consiste en una lisis celular mediante un detergente aniónico seguido por un paso de precipitación salina de las proteínas. El ADN se obtiene del sobrenadante tras la eliminación de las proteínas mediante precipitación con isopropanol. Tras un par de lavados con etanol al 70%, el ADN se resuspendió en tampón TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH=8) y se congeló a -80°C hasta su uso.

3.1.10. Cultivo de células MC3T3-E1 para la diferenciación osteoblástica

Para estudiar el efecto del CRi (Remifemin) sobre la diferenciación osteoblástica, se utilizaron cultivos de células MC3T3-E1 incubados con sueros de mujeres tratadas o sin tratamiento para establecer si variaban los niveles de fosfatasa alcalina (FA), un marcador de diferenciación osteoblástica. De las 82 mujeres incluidas en el estudio se tomaron un total de 25 mujeres tratadas y 20 no tratadas para este tipo de estudio.

Las células MC3T3-E1 son una línea celular pre-osteoblástica procedente de ratón. Estas células presentan una morfología similar a los fibroblastos y crecen en forma de monocapa. Las células MC3T3-

E1, se cultivaron en frascos de 75 cm² (Orange Scientific, Waterloo, Bélgica) con medio α -MEM (Invitrogen) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (libre de hormonas mediante absorción de carbono activo) y 1% de penicilina/estreptomicina en condiciones de 37°C y 5% de CO₂.

Cuando las células estuvieron a una confluencia del 100%, se lavaron los frascos con tampón fosfato salino (PBS) (Sigma) atemperado y se trataron con 1 ml de tripsina 1X (Invitrogen, Gibco) para despegar las células de la superficie del frasco. Tras dejar actuar la tripsina durante 2 o 3 minutos a 37°C, se recogieron las células, se hicieron nuevamente dos lavados con PBS y se centrifugó (700-1000 rpm 5 min). El precipitado de células obtenido se resuspendió en medio α -MEM y se sembraron 150.000 células/ pocillo en placas de 24 pocillos (Orange Scientific). Cada muestra (basal y 3 meses) se sembró por duplicado. Al llegar al 90% de confluencia, se añadió a los pocillos el suero (5% del volumen del pocillo) de mujeres tratadas con Remifemin (basal y 3 meses) o suero de mujeres sin tratamiento (basal y 3 meses). Además, a las células se les añadió vehículo (α -MEM) o inductores de la diferenciación osteoblástica (β -glicerofosfato (β -GP) 10mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml).

El cultivo se mantuvo durante 12 días, cambiando la mitad del medio cada tres días y añadiéndose también suero más vehículo (α -MEM) o suero más β -GP y ácido ascórbico. Tras este periodo de 12 días, se descartó el sobrenadante de cada pocillo, se lavaron las células

con PBS y se lisaron con Tritón 0.1% seguido de sonicación y centrifugación (5 minutos a 10.000 rpm, 4°C) para eliminar el precipitado. A partir del extracto celular obtenido por lisis y sonicación, se determinó la actividad fosfatasa alcalina.

3.1.11. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina

La determinación de la actividad FA se realizó mediante un kit comercial (ALP Reagent, THERMO Electron Corporation, Australia) que utiliza como sustrato el 4-nitrofenilfosfato. La FA presente en la muestra cataliza una reacción de transfosforilación del 4-nitrofenilfosfato dando 4-nitrofenóxido, un compuesto de color amarillo que presenta absorbancia a 405 nm. El incremento de absorbancia de este compuesto es proporcional a la actividad FA en el extracto celular. La reacción se monitorizó a 37°C midiendo el incremento de absorbancia del compuesto a 405 nm en un espectrofotómetro termostatizado. Las determinaciones de la actividad FA se hicieron por triplicado para cada muestra y las lecturas de la absorbancia se realizaron a intervalos de 5 minutos (de 0 a 15 min) para comprobar que el aumento de la absorbancia era proporcional al tiempo. A partir del mismo extracto celular se determinó también el contenido en proteínas (LOWRY *et al.* 1951). La actividad FA se expresó como absorbancia a 405 nm (mOD/min/ μ g proteína).

3.1.12. Tasa de expresión de genes relacionados con la diferenciación y función osteoblástica

Para estudiar si el CRi (Remifemin) afectaba a la expresión de genes relacionados con la diferenciación y la función osteoblástica, se realizó un estudio piloto con cultivos de células MC3T3-E1 incubadas con sueros de 10 mujeres tratadas y 5 sin tratar. Los genes escogidos para el estudio fueron el gen de la fosfatasa alcalina (FA), el gen de la osteocalcina (OC) y el gen *RUNX2* (*runt-related transcription factor 2*).

Para estudiar el efecto de CRi sobre la expresión de estos genes, se incubaron en placas de 6 pocillos (Orange Scientific) células MC3T3-E1 (500.000 células/pocillo) con 150 μ L de suero basal y de 3 meses de mujeres de ambos grupos (5% v/v), en presencia de medio α -MEM (3.150 μ L). A los pocillos también se les añadieron inductores de la diferenciación osteoblástica (β -GP y ácido ascórbico). El medio se cambió cada tres días, reponiendo también los inductores y el suero.

A los 10 días se retiró el sobrenadante, se lavaron las células con PBS y se añadió 1 ml de Trizol (Invitrogen) a las células para homogenizarlas y proceder a la extracción de ARN. El ARN se extrajo por el método Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Brevemente, se realizó una lisis celular mediante el reactivo Trizol tras la cual, y mediante la adición de cloroformo, se consigue la separación de la fase orgánica, conteniendo proteínas y lípidos, de la fase acuosa, que contiene el

ARN, quedándose el ADN en la interfase. A partir de la fase acuosa, se obtuvo el ARN mediante precipitación con isopropanol, se lavó con etanol al 75% (en agua tratada con DEPC) y, tras secarlo ligeramente al aire, se resuspendió en agua DEPC y se congeló a -80°C hasta su uso. Una vez obtenido el ARN, se midió su absorbancia a 260-280 nm en un espectrofotómetro y se sometió a electroforesis en gel de agarosa para evaluar la calidad y cantidad de dicho ARN. Seguidamente, se realizó la retrotranscripción del ARN (RT-PCR) partiendo de 1 μg de muestra mediante el kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen). El ADN complementario (ADNc) obtenido se amplificó mediante PCR semicuantitativa, usando los oligonucleótidos correspondientes para cada gen a estudiar. La expresión de cada gen se comparó con la de un gen de expresión constitutiva (GAPDH).

Los oligonucleótidos utilizados para cada gen estudiado fueron: *GAPDH* sentido 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' y antisentido 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'; *OC* sentido 5'-CTC TCC TAC AAG AAC GGC AC-3' y antisentido 5'-TCA CTA GCC AGA AAT CGG TGG-3'; *RUNX2* sentido 5'-CCG CAC GAC AAC CGC ACC AT-3' y antisentido 5'-CGC TCC GGC CCA CAA ATC TC-3'; *FA* sentido 5'-GGT GAA CGG GAA AAT GTC TC-3' y antisentido 5'-CTG GAC CTC TCC CTT GAG TG-3'.

Los productos obtenidos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y la intensidad de cada banda se cuantificó mediante

el programa informático Adobe Photoshop 7.0, usando la función histograma.

3.1.13. Cultivo de células endoteliales para la producción de prostaciclina

Para estudiar el efecto de la administración del CRi (Remifemin) sobre la producción de prostaciclina, se añadió suero de mujeres tratadas o sin tratar con Remifemin a cultivos de células HUVEC. Se trata de células procedentes de vena de cordón umbilical humano. Las células endoteliales se obtuvieron a partir de muestras procedentes de cordón umbilical humano por tratamiento mediante colagenasa tal y como describe Jaffe y col (Jaffe *et al.* 1973).

Las células se identificaron como endoteliales por su morfología y por la presencia, detectada mediante inmunohistoquímica, del Factor von Willebrand usando un anticuerpo específico (F-3520; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (Hermenegildo *et al.* 2005; Oviedo *et al.* 2005; Monsalve *et al.* 2007).

Las células se cultivaron en frascos de 75 cm² (Orange Scientific) en un medio específico para células endoteliales humanas (EBM-2) (Cambrex Science Walkersville MD) suplementado con EGM-2 (Cambrex Science Walkersville) en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂.

Después de 4 pases, las células se sembraron en placas de 24 pocillos (100.000 células/pocillo) para la determinación de prostaciclina. Cuando se alcanzó una confluencia del 80-90%, se cambió el medio EBM-2 por medio 199 1X sin rojo fenol (GIBCO, Invitrogen) suplementado con 20% de suero bovino fetal libre de hormonas (Invitrogen) (Hermenegildo *et al.* 2005; Oviedo *et al.* 2005; Monsalve *et al.* 2007), EGM-2, ácido pirúvico (1.1%) y antibiótico (Estreptomina 100µg/ml) y se mantuvo durante 24 horas. Seguidamente, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 450 µL de medio 199 1X sin rojo fenol y 50 µL de suero de pacientes tratadas con Remifemin (N=23) o de suero de pacientes sin tratar (N=23) (10% v/v) y se incubaron durante 24 horas. Para cada grupo de tratamiento, un pocillo fue usado para la muestra basal, otro para 3 meses y otro para 6 meses. Tras este periodo de tiempo, se retiró el sobrenadante y se congeló a -20°C hasta el ensayo de prostaciclina. Las células adheridas en los pocillos, se lavaron con tampón PBS y se recogieron con NaOH 0.5 N para la determinación de proteínas por el método de Lowry (LOWRY *et al.* 1951).

La cantidad de prostaciclina liberada en cada pocillo se estimó a partir de su producto de hidrólisis 6-ceto-prostaglandina F_{1α} mediante ELISA (Cayman Chemical). Cada medida se realizó por triplicado. La producción de prostaciclina fue expresada como ng de prostaciclina por mg de proteína.

Tanto otros investigadores como nosotros, hemos comprobado previamente el efecto del almacenamiento de las muestras hasta 6 meses (Mikkola *et al.* 1996; Garcia-Martínez *et al.* 2003). La concentración del suero y el tiempo de incubación se optimizaron en nuestro laboratorio y se adecuaron para asegurar que el efecto del suero en la producción de prostaciclina en las células endoteliales fuera óptima. También se confirmó que la concentración de 6-ceto-prostaglandina $F_{1\alpha}$ en la dilución 1/10 del suero no fuera detectable para así asegurar el origen endotelial de la prostaciclina.

Todas las muestras se analizaron individualmente. Para minimizar la variación analítica, las tres muestras procedentes de la misma mujer (basal, tres y seis meses) se procesaron de igual modo y al mismo tiempo.

3.1.14. Elección de genes candidatos y selección y priorización de los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs)

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha analizado, en la población de mujeres, la asociación a DMO de polimorfismos en los genes *RUNX2*, *OCIL*, *CD40* y *CD40L* (Tabla 3.1.). Los motivos para esta selección se dan en el epígrafe de *Introducción*, aunque muy brevemente, Runx2 es un factor de transcripción específico para osteoblastos (Komori *et al.* 1997b), OCIL es una lectina que inhibe la osteoclastogénesis (Nakamura *et al.* 2007) y que es expresada, entre otros, por los osteoblastos, y CD40 y CD40L parecen ser claves en la

regulación del metabolismo óseo basal a través de la regulación en la expresión de OPG por las células B y de IFN γ por los células T (López-Granados *et al.* 2007; Li *et al.* 2007).

Tabla 3.1. Genes y algunas características de los polimorfismos estudiados

GEN	SNP	Cambio	Posición
RUNX2	rs6921145	G>A	Exón 1, +198
	rs11498192	17Ala/11Ala	Exón 1
	rs7771980	T>C	Promotor P2, -1025
OCIL	rs16914640	C>G, Asn19Lys	Exón 1
	rs376402	C>G, Leu23Val	Exón 2
CD40	rs1883832	C>T	Secuencia Kozak (exón 1)
CD40L	rs1126535	T>C	Exón 1
	rs3092923	T>C	Intrón 4
	rs3092952	A>G	5'UTR

3.1.14.1. **RUNX2 (Cbfa1)**

El gen *RUNX2* se localiza en la posición p21 del cromosoma 6 abarcando 124.8 Kb de genoma. Contiene dos promotores (P1 y P2) y siete exones, dando dos isoformas distintas, *RUNX2*-I y II, ambas expresadas en osteoblastos y precursores osteoblásticos humanos (Shui *et al.* 2003). Los polimorfismos se eligieron tras realizar una búsqueda en PubMed de polimorfismos en *RUNX2* asociados a DMO.

De este modo se seleccionó un SNP (+198 G>A, rs6921145, posición en el cromosoma: 45.498.489) en la zona de repetición de alaninas en la región N-terminal (dominio poli-Ala) de la proteína Runx2 (Vaughan *et al.* 2002; Vaughan *et al.* 2004b), y un SNP funcional (-1025 T>C, rs7771980; posición en el cromosoma: 45.497.267) localizado en el promotor P2 (Doecke *et al.* 2006). Curiosamente, el SNP G>A rs6921145 está localizado dentro de otro polimorfismo de longitud (rs11498192) con alelos normales de 17 alaninas (17Ala) y alelos delecionados de 11 alaninas (11Ala) en la zona de repetición de alaninas de la proteína Runx2 (Vaughan *et al.* 2002; Vaughan *et al.* 2004a).

3.1.14.2. OCIL (*Osteoclast inhibitory lectin*)

El gen *OCIL*, también llamado LIT1 (*Lectin Like Transcript-1*) y cuyo nombre oficial es CLEC2D (*C-type lectin domain family 2, member D*), se encuentra situado en el cromosoma 12 humano, en la región p13, abarca alrededor de 27 Kb y contiene seis exones. De acuerdo con la base de datos de SNPs (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*), existían en el momento de la búsqueda 147 SNPs en el gen *OCIL* y en las regiones cercanas. Entre ellos, hay solo tres SNPs situados en la región traducible del gen, de los cuales dos son SNPs no sinónimos. Para el resto, seis de ellos se encuentran en la región 3'-UTR pero sin una heterocigosidad adecuada, y muchos de los otros SNPs están situados en los 6 intrones y regiones cercanas al gen. Finalmente, se seleccionaron los dos SNPs no sinónimos

situados en el exón 1 (C>G, Asn19Lys, rs16914640) y en el exón 2 (C>G, Leu23Val, rs376402). Estos dos polimorfismos se seleccionaron principalmente por cumplir dos requisitos: primero, se trata de SNPs con cambios predecibles en la secuencia de la proteína Ocil y, segundo, por presentar una adecuada heterocigosidad (0.243 para Asn19Lys SNP y 0.418 para Leu23Val en la población de estudio).

3.1.14.3. *CD40* y *CD40L*

El gen *CD40* se localiza en el cromosoma 20 humano en posición q12-q13.2. De acuerdo con la base de datos de SNPs NCBI, existían 117 SNPs en el momento de realizar la búsqueda en este gen y en las zonas adyacentes. Entre ellos, 8 polimorfismos están situados en la región traducible del gen, de los cuales 5 son no sinónimos, 9 se sitúan en la zona 5'-UTR o 3'-UTR, y el resto se encuentran en intrones y zonas cercanas al gen. Entre todos los polimorfismos funcionales para el gen *CD40* solo se encontró uno que presentaba una heterocigosidad apropiada para la población caucásica. Este polimorfismo se localiza en la región 5'-UTR, concretamente en la posición -1 de la secuencia consenso Kozak del gen *CD40*. La secuencia consenso Kozak es una secuencia corta de reconocimiento que facilita la unión inicial del ARNm a la subunidad pequeña del ribosoma (Kozak 1986). La secuencia consenso en la mayoría de los ARNm eucariotas es ACCAUGG, mientras que para el gen *CD40* es GCCCAUGG, siendo la C subrayada la posición en la que se encuentra el polimorfismo (C>T;

rs1883832) y AUG el codón de inicio para la traducción. Este es un SNP funcional ya que se ha descrito que las células B derivadas de individuos con genotipo TT presentan niveles menores de proteína CD40 como consecuencia de una menor eficiencia en la traducción (Jacobson *et al.* 2005).

El gen *CD40L* se localiza en el cromosoma X humano en la región 26, y presenta 5 exones. De acuerdo con la base de datos de SNPs (NCBI), en el momento del análisis había 84 SNPs en el gen *CD40L* y zonas cercanas. Las herramientas que se utilizaron para identificar el número de bloques haplotípicos y la potencial funcionalidad de los polimorfismos fueron las bases de datos PupaSuite (<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es>) (Conde *et al.* 2006) y FastSNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw/>) (Yuan *et al.* 2006) respectivamente. El análisis mostró dos bloques haplotípicos (Figura 3.1) que cubrían aproximadamente desde la región 5'UTR del gen hasta el intrón 2 (bloque1) y desde el intrón 4 hasta la región 3'UTR (bloque 2). Se buscaban SNPs que presentaran una buena heterocigosidad y una frecuencia alélica para el alelo minoritario en caucásicos mayor del 5%, por ello se seleccionó un SNP A>G situado en la región 5'UTR región (rs3092952, posición cromosómica 135726950) y un SNP sinónimo T>C localizado en el exón 1 (rs1126535, posición cromosómica 135730555) para el bloque 1 y, para el bloque 2, el SNP T>C localizado en el intrón 4 (rs3092923, posición cromosómica 135741185). El programa FastSNP asignó un riesgo bajo-medio para el SNP sinónimo rs1126535 y un riesgo bajo

para rs3092923 y rs3092952, aunque este último ya había sido asociado a niveles variables de proteína CD40L en plasma (Malarstig *et al.* 2006).

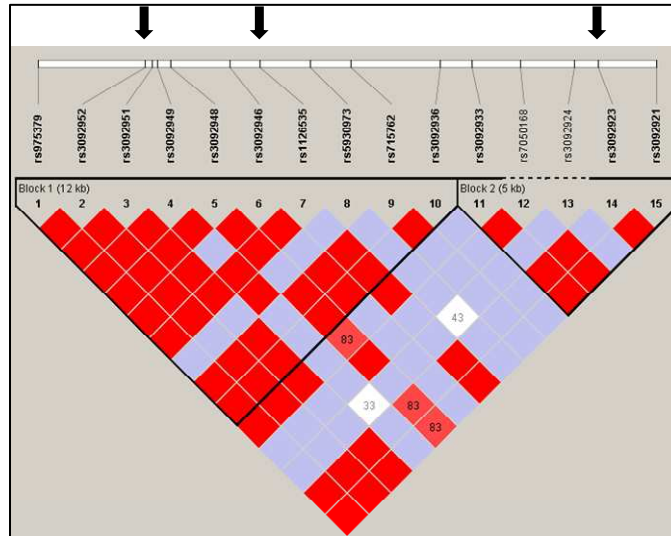


Figura 3.1 Bloques haplotípicos encontrados en el estudio del gen CD40L

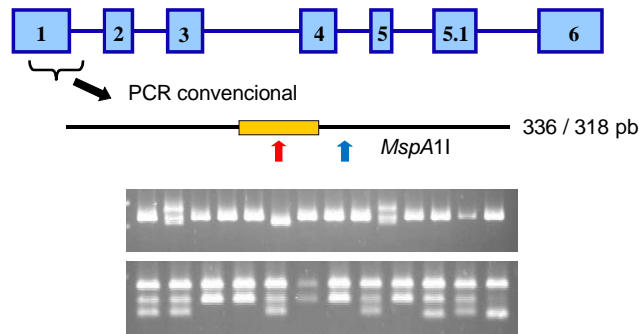
3.1.15. Genotipado

Para establecer el genotipo de las participantes en el estudio se usaron, o bien PCR-RFLP para los polimorfismos rs6921145 (G>A, +198) y rs11498192 (17Ala/11Ala) del gen *RUNX2*, o bien PCR cuantitativa a tiempo real usando sondas TaqMan para el resto de los SNPs.

El genotipado del polimorfismo para la delección 17Ala>11Ala (rs11498192) y para el polimorfismo sinónimo G>A (rs6921145) de *RUNX2*, se realizó mediante PCR-RFLPs convencionales usando el

enzima de restricción *MspAII* (Vaughan *et al.* 2004c). Brevemente, el ADN genómico se amplificó mediante PCR (condiciones: 5 min a 94°C, 37 ciclos (25 seg a 94°C, 25seg a 55°C, 30seg a 72°), 4 min a 72°) usando 10 ng de ADN genómico en una mezcla de reacción conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 15 mM MgCl₂ y 0.001% de gelatina, 0.2 mM dNTPs, 0.4 U de Taq polimerasa (Sigma) y 2 µM de los siguientes oligonucleótidos específicos 5'-CCG GCA AAA TGA GCG ACG-3' y 5'-GGG CGG TGT AGC CTC TTA CCT T-3' en un termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). Los fragmentos obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3.5% y como resultado de la amplificación se obtuvo un fragmento de 336 pb para el alelo salvaje (17Ala) y un fragmento de 318 pares de bases para el alelo con la delección de 6 alaninas (11Ala).

Los productos de PCR obtenidos se digirieron con 10 U del enzima de restricción *MspAII* (New England Biolabs, Ipswich, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante para revelar el polimorfismo rs6921145 (G>A). En el fragmento amplificado hay un sitio de corte no polimórfico para *MspAII* que rinde dos fragmentos de 180 y 156 pb. Si adicionalmente existe el sitio polimórfico, el fragmento de 156 se divide en dos de 135 y 21 pb. Por último, el alelo 11Ala únicamente da los fragmentos, de 180 y 156 pb, ya que el sitio polimórfico cae dentro de la delección (Figura 3.2.)



Genotipos: GG, GA, AA, del/G, del/A, del/del
 Figura 3.2. Esquema de los genotipos obtenidos para los polimorfismos rs6921145 (G>A, +198) y rs11498192 (17Ala/11Ala) del gen RUNX2 mediante digestión enzimática.

Por consiguiente se pueden encontrar en este sistema 6 genotipos distintos: homocigotos para el alelo 17Ala (para la deleción) + GG o GA o AA (para el SNP G>A), heterocigotos para el alelo 17Ala/11Ala y G- o A- (11Ala ha perdido la secuencia diana para *MspA1I*), u homocigotos 11Ala/11Ala. Todos los productos obtenidos de la digestión con *MspA1I* se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 3.5%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Aproximadamente, entre el 0.1-3.0% de los genotipos fueron ambiguos y las muestras fueron analizadas de nuevo.

El genotipado de los restantes SNPs estudiados en el presente trabajo se llevó a cabo mediante discriminación alélica utilizando la metodología de las sondas TaqMan (Genotyping Assays; Applied

Biosystems) en PCRs a tiempo real. Para ello se utilizó el sistema 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante (Pineda *et al.* 2008a; Pineda *et al.* 2008b).

La ventaja de la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestra secuencia de interés. Brevemente, la metodología de las sondas TaqMan, se basa en la utilización de un oligonucleótido de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia de la secuencia que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida en su extremo 5' una molécula fluorescente, llamada "reporter" o fluoróforo donador, y otra molécula en el extremo 3' llamada "quencher" o molécula aceptora. Mientras la estructura de la sonda esté intacta, el "quencher" inhibirá la fluorescencia del "reporter". Este proceso conocido como FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). De este modo, sólo cuando la sonda, perfectamente apareada a su diana, es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa, la molécula fluorescente, o "reporter", se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser (Figura 3.3.). La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando.

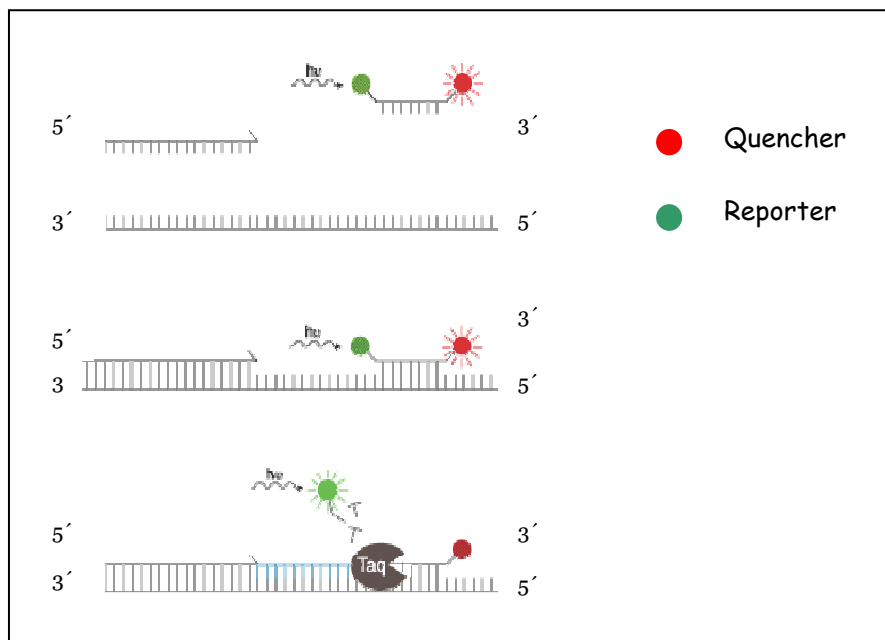


Figura 3.3. Esquema de la metodología sondas TaqMan

En el caso de la discriminación alélica, se utilizan dos sondas diferentes marcada cada una con un fluoróforo distinto para poder diferenciar los dos alelos del polimorfismo (Figura 3.4.).

Para el genotipado de los polimorfismos estudiados mediante sondas TaqMan, se amplificaron 20 ng de ADN genómico en placas de 96 pocillos en presencia de sondas TaqMan 1X y TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 1X. El análisis de la discriminación alélica se realizó mediante el programa del termociclador 7900 HT. La reproducibilidad del ensayo fue estimada por el re-genotipado del 7% de las muestras en cada placa y fue siempre mayor del 99%. Aproximadamente el 0.5 % de los genotipos

fueron ambiguos, principalmente debido a baja amplificación, por lo que las muestras fueron re-genotipadas.

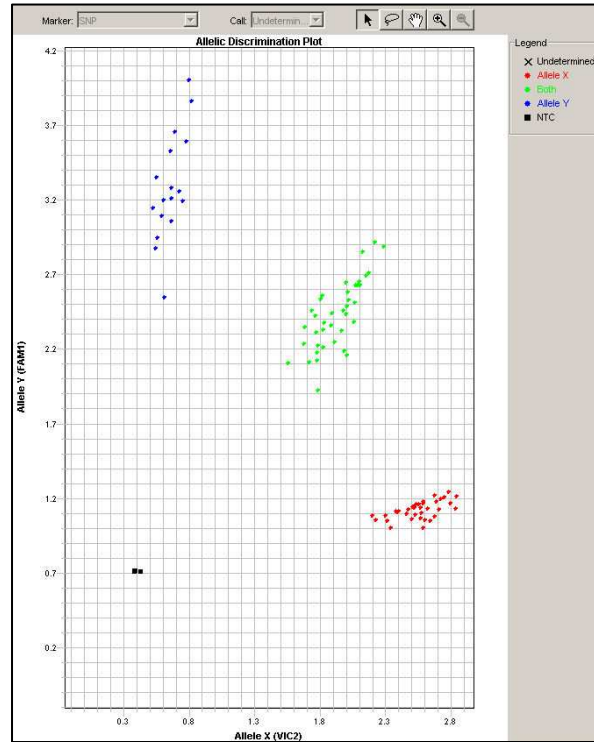


Figura 3.4. Resultado de un ensayo de discriminación alélica mediante sondas TaqMan. Se obtienen diferentes fluorescencias para cada uno de los genotipos.

3.1.16. Secuenciación de variantes raras en el dominio polyQ/polyA de *RUNX2*

Las muestras que presentaron un patrón de bandas diferente al esperado, según la secuencia del gen (Vaughan *et al.* 2002; Vaughan *et al.* 2004c), fueron sometidas a secuenciación. Para ello se separaron las bandas amplificadas mediante geles de poliacrilamida al 12%, se recortaron las dos bandas y se dejaron eluir pasivamente del gel de acrilamida en TBE durante una noche. Ambos fragmentos fueron reamplificados usando los mismos oligonucleótidos y se obtuvieron amplificaciones esencialmente puras en cada una de las bandas. Los productos de PCR fueron preparados para secuenciación tras ser purificados mediante resinas de exclusión molecular Sephadex G-50 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). La reacción de secuenciación se realizó utilizando 0.3 μ L de mezcla de secuenciación (BigDye, versión 3.1; Applied Biosystems), 6 pmoles de oligonucleótidos, 0.6 μ l de tampón de secuenciación 5X, 3% DMSO y 2 μ l de producto de PCR en un volumen final de 5 μ l. Las condiciones fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial a 96°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos a 96°C 30 s, 62°C 4 minutos, y un paso final de 72°C 15 minutos. El producto de secuenciación fue purificado usando Sephadex G-50 y secado a 95°C durante 45 min. El ADN seco, fue resuspendido en 5 μ l de Hi-Di™ Formamida (Applied Biosystems). A continuación los fragmentos se analizaron electroforéticamente usando el sistema DNA Analyzer 3730 (Applied Biosystems).

3.2 ESTUDIO EN MODELO ANIMAL

3.2.1. Ratones

En este trabajo se usaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 10-12 semanas de edad (Charles River Laboratories, Barcelona, España). Tras la llegada, los ratones se mantuvieron alrededor de cuatro días bajo condiciones adecuadas para su aclimatación en las instalaciones del estabulario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de Valencia. Los animales se mantuvieron a 21°C con ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas y con libre acceso a agua y comida de ratón de laboratorio con una composición de 0.88% de calcio, 0.59% de fósforo y 900 UI/Kg de vitamina D3 (Panlab SL, Barcelona, España). Todos los procedimientos para el bienestar de los animales fueron revisados y aprobados por el comité ético.

3.2.2. Ovariectomía

En este trabajo se utilizó el ratón sometido a ovariectomía bilateral (OVX) como modelo animal de pérdida ósea acelerada (García-Pérez *et al.* 2006a; García-Pérez *et al.* 2006b; Cano *et al.* 2008a). Este procedimiento quirúrgico fue realizado por la veterinaria titular de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de Valencia usando técnicas estándar. Los ratones fueron operados dorsalmente para la eliminación del tejido ovárico bajo anestesia general, utilizando 150 mg/Kg de Ketamina (Merial, Lyon, Francia) y 5 mg/Kg de acepromazina (Calmo Neosan, Pfizer, NY). En este trabajo siempre se usaron como controles ratones falsamente operados

(SHAM) a los que se les hacía la incisión, se removía el tejido ovárico, pero no se les extraía, con el fin de igualar al máximo las condiciones de manipulación entre estos ratones y los verdaderamente ovariectomizados.

3.2.3. Administración de tratamientos

En este trabajo de Tesis Doctoral se propuso analizar el efecto de la administración de agonistas del receptor de estrógenos como el estradiol, el raloxifeno y la genisteína, sobre el sistema inmune, el metabolismo óseo y la microestructura ósea en el modelo animal de pérdida ósea acelerada como es el ratón OVX (García-Pérez *et al.* 2006a; García-Pérez *et al.* 2006b; Cano *et al.* 2008a). Para ello, se dividieron los ratones en 5 grupos: ratones SHAM (falsamente operados, N = 6), ratones ovariectomizados sin tratamiento (OVX, N = 6) y ratones ovariectomizados tratados con 17β -estradiol (E2, N = 8), raloxifeno (RAL, N = 8) o genisteína (GEN, N = 8). Todos los compuestos se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO). A los ratones del grupo SHAM y OVX se les inyectaron subcutáneamente 100 μ l de vehículo (10% DMSO, 90% aceite de sésamo; Sigma) 5 veces a la semana. Al resto de los grupos se les inyectó 17β -estradiol (0.1 μ g/ratón/día = 5 μ g/Kg/día), raloxifeno (20 μ g/ratón/día = 1 mg/Kg/día) o genisteína (0.5 mg/ratón/día = 25 mg/Kg/día) disueltos en vehículo a partir del tercer día de la intervención. Las dosis administradas equivalen a dosis equipotentes de acuerdo con la capacidad estrogénica de cada agonista utilizado y

se seleccionaron en base a las dosis usadas frecuentemente en la literatura (Black *et al.* 1994a; Ishimi *et al.* 1999; Cenci *et al.* 2000; Erlandsson *et al.* 2002b; Modder *et al.* 2004b).

Los ratones se sacrificaron 4 semanas después de haber iniciado el tratamiento mediante punción intracardíaca bajo anestesia con halotano (Fluothano; Zeneca, Macclesfield, Reino Unido), y se les extrajo asépticamente sangre, el bazo, el útero y el fémur. El útero fue pesado para confirmar el éxito de la ovariectomía y el efecto del tratamiento. El bazo y el fémur se procesaron inmediatamente. La sangre se procesó y se separó el suero, que fue congelado a -80°C hasta su análisis.

3.2.4. Obtención de los tejidos y cultivos celulares

En este trabajo se aislaron rutinariamente células de bazo y de médula ósea de los ratones en condiciones lo más asépticas posibles trabajando, en la medida de lo posible en campana de flujo laminar. Para obtener las células de bazo, una vez obtenido el órgano se depositaba en placas petri de 3 cm en medio PBS y se desintegraba el bazo suavemente con la ayuda de un bisturí. Las células de la médula ósea se aislaron del fémur derecho de los animales mediante centrifugación (Cenci *et al.* 2000). Brevemente, tras retirar el tejido blando adherido al hueso, se cortaron los extremos del fémur con bisturí y se introdujo en un tubo de centrifuga estéril de 0.6 ml con la base perforada y, todo ello, se introdujo a su vez dentro de otro tubo de centrifuga estéril de 1.5 ml. Las células de la médula ósea se

extrajeron del fémur mediante centrifugación durante 1 min a 10000 x g a 4°C en una microcentrífuga refrigerada Eppendorf (modelo 5415R, Hamburgo, Alemania) y se resuspendieron inmediatamente en tampón PBS frío. Los hematíes del bazo y de la médula ósea se lisaron en una solución de NH₄Cl 150 mM, KHCO₃ 10 mM, y EDTA 0.1 mM a pH 7.4 y se lavaron dos veces con PBS mediante centrifugación. Una alícuota de las células se utilizó para obtener ARN, y el resto, para determinar las subpoblaciones celulares mediante citometría y para los ensayos de proliferación celular en respuesta a mitógenos.

3.2.5. Parámetros séricos

En el suero de los animales se determinaron diversos marcadores de metabolismo óseo. Así, el calcio sérico se midió mediante un kit comercial (Calcium, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) basado en la reacción con la o-cresoltaleina. Al reaccionar, los dos metabolitos forman un complejo que adquiere un color rojo a pH 10-12 y que presenta absorbancia a 575 nm. La intensidad del color a esta longitud de onda, será directamente proporcional a la concentración de calcio en la muestra.

La fosfatasa alcalina total se midió mediante otro kit comercial (ALP, Sigma, St. Louis, MO). Brevemente, esta determinación se basa en la hidrólisis en medio alcalino del p-nitrofenil fosfato por la fosfatasa alcalina. Como producto de la reacción se forma p-nitrofenol, además de fosfato inorgánico, el cual presenta una absorbancia máxima a 405 nm. El aumento de la absorbancia a esa

longitud de onda será directamente proporcional a la actividad fosfatasa alcalina en la muestra.

La piridolina sérica total (PYD) se determinó mediante un inmunoensayo enzimático competitivo (PYD EIA kit, Quidel Corporation, San Diego, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la piridolina presente en la muestra compete con la piridolina inmovilizada en la placa de ensayo por la unión a los anticuerpos policlonales anti-PYD presentes en el medio. La unión a estos anticuerpos se detectará mediante otro anticuerpo conjugado con el enzima fosfatasa alcalina que hidrolizará al sustrato *p*-nitrofenil fosfato. Como producto de la reacción se forma *p*-nitrofenol el cual presenta una absorbancia máxima a 405 nm. El aumento de absorbancia a esa longitud de onda será inversamente proporcional a la cantidad de piridolina existente en la muestra.

Los niveles séricos de IL-6, IFN- γ y IL-2, se determinaron mediante ELISA (Diacclone, Besançon, Francia).

La actividad enzimática de la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), se determinó mediante ensayo colorimétrico en microplaca. En este ensayo, se utilizó *p*-nitrofenil fosfato (10 mM) como sustrato en tampón acetato sódico 100 mM a pH 5.0, tartrato sódico 20 mM y 0.1% (v/v) Tritón X-100. Las muestras de suero (20 μ l) se añadieron a 250 μ l del sustrato y se incubaron a 37°C durante 60 min. La reacción se paró mediante la adición de 75 μ l de NaOH 0.5 M, y se midió la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de placas (Bio-Rad modelo 550, Richmond, CA, USA).

3.2.6. Proliferación celular y análisis de viabilidad

La proliferación y la viabilidad celular se evaluaron mediante ensayo colorimétrico de XTT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). basado en la transformación de sales de tetrazolio (XTT) en una sal soluble de formazán por deshidrogenasas mitocondriales de mitocondrias intactas. La cantidad de sales de formazán producida durante el ensayo, que se evalúa mediante determinación de la absorbancia a 450 nm, está relacionada con el número de células el número de células metabólicamente activas dentro del cultivo. Para este ensayo, se sembraron en placas de 96 pocillos (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica) células de bazo (2×10^5 células/100 μ l) o células de médula ósea (5×10^4 células/100 μ l) en RPMI-1640 o α -MEM, respectivamente, suplementado con glutamina, antibióticos y 10% de suero bovino fetal (SBF), en condiciones de 37°C y 5% CO₂ durante tres días. Los estímulos utilizados (Tabla 4.26 del apartado *Resultados*) fueron añadidos por triplicado. Tras la incubación, se añadieron 50 μ l de sustrato XTT a cada pocillo y se incubó en las mismas condiciones indicadas anteriormente. La absorbancia se midió a 450 nm mediante espectrofotómetro de placas. Los datos de proliferación reflejados representan el cociente entre la proliferación en presencia de cada estímulo (por triplicado) y la proliferación de las mismas células incubadas con vehículo (RPMI, α -MEM, etanol o dimetilsulfoxido (DMSO)).

3.2.7. Subpoblaciones celulares en bazo y médula ósea mediante citometría de flujo

Las células se marcaron con anticuerpos monoclonales anti CD3, CD4, CD28, CD11, CD4 y CD19 siguiendo las diluciones y condiciones indicadas por el fabricante. Las células de bazo y médula ósea (1×10^6) se incubaron durante 30 minutos en hielo con los anticuerpos correspondientes y después se lavaron y resuspendieron en PBS conteniendo 1% de BSA y 0.1% de azida sódica. Las señales no específicas se estimaron por incubación de IgG de rata conjugada con FITC y PE como controles. Las células marcadas se analizaron con el sistema de citometría de flujo EPICS-XL (Beckman Coulter). Los datos se expresaron como porcentaje de células positivas y como células totales por fémur o bazo.

3.2.8. Extracción de ARN y RT-PCRs semicuantitativas

La extracción de ARN total de células de médula ósea o de bazo se realizó utilizando el método Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se realizó una lisis celular mediante el reactivo Trizol tras la cual, y mediante la adición de cloroformo, se consigue la separación de la fase orgánica conteniendo proteínas y lípidos, de la fase acuosa que contiene el ARN, quedándose el ADN en la interfase. A partir de la fase acuosa, se obtuvo el ARN mediante precipitación con isopropanol, se lavó con etanol al 75% (en agua tratada con DEPC), y tras secarlo ligeramente al aire, se resuspendió en agua DEPC y se congeló a -80°C hasta su

uso. La integridad del ARN se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa y se midió su concentración por absorciometría.

Tras la obtención del ARN, se realizó una reacción de retrotranscripción (RT-PCR) partiendo de un microgramo de ARN total por medio de un kit de síntesis de ADN complementario (ADNc) (ThermoScript RT-PCR System, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (volumen final de reacción 20 μ L). El ADN complementario de cadena simple obtenido, se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativa, usando el enzima Taq polimerasa (Sigma) y los oligonucleótidos correspondientes para cada gen a estudiar (Tabla 3.2.). Para asegurarnos de que todas las muestras presentaban la misma cantidad de ADNc y para poder realizar la semicuantificación de los productos de PCR, las muestras de ARN retrotranscritas también se amplificaron con oligonucleótidos específicos para un gen de expresión constitutiva, GAPDH (gliceraldehido 3'-fosfato deshidrogenasa). Las amplificaciones se realizaron en termocicladores GeneAmp 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), utilizando ciclos de temperatura de acuerdo a la longitud y temperatura de fusión de los oligonucleótidos. El número de ciclos para cada par de oligonucleótidos se estableció de la curva lineal de amplificación obtenida en los primeros experimentos. Para cada reacción de PCR, algunas muestras se sometieron a 12-15 ciclos de amplificación extra para asegurar la semicuantificación. Los productos amplificados de la PCR se separaron en geles de agarosa al 2% mediante electroforesis, se tiñeron con bromuro de etidio y se

visualizaron mediante un transiluminador de luz ultravioleta. La intensidad del bromuro de etidio que presentaba cada banda al ultravioleta, se cuantificó utilizando la función histograma del programa informático Adobe PhotoShop versión 7.0 (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA) en imágenes en escala de grises y se normalizó respecto al gen GAPDH (García-Pérez *et al.* 2006a; García-Pérez *et al.* 2006b).

Tabla 3.2. Secuencia de los oligonucleótidos usados para cada gen estudiado.

GEN		Oligonucleótidos
GAPDH	Sentido	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	Antisentido	5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'
CD25	Sentido	5'-CTCTCCTACAAGAACGGCAC-3'
	Antisentido	5'-TCACTAGCCAGAAATCGGTGG-3'
Runx2	Sentido	5'-CCGCACGACAACCGCACCAT-3'
	Antisentido	5'-CGCTCCGGCCACAAATCTC-3'
OPG	Sentido	5'-GCTGAGTGTTTTGGTGGACA-3'
	Antisentido	5'-GCTCGATTTGCAGGTCTTTC-3'
Catepsina K	Sentido	5'-CTTGTGGACTGTGTGACT-3'
	Antisentido	5'-ACACTGCATGGTTCACA-3'
Osteocalcina	Sentido	5'-AAGCAGGAGGGCAATAAGGT-3'
	Antisentido	5'-AGCTGCTGTGACATCCATAC-3'
RankL	Sentido	5'-CATTTGCACACCTCACCATC-3'
	Antisentido	5'-AAGGGTTGGACACCTGAATG-3'
TRAP	Sentido	5'-ACTTCCCAGCCCTTACTACC-3'
	Antisentido	5'-TCAGCACATAGCCCACACCG-3'
IFN-γ	Sentido	5'-TCTTGGCTTTGCAGCTCTTCC-3'
	Antisentido	5'-CGAATCAGCAGCGACTCCTTTTC-3'

3.2.9. Análisis de la microarquitectura trabecular y cortical en 3D mediante microtomografía computerizada (μ -TC)

En este trabajo de Tesis Doctoral se planteó analizar el efecto comparativo de la administración de compuestos agonistas del receptor de estrógenos sobre la microestructura del hueso trabecular y cortical y sobre la DMO volumétrica en el modelo animal de pérdida ósea acelerada como es el ratón sometido a ovariectomía bilateral (OVX) (Cano *et al.* 2008b). Para ello, tratamos durante 4 semanas a ratones pertenecientes a 5 grupos distintos: ratones OVX, ratones SHAM, y ratones OVX que recibieron estradiol (E2), raloxifeno (RAL) o genisteína (GEN) (véase epígrafe 3.2.3).

Una vez finalizada la administración de los distintos compuestos, se obtuvieron los fémures a los que se les eliminó bajo una lupa el tejido blando adherido mediante un bisturí, y a continuación se les depositó en una solución de formaldehído para su envío y posterior análisis que fue realizado por los Drs. Caeiro y Dapía en Ourense (Trabeculae S.A.). A partir de los fémures de los ratones, y sin tratamientos adicionales de las muestras, se procedió al análisis de la región distal de los fémures mediante microtomografía computerizada (μ -TC) usando el aparato SkyScan 1172 (Kontich, Bélgica). Los huesos fueron escaneados mediante rayos X (50 kV de voltaje y 200 μ A de corriente y filtro de aluminio de 0.5-mm). La rotación angular del escaneado fue de 185°, y el incremento angular de 0.45°. Los datos obtenidos fueron reconstruidos usando el algoritmo Feldkamp modificado (Feldkamp *et al.* 1984), y se segmentaron en imágenes

binarias (imágenes 8-bit BMP) usando un límite local adaptado. Para analizar las propiedades microestructurales tanto del hueso trabecular como del hueso cortical, las muestras de fémur fueron evaluadas de acuerdo a la región de interés establecida (ROI). En el caso de la zona de hueso trabecular, el ROI seleccionado empezaba a 1.4 mm de la placa de crecimiento extendiéndose longitudinalmente hasta 2.70 mm en dirección proximal (202 cortes de imágenes analizadas, hueso cortical excluido). Para la región de hueso cortical, el ROI seleccionado abarcaba una distancia proximal desde 2.75 mm hasta 3.4 mm mm partiendo desde la placa de crecimiento (100 imágenes analizadas) (Figura 3.5.).

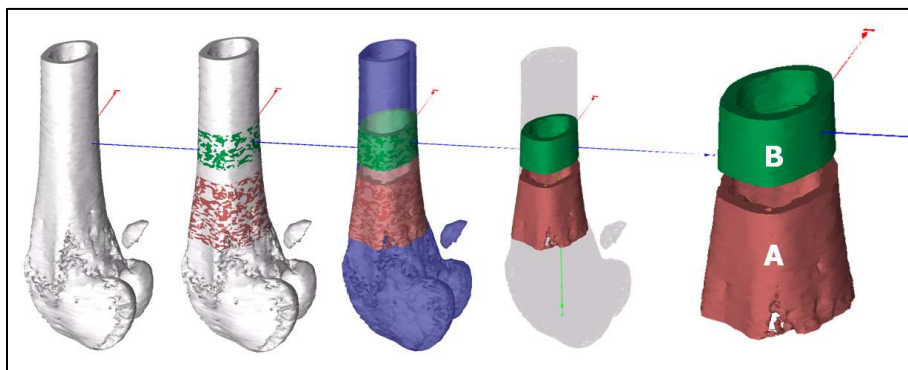


Figura 3.5. Zonas del fémur (ROI) utilizadas para el análisis de la propiedades microestructurales de hueso trabecular (región A) y cortical (región B).

Tanto las regiones de hueso trabecular como las regiones de hueso cortical fueron analizadas utilizando el programa comercial facilitado por el sistema (Sky-Scan™ CT-analyzer software, versión 1.6.0). Los índices morfométricos de la región de hueso trabecular se determinaron a partir de los datos microtomográficos obtenidos usando microtomografía 3D directa.

El volumen total ocupado por el ROI (TV, mm³) y el volumen de hueso trabecular (BV; mm³) se calcularon basándose en algoritmos habituales (*hexahedral marching cubes volume model*) para el análisis del ROI (Muller & Ruegsegger 1995). El volumen de hueso trabecular (BV/TV; %) fue calculado directamente. El grosor trabecular (Tb.Th; mm), la separación trabecular (Tb.Sp; mm), y el número de trabéculas (Tb.N; 1/mm) se midieron directamente en imágenes 3D usando métodos descritos previamente (Hildebrand & Ruegsegger 1997a; Ulrich *et al.* 1999). Las medidas del grosor trabecular se realizaron, previo calibrado, mediante escaneado y análisis de tres láminas de aluminio con grosores de 50, 125 y 250 µm. Los índices no numéricos como el índice de modelo estructural (SMI) y el factor de patrón de hueso trabecular (Tb.Pf; 1/mm) se calcularon también usando el modelo 3D directo. El parámetro SMI indica la prevalencia relativa de trabéculas en forma de plato o en forma de tubo en una estructura 3D (Hildebrand & Ruegsegger 1997b). El grado de anisotropía DA es una medida de la simetría del objeto, o de la presencia/ausencia de estructuras alineadas en una determinada dirección por lo que representa la isotropía trabecular, y se define como la proporción entre

el radio máximo y mínimo de la longitud media de intercepción (LMI) (Harrigan & Mann 1984). El factor de patrón trabecular (Tb.Pf; 1/mm) es un índice de conectividad inverso, es decir, cuanto más alto es el valor de Tb.Pf menos conectadas están las trabéculas. Por tanto, mide la conectividad relativa o concavidad de la superficie ósea total basándose en el principio de que la concavidad de las superficies trabeculares implica conectividad, mientras que la convexidad indica estructuras desconectadas y aisladas (Hahn *et al.* 1992).

Las variables morfométricas de la región de hueso cortical se calcularon mediante imágenes de secciones transversales individuales obtenidas en 2D. Las variables que se evaluaron fueron el perímetro cortical periostio (Ct.Pe.Pm; mm), el perímetro cortical endostio (Ct.En.Pm; mm), la media del momento polar de inercia (MMI; mm⁴) que es un índice básico de resistencia mecánica que indica la resistencia a la rotación de una sección transversal en un eje determinado (asumiendo propiedades biomecánicas materiales uniformes), el grosor de la sección transversal (Cs.Th; mm) y el área de hueso media de las secciones transversales (B.Ar; mm²). El coeficiente de variación para todas estas medidas fue <5%.

3.2.10. Determinación de la densidad mineral ósea volumétrica (vBMD) mediante imágenes de micro-TC.

La densidad mineral ósea volumétrica trabecular, cortical y total (vBMDtrab, vBMDc y vBMDt, respectivamente) se estimó mediante micro-TC. La vBMDc y la vBMDtrab se calcularon según el VOI,

anteriormente descrito, para la región cortical y trabecular, respectivamente. La vBMDt se calculó en la región trabecular anteriormente descrita (hueso cortical incluido). El escáner tomográfico fue realizado *ex vivo* sobre los fémures como se ha comentado en el epígrafe anterior. Cada píxel de la imagen reconstruida (imágenes 8-bit BMP) tiene un color o un valor de gris entre 0 y 255. Los valores de gris iguales a 225 fueron considerados como blanco (espacio vacío), mientras que valores de gris iguales a 0 se consideraron como negro (parte densa de la imagen). Para expresar los valores de gris obtenidos como el contenido mineral, se emplearon tubos fantasma de hidroxiapatita de 2 mm de diámetro sumergidos en agua pura con una vBMD concreta (0.25 g/cm^3 y 0.75 g/cm^3).

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La distribución de las variables se analizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La comparación de medias para los datos que presentaban una distribución normal, se realizó utilizando modelos anidados de efectos fijos y efectos mezclados de ANOVA y ANCOVA. Si mediante estos tests se obtenían diferencias significativas, se aplicaba el test de Dunnett (varianzas iguales) o el test T3 de Dunnett (varianzas desiguales). El test de Levene se empleó para establecer la homogeneidad de las varianzas. Las variables continuas que no mostraron una distribución normal se analizaron mediante tests no paramétricos (Kruskal-Wallis) o paramétricos previa transformación logarítmica. Mediante el análisis de la covarianza

(ANCOVA) y análisis de regresión se examinaron las diferencias de la DMO total o del parámetro Z-score corrigiendo por edad según el genotipo, tras ajustar por variables de confusión que fueron, según el estudio realizado, años desde la menopausia, IMC, estatus de la menopausia (pre-perimenopausia, posmenopausia), uso y tiempo de uso de THS, consumo de tabaco y tipo de densitómetro según el trabajo. Para comparaciones múltiples se aplicó el test de Bonferroni. El riesgo relativo (con intervalos de confianza del 95%) ajustado por las variables de confusión, fue calculado por análisis de regresión logística para estimar el riesgo relativo de sufrir osteopenia u osteoporosis ($T\text{-score} \leq -1$). Para comprobar la homogeneidad de la población de estudio, se analizó las frecuencias alélicas y la existencia del equilibrio Hardy-Weinberg mediante el programa Haploview 3.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (Barrett *et al.* 2005), y la construcción de haplotipos se realizó mediante PHASE 2.1 (Stephens *et al.* 2001; Stephens & Scheet 2005). El modelo de herencia (codominante, dominante, sobredominante y recesivo) se analizó mediante el programa SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>) (Sole *et al.* 2006). La estructura de la población se examinó mediante el programa STRUCTURE v2.2 (Pritchard *et al.* 2000). Cada análisis se realizó sin una previa asignación de la población y se realizó al menos cinco veces obteniendo resultados similares usando 10.000 replicas. La estimación del número correcto de poblaciones (K) se basó en la inspección visual de las respectivas probabilidades y de la distribución

de las poblaciones entre los grupos deducidos. Para evaluar la interacción entre genes (*CD40-CD40L*), se utilizó ANOVA de dos factores. El tamaño muestral y el poder de estimación se evaluaron mediante el programa QUANTO (<http://www.hydra.usc.edu/GxE/>) (Gauderman 2002). Los valores mostrados en el texto y en las tablas se presentan como media \pm desviación estándar, si no se indica lo contrario. El nivel de significación fue $P < 0.05$. El análisis estadístico se realizará mediante el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS).

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIOS EN HUMANOS**4.1.1. Descripción de la población de mujeres participantes en los estudios**

Las características clínicas, antropométricas y su estado menopáusico (pre-peri/posmenopáusica) de la población estudiada (media \pm DE) aparecen en la Tabla 4.1. Como puede apreciarse, la población de estudio está compuesta mayoritariamente de mujeres posmenopáusicas con unos ADM de 6.0, lo cual indica que se encuentran en una menopausia reciente. En la población hay un 26.8 % de mujeres con menopausia quirúrgica (ver epígrafe siguiente).

En la Tabla 4.2 aparecen los valores medios obtenidos para los distintos parámetros bioquímicos analizados, incluyendo marcadores de remodelado ósea como CTx y FA, hormonas (PTH, estradiol y FSH) y niveles de 25-OH-vitamina-D3 y de OPG.

Tabla 4.1. Datos clínicos y antropométricos y estado menopáusico de nuestra población global (N = 811).

	Media \pm DE
Edad (años)	52.8 \pm 6.5
Adm (años)	6.0 \pm 6.4
Peso (kg)	66.2 \pm 10.9
Altura (cm)	157.7 \pm 6.2
IMC (kg/m²)	26.7 \pm 4.3
Gestaciones	2.2 \pm 1.4
Partos	1.9 \pm 1.1
Consumo tabaco	26.5 %
Edad menopausia	46.4 \pm 5.9
Edad menarquia	12.7 \pm 1.6
Menopausia quirúrgica	26.8 %
Consumo THS previa	34.1 %
Estado posmenopáusico	88 %

Tabla 4.2. Valores medios de los parámetros bioquímicos analizados.

	N	Media ± DE
Estradiol (pg/ml)	768	16.5 ± 15.0
FSH (UI/ml)	743	76.3 ± 34.0
PTH (pg/ml)	350	45.2 ± 14.3
CTx (ng/ml)	602	0.42 ± 0.19
Calcio (mg/dl)	756	9.6 ± 0.4
Fósforo (mg/dl)	756	3.6 ± 0.5
FA total (U/L)	670	170.1 ± 40.7
25(OH)D3 (ng/ml)	350	25.6 ± 9.9
OPG (pg/ml)	350	95.5 ± 42.6

En la Tabla 4.3 aparecen los valores medios de las determinaciones densitométricas (DMO estandarizada, DMOe) para cuello femoral y columna lumbar (incluyendo los T y Z-scores) para las mujeres de nuestra población.

Tabla 4.3. Valores de DMOe para cuello femoral y columna lumbar junto con los T- y Z-scores.

	N	Media ± DE
Cuello Femoral		
DMOe	693	0.798 ± 0.110
T-score		-0.935 ± 0.953
Z-score		-0.123 ± 0.909
Columna Lumbar		
DMOe	719	0.997 ± 0.147
T-score		-1.118 ± 1.372
Z-score		-0.250 ± 1.214

Como se puede observar, las mujeres del grupo de estudio presentan una ligera osteopenia (según definición de la OMS) únicamente en columna lumbar pero no en cuello femoral como indican los valores de T-score que aparecen en la Tabla 4.3. Estos valores están de acuerdo para mujeres en esta etapa de su vida. Al separar a las mujeres en pre/peri y posmenopáusicas, estos valores cambiaron radicalmente como era de esperar y las mujeres posmenopáusicas mostraron peores parámetros óseos para DMO así como para los T- y Z-scores (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Comparación de los valores de DMOe para cuello femoral y columna lumbar junto con los T- y Z-scores entre las mujeres posmenopáusicas y peri/premenopáusicas.

	Estado menopáusico		
	Pre/peri	Post	P
Cuello Femoral			
DMOe	0.856 ± 0.103	0.790 ± 0.109	< 0.0001
T-scores	-0.394 ± 0.913	-1.014 ± 0.933	< 0.0001
Z-score	0.193 ± 0.916	-0.170 ± 0.899	< 0.0001
Columna Lumbar			
DMOe	1.078 ± 0.150	0.985 ± 0.143	< 0.0001
T-scores	-0.372 ± 1.353	-1.236 ± 1.339	< 0.0001
Z-score	0.224 ± 1.258	-0.326 ± 1.190	< 0.0001

4.1.2. Efecto del tipo de menopausia

Para el análisis de la asociación de los distintos polimorfismos genéticos a DMO, como parámetro indicativo de la calidad ósea, se

incluyeron tanto mujeres con menopausia natural como mujeres con menopausia quirúrgica. Efectivamente, la población de mujeres posmenopáusicas está compuesta por más de un 28.1% de mujeres con menopausia quirúrgica y un 71.9% de mujeres con menopausia natural, con lo que, atendiendo al diferente comportamiento respecto a la retirada de la protección estrogénica de cada una de ellas, una de las primeras preguntas que surgió fue si podíamos estudiarlas conjuntamente o por el contrario este distinto comportamiento podía afectar al hueso de forma diferencial. La Tabla 4.5 muestra que, aunque las mujeres sometidas a ovariectomía bilateral son significativamente más jóvenes, no hubo diferencias significativas respecto a la DMOe de cuello femoral (CF) ni de columna lumbar (CL), probablemente debido al mayor ADM que mostraron las mujeres sometidas a ovariectomía bilateral hasta la realización de una DXA.

Tampoco hubo diferencias significativas respecto a parámetros tales como el IMC, y niveles de estradiol, FSH, CTx, FA, y fósforo. No obstante se encontró una diferencia significativa respecto al valor de calcio total, mostrando las mujeres con menopáusicas quirúrgica niveles más altos ($P=0.036$).

Tabla 4.5. Efecto del tipo de menopausia sobre distintos parámetros óseos y bioquímicos.

	Tipo de menopausia		
	Natural	Quirúrgica	P
DMOe CF	0.795 ± 0.109	0.805 ± 0.116	0.289
DMOe CL	0.995 ± 0.148	0.997 ± 0.142	0.855
Edad	53.7 ± 6.1	50.3 ± 6.9	<0.001
Adm	5.8 ± 6.3	7.2 ± 6.8	0.016
IMC	26.7 ± 4.2	26.6 ± 4.4	0.616
Estradiol	15.8 ± 12.8	16.4 ± 14.8	0.619
FSH	76.8 ± 32.5	77.6 ± 37.2	0.792
PTH	46.2 ± 14.2	43.8 ± 14.3	0.162
CTx	0.42 ± 0.20	0.44 ± 0.20	0.296
FA total	169.1 ± 39.4	174.4 ± 42.7	0.150
Calcio	9.58 ± 0.41	9.65 ± 0.40	0.036
Fósforo	3.62 ± 0.45	3.63 ± 0.46	0.617
25(OH)D3	25.8 ± 9.9	25.4 ± 10.4	0.748
OPG	95.8 ± 41.7	96.5 ± 46.3	0.912

4.1.3. Asociación entre parámetros clínicos, óseos y bioquímicos

Con el fin de detectar relaciones entre las distintas variables continuas de este estudio y poder seleccionar adecuadamente las covariables y variables de confusión, se realizó un análisis mediante la correlación de Pearson. Una de las relaciones más evidentes encontrada fue entre la DMOe de cuello femoral y la de columna lumbar ($r = 0.633$, $P < 0.0001$, Figura 4.1).

Como era de esperar tanto la DMOe de cuello femoral como la de columna lumbar se correlacionaron negativamente con la edad y los

ADM y positivamente con el peso, la talla, el IMC, los niveles de estradiol, entre otros (Tabla 4.6).

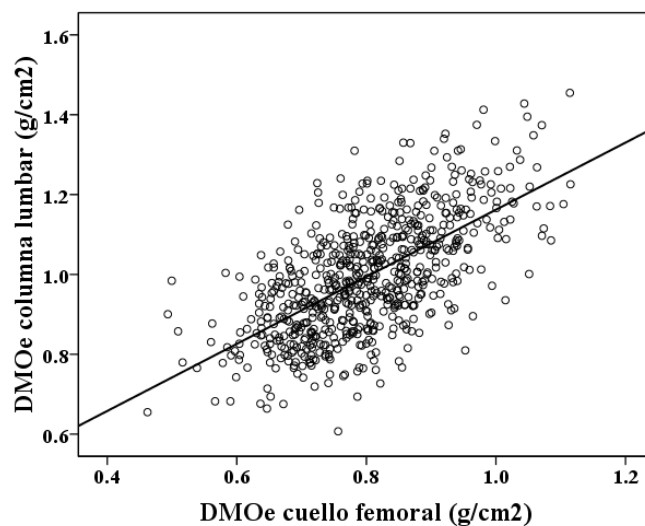


Figura 4.1. Recta de correlación entre los valores de DMOe de cuello femoral y cadera lumbar en nuestra población.

Se detectaron otras correlaciones interesantes como la negativa entre la edad y los niveles de CTx y entre los niveles de éstos y la edad y el IMC o la correlación positiva entre los niveles de PTH y OPG. Se detectaron muchas más correlaciones que no aparecen en la Tabla 4.6. Por tanto, en los estudios de asociación del presente trabajo siempre se ha ajustado por las covariables edad y peso o IMC ya que son verdaderas variables de confusión.

Tabla 4.6. Algunas correlaciones de Pearson entre características antropométricas, óseas y bioquímicas.

Variables		r de Pearson	P
DMOe CF	Edad	-0.276	<0.000001
	Adm	-0.291	<0.000001
	Peso	0.217	<0.000001
	Talla	0.244	<0.000001
	IMC	0.103	0.007
	Calcio	0.070	0.077
	Fósforo	0.105	0.008
	Estradiol	0.132	0.001
DMOe CL	Edad	-0.190	<0.00001
	Adm	-0.271	<0.000001
	Peso	0.242	<0.000001
	Talla	0.215	<0.000001
	IMC	0.147	<0.0001
	Calcio	0.101	0.009
	Fósforo	0.113	0.003
	Estradiol	0.129	0.001
Edad	IMC	0.170	<0.00001
	CTx	-0.141	0.001
	Estradiol	-0.130	0.001
Peso	CTx	-0.157	<0.0001
IMC	CTx	-0.181	<0.00001
PTH	25(OH)D3	-0.247	0.003
	OPG	-0.170	0.027
	Fósforo	-0.136	0.013

4.1.4. Asociación de genotipos en *RUNX2* y estado óseo

En base a datos previos (Vaughan *et al.* 2002; Vaughan *et al.* 2004c), se decidió estudiar la asociación de polimorfismos en el gen *Runx2* con DMO en la población de mujeres debido a la importancia de *Runx2* en la diferenciación del osteoblasto y en la formación del esqueleto. En este estudio se analizaron un total de 776 mujeres, cuyas principales características se pueden encontrar en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Características de las mujeres usadas en este estudio. Los valores presentados: la media \pm DE si la variable se distribuye normalmente; la mediana (intervalo de confianza 95%) si la distribución de la variable no se ajusta a la normalidad.

	N	Valor
Edad (años)	776	52.0 (52-53)
Peso (kg)	776	65.0 (64.5-66)
Altura (cm)	776	157.6 \pm 6.2
IMC (kg/m²)	776	26.2 (26.0-26.7)
Consumo de Tabaco (%)	776	23.3
Estradiol (pg/ml)	740	13.3 (12.5-14.0)
FSH (U/L)	740	76.4 \pm 34.1
TSH (U/L)	738	2.02 (1.93-2.11)
DMO (g/cm²)		
Columna Lumbar	703	0.997 \pm 0.150
Cuello Femoral	686	0.799 \pm 0.116

En este trabajo se analizaron 3 polimorfismos en el gen (ver *Materiales y Métodos*). Las frecuencias genotípicas y alélicas para los tres polimorfismos estudiados se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Frecuencias alélicas y genotípicas y valor del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) para los polimorfismos analizados.

Polimorfismo	Genotipo	N (%)	Frecuencia alélica	HWE (P)
17Ala>11Ala	17Ala/17Ala	643 (82.9)	17Ala (0.91)	0.332
	17Ala/11Ala	123 (15.8)	11Ala (0.09)	
	11Ala/11Ala	10 (1.3)		
+198 G>A	G G	568 (88.3)	G (0.94)	0.022
	G A	68 (10.6)	A (0.06)	
	A A	7 (1.1)		
-1025 T>C	T T	685 (88.3)	T (0.94)	0.124
	T C	84 (10.8)	C (0.06)	
	C C	7 (0.90)		

El genotipo para el polimorfismo +198 G>A se refiere a las mujeres de genotipo 17Ala/17Ala (N=643) ya que el sitio de restricción para *MspAII* se ha perdido en el alelo deleciónado 11Ala (Vaughan *et al.* 2002; Vaughan *et al.* 2004c). Ésta es probablemente la razón por la que se observó una pérdida del equilibrio de Hardy-Weinberg para este polimorfismo en la población estudiada (Tabla 4.8). Por otro lado, los polimorfismos +198 G>A y -1025 T>C mostraron un fuerte desequilibrio de ligamiento ($D'=0.97$, $\chi^2=1100$). Además se utilizó el programa STRUCTURE para comprobar la posible existencia de una subestructura en la población. Los datos obtenidos reflejaron la existencia de una única población (probabilidad=0.996) y los modelos que asumieron la existencia de 2-5 poblaciones mostraron una probabilidad insignificante.

Un análisis preliminar de los datos comparando las medias de DMO respecto al genotipo mediante el test ANOVA no detectó asociaciones entre el polimorfismo de longitud 17Ala>11Ala o el polimorfismo +198 G>A con DMOe de cadera o columna en la población estudiada. Sin embargo, para verificar la asociación previamente descrita del genotipo GA/AA para el polimorfismo +198 G>A con la DMO de cadera, principalmente en mujeres con un IMC elevado (Vaughan *et al.* 2002; Vaughan *et al.* 2004c), se realizó un análisis de acuerdo con el IMC medio que presentaba nuestra población ($IMC \leq$ o $> 26.3 \text{ kg/m}^2$). Este análisis tampoco detectó asociación de este polimorfismos a DMOe de cadera, aunque encontramos una tendencia tanto para la DMOe de cadera (mujeres GG: 0.784 ± 0.118 vs. mujeres GA/AA: $0.820 \pm 0.111 \text{ g/cm}^2$; $P=0.087$), como para la DMOe de columna (mujeres GG: 0.974 ± 0.143 vs. mujeres GA/AA: $1.018 \pm 0.143 \text{ g/cm}^2$; $P=0.087$). Curiosamente, y a diferencia de lo publicado previamente (Vaughan *et al.* 2004c), esta tendencia únicamente se dió en las mujeres con $IMC \leq 26.3 \text{ kg/m}^2$ ($N=337$ y 353 para DMOe de cadera y de columna, respectivamente).

Si que detectamos, no obstante, una asociación entre los genotipos del polimorfismo -1025 T>C y DMOe de cadera ($P=0.021$), siendo las mujeres con el alelo C las que presentaron una mayor DMOe en cadera. No ocurrió lo mismo para la columna ($P=0.296$). Ante la baja frecuencia del genotipo CC (<1%; Tabla 4.8) y el hecho de que el programa SNPstats (Sole *et al.* 2006) asignó un modelo de herencia dominante para este sistema genotípico, se decidió agrupar a los

genotipos TC y CC para continuar con el estudio, y a partir de aquí en realidad comparamos mujeres de genotipo TT vs. mujeres de genotipo TC/CC.

Se analizaron las características antropométricas, bioquímicas, densitométricas y el estatus de la menopausia de las mujeres participantes en el estudio según los genotipos (TT vs. TC/CC) (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Características antropométricas, bioquímicas y estado menopáusico en la población estudiada de acuerdo al genotipo del SNP - 1025 T>C del gen RUNX2. Los valores son la media ± DE si la variable se distribuye normalmente, la mediana (intervalo de confianza al 95%) si no lo hace o porcentajes.

	GENOTIPO			
	N	TT	TC/CC	P
Edad (años)	776	52.0 (52.0-53.0)	52.0 (50.0-53.0)	0.902
Adm (años)	776	5.0 (4.0-5.0)	5.0 (4.0-7.0)	0.966
Peso(kg)	776	65.0 (64.5-66.0)	66.5 (63.5-68.6)	0.272
Altura(cm)	776	157.5±6.2	158.7±6.3	0.085
IMC (kg/m²)	776	26.2 (25.9-26.7)	26.6 (25.5-27.3)	0.881
Estradiol (pg/ml)	740	13.4 (12.7-14.4)	14.5 (12.9-16.5)	0.275
Uso THS	776	34.2 %	36.7 %	0.639
Menop. quirúrgica	776	27.5 %	23.6 %	0.525
Posmenopausicas	776	86.9 %	86.2 %	0.866
CTx (ng/ml)	776	0.41 (0.38-0.43)	0.41 (0.35-0.47)	0.945
FA Total(U/L)	776	168.0 (163.0-172.0)	152.0 (142.0-162.0)	0.003
Calcio (mg/dl)	776	9.6 (9.5-9.6)	9.7 (9.5-9.8)	0.030
Fósforo(mg/dl)	776	3.6 (3.5-3.6)	3.6 (3.5-3.7)	0.654
OPG (pg/ml)	450	89.5±29.4	97.5±31.6	0.080
25(OH)D3 (ng/ml)	410	22.8 (21.6-24.5)	25.8 (22.1-32.9)	0.117

No se observaron diferencias significativas entre genotipos en cuanto a las características antropométricas y estado respecto a la menopausia. En cuanto a los datos bioquímicos, las mujeres de genotipo TT mostraron valores más altos de FA total ($P=0.003$) y una disminución en los valores de calcio sérico total ($P=0.030$) respecto a las mujeres de genotipo TC/CC. Por otra parte, las mujeres de genotipo TC/CC mostraron valores más altos de DMOe en cadera ($P=0.006$; Tabla 4.10) que las mujeres de genotipo TT, por lo que fue lógico encontrar valores de T-score y Z-score más negativos en las mujeres TT (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Características óseas en la población estudiada de acuerdo al genotipo del SNP -1025 T>C del gen RUNX2. Los valores son la media \pm DE.

	GENOTIPO			
	N	TT	TC/CC	P
DMOe CF (g/cm²)	686	0.796 \pm 0.116	0.833 \pm 0.113	0.006
T-score		-0.956 \pm 1.007	-0.651 \pm 0.987	0.010
Z-score		-0.145 \pm 0.957	0.148 \pm 0.980	0.009
DMOe CL (g/cm²)	703	0.996 \pm 0.149	1.019 \pm 0.148	0.182
T-score		-1.133 \pm 1.395	-0.914 \pm 1.368	0.180
Z-score		-0.270 \pm 1.227	-0.044 \pm 1.235	0.117

Con la finalidad de estudiar la asociación entre el polimorfismo -1025 T>C con DMOe de cadera y de columna en mujeres que mostraron valores extremos de DMOe, se dividió a la población en cuartiles de DMO. Cuando se seleccionaron únicamente las mujeres

que presentaban los cuartiles de DMO más elevados o los más pequeños, la asociación de este polimorfismo (-1025 T>C) con DMO fue más evidente en cadera (DMOe en mujeres TT: 0.797 ± 0.159 vs. mujeres TC/CC: 0.876 ± 0.142 g/cm²; $P=0.002$). Curiosamente, en este análisis se observó una asociación estadísticamente significativa del polimorfismo +198 G>A con la DMOe de cadera en mujeres con valores extremos de DMO (DMOe CF en mujeres GG: 0.798 ± 0.160 vs. mujeres GA/AA: 0.857 ± 0.141 g/cm²; $P=0.049$).

Del mismo modo que se ha descrito en otros estudios y está ampliamente aceptado, la edad, el peso, el uso de THS y el estado respecto a la menopausia (pre/perí vs. posmenopáusica) se relacionan significativamente con la DMOe de cadera y de columna. Además, en nuestro estudio detectamos diferencias significativas entre grupos en cuanto a los niveles de FA total y calcio sérico total (Tabla 4.9). Por todo ello se realizó un análisis ANCOVA para evaluar los efectos del polimorfismo -1025 T>C sobre la DMOe utilizando estos parámetros como covariables o variables de confusión. En la Figura 4.2, se muestra la DMOe de cadera y de columna ajustada por la edad, el peso, los niveles de FA y calcio total, el uso y el tiempo de uso de la THS y el estatus menopáusico.

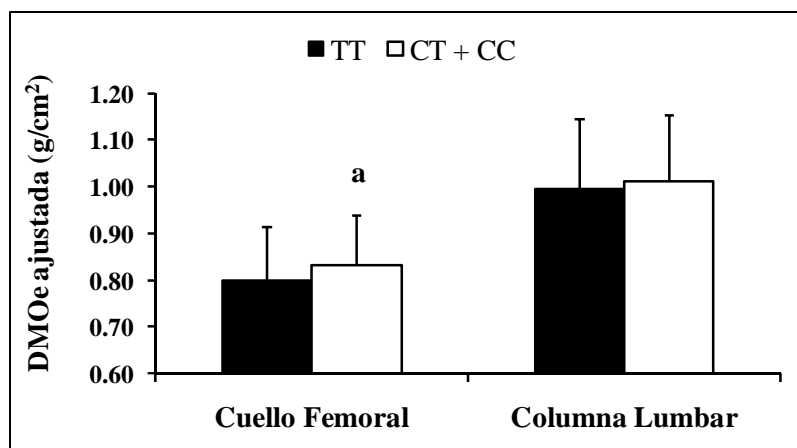


Figura 4.2. DMOe de cuello femoral y de columna lumbar ajustada por la edad, el peso, los niveles de FA y calcio total, el uso y el tiempo de uso de la THS y el estatus menopáusico de acuerdo al genotipo del SNP -1025 T>C. Los valores son la media \pm DE. ^aP=0.021. (El eje de ordenadas se ha recortado para facilitar visualmente la diferencia que existe entre grupos).

Como puede apreciarse en la Figura 4.2, la DMOe de cuello femoral en mujeres con genotipo TC/CC (0.830 ± 0.112 g/cm²) fue un 3.9% ($P=0.021$) mayor que la DMOe de mujeres de genotipo TT (0.798 ± 0.116 g/cm²). No se observaron diferencias significativas en la DMO de columna (Figura 4.2). El porcentaje de varianza de la DMOe de cadera mostrado por los genotipos del polimorfismo -1025 T>C fue del 1.2% en modelos multivariados ajustados por estas covariables.

4.1.5. Variantes raras en el exón 2 del gen RUNX2 y DMO

Durante el proceso de genotipado de los polimorfismos 17Ala>11Ala y +198 G>A (Vaughan *et al.* 2002; Vaughan *et al.* 2004c), se observaron tres productos de PCR que presentaban un tamaño diferente al esperado según la secuencia publicada, de un total de 1366 cromosomas analizados. En los tres casos, la banda normal de 336 pb aparecía junto con otra banda de mayor o menor tamaño, lo cual indicaba la aparición de una inserción y dos deleciones en los productos de PCR, respectivamente. Todas estas bandas de tamaño anormal fueron secuenciadas previo aislamiento en geles de acrilamida (ver *Materiales y Métodos*).

La inserción consistió en la aparición de un fragmento de 21-pb (CAG CAG CAG CAG CAA CAG CAG) en la región de poli-glutaminas del gen (poli-Q), generando una proteína de 30 glutaminas (mutación 30Q) en lugar de las 23 que aparecen en la secuencia normal (Figura 4.3). La segunda variante, consistió en una deleción de 15 pb (CAA CAG CAG CAG CAG) que se tradujo en la deleción de 5 glutaminas en la región poli-Q del gen (mutación 18Q). Finalmente, la tercera variante rara consistió en una deleción de 21 pb (CAA CAG CAG CAG CAG CAG) que produjo la desaparición de 7 glutaminas en la región poli-Q del gen (mutación 16Q).

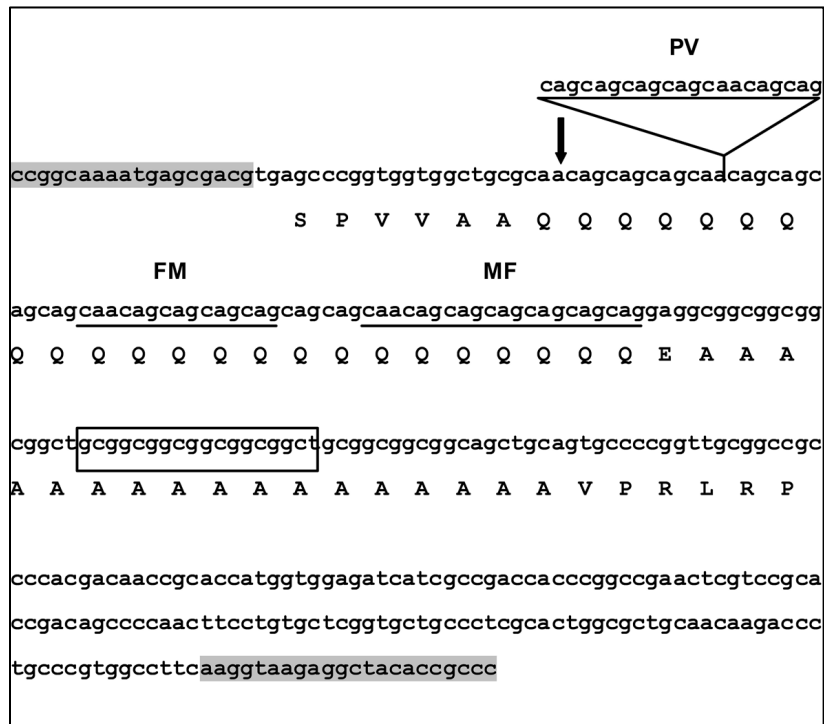


Figura 4.3. Posición de las mutaciones en RUNX2 en la secuencia nucleotídica (minúsculas) y de la proteína (mayúsculas). La secuencia marcada en gris corresponde a los oligonucleótidos usados para la amplificación de la región mediante PCR. PV, FM y MF son las iniciales de las mujeres que mostraron estas variantes. PV mostró una inserción de 21 pb resultando en una inserción de glutaminas en la misma pauta de lectura. Las variantes de FM y MF fueron deleciones de 15 y 21 pb, respectivamente, resultando en dos deleciones de 5 y 7 residuos de glutamina con la misma pauta de lectura. Con un rectángulo se muestra el polimorfismo consistente en la deleción de 6 alaninas. Una flecha indica la localización de las inserciones y deleciones de glutaminas descritas por Vaughan y col. (Vaughan et al. 2002).

Estas variantes raras no se asociaron a variaciones en la DMO ya que ninguna de las mujeres portadoras de dichas variantes mostró osteopenia (T-score<-1) u osteoporosis (T-score<-2.5) a nivel de cadera o columna, a excepción de una mujer, que presentó osteopenia (T-score=-2.4) en la columna. Esta paciente presentaba la variante producida por la inserción de 7 glutaminas.

Con el fin de determinar si estas variantes raras eran compatibles con el fenotipo más leve en la displasia cleidocraneal, enfermedad provocada por mutaciones en el gen RUNX2 (Mundlos *et al.* 1997), realizamos un estudio mediante rayos X a la paciente con la mutación 30Q (Figura 4.4).

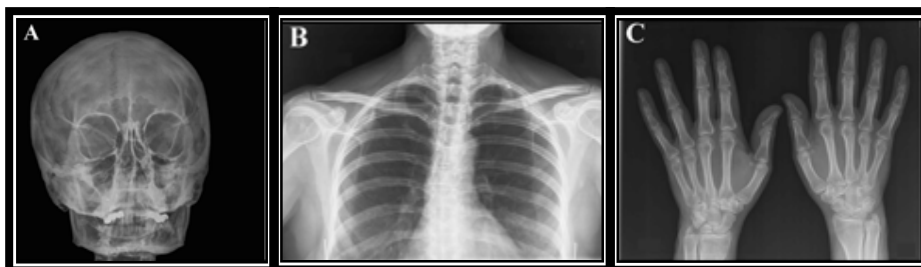


Figura 4.4. Imágenes radiológicas del cráneo (A), clavículas (B) y manos (C) de la paciente con la variante de 30 glutaminas. La información clínica fue: cráneo con imágenes compatibles con hiperostosis endocraneal frontal, discreta escoliosis dorsal derecha. Prominentes apófisis estiloides de ambos cúbitos. Ninguno de estos hallazgos es compatible con el fenotipo de displasia cleidocraneal.

Los resultados de la exploración radiológica de esta mujer fueron normales tanto para los huesos como para los dientes. Todos los

hallazgos encontrados (Figura 4.4) fueron clínicamente insignificantes y no mantenían relación con la displasia cleidocraneal. El examen clínico de las otras dos pacientes descartó la existencia de cualquier fenotipo compatible con la displasia cleidocraneal.

4.1.6. El gen *OCIL* (Osteoclast Inhibitory Lectin) y masa ósea

En este trabajo de Tesis Doctoral se realizó el estudio de la posible asociación del gen *OCIL* a masa ósea por el hecho de que este gen codifica para una lectina que se expresa en células B y en osteoblastos, que su expresión en células B inhibe la producción de IFN γ por las células NK y, sobre todo, porque *in vitro* inhibe la diferenciación osteoclástica (Kartsogiannis *et al.* 2008; Rosen *et al.* 2008).

En el presente trabajo se analizó la asociación de dos polimorfismos no-sinónimos Asn19Lys (C>G) y Leu23Val (C>G) con masa ósea. La frecuencia alélica para el alelo G fue del 14.0% y del 31.0% para los polimorfismos Asn19Lys y Leu23Val, respectivamente. En cuanto a las frecuencias genotípicas fueron CC, 73.8%; CG, 23.6% y GG, 2.5% para el polimorfismo Asn19Lys y CC, 48.4%; CG, 41.6%; y GG, 10.0% para el polimorfismo Leu23Val. Esta distribución se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg y, además, los dos polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento (D' : 0.82; χ^2 : 22.9; $P=0.00013$), aunque éste no fue muy fuerte.

En un análisis preliminar mediante el test ANOVA para comparar medias entre grupos, se detectó una asociación sugestiva del polimorfismo rs16914640 (C>G; Asn19Lys) a DMOe de columna

($P=0.057$) y con DMOe de cadera ($P=0.108$). Dada la baja frecuencia del genotipo GG para el polimorfismo Asn19Lys, se agruparon los genotipos CG y GG. Las características de la población de estudio, después de esta reagrupación por genotipos para el polimorfismo Asn19Lys y para el polimorfismo Leu23Val se resumen en las Tablas 4.11 y 4.12, respectivamente.

Como se puede apreciar, el polimorfismo Leu23Val no presenta diferencias significativas entre genotipos para las variables estudiadas. Sin embargo, en el caso del polimorfismo Asn19Lys, el grupo de mujeres con genotipo CG/GG presentaba una disminución en los niveles de DMO en cadera y una disminución en los niveles de OPG con respecto a las mujeres de genotipo CC ($P<0.05$; Tabla 4.11). Además, estas mujeres con genotipo CG+GG también mostraron una tendencia hacia valores más pequeños de DMO en columna con respecto a las mujeres de genotipo CC, aunque esa tendencia no llegó a ser significativa ($P=0.059$, ANOVA).

Tabla 4.11. Datos antropométricos y características bioquímicas de los subgrupos de mujeres de acuerdo al polimorfismo Asn19Lys. Los valores son la media \pm DE si la variable se distribuye normalmente, o la mediana (intervalo de confianza al 95%) si no lo hace, o porcentajes. La N se muestra entre paréntesis.

	Asn19Lys		
	CC (370)	CG / GG (130)	P
Edad (años)	53.0 (53.0-54.0)	53 (52-55)	0.342
Peso (kg)	65.9 \pm 10.3	65.6 \pm 11.3	0.818
Altura (cm)	157.0 \pm 5.9	157.0 \pm 6.6	0.955
IMC (kg/m²)	26.8 \pm 4.2	26.6 \pm 4.0	0.624
C. Tabaco (%)	22.5	25.2	0.533
Estradiol (pg/ml)	14.0 (13.0-15.5)	15.1 (13.1-16.3)	0.921
FSH (U/L)	79.9 \pm 33.4	75.8 \pm 28.8	0.221
CTx (ng/ml)	0.42 (0.37-0.45)	0.42 (0.38-0.47)	0.659
FA total (U/L)	174.4 \pm 47.3	172.5 \pm 44.4	0.720
FA ósea (μg/L)	12.1 \pm 5.8	10.5 \pm 5.1	0.137
PTH (pg/ml)	42.2 (37.7-46.3)	38.6 (34.4-45.1)	0.227
25(OH)D3	29.9 \pm 12.5	31.8 \pm 14.0	0.459
RANKL (pg/ml)	27.6 \pm 13.7	30.2 \pm 11.0	0.282
OPG (pg/ml)	91.6 (82.7-99.1)	76.9 (63.8-107.8)	0.048
DMOe (g/cm²)			
Columna lumbar	1.000 \pm 0.152	0.970 \pm 0.163	0.059
Cuello Femoral	0.802 \pm 0.122	0.776 \pm 0.124	0.045

Tabla 4.12. Datos antropométricos y características bioquímicas de los subgrupos de mujeres de acuerdo al polimorfismo Leu23Val. Los valores son la media \pm DE si la variable se distribuye normalmente, o la mediana (intervalo de confianza al 95%) si no lo hace, o porcentajes. La N se muestra entre paréntesis.

	Leu23Val			P
	CC (242)	CG (208)	GG (50)	
Edad (años)	53.0 (52.0-55.0)	53.0 (53.0-54.0)	53.0 (52.0-56.0)	0.900
Peso (kg)	66.0 \pm 10.3	65.3 \pm 10.7	67.9 \pm 11.6	0.306
Altura (cm)	157.7 \pm 6.3	156.3 \pm 6.0	156.6 \pm 4.7	0.063
IMC (kg/m²)	26.6 \pm 4.0	26.8 \pm 4.1	27.7 \pm 4.6	0.212
C. Tabaco (%)	22.5	24.2	19.6	0.783
Estradiol (pg/ml)	14.3 (12.8-15.9)	13.4 (11.3-15.8)	14.3 (13.1-18.1)	0.637
FSH (U/L)	79.1 \pm 32.1	80.6 \pm 32.6	74.0 \pm 31.9	0.452
CTx (ng/ml)	0.44 (0.37-0.47)	0.41 (0.38-0.45)	0.44 (0.29-0.49)	0.572
FA total (U/L)	171.8 \pm 47.9	175.4 \pm 45.1	170.8 \pm 35.5	0.717
FA ósea (μg/L)	12.0 \pm 6.4	11.5 \pm 5.0	11.1 \pm 5.2	0.825
PTH (pg/ml)	39.1 (37.4-46.3)	41.5 (37.3-46.2)	41.5 (29.3-47.2)	0.403
25(OH)D3	30.4 \pm 12.5	29.9 \pm 11.3	32.8 \pm 14.1	0.710
RANKL (pg/ml)	29.9 \pm 14.4	26.8 \pm 12.5	26.6 \pm 9.0	0.327
OPG (pg/ml)	82.7 (78.2-99.2)	86.3 (75.9-106.5)	91.4 (58.1-108.6)	0.806
DMOe (g/cm²)				
Columna	0.998 \pm 0.157	0.991 \pm 0.158	0.989 \pm 0.161	0.870
Cadera	0.799 \pm 0.126	0.791 \pm 0.122	0.799 \pm 0.103	0.790

Resultados

Una vez detectada la asociación del polimorfismo Asn19Lys con DMO en la población total, se decidió hacer un análisis más discriminativo para poder determinar si esta asociación era más fuerte. Para ello, y siguiendo los resultados obtenidos de un análisis de regresión preliminar el cual indicó que la edad es un potente factor que influye sobre la DMO, se decidió estudiar si la segmentación de la población según la edad media (53 años) podría revelar más datos sobre la capacidad de asociación del polimorfismo Asn19Lys con DMO (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Datos óseos en la población tras dividirla por la edad media (53 años). DMOe en g/cm².

	< 53 años			≥ 53 años		
	CC (177)	CG/GG(63)	P	CC (193)	CG/GG(67)	P
Cuello Femoral						
DMOe	0.826±0.112	0.831±0.121	0.80	0.779±0.128	0.725±0.102	0.0031
T-score	-0.691±0.974	-0.669±1.001	0.88	-1.094±1.060	-1.542±0.847	0.0032
Z-score	-0.108±0.986	-0.019±1.029	0.55	0.001±1.030	-0.355±0.772	0.015
Columna Lumbar						
DMOe	1.018±0.144	1.030±0.155	0.55	0.977±0.162	0.904±0.140	0.0029
T-score	-0.912±1.363	-0.812±1.469	0.63	-1.274±1.509	-1.961±1.315	0.0025
Z-score	-0.359±1.296	-0.154±1.288	0.29	-0.016±1.323	-0.631±1.146	0.002

Una vez segmentada la población de acuerdo a la edad media de 53 años, se analizaron parámetros como peso, altura, consumo de tabaco, IMC, y diferentes parámetros bioquímicos, no observándose diferencias significativas entre genotipos en el grupo de mujeres jóvenes (< 53 años) ni en el grupo de mujeres mayores (≥ 53 años),

excepto en el grupo de mujeres jóvenes donde se observaron diferencias significativas en cuanto a la edad según el genotipo (mujeres CC, 48.2 años; mujeres CG/GG, 49.2 años; $P=0.046$). En cuanto a los parámetros estudiados referentes al estado óseo, se detectó una asociación significativa del polimorfismo Asn19Lys con DMO en el grupo de mujeres mayores de 53 años (Tabla 4.13). De este modo, las mujeres con genotipo CG/GG presentaban una disminución significativa tanto en la DMO de columna lumbar ($P=0.0029$) como en cadera ($P=0.0031$) respecto a las mujeres de genotipo CC. Los valores correspondientes a la T-score y la Z-score reprodujeron el mismo patrón para ambas localizaciones, mostrando así valores mucho más negativos para las mujeres de genotipo CG/GG.

En la Figura 4.5 se muestran los valores de DMO corregidos por edad e IMC tanto de cuello femoral como en columna lumbar para el grupo de mujeres mayores de 53 años y menores de 53 años de acuerdo al genotipo para el polimorfismo Asn19Lys. Como puede apreciarse, no encontramos diferencias entre genotipos en ninguna localización esquelética en las mujeres menores de 53 años, aunque sí para las mayores de 53 años. En este último grupo de mujeres, detectamos diferencias marcadas para DMOe de cadera (5.6%) y para DMOe de columna (6.7%) entre las mujeres CG/GG y CC del polimorfismo Asn19Lys.

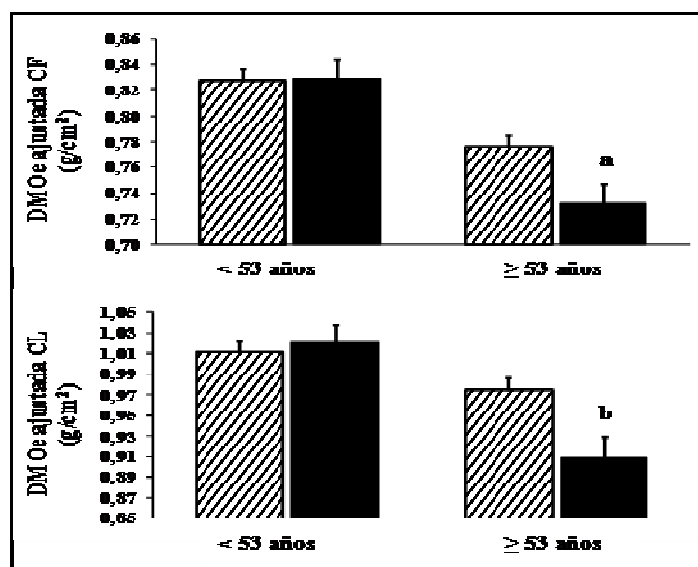


Figura 4.5. DMOe ajustada por la edad y el IMC en cuello femoral (CF) y columna lumbar (CL) en mujeres <53 años) y ≥ 53 años de acuerdo al genotipo para el polimorfismo Asn19Lys. Barras rayadas, genotipo CC; barras sólidas negras, genotipos CG/GG. Los valores son la media \pm SEM. ^a: $P=0.012$ y ^b: $P=0.0058$ respecto a las mujeres de genotipo CC del mismo grupo de edad. (El eje de ordenadas se ha recortado para facilitar visualmente la diferencia que existe entre grupos).

En modelos de regresión múltiple, la varianza de la DMO para los genotipos del polimorfismo Asn19Lys en la población entera fue del 1.7% para cadera y del 3.9% para columna y, en el grupo de mujeres mayores de 53 años fue del 6.8% en cadera y del 7.2% en columna. Los análisis de regresión de la DMO ajustada por edad e IMC mostraron asociaciones significativas de los genotipos del polimorfismo Asn19Lys con DMO de columna ($P=0.0058$) y DMO

de cadera ($P=0.012$; Figura 3.5), aunque, debido al pequeño número de mujeres homocigotas para el alelo G, no se pudo probar la existencia de un efecto de dosis génica.

En este trabajo y dado el desequilibrio de ligamiento entre los dos polimorfismos estudiados, se realizó un estudio de reconstrucción de haplotipos utilizando el software PHASE 2.1 (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>) (Stephens *et al.* 2001; Stephens & Scheet 2005), tomando todas las frecuencia mayores de 0.75 para el análisis. Las frecuencias haplotípicas deducidas del análisis de los polimorfismos rs16914640 (C>G; Asn19Lys) y rs376402 (C>G; Leu23Val) del gen *OCIL* fueron 0.543 para el haplotipo CC, 0.311 para el haplotipo CG, 0.141 para el haplotipo GC y 0.005 para el haplotipo GG, siendo el primer alelo el correspondiente al polimorfismo Asn19Lys y el segundo al polimorfismo Leu23Val. El análisis ANOVA de toda la población usando únicamente los haplotipos CC, CG y GC, mostró una débil asociación de los haplotipos con DMO (cadera $P=0.079$; columna $P=0.035$) siendo las mujeres de haplotipo CC las que presentaban los valores de DMO más elevados. Cuando la población se segmentó según la edad media de la población (< 53 años o \geq 53 años) se detectó una asociación de los haplotipos con DMO tanto en cadera ($P=0.032$) como en columna lumbar ($P=0.0027$) sólo en las mujeres de más de 53 años. La asociación de los haplotipos con DMO para las mujeres mayores de 53 años se muestra en la Figura 4.6.

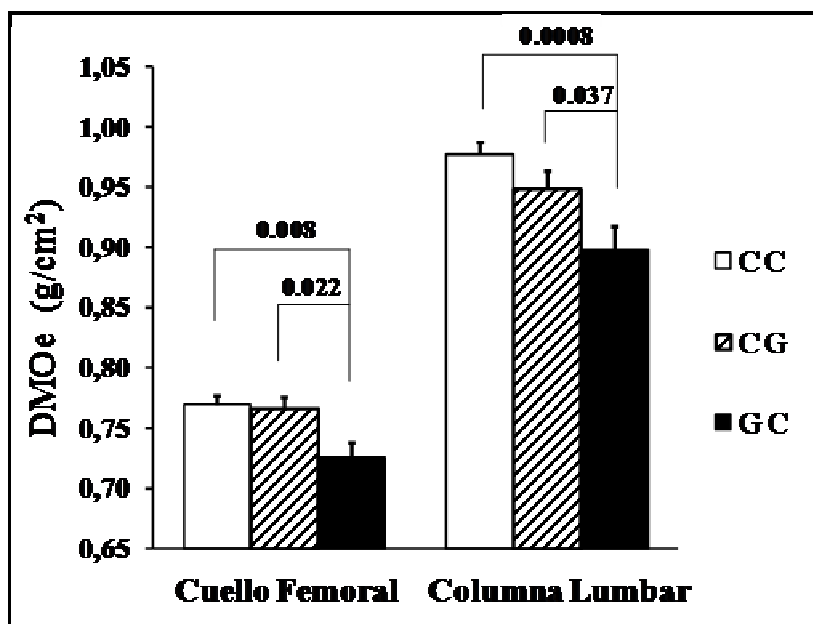


Figura 4.6. DMOe de cuello femoral y de columna lumbar (media \pm SEM) en mujeres \geq 53 años respecto a los haplotipos comunes (CC, CG, y GC) para los dos polimorfismos estudiados Asn19Lys y Leu23Val. Se muestra el valor de P después del ajuste mediante el test de Dunnett para comparaciones múltiples.

4.1.7. Polimorfismo en CD40 y estado óseo

En este trabajo se analizó la asociación de un polimorfismo funcional (rs1883832) en la secuencia Kozak del gen CD40 con masa ósea en nuestra población de mujeres.

En la Tabla 4.14 se representan los parámetros antropomórficos y los niveles de los marcadores bioquímicos de las mujeres según su genotipo para el polimorfismo rs1883832 (C>T). Como se puede

observar, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos para los distintos parámetros analizados.

Tabla 4.14. Datos antropométricos y bioquímicos de las participantes de acuerdo al genotipo del SNP en el gen CD40. Los valores son la media \pm DE. El número de mujeres se muestra entre paréntesis.

Características	C C (304)	C T (246)	T T (52)
Edad (años)	57.3 \pm 7.9	57.3 \pm 7.7	57.8 \pm 7.6
Adm (años)	11.4 \pm 7.6	11.2 \pm 6.8	12.4 \pm 8.5
Menarquia (años)	12.8 \pm 1.7	12.7 \pm 1.5	12.8 \pm 1.3
Menopausia (años)	46.4 \pm 6.2	46.4 \pm 5.4	45.5 \pm 7.8
Menop. quirúrgica (%)	24.6	22.4	27.5
Partos	1.9 \pm 1.1	2.1 \pm 1.1	2.0 \pm 1.3
Peso (Kg)	65.8 \pm 10.9	66.2 \pm 11.1	67.7 \pm 10.4
Altura (cm)	156.4 \pm 5.5	156.7 \pm 6.0	157.4 \pm 6.2
IMC (kg/m²)	26.8 \pm 4.2	26.9 \pm 4.3	27.3 \pm 4.2
Consumo tabaco (%)	24.1	23.7	20.0
Estradiol (pg/ml)	15.6 \pm 9.4	15.8 \pm 10.3	14.1 \pm 7.9
Testosterona (ng/ml)	0.25 \pm 0.13	0.27 \pm 0.14	0.22 \pm 0.13
PTH (pg/ml)	45.9 \pm 17.4	46.0 \pm 20.9	48.1 \pm 22.1
CTx (ng/ml)	0.43 \pm 0.23	0.45 \pm 0.20	0.44 \pm 0.26
FA total (U/L)	171.6 \pm 48.8	174.0 \pm 43.2	181.1 \pm 40.5

En la Tabla 4.15 se muestran los valores de DMO de las mujeres según su genotipo. Como se puede apreciar, las mujeres con genotipo TT presentaban una considerable reducción en la DMO de cadera cuando se comparaban con las mujeres de genotipo CC (5.9 %, $P=0.014$) y con las mujeres de genotipo CT (6.5 %, $P=0.007$).

Tabla 4.15. DMOe y T- y Z-scores de acuerdo con el genotipo. Los valores son la media \pm DE. El número de mujeres se muestra entre paréntesis.

	C C (304)	C T (246)	T T (52)
DMOe CF	0.78 \pm 0.11 (235)	0.79 \pm 0.12 (200)	0.74 \pm 0.13 (43) ^a
CF T-score	-1.01 \pm 0.92	-0.99 \pm 1.00	-1.42 \pm 1.10 ^a
CF Z-score	-0.12 \pm 0.88	-0.11 \pm 0.97	-0.53 \pm 0.98 ^b
DMOe CL	0.99 \pm 0.16 (247)	0.99 \pm 0.15 (207)	0.92 \pm 0.13 (47) ^b
CL T-score	-1.23 \pm 1.47	-1.20 \pm 1.39	-1.78 \pm 1.22 ^a
CL Z-score	-0.26 \pm 1.33	-0.26 \pm 1.28	-0.78 \pm 0.94 ^b

CF: cuello femoral; CL: columna lumbar; DMO en g/cm². ^aP < 0.05 con respecto al genotipo CC y P < 0.01 con respecto al genotipo CT; ^bP < 0.01 respecto a los genotipos CC o CT.

En cuanto a la DMO de columna lumbar, presentaba una reducción similar a la observada en cadera (6.2 % para el genotipo CC, P=0.010, y 6.2 % para el genotipo CT, P=0.009). Los valores correspondientes para la T-score y la Z-score según el genotipo, mostraron el mismo patrón que la DMO siendo las mujeres con genotipo TT las que presentaron los valores más negativos. Los genotipos CC y CT mostraron valores de DMO similares, lo cual reflejaba un modelo de herencia recesivo para el alelo T.

En este trabajo se analizó el riesgo de sufrir osteoporosis u osteopenia mediante análisis de regresión logística. En la Tabla 4.16 se muestra el riesgo de las mujeres de sufrir osteopenia u osteoporosis,

Resultados

tanto en cadera como en columna, según los genotipos, corrigiendo por variables de confusión como edad, peso y altura. La prevalencia del genotipo TT fue mayor en mujeres con osteopenia u osteoporosis tanto en cadera como en columna. Así pues, el *odds ratio* de sufrir osteopenia u osteoporosis que presentaron las mujeres de genotipo TT fue de 2.34 (95% CI: 1.12-4.89) al compararlas con mujeres de genotipo CC+CT, de 2.46 (95% CI: 1.12-5.38) cuando se compararon con mujeres de genotipo CC, y de 2.36 (95% CI: 1.09-5.11) cuando se compararon con mujeres de genotipo CT.

Tabla 4.16. Estimación del riesgo de acuerdo al genotipo de sufrir osteopenia u osteoporosis para cuello femoral (CF) y columna lumbar (CL) ajustado por edad, peso, y altura.

Genotipo	CF Normal (n = 208)		CF OTP / OTN (n = 270)		P	OR	95% CI
	%	Nº con genotipo /total	%	Nº con genotipo /total			
TT+CT vs. CC	49.0	102/208	52.2	141/270	0.394	1.18	0.80-1.74
TT vs. CT+CC	5.8	12/208	11.5	31/270	0.024	2.34	1.12-4.89
TT vs. CC	10.2	12/118	19.4	31/160	0.024	2.46	1.12-5.38
TT vs. CT	11.8	12/102	22.0	31/141	0.030	2.36	1.09-5.11
CT vs. CC	45.9	90/196	46.0	110/239	0.887	0.97	0.65-1.45
Genotipo	CL Normal (n = 199)		CL OTP / OTN (n = 302)		P	OR	95% CI
	%	Nº con genotipo /total	%	Nº con genotipo /total			
TT+CT vs. CC	48.2	98/199	52.3	158/302	0.302	1.22	0.84-1.79
TT vs. CT+CC	6.0	12/199	11.6	35/302	0.016	2.49	1.19-5.24
TT vs. CC	10.4	12/115	19.6	35/179	0.015	2.59	1.20-5.59
TT vs. CT	12.5	12/96	22.2	35/158	0.018	2.68	1.19-6.04
CT vs. CC	44.9	84/187	46.1	123/267	0.662	0.91	0.61-1.37

Los resultados que se obtuvieron para columna lumbar fueron similares, presentando unos *odds ratios* de 2.49 (95% CI: 1.19-5.24), de 2.59 (95% CI: 1.20-5.59) y de 2.68 (95% CI: 1.19-6.04), respectivamente. Al realizar estudios de regresión, los datos obtenidos también reflejaron un modelo de herencia recesiva, apoyando así los resultados obtenidos con la DMO. Como el sistema mostraba una herencia recesiva, las mujeres se agruparon en dos grupos: mujeres de genotipo TT y mujeres de genotipo CC+CT. La Figura 4.7 muestra los valores de DMO tanto para cadera como para columna, según esta agrupación de los genotipos.

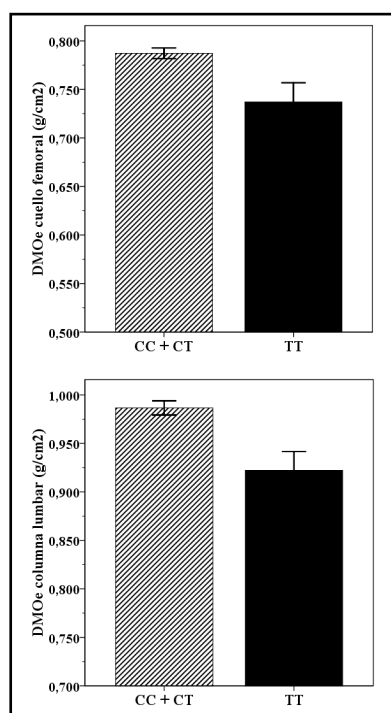


Figura 4.7. DMOe de cuello femoral y de columna lumbar de acuerdo al genotipo (TT y CC+CT). En ambos casos se obtuvo una $P < 0.009$.

Las mujeres de genotipo TT presentaron una menor DMO en cadera (0.739 vs. 0.787 g/cm²; P<0.009) y una menor DMO en columna (0.925 vs. 0.987 g/cm²; P<0.009) que las mujeres de genotipo CC+CT (Figura 4.7).

4.1.8. Descripción de una interacción génica entre los genes *CD40* y *CD40L*

Dado que CD40L interacciona in vivo con su receptor CD40 para llevar a cabo todas sus funciones en el sistema inmune, se planteó si, ya que se había detectado una asociación entre un SNP en el gen *CD40* y masa ósea y riesgo de sufrir osteoporosis u osteopenia, se podría encontrar algo similar en polimorfismos del gen *CD40L*.

La Tabla 4.17 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas de los cuatro polimorfismos estudiados, comprobándose que las frecuencias para los cuatro polimorfismos se ajustaban al equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tal y como se esperaba, los dos polimorfismos pertenecientes al bloque haplotípico 1 (ver *Materiales y Métodos*) del gen *CD40L* (rs3092952 y rs1126535) presentaban un fuerte desequilibrio de ligamiento ($D'=0.99$), mientras que el desequilibrio de ligamiento que presentaban estos dos anteriores con el polimorfismo rs3092923 perteneciente al bloque 2 fue más mucho más débil ($D'=0.87$ y $D'=0.64$, respectivamente).

Tabla 4.17. Frecuencia genotípica y alélica y valor de *P* para el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg (*H-W*), en los 3 SNPs estudiados del gen *CD40L* y el SNP de la secuencia Kozak del gen *CD40*.

Gen	SNP	Genotipo	N (frecuencia)	Frecuencia alélica	H-W (P)
<i>CD40</i>	rs1883832	C C	411 (0.51)	C (0.71)	0.895
		C T	332 (0.41)	T (0.29)	
		T T	68 (0.08)		
<i>CD40L</i>	rs3092952	A A	544 (0.67)	A (0.82)	0.769
		A G	243 (0.30)	G (0.18)	
		G G	24 (0.03)		
	rs1126535	T T	568 (0.70)	T (0.84)	0.583
		T C	227 (0.28)	C (0.16)	
		C C	16 (0.02)		
rs3092923	T T	649 (0.80)	T (0.90)	0.750	
	T C	154 (0.19)	C (0.10)		
	C C	8 (0.01)			

A partir de un análisis preliminar realizado mediante comparación de medias (ANOVA), se detectaron asociaciones significativas y/o sugestivas entre el polimorfismo rs1883832 del gen *CD40* con DMO de cadera ($P=0.018$) y columna ($P=0.063$) e, interesantemente, entre el polimorfismo rs1126535 del gen *CD40L* con DMO de columna ($P=0.040$). En ambos casos, las mujeres con genotipo TT mostraron una menor masa ósea que las mujeres de genotipo CC o CT. Para establecer el tipo de herencia que seguía cada polimorfismo, se utilizó el programa SNPStats el cual asignó un modelo de herencia recesiva para el polimorfismo rs1883832 (*CD40*) ($P=0.004$ y $P=0.02$ para cadera y columna, respectivamente), siendo el genotipo TT el recesivo (ver frecuencias en Tabla 4.17). Para el polimorfismo rs1126535

(*CD40L*), el programa asignó un modelo de herencia dominante ($P=0.01$ para columna) para el genotipo TT (ver frecuencias en Tabla 4.17). Siguiendo estos datos, las mujeres con genotipo CC y CT se agruparon (CC/CT) en ambos casos. Las principales características de las 811 mujeres participantes en el estudio según esta clasificación genotípica para cada uno de los polimorfismos rs1883832 (*CD40*) y rs1126535 (*CD40L*) se muestran en las Tablas 4.18 y 4.19, respectivamente.

Como se puede observar en las Tablas 4.18 y 4.19, no se observaron diferencias significativas entre las mujeres de genotipo TT y las mujeres de genotipo CC/CT para las variables examinadas, a excepción del porcentaje de fumadoras que fue mayor en mujeres TT que en las CC/CT en el polimorfismo rs1126535 del gen *CD40L* (Tabla 4.19). En cuanto a los parámetros densitométricos, las mujeres con genotipo TT para el polimorfismo rs1883832 del gen *CD40* mostraron una menor DMO (también para el Z-score) tanto en cadera como en columna ($P=0.005$ y $P=0.020$, respectivamente). Además, las mujeres TT para el polimorfismo rs1126535 de *CD40L* mostraron una menor DMO en columna que las mujeres con genotipo CC+CT ($P=0.014$, Tabla 4.19).

Tabla 4.18. Datos antropométricos, bioquímicos, óseos y estado menopáusico de la población estudiada de acuerdo al genotipo del SNP rs1883832 (CD40).

	N	rs1883832 (CD40)		P
		TT	CC/CT	
Edad (años)	811	53.8±6.1	52.7±6.6	0.257
Peso(kg)	811	66.8±10.2	66.2±11.0	0.301
Altura(cm)	811	158.1±6.1	157.6±6.2	0.533
IMC (kg/m²)	811	26.8±4.2	26.6±4.3	0.651
C. Tabaco (%)	811	22.1	26.9	0.385
Estradiol (pg/ml)	768	15.1±13.5	16.7±15.1	0.289
Uso THS (%)	811	41.2	33.5	0.229
Menop. quirúrgica (%)	811	30.8	26.5	0.466
Posmenopáusicas (%)	811	94.1	87.2	0.120
PTH (pg/mL)	350	43.6±13.1	45.3±14.4	0.510
CTx (ng/mL)	602	0.38±0.18	0.43±0.20	0.093
Calcio (mg/dL)	756	9.65±0.44	9.60±0.41	0.468
Fósforo (mg/dL)	756	3.65±0.42	3.62±0.46	0.652
FA Total(U/L)	670	177.9±40.7	169.4±40.7	0.139
25(OH)D3 (ng/mL)	350	27.4±9.5	25.4±9.9	0.204
OPG (pg/mL)	350	88.3±30.5	97.0±44.6	0.193
DMO CF(g/cm²)	693	0.759±0.122	0.802±0.109	0.005
Z-score CF	693	-0.429±0.938	-0.095±0.901	0.007
DMO CL (g/cm²)	719	0.956±0.138	1.001±0.148	0.020
Z-score CL	719	-0.557±1.032	-0.221±1.226	0.036

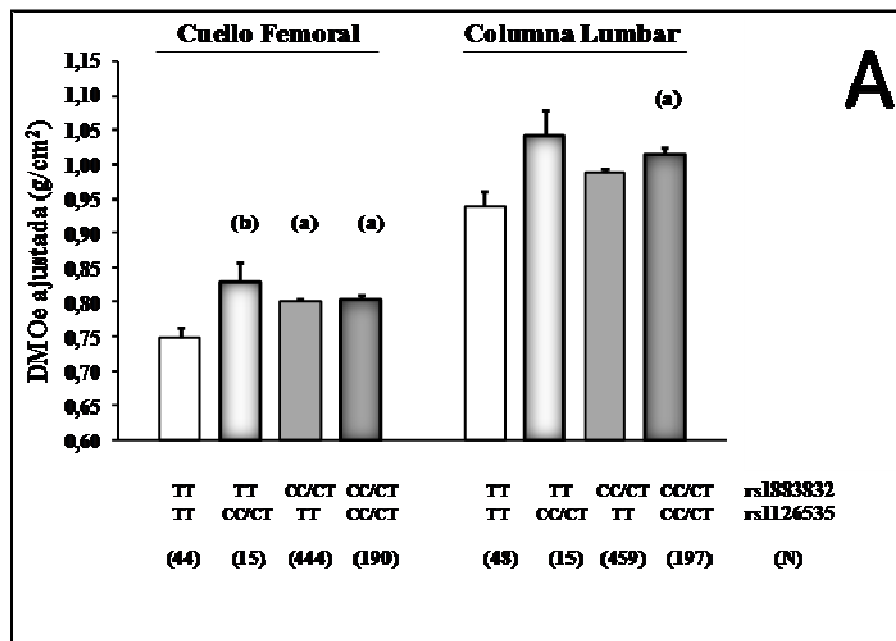
Tabla 4.19. Datos antropométricos, bioquímicos, óseos y estado menopáusico de la población estudiada de acuerdo al genotipo del SNP rs1126535 (CD40L).

	N	rs1126535 (CD40L)		P
		TT	CC/CT	
Edad (años)	811	52.7±6.3	52.8±7.0	0.805
Peso(kg)	811	66.4±10.5	65.8±11.9	0.213
Altura(cm)	811	157.7±6.2	157.6±6.2	0.788
IMC (kg/m ²)	811	26.8±4.2	26.5±4.6	0.379
C. Tabaco (%)	811	28.9	20.8	0.018
Estradiol (pg/ml)	768	16.4±15.5	16.4±12.6	0.333
Uso THS (%)	811	34.9	32.5	0.517
Menop. quirúrgica (%)	811	26.0	29.3	0.375
Posmenopáusicas (%)	811	88.7	85.8	0.289
PTH (pg/mL)	350	45.7±14.2	44.1±14.5	0.345
CTx (ng/mL)	602	0.42±0.19	0.43±0.21	0.749
Calcio (mg/dL)	756	9.62±0.41	9.56±0.41	0.101
Fósforo (mg/dL)	756	3.59±0.45	3.67±0.46	0.109
FA Total(U/L)	670	170.2±40.3	169.1±41.8	0.756
25(OH)D3 (ng/mL)	350	25.5±10.1	25.6±9.6	0.793
OPG (pg/mL)	350	97.2±43.7	92.2±40.0	0.181
DMO CF(g/cm ²)	693	0.796±0.109	0.805±0.114	0.333
Z-score CF	693	-0.156±0.892	-0.050±0.952	0.166
DMO CL (g/cm ²)	719	0.989±0.143	1.018±0.156	0.014
Z-score CL	719	-0.338±1.170	-0.038±1.294	0.003

Teniendo en cuenta que los genes *CD40* y *CD40L* necesitan interactuar in vivo para llevar a cabo su función biológica y que, según los resultados previos, ambos genes parecen estar relacionados con la DMO, se planteó el análisis de una posible interacción génica entre ambos en relación a estos fenotipos. Para ello, se realizó un análisis bifactorial (ANOVA factorial) entre el polimorfismo rs1883832 del gen *CD40* y el polimorfismo rs1126535 del gen *CD40L*. Muy interesantemente, se detectó una asociación entre ambos polimorfismos y la DMO de cadera ($P=0.0020$) y de columna ($P=0.0013$) y con respecto a la Z-score ($P=0.0001$) de cadera y la Z-score de columna ($P=0.0001$). Tal y como se ha descrito en muchos trabajos, la edad, los años desde la menopausia, el IMC, uso de terapia hormonal y duración, y el estatus de la menopausia, son parámetros que se relacionan significativamente con la DMO de cadera y de columna. Así pues, se realizó un análisis ANCOVA entre los fenotipos DMOe de cadera y de columna y los Z-score de cadera y de columna (parámetro ya corregido por la edad) y los dos polimorfismos como factores principales, usando como covariables los años desde la menopausia, IMC, uso y tiempo de uso de la terapia hormonal, y estatus de la menopausia, junto con el tipo de densitómetro usado y porcentaje de fumadoras ya que este último factor fue significativo entre genotipos (Tabla 4.19).

Resultados

El análisis mostró que las mujeres con genotipo TT para ambos polimorfismos presentaban un valor menor de DMOe y de Z-score en cadera que el resto de mujeres del estudio y tras ajustar por las covariables citadas (Figura 4.8), manteniéndose incluso la significación después de aplicar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, a excepción de las mujeres con genotipo TT y CC/CT para el polimorfismo rs1883832 de *CD40* y rs1126535 del gen *CD40L* respectivamente ($P=0.090$; Figura 4.8-B) en el análisis de la Z-score.



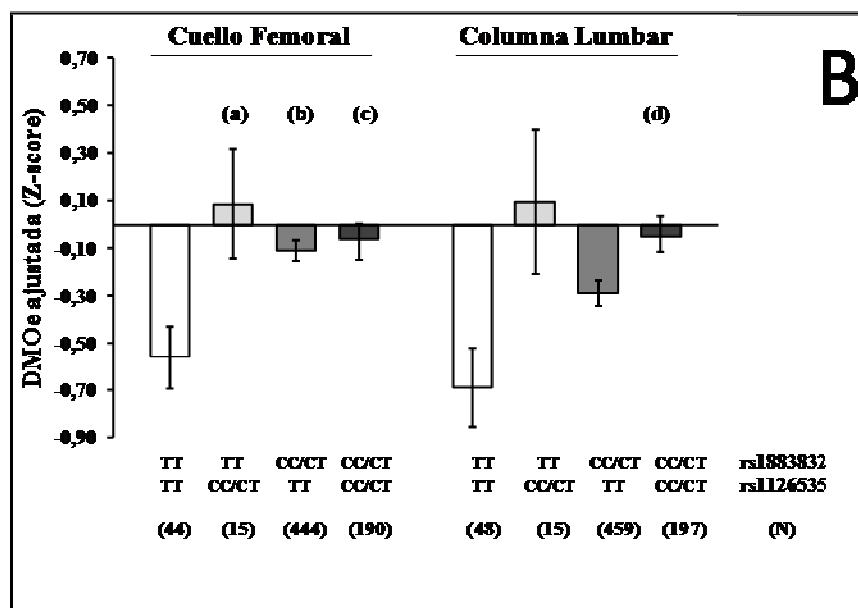


Figura 4.8. DMOe (A) y Z-scores (B) de cadera y de columna ajustadas por edad (excepto en Z-scores), ADM, IMC, consumo de tabaco, estado menopáusico, tipo de densitómetro y uso y duración de THS en nuestra población de acuerdo a los genotipos para el SNP rs1883832 en el gen CD40 y rs1126535 en el gen CD40L. Los valores son medias \pm SEM. (A): (a) $P=0.008$ vs. mujeres TT+TT y (b) $P=0.046$ vs. mujeres TT+TT y (B): (a) $P=0.090$, (b) $P=0.008$, (c) $P=0.005$ vs. mujeres TT+TT y (d) $P=0.005$ vs. mujeres TT+TT, en cada localización esquelética, tras la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

En cuanto al análisis para la columna lumbar, las mujeres con genotipo TT para ambos polimorfismos, mostraron una menor DMOe y Z-score ajustadas que las mujeres con genotipo CC/CT para ambos polimorfismos ($P=0.008$ y $P=0.005$, respectivamente), tras aplicar la corrección de Bonferroni (Figura 4.8). Cuando comparamos las de genotipo TT+TT con el resto de las mujeres, encontramos un

significación estadística de $P=0.0007$ para la Z-score de cadera y de $P=0.007$ para la Z-score de columna (datos no mostrados).

Finalmente, se realizó un análisis de regresión múltiple, ajustando por edad, años desde la menopausia, IMC, tipo de densitómetro, uso y tiempo de uso de la terapia hormonal y estatus de la menopausia y porcentaje de fumadoras, para evaluar el riesgo de sufrir osteopenia u osteoporosis tanto en cuello femoral como en columna lumbar (Tabla 4.20).

Tabla 4.20. Estimación del riesgo de osteopenia u osteoporosis en cuello femoral y columna lumbar, ajustado por la edad, Adm, IMC, consume de tabaco, estatus menopáusico, tipo de densitómetro, y uso y duración de THS, de acuerdo al genotipo. La N se muestra entre paréntesis.

GENOTIPO*	P	OR	95% CI
Cuello Femoral			
TT+TT (44) vs. TT + CC/CT (15)	0.019	5.39	1.32-22.03
TT+TT (44) vs. CC/CT + TT (445)	0.005	2.79	1.36-5.76
TT+TT (44) vs. CC/CT + CC/CT (189)	0.006	2.97	1.36-6.50
TT+TT (44) vs. ALL (649)	0.006	2.76	1.35-5.65
Columna Lumbar			
TT+TT (48) vs. TT + CC/CT (15)	0.011	5.10	1.46-17.81
TT+TT (48) vs. CC/CT + TT (460)	0.055	2.08	0.98-4.39
TT+TT (48) vs. CC/CT + CC/CT (196)	0.002	3.41	1.56-7.47
TT + TT (48) vs. ALL (671)	0.020	2.39	1.15-4.98

* El primer genotipo de cada par corresponde al SNP rs1883832 (CD40) y el Segundo al SNP rs1126535 (CD40L).

En cadera, al comparar las mujeres de genotipo TT para ambos polimorfismos con las mujeres de los otros tres grupos, se obtuvo un *odds ratio* para osteopenia/osteoporosis siempre mayor de 2.79 (2.79-5.39) (Tabla 4.20) y cuando se comparó con todas las mujeres del estudio (mujeres TT+TT vs. todas las demás), se obtuvo un *odds ratio* para osteopenia/osteoporosis de 2.76 (95%CI: 1.35-5.65; $P=0.006$). En el caso de la columna, de nuevo, las mujeres TT para ambos polimorfismos mostraron un elevado riesgo de sufrir osteopenia u osteoporosis pero, en este caso, solo cuando se realizaron las comparaciones TT+TT vs. CC/CT+CC/CT, manteniéndose la significación tras la aplicar la corrección de Bonferroni ($P<0.00625$; dos fenotipos, 4 comparaciones).

En este estudio de riesgo se han incluido tanto mujeres con osteopenia como mujeres con osteoporosis debido a que la población solo incluye 30 casos de mujeres con osteoporosis en cadera de un total de 693 con estudios densitométricos. No obstante, se realizó un análisis de regresión múltiple, ajustando por las mismas covariables indicadas anteriormente, para estimar el riesgo de osteoporosis de acuerdo con la OMS ($T\leq-2.5$), mostrando un *odds ratio* para las mujeres TT+TT, cuando se compararon con el resto de mujeres del estudio, de 3.14 (95%IC: 1.073-9.202; $P=0.037$) y de 2.09 (95%IC: 1.032-4.218; $P=0.041$) para cadera y columna, respectivamente.

4.1.9. Descripción de la población de mujeres participantes en el estudio del efecto de CRi sobre el metabolismo óseo y sistema cardiovascular

El tratamiento fue bien tolerado y ninguna paciente abandonó el estudio debido a algún tipo de efecto secundario. La Tabla 4.21 presenta los datos clínicos y antropométricos basales de las 82 mujeres estudiadas.

Tabla 4.21. Características antropométricas y clínicas basales de 82 mujeres posmenopáusicas, 45 mujeres con tratamiento (Remifemin) y 37 sin tratamiento. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DE).

	SIN TRATAMIENTO	REMIFEMIN
<i>Datos antropométricos y clínicos</i>		
Edad (años)	55.5 \pm 5.9	55.3 \pm 5.1
Años desde la menopausia (años)	10.4 \pm 5.3	8.5 \pm 4.5
IMC (kg/m ²)	26.8 \pm 3.8	27.4 \pm 4.2
Cintura/cadera	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1
Menarquia (años)	12.2 \pm 1.5	13.0 \pm 1.6
Menopausia (años)	47.8 \pm 4.7	49.1 \pm 43.8
Menopausia quirúrgica (%)	25.0	27.9
Gestaciones	2.2 \pm 1.4	2.6 \pm 1.9
Fumadora (%)	20.6	31.7
Tensión sistólica (mmHg)	143.1 \pm 19.1	136.7 \pm 21.7
Tensión diastólica (mmHg)	84.0 \pm 10.8	82.2 \pm 10.9
<i>Parámetros bioquímicos</i>		
Estradiol (pg/mL)	14.3 \pm 10.7	17.9 \pm 13.5
Testosterona (ng/mL)	0.4 \pm 0.2	0.4 \pm 0.24
FSH (U/I)	73,9 \pm 33,9	68,4 \pm 32,2
PTH (pg/mL)	39.1 \pm 11.6	43.5 \pm 14.8

Los valores basales de estradiol, testosterona, FSH y PTH también aparecen en la misma tabla. Los valores densitométricos de cadera y columna (T-score y Z-score) que aparecen en la Tabla 4.22 muestran que ambas poblaciones estudiadas tienen una adecuada densitometría de acuerdo a la edad media de esta población. No existen diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control para los parámetros presentados tanto en la Tabla 4.21 como en la Tabla 4.22, por lo que ambas poblaciones son comparables.

El resto de parámetros bioquímicos incluidos en la analítica de rutina fueron normales (datos no presentados).

Tabla 4.22. Valores densitométricos basales de la población estudiada. Los resultados se expresan como media \pm DE.

	No tratadas	REMIFEMIN
DMO cadera (g/cm²)	0.82 \pm 0.13	0.83 \pm 0.11
T cadera	-0.7 \pm 1.1	-0.4 \pm 1.1
Z cadera	0.1 \pm 1.1	0.4 \pm 1.2
DMO columna (g/cm²)	1.04 \pm 0.14	1.06 \pm 0.13
T columna	-0.7 \pm 1.4	-0.5 \pm 1.3
Z columna	0.1 \pm 1.3	0.4 \pm 1.2

4.1.10. Efecto del CRi sobre el metabolismo óseo

Ningún parámetro bioquímico de metabolismo óseo presentó diferencias significativas a los 3 meses entre ambos grupos de

tratamiento, excepto NTx y FA. En la Tabla 4.23 se puede ver los valores de NTx y FA a los 3 meses (% respecto al basal). Se observó un descenso significativo ($p < 0.05$) en los niveles de NTx en el grupo tratado con Remifemin cuando se comparó con el grupo no tratado. La FA presentó un aumento significativo ($p < 0.05$) en el grupo tratado cuando se comparó con el grupo no tratado.

*Tabla 4.23. Efecto del tratamiento sobre parámetros bioquímicos de metabolismo óseo en la población estudiada a los 3 meses (% respecto al basal). Los valores se presentan como la media \pm DE. *: $p < 0.05$ entre Sin tratamiento y Remifemin respecto al mismo tiempo de tratamiento.*

	3 meses	
	Sin tratamiento	Remifemin
NTx	123.7 \pm 65.2	90.6 \pm 33.3 *
Ca total	99.7 \pm 4.8	100.8 \pm 6.8
Ca/Cr	153.8 \pm 132.4	117.1 \pm 47.3
FA	98.1 \pm 10.7	105.0 \pm 15.5 *
Fosfato	105.2 \pm 14.8	99.8 \pm 10.6

4.1.11. Efecto del CRi sobre la diferenciación de células preosteoblástica (MC3T3-E1) y expresión génica

Como se ha comentado anteriormente, la fosfatasa alcalina es un marcador de diferenciación osteoblástica. Así pues, se planteó realizar un estudio *in vitro* para analizar si los sueros de mujeres tratadas o no con el CRi (Remifemin) influían en la producción de fosfatasa alcalina en cultivos de células preosteoblásticas (MC3T3-E1).

La Figura 4.9a muestra los valores de FA (% respecto al basal) en cultivos de células MC3T3-E1 a las que se les añadió suero de las mujeres tratadas o sin tratar con vehículo α -MEM (sin inductores de diferenciación osteoblástica). No se apreciaron cambios significativos entre grupos a los 3 meses, aunque parece que exista una tendencia a aumentar los niveles de FA en las células cultivadas con suero de pacientes tratadas con Remifemin. El mismo efecto fue observado cuando se trató a las células con suero de las mujeres tratadas o sin tratar con inductores de la diferenciación osteoblástica (Figura 4.9b).

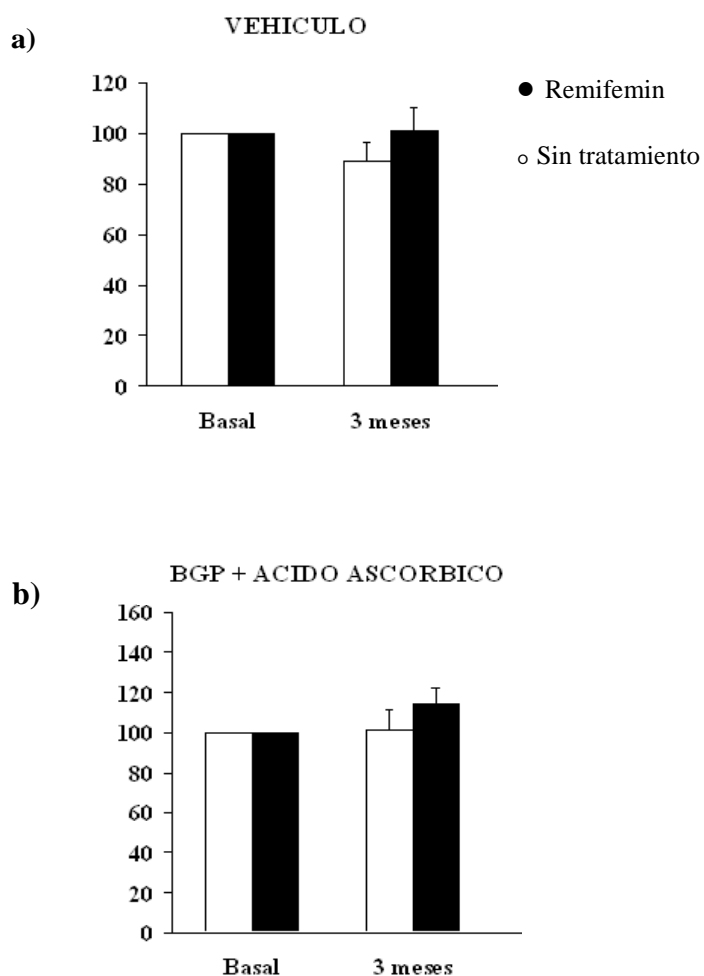


Figura 4.9. a) Niveles de FA en cultivos de células MC3T3-E1 incubados con sueros de pacientes tratadas o no tratadas y con vehículo (α -MEM) respecto al basal; b) niveles de FA en cultivos de células MC3T3-E1 incubados con sueros de pacientes tratadas o no tratadas y con inductores de la diferenciación osteoblástica respecto al basal.

De acuerdo con estos resultados, cuando se compararon los datos de expresión del gen constitutivo GAPDH respecto al gen de la FA no se encontraron diferencias significativas (FA: 101 ± 16 (Remifemin) frente a 103 ± 9 (Sin tratamiento)) (Figura 4.10.). Tampoco se encontraron cambios en la expresión de los genes de la osteocalcina ni de Runx2 (Osteocalcina: 107 ± 13 (Remifemin) frente a 104 ± 11 (Sin tratamiento); y Runx2: 110 ± 17 (Remifemin) frente a 105 ± 12 (Sin tratamiento)). (Datos normalizados respecto a la expresión de GAPDH)

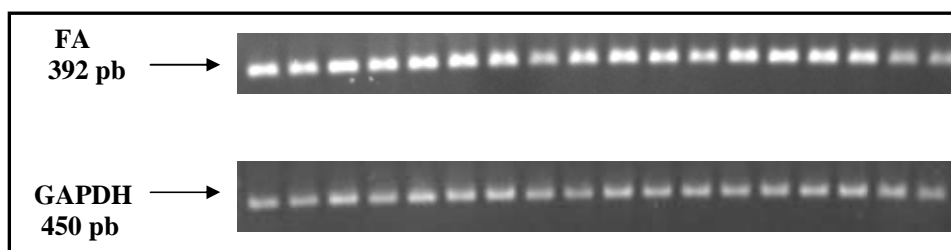


Figura 4.10. Productos obtenidos mediante RT-PCR de los genes FA y GAPDH por electroforesis en gel de agarosa. La intensidad de cada banda se cuantificó mediante el programa informático Adobe Photoshop 7.0, usando la función histograma.

4.1.12. Efecto del CRi sobre el perfil lipídico y los niveles de IL6

Para el estudio del efecto del CRi sobre el sistema cardiovascular, se analizó el efecto del CRi sobre los niveles de IL-6, como marcador inflamatorio, y el perfil lipídico en el suero de mujeres tratadas y no tratadas con CRi a los 3 y 6 meses (Figura 4.11.; Tabla 4.24.).

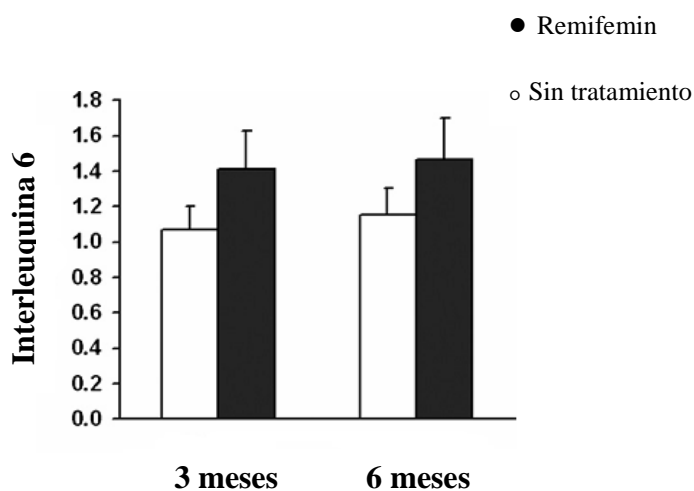


Figura 4.11. Efecto de CRI sobre los niveles séricos de IL-6 para el grupo tratado y control a los 3 y 6 meses respecto al basal

Tabla 4.24. Efecto del CRI sobre el perfil lipídico a los 3 y 6 meses (% respecto al basal). Los valores se presentan como la media \pm DE.

	3 meses		6 meses	
	Sin tratamiento	Remifemin	Sin tratamiento	Remifemin
Colesterol	104.9 \pm 15.0	103.1 \pm 12.2	102.0 \pm 11.2	99.6 \pm 16.0
Triglicéridos	113.8 \pm 40.4	102.7 \pm 31.9	105.6 \pm 26.6	99.5 \pm 34.3
HDL	102.8 \pm 14.7	103.4 \pm 14.7	103.2 \pm 11.1	100.7 \pm 17.7
LDL	105.5 \pm 18.5	99.6 \pm 25.2	101.8 \pm 14.5	100.5 \pm 24.6

En ambos casos no se observaron diferencias significativas a los 3 meses ni a los 6 meses entre ambos grupos de mujeres. La estabilidad

del perfil lipídico se mantuvo en cada grupo a lo largo del estudio (Tabla 4.24.).

4.1.13. Efecto del CRi sobre la producción de prostaciclina en células HUVEC

La figura 4.12. muestra los niveles de 6-ceto-prostaglandina $F_{1\alpha}$ (% respecto al basal) producidos por las células HUVEC tras la adición de suero de pacientes de cada grupo. Los niveles de 6-ceto-prostaglandina $F_{1\alpha}$ no presentaron cambios significativos entre el grupo control y el grupo tratado a los 3 meses ni a los 6 meses. Tampoco se vieron cambios significativos al comparar con los niveles basales.

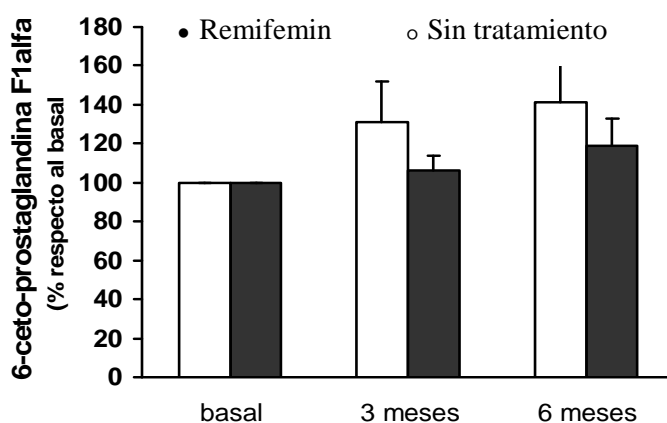


Figura 4.12. Producción de 6-ceto-prostaglandina $F_{1\alpha}$ por células HUVEC en presencia de suero de pacientes tratadas o no con Remifemin.

4.2. ESTUDIO EN MODELO ANIMAL

4.2.1. Efecto de la ovariectomía y de la administración de agonistas del receptor de estrógenos sobre el sistema inmune y sobre el metabolismo óseo en el ratón.

4.2.1.1. Efecto sobre parámetros físicos

El efecto de la ovariectomía y de la administración de agonistas del receptor de estrógenos (estradiol, raloxifeno y genisteína) sobre el peso del animal y sobre la relación entre el peso del útero y peso del timo respecto al peso del animal se muestra en la Figura 4.13.

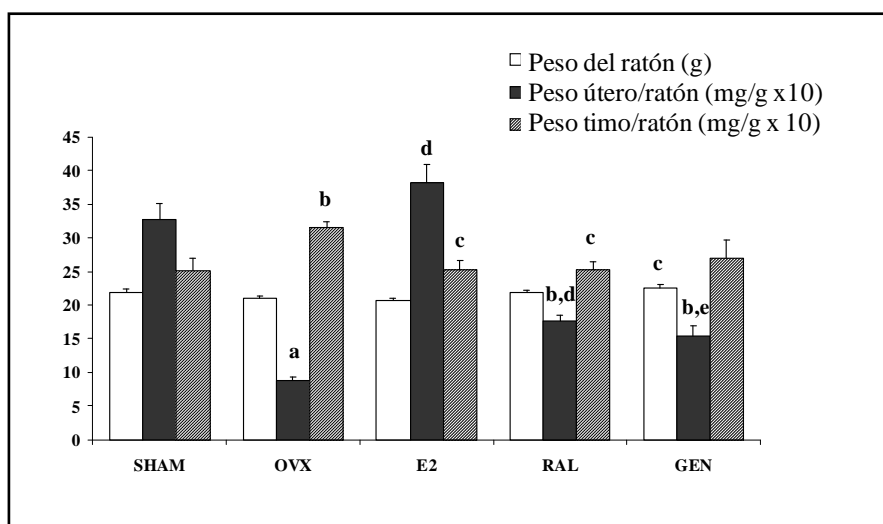


Figura 4.13. Peso del ratón al final del experimento y relación entre los pesos del útero y del timo respecto al peso del ratón. Cada barra representa la media \pm SEM. a $P < 0.0001$ vs SHAM; b $P < 0.01$ vs SHAM; c $P < 0.05$ vs OVX; d $P < 0.0001$ vs OVX; e $P < 0.05$ vs OVX.

En el momento del sacrificio de los animales, no se observaron diferencias significativas respecto al peso entre el grupo SHAM y el grupo OVX. Sin embargo, se observó una marcada atrofia uterina ($P<0.0001$; Figura 4.14.) al igual que una hipertrofia del timo ($P<0.01$) como consecuencia de la ovariectomía.



Figura 4.14. Imágenes representativas de los úteros de cada grupo experimental. SHAM, ratones falsamente operados; OVX, ratones ovariectomizados; E2, ratones OVX tratados con estradiol; RAL, ratones OVX tratados con raloxifeno; GEN, ratones OVX tratados con genisteína.

Cuando se analizó el efecto de la administración de agonistas del receptor de estrógenos, se observó que el peso de los ratones fue mayor en el grupo GEN con respecto al grupo OVX ($P<0.05$). Todos los tratamientos aumentaron el peso del útero respecto al grupo OVX (E2: $P<0.0001$; RAL: $P<0.0001$; GEN: $P<0.05$; Figuras 4.13. y 4.14.). Solo el grupo E2 recuperó el tamaño original del útero. Los grupos RAL y GEN, pese a presentar un aumento en el peso del útero respecto a OVX, se mantuvieron por debajo del grupo SHAM (ambos, $P<0.01$).

En cuanto al tamaño del timo, los grupos E2 y RAL mostraron una corrección de la hipertrofia tímica inducida por la ovariectomía respecto al grupo OVX ($P<0.05$) mientras que el grupo GEN mostró una tendencia únicamente ($P=0.08$; Figura 4.13.).

4.2.1.2. Efecto sobre parámetros séricos

El efecto de la ovariectomía y de la administración de agonistas del receptor de estrógenos sobre los parámetros séricos se muestra en la Tabla 4.25.

Tabla 4.25. Valores séricos de parámetros bioquímicos de los ratones SHAM, OVX, y OVX-tratados.

	SHAM	OVX	E2	RAL	GEN
Calcio (mg/dl)	9.5±0.2	9.9±0.1 ^a	9.6±0.2	9.9±0.2	9.7±0.1
FA (U/L)	69.7±4.6	47.3±8.3 ^a	62.9±6.1	55.4±6.3	56.5±7.3
TRAP (mOD 405nm/mL)	80.8±6.5	91.0±8.4	76.9±5.7	87.6±13.7	80.6±2.6
IL-6 (pg/ml)	8.8±1.5	12.2±2.7	10.7±2.2	9.7±2.1	7.4±0.4
IFN-γ (pg/ml)	20.4±2.1	17.4±2.2	18.6±1.7	14.9±1.7	20.8±1.1
IL-2 (pg/ml)	10.6±1.1	11.0±1.2	11.2±0.4	13.4±0.8 ^a	16.0±0.9 ^{b,c,d}
Piridolinas (mM/l)	2.7±0.1	2.4±0.2	2.8±0.2	2.7±0.2	2.9±0.2

Los valores representan la media ± SEM. ^a $P<0.05$ vs. SHAM; ^b $P<0.05$ vs. OVX; ^c $P<0.01$ vs. E2; ^d $P<0.001$ vs. SHAM

Cuatro semanas después de realizar la ovariectomía, se determinaron los niveles de calcio y se observó que los ratones del grupo OVX presentaban mayores niveles de calcio sérico que los

ratones del grupo SHAM ($P<0.05$), mientras que los de la actividad fosfatasa alcalina fueron menores ($P<0.05$). En cuanto a los niveles de TRAP, piridolina y diversas citoquinas estudiadas (IL-6, IFN- γ y IL-2), no se observaron cambios inducidos por la ovariectomía.

Cuando se analizó el efecto de la administración de agonistas del receptor de estrógenos, no se observaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de calcio sérico y de FA entre los grupos tratados y el grupo SHAM (Tabla 4.25.). Los tratamientos tampoco modificaron los niveles de las citoquinas ensayadas a excepción de la IL-2 (Tabla 4.25.) cuyos niveles fueron mayores en el grupo RAL ($P<0.05$ vs. SHAM) y en el grupo GEN ($P<0.05$ vs. OVX, y $P<0.001$ vs. SHAM).

4.2.1.3. Efecto sobre la proliferación celular

Con el fin de evaluar la funcionalidad de las células del bazo y de la médula ósea de los ratones con los distintos tratamientos, se realizaron ensayos de proliferación celular *in vitro* en respuesta a diferentes mitógenos (Tabla 4.26.).

Resultados

Tabla 4.26. Proliferación celular en bazo y médula ósea de los ratones SHAM, OVX, y OVX-tratados. Los valores representan la media \pm SEM. ^a $P < 0.01$ vs. SHAM; ^b $P < 0.05$ vs. OVX; ^c $P < 0.05$ vs. SHAM.

	BAZO				
	SHAM	OVX	E2	RAL	GEN
PHA (10 μ g/ml)	1.08 \pm 0.02	1.10 \pm 0.03	1.03 \pm 0.05	1.04 \pm 0.04	1.10 \pm 0.06
PMA (10 ng/ml)	1.26 \pm 0.07	1.32 \pm 0.03	1.21 \pm 0.05	1.16 \pm 0.04 ^b	1.17 \pm 0.05 ^b
α CD3 (1 μ g/ml) + α CD28 (0,2 μ g/ml)	1.37 \pm 0.11	1.38 \pm 0.09	1.38 \pm 0.09	1.25 \pm 0.09	1.35 \pm 0.14
MCSF (25 ng/ml)	1.22 \pm 0.03	1.35 \pm 0.08	1.30 \pm 0.05	1.26 \pm 0.06	1.32 \pm 0.10
LPS (1 μ g/ml)	1.31 \pm 0.05	1.61 \pm 0.06 ^a	1.47 \pm 0.08	1.51 \pm 0.14	1.60 \pm 0.16
Dexametasona 0.1 μ M	0.68 \pm 0.04	0.60 \pm 0.05	0.56 \pm 0.03 ^c	0.54 \pm 0.04 ^c	0.51 \pm 0.03 ^a
IFN γ (100 ng/ml)	1.00 \pm 0.02	1.03 \pm 0.04	0.96 \pm 0.04	0.93 \pm 0.02	1.00 \pm 0.04
	MÉDULA ÓSEA				
	SHAM	OVX	E2	RAL	GEN
PHA (10 μ g/ml)	1.28 \pm 0.05	1.26 \pm 0.07	1.37 \pm 0.08	1.26 \pm 0.07	1.34 \pm 0.08
PMA (10 ng/ml)	1.78 \pm 0.03	1.89 \pm 0.07	1.75 \pm 0.08	1.88 \pm 0.08	1.98 \pm 0.07
α CD3 (1 μ g/ml) + α CD28 (0,2 μ g/ml)	1.08 \pm 0.02	1.14 \pm 0.04	1.11 \pm 0.02	1.08 \pm 0.02	1.09 \pm 0.03
MCSF (25 ng/ml)	2.39 \pm 0.03	2.64 \pm 0.17	2.49 \pm 0.15	2.58 \pm 0.19	2.65 \pm 0.13
LPS (1 μ g/ml)	1.93 \pm 0.07	1.89 \pm 0.17	2.13 \pm 0.15	2.03 \pm 0.14	1.94 \pm 0.18
Dexametasona 0.1 μ M	0.77 \pm 0.02	0.79 \pm 0.02	0.79 \pm 0.03	0.85 \pm 0.04	0.77 \pm 0.03
IFN γ (100 ng/ml)	1.22 \pm 0.03	1.32 \pm 0.07	1.37 \pm 0.06	1.35 \pm 0.07	1.43 \pm 0.07 ^c

Se observó que la ovariectomía indujo un aumento en la respuesta proliferativa de las células del bazo cuando eran estimuladas con LPS ($P<0.01$). Sin embargo este efecto no se observó al comparar los grupos tratados con el grupo SHAM (Tabla 4.26.). Por otro lado, las células procedentes del bazo de los ratones de los grupos RAL y GEN, mostraron una disminución en la proliferación celular en respuesta a PMA respecto al grupo SHAM ($P<0.05$). Finalmente se observó que la dexametasona $0.1 \mu\text{M}$ indujo apoptosis en todos los grupos tratados, siendo este efecto mayor en los animales tratados al compararlos con el grupo SHAM ($P<0.05$ para E2 y RAL y $P<0.01$ para GEN). Cuando se utilizaron otros estímulos como IFN- γ , anti-CD3+anti-CD28, M-CSF o PHA, la respuesta proliferativa de las células del bazo se mantuvo inalterable tanto para la ovariectomía como para los diferentes tratamientos.

La tasa de proliferación celular *in vitro* para las células de la médula ósea en respuesta a los diferentes mitógenos utilizados no se vio afectada ni por la ovariectomía ni por la administración de agonistas de los receptor de estrógenos (Tabla 4.26).

4.2.1.4. Efecto sobre las subpoblaciones celulares de bazo y de médula ósea.

Con el objetivo de examinar los efectos que provoca la ovariectomía y la administración de agonistas del receptor de estrógenos sobre la hematopoyesis, se analizaron las células del bazo y de la médula ósea de los animales mediante citometría de flujo. El

sistema nos diferenció claramente una región para el bazo (R1) y dos regiones (R1 y R2) para la médula que fueron analizadas. La región R1 contenía el mayor número de linfocitos/linfoblastos, mientras que R2 contenía la mayoría de las células mieloides (Figura 4.15.)

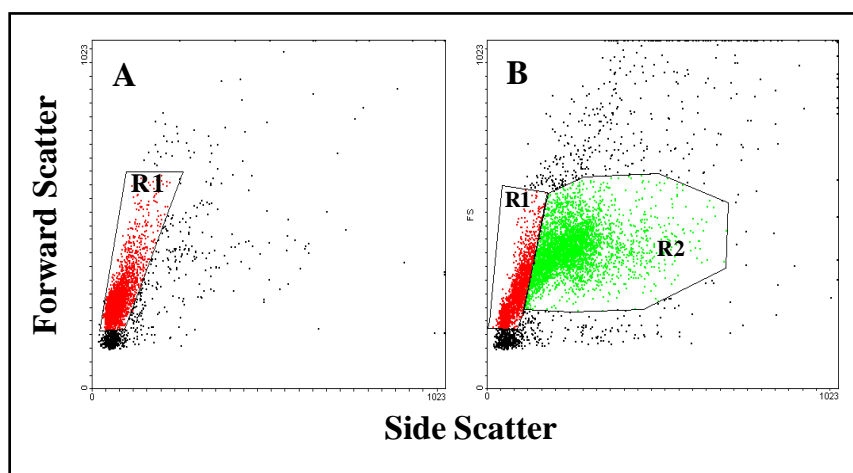


Figura 4.15. Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo representativos de bazo (A) y médula ósea (B). La región R1 contiene el mayor número de linfocitos/linfoblastos en bazo y médula ósea. La región R2 contiene la mayoría de las células mieloides, las cuales son células grandes con mayor proporción de gránulos intracelulares que las células de la región R1. Más del 85% de las células en la región R2 son positivas para el anticuerpo CD11b que reconoce el receptor para complemento tipo-3, que es común a todas las células mielomonocíticas.

El número total de células en el grupo OVX se mantuvo inalterable tanto en el bazo como en la médula ósea, aunque se observó una tendencia a aumentar, aproximadamente del 20%. Todos los grupos tratados mostraron una tendencia a disminuir el número

total de células por bazo o por fémur debido al efecto de la ovariectomía, aunque solo el grupo E2 mostró un descenso significativo ($p < 0.05$) en ambos órganos. Los ratones tratados no mostraron diferencias respecto al grupo SHAM (resultados no mostrados).

En cuanto al fenotipo celular, el efecto de la ovariectomía en el bazo no produjo ninguna modificación (Tabla 4.27).

Tabla 4.27. Análisis mediante citometría de flujo de las células de bazo de ratones SHAM, OVX, y OVX-tratados en la Región I.

	SHAM	OVX	E2	RAL	GEN
% de células positivas					
CD3	30.8±1.0	28.4±1.2	28.0±0.9	27.1±0.9 ^a	26.5±1.1 ^b
CD3+/CD4+	18.6±1.0	17.8±1.1	16.8±0.8	16.2±0.6	16.1±0.7 ^a
CD3+/CD8+	12.3±0.5	11.3±0.6	11.4±0.3	11.2±0.5	10.3±0.4 ^b
CD11b	5.3±0.3	6.5±1.0	6.7±0.8	7.5±0.8	6.4±1.0
CD19	57.9±0.8	56.1±0.8	57.0±1.1	54.9±1.9	57.9±0.9
Células totales positivas (x10⁶/bazo)					
CD3	6.7±1.3	7.2±0.6	5.3±0.7	5.3±0.7	6.2±0.4
CD3+/CD4+	3.8±0.7	4.5±0.4	3.2±0.4 ^c	3.3±0.3 ^c	3.8±0.3
CD3+/CD8+	2.7±0.6	2.9±0.2	2.1±0.2	2.3±0.3	2.4±0.2
CD11b	1.2±0.3	1.6±0.2	1.2±0.1	1.6±0.3	1.5±0.3
CD19	12.5±2.7	14.2±1.0	10.9±1.4 ^c	11.1±1.0	13.6±0.6

Los valores representan la media ± SEM. El número total de células por bazo se calculó a partir del número total de células tras la lisis de las células rojas y los porcentajes de las células positivas obtenidas para cada monoclonal (respecto a las células totales en cada histograma). ^a P<0.05 vs. SHAM; ^b P<0.01 vs. SHAM; ^c P<0.05 vs. OVX.

En el grupo E2 se observó una disminución en los niveles de las células totales positivas CD3+/CD4+ y de las células CD19+ respecto

al grupo OVX, al igual que el grupo RAL el cual también mostró una disminución de las células totales positivas CD3+/CD4+ respecto a OVX. Además, los ratones RAL presentaron una disminución en el porcentaje de células CD3+ ($P<0.05$), mientras que el grupo GEN mostró una disminución significativa en los porcentajes de todos los tipos de células T respecto al grupo SHAM (CD3+, CD4+, y CD8+; Tabla 4.27).

En cuanto a la médula ósea, la ovariectomía provocó cambios destacables en el fenotipo celular. En la región linfóide de la médula ósea (Tabla 4.28), la ovariectomía indujo un descenso en el porcentaje de células CD3+ ($P<0.05$) y un aumento en el de células CD19+ ($P<0.05$). Sin embargo, para el total de las células, solo se observó el aumento de las células CD19+ y CD25+ ($P<0.05$, para ambos)

Todos los ratones tratados mostraron un descenso en el porcentaje de células CD3+ respecto al grupo SHAM (E2, $P<0.001$; RAL, $P<0.01$, GEN, $P<0.001$) al igual que un descenso en el número total de células por fémur comparado con los grupos OVX y SHAM (Tabla 4.28). Además, los grupos E2 y RAL mostraron una disminución en el número de células CD19+ totales ($P<0.01$) respecto al grupo OVX, mientras que solo el grupo E2 experimentó una disminución en el número de células CD25+ al compararlo con el grupo OVX ($P<0.05$). Finalmente, todos los grupos de ratones tratados mostraron niveles bajos de células RANKL+ ($P<0.01$) respecto al grupo OVX (Tabla 4.28).

Tabla 4.28. Análisis mediante citometría de flujo de las células de médula ósea en la región linfoide de ratones SHAM, OVX y OVX-tratados (Región RI).

	SHAM	OVX	E2	RAL	GEN
	% de células positivas				
CD3	7.2±0.5	5.2±0.2 ^a	4.9±0.4 ^b	5.2±0.3 ^c	4.3±0.3 ^b
CD11b	27.0±3.5	24.5±6.0	33.8±4.3	34.9±5.7	32.9±6.6
CD19	23.1±1.7	31.4±3.1 ^a	29.8±3.1	27.8±3.6	33.8±3.4 ^a
CD25	17.0±0.7	24.1±4.4	23.5±2.2	29.6±4.2	30.3±6.7
RANKL	2.8±0.4	3.0±0.2	2.8±0.3	3.2±0.3	2.2±0.2
	Células totales positivas (x10⁶/médula ósea)				
CD3	2.6±0.7	2.5±0.3	1.2±0.3 ^{d,a}	1.3±0.1 ^{d,a}	1.5±0.2 ^{e,a}
CD11b	8.4±1.2	10.5±1.3	7.6±1.3	8.6±1.6	9.7±0.8
CD19	7.6±1.6	15.9±3.1 ^a	6.8±1.0 ^d	6.7±0.9 ^d	11.3±1.7
CD25	5.8±1.1	9.9±1.2 ^a	5.5±1.0 ^e	7.3±1.2	9.1±0.9
RANKL	0.9±0.2	1.5±0.2	0.6±0.1 ^d	0.8±0.1 ^d	0.8±0.1 ^d

Los valores representan la media ± SEM. El número total de células de la médula ósea por fémur se calculó a partir del número total de células tras la lisis de las células rojas y los porcentajes de las células positivas obtenidas para cada monoclonal (respecto a las células totales en cada histograma).

^a P<0.05 vs. SHAM; ^b P<0.001 vs. SHAM; ^c P<0.01 vs. SHAM; ^d P<0.01 vs. OVX; ^e P<0.05 vs. OVX.

La ovariectomía y los tratamientos afectaron al fenotipo de las células de la región mieloide (R2) pero en menor grado (datos no mostrados). No se observaron diferencias significativas en el número total de células, solo una disminución en el porcentaje de células CD3+ (P<0.05) en el grupo RAL cuando se comparó con el grupo SHAM, y un aumento en el porcentaje de células CD25+ (P<0.05) en el grupo OVX y E2 respecto al grupo SHAM (datos no mostrados).

4.2.1.5. Efecto sobre la expresión génica

A partir del ARN total extraído de células de médula ósea y mediante RT-PCRs semicuantitativas, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de diversos genes (Figura 4.16).

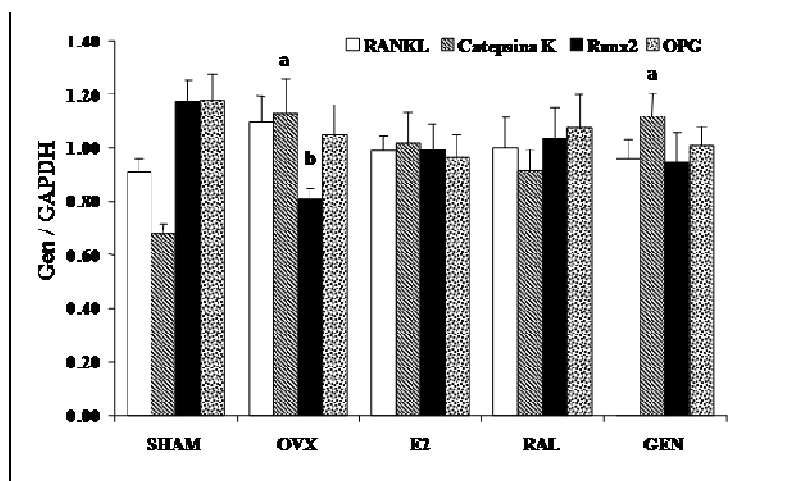


Figura 4.16. Niveles de expresión del ARNm a partir de médula ósea de ratones SHAM, OVX, y OVX-tratados mediante RT-PCR semicuantitativa a las 4 semanas de empezar los distintos tratamientos. Los valores son la media \pm SEM y representan la intensidad de la banda de bromuro de etidio de dos experimentos RT-PCR diferentes cuantificados usando la función histograma del software Adobe PhotoShop. Cada gen se normalizó respecto a la expresión de un gen constitutivo (GAPDH). ^a $P < 0.05$ vs. SHAM; ^b $P < 0.01$ vs. SHAM.

Tras cuatro semanas de tratamiento, se observó un elevado nivel de expresión de la catepsina K tanto en el grupo OVX como en el grupo GEN respecto al grupo SHAM, sin embargo no se observó

dicho efecto en los grupos E2 y RAL. Sorprendentemente, la ovariectomía provocó una disminución en la expresión del gen Runx2. Finalmente, la ovariectomía y el tratamiento con agonistas del receptor de estrógenos no afectaron a la expresión del resto de genes estudiados como RANKL y OPG (Figura 4.16.) o CD25, TRAP, osteocalcina, o IFN- γ (datos no mostrados).

4.2.2. Efecto de la ovariectomía y de la administración de agonistas del receptor de estrógenos sobre la microestructura ósea en el ratón

4.2.2.1. Efecto sobre el hueso trabecular

Tras realizar la ovariectomía a los ratones y administrarles durante 4 semanas distintos agonistas del receptor de estrógenos como estradiol, raloxifeno y genisteína, se realizó un análisis de la microestructura ósea de los fémures mediante microtomografía axial computerizada (micro-TAC). La Figura 4.17. muestra algunas imágenes representativas de la región femoral analizada mediante micro-TC. Se puede observar como las diferencias de la arquitectura trabecular entre grupos son evidentes y que todos los grupos de ratones tratados mejoraron la microestructura ósea que indujo la ovariectomía.

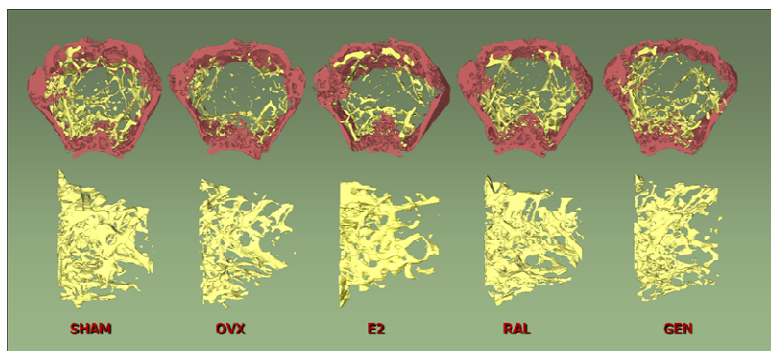


Figura 4.17. Detalles en 3-D del fémur de los distintos grupos de ratones analizados mediante μ -TC. La región roja es hueso cortical y la amarilla es hueso trabecular.

El análisis de los datos se muestra en la Figura 4.18. Como se puede observar en la figura, la ovariectomía disminuyó el número de trabéculas (Tb.N) y el grosor medio tridimensional de las trabéculas (Tb.Th) aproximadamente un 23% ($P < 0.01$) y un 11% ($P < 0.001$), respectivamente, cuando se comparó con el grupo SHAM, y aumentó la separación trabecular (Tb.Sp) un 9% ($p < 0.05$, Figura 4.18, A, C, y E).

Otros efectos adicionales inducidos por la ovariectomía fueron una disminución del 25% del porcentaje de volumen de hueso trabecular (BV/TV) ($P < 0.01$, Figura 4.18, B), y un aumento del 11% en el factor de patrón trabecular (Tb.Pf) ($P < 0.01$), sugiriendo una estructura con menor conectividad trabecular (Figura 4.18, D).

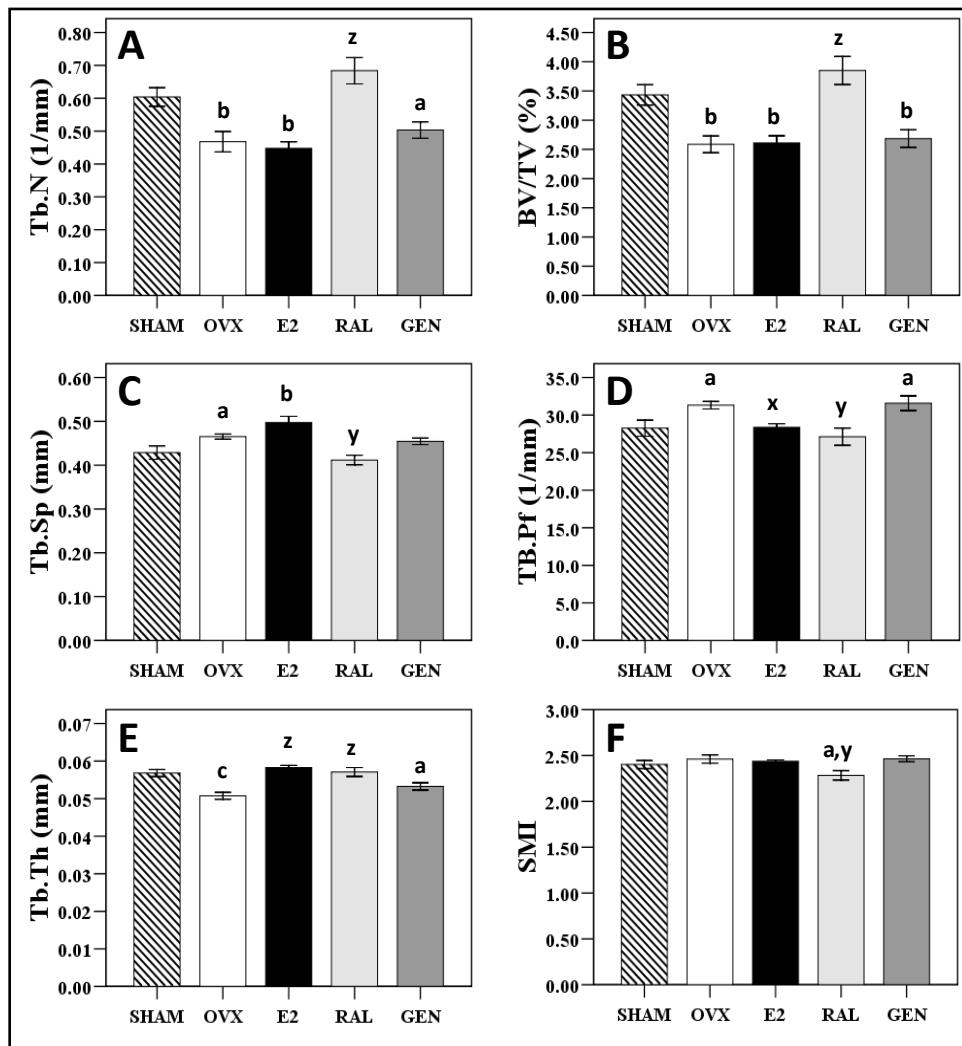


Figura 4.18. Efectos de la ovariectomía y de los tratamientos sobre parámetros de la microestructura ósea trabecular, Los valores son la media \pm SEM. ^a: $P < 0.05$ vs SHAM; ^b: $P < 0.01$ vs SHAM; ^c: $P < 0.001$ vs SHAM; ^x: $P < 0.05$ vs OVX; ^y: $P < 0.01$ vs OVX; ^z: $P < 0.0001$ vs OVX.

No se observaron diferencias significativas respecto al índice de modelo estructural (SMI) (Figura 4.18, F), una variable que cuantifica la prevalencia relativa de las trabéculas en forma de placa o en forma de tubo en una estructura 3D del hueso trabecular.

Respecto a los tratamientos, los datos referentes al grupo RAL y SHAM fueron similares (Figura 4.18), excepto para el índice de modelo estructural (SMI), el cual fue ligeramente menor para el grupo RAL ($P<0.05$). Sin embargo, los ratones tratados con RAL mostraron diferencias en todos los parámetros respecto al grupo OVX, demostrando claramente que este compuesto inhibió cualquier cambio provocado por la ovariectomía en el hueso trabecular (Figura 3.14). El efecto de la administración de E2 y GEN fue diferente. (Figura 4.18). El estradiol previno los cambios inducidos por la ovariectomía tanto en el grosor medio tridimensional de las trabéculas (Tb.Th) ($P<0.0001$) como en el factor de patrón trabecular (Tb.Pf) ($P<0.05$), pero no previno los cambios en el número de trabéculas (Tb.N), en la separación trabecular (Tb.Sp) o en el porcentaje de volumen de hueso trabecular (BV/TV). Respecto a la genisteína (GEN), este compuesto fue incapaz de corregir cualquier cambio inducido por la ovariectomía (Figura 4.18).

4.2.2.2. Efectos sobre el hueso cortical

En el caso del hueso cortical, al comparar el grupo OVX con el grupo SHAM, se observaron una serie de cambios, inducidos por la ovariectomía, en el perímetro periosteal (Ct.Pe.Pm) (un aumento del

13.1%, $P<0.01$), en el índice de resistencia mecánica o momento de inercia polar (MMI) (una disminución del 13.4%, $P<0.01$) y en el área de hueso cortical (B.Ar) (una disminución del 8.2% , $P<0.05$) (Tabla 4.29).

Tabla 4.29. Efecto de la ovariectomía y del tratamiento con agonistas del receptor de estrógenos sobre la microestructura del hueso cortical.

	SHAM	OVX	E2	RAL	GEN
Ct.En.Pm (mm)	4.95±0.27	4.93±0.17	5.04±0.16	5.02±0.18	5.30±0.09
Ct.Pe.Pm (mm)	6.05±0.21	6.84±0.36 ^b	6.06±0.07 ^y	6.06±0.08 ^y	6.28±0.08 ^x
MMI (mm ⁴)	0.57±0.02	0.50±0.01 ^b	0.49±0.02 ^b	0.55±0.01 ^x	0.53±0.02
Cs.Th (mm)	0.13±0.01	0.12±0.01	0.13±0.01	0.14±0.01	0.12±0.01
B.Ar (mm ²)	0.76±0.02	0.70±0.01 ^a	0.73±0.01	0.80±0.01 ^z	0.78±0.01 ^z

Ct.En.Pm: perímetro endostal cortical; *Ct.Pe.Pm*: perímetro periostal cortical; *MMI*: media del momento polar de inercia; *Cs.Th*: grosor de la sección transversal; *B.Ar*: área de hueso media de las secciones transversales. ^a: $P<0.05$ vs SHAM, ^b: $P<0.01$ vs SHAM; ^x: $P<0.05$ vs OVX, ^y: $P<0.01$ vs OVX, ^z: $P<0.0001$ vs OVX.

La administración de RAL normalizó significativamente los tres parámetros anteriores, mientras que el E2 sólo normalizó el perímetro periostal (Ct.Pe.Pm) ($P<0.01$), aunque se observó una tendencia a prevenir el deterioro del área de hueso media de las secciones transversales (B.Ar) ($P=0.06$). La GEN neutralizó los cambios en el

perímetro periosteal (Ct.Pe.Pm) ($P<0.05$) y en el área de hueso media de las secciones transversales (B.Ar) ($P<0.0001$) (Tabla 4.29).

4.2.2.3. Efecto sobre la densidad mineral ósea volumétrica (vDMO)

La ovariectomía resultó en una reducción del 34% ($P<0.01$) y del 4% ($P<0.01$) en la densidad mineral ósea volumétrica trabecular (vDMOtrab) y en la DMO volumétrica cortical (vDMOc), respectivamente, un efecto que representó una disminución de la DMO volumétrica total (vDMOt) del 32% aproximadamente ($P<0.001$) (Figura 4.19). Los diferentes agonistas del receptor de estrógenos utilizados, previnieron la pérdida de masa ósea trabecular con diferente eficacia. Así, el RAL bloqueó completamente la pérdida de hueso trabecular tras 4 semanas de tratamiento ($P<0.0001$). Los ratones tratados con E2 y GEN, mostraron una vDMOtrab intermedia entre el grupo SHAM y OVX, indicando que estos compuestos inhiben parcialmente la pérdida ósea trabecular (Figura 4.19.). Ningún tratamiento inhibió la pérdida ósea cortical, aunque el grupo E2 casi alcanzó una diferencia significativa respecto al grupo OVX ($P=0.09$).

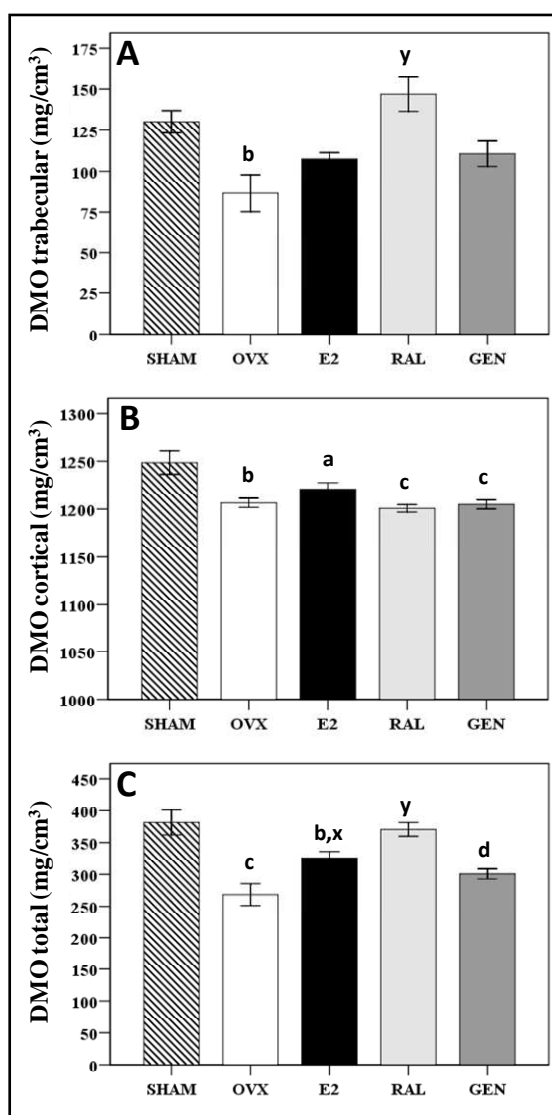


Figura 4.19. DMO volumétrica trabecular (vDMOtrab; A), cortical (vDMOc; B) y total (vDMOt; C) en los ratones SHAM, OVX, y OVX-tratados. La vDMO fue determinada mediante micro-TAC como se describe en Material y Métodos. Los valores se expresan como la media \pm SEM. ^a: $P < 0.05$ vs SHAM; ^b: $P < 0.01$ vs SHAM; ^c: $P < 0.001$ vs SHAM; ^d: $P < 0.0001$ vs SHAM; ^x: $P < 0.01$ vs OVX; ^y: $P < 0.0001$ vs OVX.

Respecto a la DMO volumétrica total (vDMOt), el RAL neutralizó significativamente la pérdida de masa ósea asociada a la ovariectomía. No ocurrió lo mismo con la GEN. Respecto al E2, este compuesto exhibió un comportamiento intermedio, ya que indujo un aumento del 21.4% en la vDMOt respecto al grupo OVX, y una disminución del 14.6% respecto al grupo SHAM (Figura 4.19).

Tal y como se esperaba, se encontraron correlaciones entre los valores de vDMOt y casi todos los parámetros microestructurales de hueso trabecular. Así, la vDMOt correlacionó positivamente con BV/TV ($r = 0.62$, $P < 0.001$), Tb.Th ($r = 0.60$, $P < 0.001$), y Tb.N ($r = 0.59$, $P < 0.001$) y negativamente con Tb.Pf ($r = 0.59$, $P < 0.001$) y SMI ($r = 0.46$, $P < 0.01$).

DISCUSIÓN

●1. Breve descripción de la población

La población analizada en el presente trabajo de Tesis Doctoral está compuesta mayoritariamente por mujeres posmenopáusicas (88%) aunque también incluye mujeres pre y perimenopáusicas. Esta inclusión fue motivada por la necesidad de aumentar el tamaño poblacional y consecuentemente el poder estadístico de nuestros análisis. De todas formas, la inclusión de mujeres posmenopáusicas y peri/premenopáusicas, así como la inclusión de mujeres a las que se les ha administrado terapia hormonal previa al estudio densitométrico, es una práctica extendida y habitual en numerosos trabajos (Ioannidis *et al.* 2004) por lo que está aceptado siempre y cuando en los análisis multivariados y en los análisis de regresión se contemplen estas variables como variables de confusión o covariables, como se ha hecho en el presente trabajo de Tesis.

La población estudiada en la presente Tesis es una población de mujeres sanas en general y en particular respecto a su estado óseo como puede apreciarse en las Tablas 4.3 y 4.4. La población global únicamente muestra una ligera osteopenia en columna lumbar (T-score=-1.12), mostrando normalidad en cuello femoral. Ya que el estado óseo está determinado en gran medida por el estado menopáusico, si dividimos a la población en mujeres posmenopáusicas y peri/premenopáusicas apreciamos claramente que las mujeres que mantienen o que no han perdido completamente su función ovárica presentan parámetros óseos claramente mejores que las mujeres posmenopáusicas (Tabla 4.4). A pesar de esta diferencia,

el grupo de mujeres posmenopáusicas presenta un estado óseo muy aceptable como lo muestran los T-scores para cuello femoral ($T=-1.01$) y de columna lumbar ($T=-1.24$). Sin duda alguna este estado óseo saludable viene determinado fundamentalmente por la edad de las mujeres participantes y los años transcurridos desde la menopausia, la gran mayoría de ellas en los primeros 12 años desde la menopausia (87.7%).

Nuestra población de mujeres posmenopáusicas está compuesta por un 28.1% de mujeres con menopausia quirúrgica y un 71.9% de mujeres con menopausia natural. Dado que los estrógenos son determinantes en el estado óseo y que la retirada de la función ovárica en las mujeres sometidas a ovariectomía bilateral es una retirada brusca, se podría pensar que este diferente comportamiento respecto a la protección estrogénica invalidase la comparación de ambos grupos de mujeres en este tipo de estudios genéticos. Como puede apreciarse en la Tabla 4.5, no hubo diferencias entre la DMO de cadera ni de columna entre ambos grupos de mujeres según el tipo de menopausia (natural/quirúrgica). Sin embargo la edad fue diferente entre ambos grupos ($P<0.001$), lo cual parece una contradicción ya que la DMO es altamente dependiente de la edad (Tabla 4.6). Esta igualdad en cuanto a estado óseo, siendo mujeres que difieren en la edad, se atribuyó al hecho de que el grupo de mujeres con menopausia quirúrgica mostraron unos años desde la menopausia significativamente mayores que el grupo de menopausia natural ($P<0.05$), con lo que se establece una compensación ya que este parámetro también es decisivo (afectando negativamente) respecto a la DMO (Tabla 4.6). En cuanto a

los demás parámetros bioquímicos estudiados entre ambos grupos de mujeres, únicamente el nivel de calcio fue significativamente diferente, siendo algo mayor en el grupo de menopausia quirúrgica. Nuestro grupo previamente estudió el efecto del tipo de menopausia sobre distintos parámetros óseos (García-Pérez *et al.* 2004). La conclusión principal fue que el tipo de menopausia no impone grandes diferencias en cuanto a marcadores bioquímicos de remodelado óseo, como mostramos en el presente trabajo, por lo que la inclusión de mujeres con menopausia quirúrgica en este tipo de estudios genéticos está plenamente justificada.

5.2. Runx2 y masa ósea

Se decidió estudiar la asociación de polimorfismos en el gen *RUNX2* (*Runt-related transcription factor 2*) debido a que los ratones deficientes en este gen muestran un bloqueo en la diferenciación osteoblástica y diversos problemas óseos (Otto *et al.* 1997; Komori *et al.* 1997a). Igualmente, porque mutaciones en el gen humano causan la displasia cleidocraneal (OMIM 119600), enfermedad autosómica dominante caracterizada, entre otros rasgos, por presentar ausencia total o parcial de clavículas, fontanelas abiertas, dientes supernumerarios y estatura corta (Mundlos *et al.* 1997). Por último, trabajos previos habían relacionado polimorfismos en este gen y masa ósea en el humano (Vaughan *et al.* 2002; Vaughan *et al.* 2004c; Doecke *et al.* 2006).

En el presente trabajo se detectó que el polimorfismo -1025 T>C, localizado en el promotor P2 del gen *RUNX2*, está asociado a la DMO

de cadera en una población de mujeres españolas (Pineda *et al.* 2010). En esta población, las mujeres portadoras del alelo C (genotipos CC o TC) para este polimorfismo, presentaban una mayor DMO de cadera que las mujeres homocigotas para el alelo T, revelando, por tanto, un modelo de herencia dominante (análisis realizado mediante el programa SNPstats) (Sole *et al.* 2006). Cuando se comparó la DMO para los diferentes grupos (TT vs. TC/CC) la diferencia se mantuvo significativa ($P=0.006$) incluso tras aplicar la exigente corrección de Bonferroni para comparaciones múltiple con los tres polimorfismos estudiados ($P=0.017$; $0.05/3$).

Esta diferencia en la DMO de cadera se hizo mucho más evidente al realizar el análisis con las mujeres que presentaban valores de DMO extremos (comparando los cuartiles de DMO más alta con la más baja) y se observó que la diferencia en la DMO de cadera entre genotipos fue más evidente. Resaltar que, cuando se realizó este estudio de cuartiles de DMOe, la asociación del polimorfismo +198 G>A con DMOe de cuello femoral alcanzó una débil, pero significativa diferencia ($P=0.049$) con lo que se estaría replicando los resultados previos con este polimorfismo (Vaughan *et al.* 2002; Vaughan *et al.* 2004c). Se desconoce la razón por la cual no se detectó asociación entre el polimorfismo -1025 T>C a DMOe de columna, aunque esto podría reflejar la distinta composición entre los dos tipos de hueso o, incluso, una dependencia diferente en cuanto a la funcionalidad del osteoblasto mediada por Runx2.

El presente estudio confirma los resultados previos obtenidos de un estudio realizado con mujeres posmenopáusicas españolas de

Barcelona, el cuál describe una asociación entre el polimorfismo -1025 T>C y la DMO de cadera, siendo las mujeres de genotipo TC las que mostraron mayor DMO de cadera respecto a las mujeres con genotipo TT (Bustamante *et al.* 2007). Al igual que en este trabajo, Bustamante y col. no detectaron asociación de este polimorfismo a la DMO de columna, lo cual refuerza nuestras investigaciones y análisis (Bustamante *et al.* 2007). Por otra parte, Bustamante y col., describieron que las mujeres con genotipo CC presentaban unos valores más bajos de DMO que las mujeres con genotipo TT y TC, coincidiendo con los resultados obtenidos en un estudio realizado en una población de mujeres posmenopáusicas de Korea (Lee *et al.* 2009). Según este último estudio, las mujeres de genotipo CC presentan menor DMO en todas las localizaciones del esqueleto, aunque en este estudio los genotipos TT y TC no difieren en cuanto a DMO (Lee *et al.* 2009). No obstante, los datos de DMO de mujeres con genotipo CC deberían manejarse e interpretarse con mucha precaución y cautela ya que la frecuencia de mujeres de genotipo CC no alcanzó el 1% en ninguna de las tres poblaciones que estamos comparando en esta discusión (la nuestra, la catalana y la coreana), no llegando en ninguno de los casos a una N = 10.

Casi con toda seguridad, el polimorfismo -1025 T>C se trata de un polimorfismo funcional ya que la transición T>C provoca un aumento en la transcripción del gen *RUNX2*, tal y como se ha demostrado en experimentos *in vitro* usando el gen de la luciferasa como gen indicador (Doecke *et al.* 2006). Esta diferencia en cuanto a la tasa de transcripción podría explicar la elevada DMO observada en las

mujeres con genotipo TC/CC observada en el presente trabajo (Pineda *et al.* 2010) y en el de Bustamante y col. (Bustamante *et al.* 2007). La razón de este aumento en la tasa de transcripción del gen parece ser debido a que el cambio T>C en la región -1025 del gen *RUNX2* elimina la secuencia consenso de un sitio de unión para un represor de la transcripción, por lo que el cambio permitiría un aumento en la expresión en presencia del alelo C (Doecke *et al.* 2006). Estos resultados en experimentos *in vitro* concuerdan con los datos obtenidos del programa FastSNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw/>), el cual asignó un riesgo bajo-medio a los cambios producidos por este polimorfismo. Sin embargo, el aumento en los niveles del marcador de actividad osteoblástica FA (Tabla 4.9) en mujeres de genotipo TT parece contradecir esta hipótesis. No conocemos la razón de este comportamiento de la FA, aunque los niveles similares de CTx (marcador de remodelado óseo mucho más sensible que la FA total) que existen entre grupos de acuerdo al genotipo, sugeriría la existencia de un remodelado óseo comparable.

En este estudio, no se detectó la asociación entre el polimorfismo +198 G>A y la DMO descrita previamente por otros grupos (Vaughan *et al.* 2002; Vaughan *et al.* 2004c; Doecke *et al.* 2006), pese a que este polimorfismo está en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo -1025 T>C. En el presente estudio, sólo se detectó una tendencia a tener mayores niveles de DMO, tanto en cadera como en columna, en las mujeres de genotipo GA/AA respecto a las mujeres con genotipo GG (véase *Resultados*). Sin embargo, esta tendencia se observó en mujeres con un IMC <26.3 kg/m², contradiciendo los datos

previamente publicados en los que se confirmaba esta asociación en mujeres con IMC elevado (Vaughan *et al.* 2004c). Se desconoce el motivo de esta ausencia de asociación aunque podría estar relacionada con el hecho de que el polimorfismo +198 G>A no se ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 4.8). El análisis de la población mediante el programa STRUCTURE demostró que la población de estudio no muestra subestructuras, por lo que se asume como posible causa del alejamiento de este equilibrio, hecho que podría haber impedido la detección de la asociación del polimorfismo +198 G>A con DMO, al propio sistema de detección del polimorfismos +198 G>A. Para genotipar este polimorfismo únicamente se tuvo en consideración (al igual que Vaughan *et al.* 2004c) a las mujeres de genotipo 17Ala/17Ala y no a aquellas de genotipo 17Ala/11Ala o 11Ala/11Ala (17.1% de la población), ya que el alelo 11Ala ha perdido el sitio de restricción para el enzima *MspA1I* y, por tanto, el polimorfismo +198 G>A. Por este motivo no se ha realizado en este trabajo un análisis de haplotipos para estos dos polimorfismos. Si por el contrario se considera el sistema como un polimorfismo con tres alelos distintos (G, A, y 11Ala), el sistema se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($P=0.124$, datos no mostrados).

Finalmente, cuando se seleccionaron mujeres con valores de DMO extremos (cuartiles altos o bajos de DMO) la asociación del polimorfismo +198 G>A con DMO de cadera llegó a ser estadísticamente significativa, mostrando la relación de este polimorfismo con la DMO de cadera (Vaughan *et al.* 2002; Vaughan *et al.* 2004c; Doecker *et al.* 2006). Alternativamente, aunque el

programa FastSNP asignó un riesgo bajo a medio al polimorfismo 17Ala>11Ala, probablemente debido a la reducción de alaninas y al posible cambio conformacional en la proteína Runx2 que puede alterar la capacidad de unión a las secuencias, los datos de este trabajo confirman que este cambio no está asociado con DMO tal y como se había publicado previamente (Vaughan *et al.* 2004c).

Las mujeres de genotipo TC/CC que mostraban una elevada DMO también presentaron niveles más bajos de FA y más altos de calcio total que las mujeres con menor DMO (genotipo TT). Este comportamiento es el esperado ya que los niveles de FA se correlacionan negativamente con la DMO en cualquier punto del esqueleto, están elevados en mujeres osteoporóticas y se asocian a un elevado riesgo de fractura (Melton, III *et al.* 1997; Garnero *et al.* 2000; Lips *et al.* 2001). Esos datos bioquímicos refuerzan los resultados entre el genotipo y la DMO en la población de mujeres estudiada en este trabajo.

Comentar por último una observación inesperada en el presente estudio. De acuerdo con los resultados, las mujeres de genotipo TC/CC presentan valores más altos en altura que las mujeres con genotipo TT ($P=0.085$). Esta tendencia podría tratarse de un hallazgo casual aunque también podría estar relacionada con una asociación entre polimorfismos de *RUNX2* y la longitud de los huesos de la mano o del fémur, tal y como describen algunos trabajos (Ermakov *et al.* 2006; Ermakov *et al.* 2008).

En este estudio se han caracterizado tres nuevas mutaciones heterocigotas o variantes raras en el gen *RUNX2*. Estas variantes raras

han consistido en una inserción de 21 pb o en deleciones de 21 o 15 pb en la región de poli-glutaminas (poli-Q) del gen, ocasionando la inserción de 7 glutaminas o la deleción de 7 o 5 glutaminas en la secuencia de la proteína Runx2. Las deleciones no han podido ser localizadas de forma precisa porque en la secuencia normal hay duplicaciones de esos mismos 7 y 5 triplete, respectivamente, inmediatamente a la derecha de la deleción subrayada en la Figura 4.3. De esta forma, la proteínas Runx2 para nuestras pacientes tienen 30, 18, o 16 residuos de glutamina (30Q, 18Q, o 16Q) en lugar de las 23Q como en el caso de la proteína de individuos normales (Mundlos *et al.* 1997). Estos cambios genotípicos no afectan a la DMO de cadera ni a la DMO de columna a juzgar por los parámetros densitométricos T-score y Z-score. Únicamente una paciente mostró una DMO compatible con osteoporosis en columna (T-score = -2.4), aunque este valor fue normal para la edad de la paciente como lo confirmó el Z-score de la densitometría (-0.8). Además, estas variantes genéticas no se relacionaron con el fenotipo de la displasia cleidocraneal, ni siquiera en su forma más benigna que puede producir alteraciones en los dientes o braquidactilia (Mundlos *et al.* 1997).

La literatura describe un amplio rango de variaciones en la región polyQ/polyA del gen, incluyendo inserciones, deleciones y mutaciones sin sentido que manifiestan fenotipo relacionados con la displasia cleidocraneal (Mundlos *et al.* 1997; Otto *et al.* 1997). Pese a ello, estudios realizados en una cohorte australiana formada por individuos con fracturas, han descrito variantes raras (30Q, 24Q y 16Q) en la zona de repeticiones de glutaminas que no se relacionan

con fenotipos asociados a la displasia cleidocraneal (Vaughan *et al.* 2002). La conclusión de los autores fue que estas mutaciones o variantes raras (presentes en el 0.9% de su población) pueden correlacionarse con una reducción en la DMO y aumento en el índice y frecuencia de fracturas osteoporóticas (Vaughan *et al.* 2002). En el presente trabajo, se amplificó la región polyQ/polyA de 1366 cromosomas encontrando únicamente las 3 variantes descritas aquí, lo que representa una frecuencia del 0.2%, un porcentaje mucho menor que el encontrado en la población australiana (Vaughan *et al.* 2002). Los datos del grupo de Vaughan y col., junto con los datos aportados en el presente estudio, indican que las inserciones y/o las deleciones son toleradas en la región polyQ del gen sin inducir fenotipos asociados a la displasia cleidocraneal. Por último, el efecto de estas mutaciones o variantes raras sobre la DMO debería ser establecido en el futuro, aunque en el caso de la población estudiada en este trabajo no manifestó cambios a nivel de la DMO.

Como conclusión, en el presente trabajo se han replicado los resultados obtenidos por otros estudios en los que se describe que el polimorfismo funcional -1025 T>C del promotor P2 del gen *RUNX2* está asociado a la DMO de cadera. Sin embargo, variantes raras encontradas en el dominio de poliglutaminas de la proteína Runx2 y que implican la inserción o la eliminación de glutaminas, no provocan cambios aparentes en la DMO ni se asocian con fenotipos relacionados con la displasia cleidocraneal.

5.3. *OCIL* y masa ósea

Los datos obtenidos en el presente estudio muestran una asociación del polimorfismo Asn19Lys (C>G; rs16914640), localizado en el exón 1 del gen *OCIL*, con DMO en una población de mujeres posmenopáusicas españolas. Las mujeres mayores de 53 años con genotipo CG/GG mostraron, en modelos multivariantes ajustados por edad y IMC, un descenso del 5.6% en DMOe de cadera y del 6.7% en DMOe de columna con respecto a las mujeres de genotipo CC. Dado el bajo número de individuos con genotipo GG (2.8%) decidimos desestimarlos como grupo para el análisis del trabajo. Este polimorfismo explicó una varianza de la DMO en mujeres mayores de 53 años de aproximadamente el 7%. Por otro lado, al analizar la asociación de este polimorfismo con DMO en el grupo de mujeres menores de 53 años, no se observaron diferencias significativas. Dado el número de participantes en este estudio, el análisis alcanzó un poder estadístico del 94% (para detectar un efecto del genotipo del 2% de varianza de DMO), el cual disminuye al 70% cuando la población se divide en dos grupos (según la media de edad). A pesar de esta disminución del poder estadístico, los datos indican significativamente que el polimorfismo Asn19Lys está relacionado con la masa ósea en este grupo de mujeres. La asociación con el grupo de mujeres de mayor edad, sugiere que el polimorfismo Asn19Lys gana importancia en la segunda mitad de vida, una vez que el pico de masa ósea ha sido alcanzado y el remodelado óseo empieza a ser el principal proceso en el metabolismo óseo (Zaidi 2007). Esta hipótesis adquiere mayor relevancia cuando se habla en el contexto de la función inhibitoria de

la diferenciación y función osteoblástica de la proteína Ocil (Zhou *et al.* 2001a; Hu *et al.* 2004). Efectivamente, en cultivos *in vitro*, Ocil inhibe la osteoclastogénesis y es capaz asimismo de inhibir la producción de un factor muy relevante en la osteoclastogénesis como es el IFN γ por las células NK. Además, Ocil se expresa en la célula B previa estimulación de CD40 (Kartsogiannis *et al.* 2008; Rosen *et al.* 2008). El efecto de la edad sobre la DMO en cada subgrupo de mujeres dependiendo del genotipo (CG+GG vs. CC) se puede ver en la Figura 5.1. En ella se aprecia claramente que las principales diferencias entre las mujeres CG+GG respecto a las CC para el polimorfismo Asn19Lys aparecen en una edad más tardía, una vez sobrepasado el pico de masa ósea.

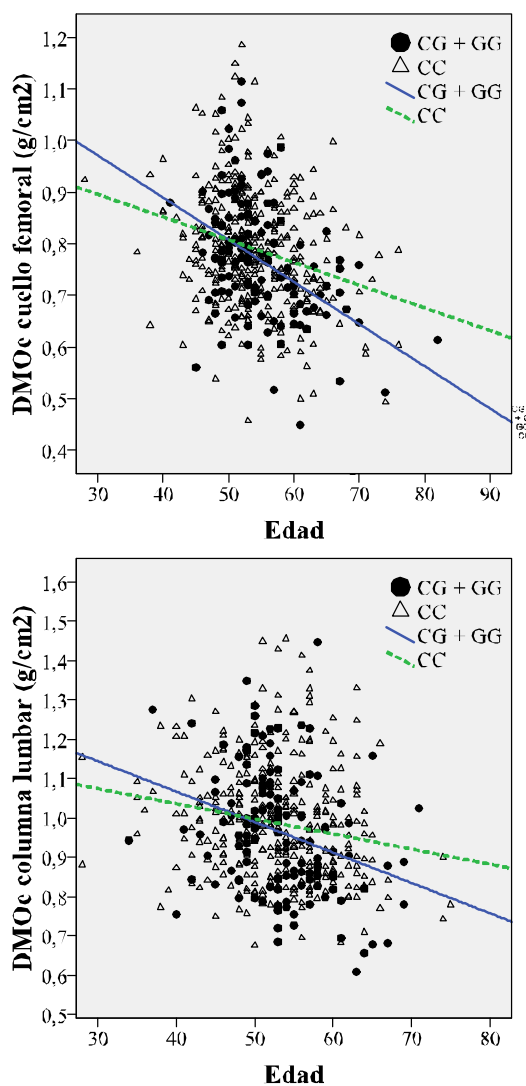


Figura 5.1. DMOe de cuello femoral y de columna lumbar respecto a la edad en mujeres CG+GG y CC según el polimorfismo Asn19Lys.

El presente trabajo es el primero que describe la asociación de un polimorfismo genético de *OCIL* con un rasgo humano cuantitativo como es la masa ósea. Una limitación que presenta este trabajo es que esta realizado con una población compuesta sólo por mujeres posmenopáusicas, pese a ser una población heterogénea en cuanto a edad y estatus óseo. Sería muy valioso comprobar si la asociación descrita entre el polimorfismo Asn19Lys y la masa ósea según la edad, se produce también en hombres. Otra limitación del presente estudio es que, pese a la importancia de la vitamina D3 para el hueso, este parámetro no se puede utilizar como covariable en estudios de regresión lineal debido a la falta de información para algunas participantes. Pese a ello, el análisis del presente trabajo es robusto ya que el análisis de los datos se ajustó por edad e IMC, probablemente las principales variables de confusión en estudios de DMO. Por otra parte, recientemente se ha descrito que el ratón deficiente en *OCIL* presenta osteopenia como consecuencia del mayor número y actividad de los osteoclastos y que la proteína Ocil colocaliza con RANKL, sugiriendo mecanismos interrelacionados (Zhou *et al.* 2001a; Kartsogiannis *et al.* 2008).

Del estudio de asociación a DMO de los polimorfismos Asn19Lys y Leu23Val del gen *OCIL* sólo se detectó asociación a DMO con el polimorfismo Asn19Lys y no con el polimorfismo Leu23Val pese a encontrarse en desequilibrio de ligamiento, aunque se trata de un desequilibrio de ligamiento débil (D' : 0.80; χ^2 : 22.9) debido a la gran distancia que los separa (11105 pb según la base de datos NCBI). De acuerdo con este débil desequilibrio de ligamiento, los análisis

haplotípicos no aportaron mucha más información que la que se obtuvo del análisis por genotipos. Dentro del grupo de mujeres mayores de 53 años, los individuos con haplotipo CC o CG presentaban unos parámetros óseos mejores que las mujeres con haplotipo GC (Figura 4.6). Estos datos indicarían que la presencia del alelo G en el polimorfismo rs16914640 (C>G; Asn19Lys), el cual codifica para el aminoácido lisina, estarían relacionado con peor calidad ósea.

De acuerdo con la base de datos NCBI, existen dos isoformas de la proteína Ocil humana, y ambas presentan una asparagina en posición 19 y una leucina en posición 23 de la secuencia de la proteína (Hu *et al.* 2004). Para la predicción de las consecuencias de los dos polimorfismos en la proteína Ocil, hemos utilizado en este trabajo el servidor PolyPhen <http://www.bork.emblheidelberg.de/PolyPhen> (Ramensky *et al.* 2002) el cual combina predicciones basadas tanto en la secuencia como en la estructura. La predicción del servidor PolyPhen para los polimorfismos estudiados en este trabajo fue que ambos eran polimorfismos benignos y, por tanto, no alteraban el fenotipo de la proteína. Sin embargo, el fenotipo se estimó únicamente por alineamiento de las secuencias y no por la estructura. Para el polimorfismo Asn19Lys, el programa asignó un elevado valor para PSIC (*Position-Specific Independent Counts*), lo que indica que la sustitución estudiada raramente o nunca se observa en la familia proteica y que por tanto, uno puede esperar una peor predicción. En lo referente al polimorfismo Leu23Val SNP, la leucina 23 está conservada tanto en la proteína Ocil humana como en la murina y

también en las proteínas murinas de la familia de Ocil (mOCILrP1) (Zhou *et al.* 2002). La sustitución de Leu23 por Val no debería causar grandes cambios estructurales en la proteína ya que ambos aminoácidos comparten características fisicoquímicas similares. Además, existe otra proteína murina de la familia de Ocil (mOCILrP2) que posee en esta posición una valina, demostrando que esta sustitución es tolerable.

En conclusión, el presente trabajo describe una asociación de un polimorfismo no sinónimo (Asn19Lys) con DMO en mujeres mayores de 53 años. Esta particular asociación dependiente de la edad, debería ser relacionada con la capacidad inhibitoria que la proteína Ocil tiene sobre la diferenciación y función osteoclástica. Aunque no se tienen datos al respecto, es posible que si el cambio de Asn por Lys causa alguna pérdida funcional en la proteína Ocil, este efecto sea sólo aparente durante los procesos metabólicos que se suceden en el hueso a partir de una edad avanzada.

5.4. Polimorfismo en la secuencia Kozak del gen *CD40* y estado óseo

El sistema CD40/CD40L es crucial para varias funciones importantes del sistema inmune. Además, recientemente se ha relacionado este sistema con la regulación del metabolismo óseo basal tras la descripción de algunos hechos muy relevantes. Así, se ha descrito que los ratones deficientes en CD40 o CD40L tienen osteoporosis y reducida expresión de OPG, y que la célula B es la principal productora de OPG en el entorno de la medula ósea (Li *et al.*

2007). También se ha descrito que niños afectados del síndrome de Hiper-IgM, una inmunodeficiencia primaria que cursa con infecciones de repetición y diversos problemas en las funciones de la célula B, tienen osteopenia (López-Granados *et al.* 2007).

Sin embargo, el interés por estudiar este sistema en el presente trabajo y su relación con el hueso nació antes de publicarse todos estos datos como consecuencia de que se había descrito asociación de algún polimorfismo en el gen *CD40* con enfermedades autoinmunes, como la enfermedad de Graves (Jacobson *et al.* 2005).

Los datos del presente estudio mostraron una asociación del polimorfismo rs1883832 (C>T), situado en la posición -1 de la secuencia consenso Kozak del gen *CD40*, con DMO en una población de mujeres posmenopáusicas. Las mujeres con genotipo TT (8.6 %) presentaron una reducción en los niveles de DMO que sobrepasó el 6%, tanto en cadera como en columna lumbar, cuando se compararon con mujeres con genotipo CC o CT. Esta diferencia se traduce en que estas mujeres tienen un doble riesgo de sufrir osteopenia u osteoporosis que las mujeres con genotipo CC o CT. Curiosamente, pese a observar esta disminución en la DMO en las mujeres de genotipo TT, no se encontraron diferencias significativas entre genotipos cuando se analizaron los marcadores bioquímicos de metabolismo óseo (Tabla 4.14).

En la población de estudio se incluyeron mujeres con osteopenia y osteoporosis. El motivo fue debido al reducido número de mujeres que presentaban osteoporosis en cadera (27 mujeres, 6 con genotipo TT) o en columna lumbar (111 mujeres, 14 con genotipo TT). No obstante,

al realizar un análisis de regresión logística, ajustando por edad, peso y altura, con este reducido grupo de mujeres, todavía se detectó un *odds ratio* de 3.87 (95% IC: 1.23-12.18; $P=0.021$) para osteoporosis en cadera y de 1.61 (95% IC: 0.78-3.34; $P=0.199$) para osteoporosis en columna en el grupo de mujeres con genotipo TT.

El polimorfismo analizado en este trabajo, está situado en la región funcional del gen *CD40*, concretamente en la secuencia consenso Kozak. Los efectos que causa esta mutación a nivel molecular han sido analizados en las células B, donde se observó una disminución de la expresión del gen *CD40* del 39.4% en los individuos de genotipo TT cuando se comparó con individuos de genotipo CC. Este efecto fue debido a una menor eficiencia en la traducción (Jacobson *et al.* 2005).

Apoyando nuestros datos, dos estudios recientes han encontrado una asociación entre el sistema CD40-CD40L y la regulación del metabolismo óseo. En uno de esos trabajos se describe como los niños afectados por el síndrome Hiper-IgM, una inmunodeficiencia provocada por mutaciones en el gen *CD40L*, presentan osteopenia además de una serie de anomalías en el sistema inmune (López-Granados *et al.* 2007). Las células T activadas de estos niños, expresan niveles normales de RANKL, sin embargo, no producen IFN γ debido a una deficiente interacción entre las células T y las células presentadoras de antígenos. Como resultado se produce una inhibición defectiva de la osteoclastogénesis que conduce a la aparición de osteopenia (López-Granados *et al.* 2007). En el segundo estudio, Li y colaboradores (Li *et al.* 2007), demostraron que las células B son la mayor fuente de producción de OPG, y que las células T promueven la

síntesis *in vivo* de OPG por las células B a través del sistema CD40-CD40L. Del mismo modo, y muy interesantemente, los ratones deficientes en CD40 y CD40L presentan osteopenia y osteoporosis (Li *et al.* 2007). Estos dos trabajos, que se comentarán más extensamente en el siguiente epígrafe, constituyen un nuevo campo abierto al estudio de la cooperación entre las células T y B como elementos cruciales en la regulación de la homeostasis del hueso.

Este trabajo añade, a estos previos, datos acerca de la asociación de polimorfismos en *CD40* con el riesgo de osteoporosis y osteopenia en una población normal de mujeres. Sin embargo, una limitación en este trabajo es que se basa en el estudio de una población formada por mujeres posmenopáusicas. No obstante, se puede afirmar que los resultados obtenidos son consistentes ya que se trata de una población heterogénea en cuanto a la edad y al estatus óseo. De todos modos, esta asociación debería ser estudiada tanto en hombres como en mujeres premenopáusicas.

La relación que existe entre una baja expresión de *CD40* en células de mujeres con genotipo TT con niveles bajos de DMO y un aumento del riesgo de sufrir osteopenia u osteoporosis no se conoce muy bien. Aunque se discutirá con mayor detalle en el siguiente epígrafe, una explicación podría ser que la disminución en la expresión del gen *CD40* que presentan las mujeres con genotipo TT pudiera provocar una disminución en la producción de OPG, un potente inhibidor de la osteoclastogénesis (Simonet *et al.* 1997; Lacey *et al.* 1998), por las células B (Li *et al.* 2007) u otro tipo de célula presentadora de antígenos, o incluso por osteocitos u osteoblastos, ya que se sabe que

estas células también expresan *CD40* (Ahuja *et al.* 2003; Schrum *et al.* 2003). Por otro lado, se sabe que *CD40* inhibe la apoptosis de los osteocitos y de los osteoblastos (Ahuja *et al.* 2003), por lo que una disminución en los niveles de *CD40* podría estar reduciendo la vida de estas células afectando, por tanto, al metabolismo óseo. Pese a todo ello, lo que es evidente es que los niveles de *CD40* expresados por las células B, por osteoblastos o por otras células, están implicados en la regulación del metabolismo óseo.

5.5. Interacción génica entre *CD40* y *CD40L* y estado óseo

En la presente Tesis, se han aportado datos acerca de una posible interacción significativa entre polimorfismos de los genes *CD40* y *CD40L* en cuanto a DMO y riesgo de sufrir osteoporosis u osteopenia. Concretamente, las mujeres doblemente homocigotas para el alelo T, tanto para el polimorfismo rs1883832 del gen *CD40* como para el polimorfismo rs1126535 del gen *CD40L*, mostraron menor masa ósea tanto en cadera como en columna, aunque principalmente en cadera, que las mujeres con otros genotipos para estos polimorfismos. Además, estas mujeres doblemente homocigotas para el alelo T de ambos polimorfismos, mostraron un mayor riesgo de sufrir osteopenia/osteoporosis que el resto de mujeres, especialmente en cadera.

El interés por este sistema, aparte de por todo lo expuesto en el epígrafe de la *Introducción*, surgió de la reciente descripción por nuestro grupo de una asociación entre el polimorfismo rs1883832 del gen *CD40* con DMO (Pineda *et al.* 2008b). Este polimorfismo está

localizado en la posición -1 de la secuencia consenso Kozak del gen *CD40* y representa un polimorfismo funcional ya que se sabe que en individuos con genotipo TT, los niveles de expresión de CD40 por las células B son un 39.4% menores que los niveles alcanzados por individuos con genotipo CC (Jacobson *et al.* 2005).

En el presente trabajo se describe por primera vez que variantes genéticas comunes del gen *CD40L* están asociadas a DMO en humanos. Concretamente, el polimorfismo rs1126535 del gen *CD40L* mostró una asociación con DMO, principalmente en columna (Tabla 4.19). En cuanto al riesgo potencial para este polimorfismo sinónimo de sufrir osteopenia/osteoporosis, el programa FastSNP asignó un riesgo medio-bajo, ya que se sabe que puede afectar a la regulación del splicing del gen *CD40L*.

Como ya se ha comentado anteriormente, los niños afectados por el síndrome Hyper-IgM ligado al cromosoma X (XHIM), presentan osteopenia (López-Granados *et al.* 2007). Igualmente, las células T de estos pacientes inducen una mayor osteoclastogénesis que las células T de individuos normales pese a presentar una producción normal de RANKL, lo cual indica una fuerte capacidad osteoclastogénica en estas células. Todo ello es debido, probablemente, a la incapacidad de estas células de producir IFN γ como consecuencia de una interacción deficiente entre las células T XHIM y las células presentadoras de antígenos (López-Granados *et al.* 2007). Por otro lado, los ratones deficientes en CD40 y CD40L muestran osteoporosis y una menor producción de OPG como consecuencia de nula coestimulación CD40-CD40L ya que es esta interacción la que induce la producción

de OPG por las células B (Li *et al.* 2007). Además, como se ha comentado anteriormente, existen evidencias que apoyan que la mayor producción de OPG en médula ósea es debida a las células B, y de acuerdo con ello, los ratones deficientes en células B sufren osteoporosis y presentan una producción deficiente de OPG en médula ósea (Li *et al.* 2007).

Todos estos datos sugieren que el sistema CD40/CD40L es un factor importante en la regulación del metabolismo óseo basal, y además indica que la cooperación entre las células T y B parece ser crucial en la regulación de la homeostasis ósea. A pesar de todos los datos que se tienen sobre el tema, actualmente todavía no se conoce el mecanismo potencial que podría explicar esta disminución de DMO observada en el grupo de mujeres con genotipo TT+TT. Siguiendo el mecanismo propuesto para los ratones deficientes en CD40 el cual describe una disminución de la producción de OPG por las células B (Li *et al.* 2007), sería razonable proponer un mecanismo similar para explicar la disminución de DMO en las mujeres TT del polimorfismo rs1883832 del gen *CD40*, si realmente la OPG producida por las células B de estas mujeres fuera menor debido a una menor expresión del gen *CD40* (Jacobson *et al.* 2005). Aunque los niveles de OPG sérica de estas mujeres TT es similar a la de las mujeres con genotipo CC/CT para el polimorfismo rs1883832 (Tabla 4.18), no se puede descartar un mecanismo mediado por OPG sin conocer la producción de OPG en la médula ósea, lugar donde este inhibidor ejerce su efecto. Por este motivo sería conveniente realizar estudios *in vitro* para clarificar la producción de OPG por las células B de mujeres de

ambos genotipos. Además, los osteocitos y los osteoblastos podrían ser células implicadas en este mecanismo ya que se ha demostrado que estas células también expresan CD40 en su membrana (Ahuja *et al.* 2003; Schrum *et al.* 2003), y que la activación de CD40 inhibe la apoptosis de estas células (Ahuja *et al.* 2003), por lo que una disminución en la expresión de CD40 podría reducir su tiempo de vida media y afectar a la homeostasis ósea. Finalmente, y de forma similar a lo que ocurre con los niños con síndrome Hiper-IgM, en estas mujeres podría existir una deficiente interacción entre células T y B debida a una menor expresión de la proteína CD40 o CD40L, lo cual llevaría a una menor producción de IFN γ por parte de las células T provocando una mayor osteoclastogénesis, por lo que esto podría explicar la disminución en la DMO que presentan estas mujeres.

En este trabajo, se describe una interacción entre los genes *CD40* y *CD40L*. El programa utilizado para analizar la posible funcionalidad de los polimorfismos (FastSNP) (Ahuja *et al.* 2003; Yuan *et al.* 2006), asignó al polimorfismo rs1126535 un riesgo bajo-medio ya que parece estar relacionado con algunos elementos reguladores del splicing por lo que podría ser razonable suponer que dicho polimorfismo pudiera ser funcional debido a ello. No obstante, no se puede descartar que la asociación de este polimorfismo con DMO sea una consecuencia de una variación funcional del gen si la interacción que se describe en este trabajo es real. Aunque es necesario realizar estudios *in vitro* para determinar los niveles de CD40L en las células T según el genotipo, una disminución en la expresión de CD40L en las células T como consecuencia de una alteración en el proceso de splicing en mujeres

homocigotas para el alelo T del polimorfismo rs1126535 (*CD40L*), podría explicar parte del mecanismo de forma similar al ratón deficiente en el gen *CD40L* (Ahuja *et al.* 2003; Li *et al.* 2007). Según esto, la mujer doble homocigota para el alelo T para ambos polimorfismos mostraría menores niveles de CD40 y CD40L y, por tanto, menor producción de OPG por las células B o por los osteoblastos, lo cual explicaría la baja masa ósea en estas mujeres.

Como conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la interacción entre variantes genéticas en los genes *CD40* y *CD40L* desempeñan un papel importante en la regulación de la DMO, y apoyan los resultados de otros trabajos anteriores (López-Granados *et al.* 2007; Li *et al.* 2007) en los que también se defiende la importancia del papel de las células T y B en la homeostasis basal del hueso.

5.6. Estudio del efecto del extracto isopropanólico de *Cimicífuga racemosa* (CRi) (Remifemin) sobre el metabolismo óseo y el sistema cardiovascular

El uso del extracto isopropanólico del rizoma de CR (CRi, Remifemin®), en este estudio durante un periodo de tiempo de 6 meses fue bien tolerado y seguro como corroboraron las propias pacientes. Además, no modificó de forma sensible los parámetros analíticos de las mujeres a lo largo del estudio (datos no mostrados). Dentro de esta constancia en los parámetros bioquímicos se incluye la estabilidad en el perfil lipídico, a diferencia de lo observado en la terapia con estrógenos que sí varía este perfil. Además, el tratamiento

con el CRi (Remifemin) no se asoció a cambios en los niveles de hormonas reproductivas como FSH, LH, estradiol y testosterona (datos no mostrados). Esta información es importante ya que existe un gran debate acerca del efecto de extractos de CR sobre los niveles de LH. Existe un estudio que describe una supresión de LH por parte de CR (Duker *et al.* 1991) mientras que otros dos estudios no apoyan esta información (Liske *et al.* 2002; Wuttke *et al.* 2006). El uso de un extracto etanólico en el estudio discrepante podría explicar esa diferencia. De acuerdo con otros estudios, los niveles de FSH y estradiol se mantienen sin variaciones a lo largo de los 6 meses de estudio.

Este estudio se basó en los denominados marcadores bioquímicos específicos de remodelado óseo (formación y resorción ósea) para analizar el efecto de sueros de mujeres tratadas con Remifemin sobre el metabolismo óseo. Algunos de estos marcadores analizados en el presente estudio fueron el NTx (fragmento amino-terminal de la degradación del colágeno tipo I) como indicador de resorción ósea, y la fosfatasa alcalina como marcador de formación ósea. En este estudio, la reducción observada a los 3 meses en los niveles de NTx en orina y el aumento de los niveles de FA en suero de mujeres tratadas con el CRi (Remifemin) respecto al basal, sugiere un efecto protector contra el recambio óseo acelerado que tiene lugar durante la menopausia. Estudios realizados en ratas con el CRi (Remifemin) confirman este efecto positivo sobre la disminución de la pérdida ósea (Nisslein & Freudenstein 2003).

El mecanismo por el cual el CRi (Remifemin) limita el remodelado óseo todavía se desconoce. Sin embargo, un estudio experimental reciente aporta nuevos datos al respecto al demostrar que el 25-acetilcimigenol xyropiranósido, un glicósido triterpenoide aislado de CR, bloquea potentemente la osteoclastogénesis *in vitro* inducida por RANKL o TNF- α , dos citoquinas que inducen osteoclastogénesis y aumento de la resorción ósea (Qiu *et al.* 2007). Más información ha sido obtenida a partir de otro estudio en el cual se usó el mismo tipo de extracto isopropanólico que el utilizado en el presente estudio, en cultivos de osteoblastos humanos (Viereck *et al.* 2005). Apoyando nuestros datos, estos investigadores encontraron un efecto estimulador del extracto de CRi en el metabolismo óseo pero, en este caso, debido a la producción de osteoprotegerina, una citoquina que inhibe la osteoclastogénesis y que es producida por los propios osteoblastos y las células B. Probablemente, el efecto de la osteoprotegerina en la osteoclastogénesis podría estar influyendo en la reducción de la actividad del remodelado óseo observado en nuestro estudio, pero no disponemos de datos al respecto.

Los detalles moleculares implicados en el mecanismo de acción de CR sobre el hueso son completamente desconocidos. Existe un debate sobre una hipotética actividad estrogénica de los extractos de CR. En un principio se creyó que los extractos de CR contenían formononetina, una isoflavona existente en la parte aérea de la planta. Los primeros extractos utilizados no eran estandarizados y, posiblemente, podrían tener contaminantes de la parte aérea de la planta que, probablemente, eran los que tenían acción estrogénica.

Cuando se empezaron a usar extractos estandarizados de CR (etanólico o isopropanólico) se vió que realmente no existían isoflavonas en los extractos (Borrelli *et al.* 2003).

Actualmente, experimentos realizados para estudiar la afinidad del extracto etanólico de CR por los receptores de estrógenos recombinantes humanos (ER) demuestran la no afinidad por los ER α o ER β (Jarry *et al.* 2003). Sin embargo, se demostró afinidad de CR por receptores de estrógenos citosólicos de endometrio, tanto humano como porcino. Todo esto hace pensar que el mecanismo de acción de CR es todavía desconocido pero que cabe la posibilidad de que CR contenga sustancias, todavía desconocidas, que tienden a unirse a sitios de unión de estrógenos diferentes a los ER α o ER β . Se ha postulado la posibilidad de que actúen vía proteínas de unión a estrógenos o bien la existencia de un tercer ER (ER γ) al que podrían unirse compuestos de CR. Nosotros no podemos descartar un posible agonismo estrogénico en nuestro extracto isopropanólico aunque la no variación de los niveles séricos de FSH en la población tratada con Remifemin limita esta hipótesis.

Existen algunos estudios en los que se demuestra que extractos de CR etanólico tienen un efecto positivo en los síntomas vasomotores de la menopausia y a nivel del recambio óseo ya que estimulan la actividad de los osteoblastos. Sin embargo, no inducen proliferación endometrial. La explicación que se podría dar en este caso es que CR contiene sustancias llamadas SERMs (moduladores selectivos de los receptores de estrógenos), es decir, sustancias que provocan un efecto

estrogénico en algunos órganos (hueso) pero no en otros (útero, mama) (Wuttke *et al.* 2003a; Seidlova-Wuttke *et al.* 2003a; Wuttke *et al.* 2003b; Seidlova-Wuttke *et al.* 2003b). Por todo ello, el mecanismo de acción de la CR es todavía desconocido y complejo.

Para intentar conocer el mecanismo de acción del extracto isopropanólico de CR, en el presente trabajo se utilizó una línea celular pre-osteoblástica de ratón (MC3T3-E1). El uso de osteoblastos es de especial interés en el área actual de investigación sobre la osteoporosis desde que se descubrió la capacidad de diferentes sustancias de activar a estas células. Apoyando esta propuesta, datos obtenidos en estudios previos con el extracto isopropanólico de CR sugieren que los osteoblastos parecen ser sensibles a CR y que reaccionan aumentando la síntesis de osteoprotegerina (OPG), osteocalcina (OC) y fosfatasa alcalina (FA), todos ellos indicadores de formación ósea (Viereck *et al.* 2005). Además se usó suero de mujeres tratadas con CR como agente estimulante de los osteoblastos en lugar de usar directamente el extracto de CR. El interés de este modelo experimental, usado previamente de forma exitosa por nosotros y otros investigadores (Mikkola *et al.* 1996; Garcia-Martínez *et al.* 2003), reside en que reproduce de forma muy similar las condiciones que suceden en el ambiente fisiológico. El proceso metabólico que sufre la compleja mezcla de componentes de CR en el hígado, produce probablemente una serie de metabolitos bastante diferentes de los iniciales. Así pues, las células diana del organismo estarán expuestas al efecto de estos metabolitos y no al de los compuestos iniciales del extracto. Realmente no se conoce la mezcla final resultante de estos

metabolitos, pero utilizando el suero de mujeres tratadas estaremos simulado la situación real.

En este estudio, el suero de pacientes tratadas con el extracto isopropanólico de CR (Remifemin) y con inductores de la diferenciación osteoblástica no estimuló la diferenciación osteoblástica medida como niveles de FA en el extracto celular, a diferencia de los cambios encontrados en los niveles de FA en el suero de las mujeres. Además, para comprobar si los metabolitos de CR existentes en el suero de las mujeres tratadas eran capaces de activar genes implicados en la diferenciación / función osteoblástica, se realizaron experimentos de RT-PCR para analizar la activación de los genes de la *FA*, *osteocalcina* y *RUNX2*. *FA*, *osteocalcina* y *RUNX2* son genes específicos de actividad osteoblástica. No se detectó activación del gen de la *FA* en los cultivos con suero de mujeres tratadas. Tampoco se encontró activación de los genes *osteocalcina* o *RUNX2*. No se dispone de una explicación clara para la discrepancia encontrada entre los resultados obtenidos para la *FA* en el suero de las mujeres y los obtenidos para el extracto celular. Posiblemente uno de los motivos para esta diferencia sea el origen murino de las células MC3T3-E1.

Respecto al sistema vascular, de acuerdo con los datos de que se dispone, este es el primer estudio dirigido a estudiar el efecto de Remifemin sobre células endoteliales. Pese a los resultados negativos obtenidos, este estudio es de gran importancia por varias razones. Primero, debido a la alta prevalencia de enfermedades

cardiovasculares, en donde la aterosclerosis es el proceso fisiopatológico clave, y segundo, porque la información obtenida nos amplía el conocimiento de si existe similitud entre el efecto de CR y el efecto de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular.

La aterosclerosis está considerada actualmente como un proceso inflamatorio (Ross 1999; Tedgui & Mallat 2006). El inicio de la aterosclerosis va unido a la disfunción endotelial, proceso que va seguido de la expresión de moléculas de adhesión y por una serie de eventos subsecuentes implicados en la progresión de la enfermedad. La regulación del funcionamiento correcto del endotelio depende de diferentes mecanismos donde el óxido nítrico y las prostaciclina son dos agentes importantes. Ambos mediadores actúan localmente promoviendo la relajación vascular y el efecto antiagregante plaquetario (Luscher & Noll 1995; Hermenegildo *et al.* 2006). La persistente inhibición de la producción de prostaciclina favorece el desarrollo de la placa de ateroma, como se ha confirmado en modelos animales (Todaka *et al.* 1999). Esta es la razón por la que se le da tanta importancia en la literatura al efecto de los estrógenos en la producción de prostaciclina (Hermenegildo *et al.* 2006) y, de acuerdo con esto, la importancia de nuestro estudio.

La falta de resultados positivos en nuestro estudio sugiere, por un lado, un efecto neutral del CRi (Remifemin) sobre el mecanismo fisiológico de la producción de prostaciclina en el endotelio. Estos datos pueden ser usados para concluir negativamente un posible agonismo estrogénico de Remifemin sobre las células endoteliales. Se

sabe que las células HUVEC expresan receptores de estrógenos α y β (Venkov *et al.* 1996), actuando tanto por mecanismos genómicos como no genómicos (Venkov *et al.* 1996; Chen *et al.* 1999), así como sitios de unión en membrana para estradiol (Russell *et al.* 2000). Tanto mecanismos dependientes como independientes de los receptores de estrógenos se ha visto que están relacionados con la producción de prostaciclina en el endotelio y, de acuerdo con nuestros datos, parece ser que ninguno de estos mecanismos es estimulado por el extracto isopropanólico de CR (Remifemin).

Apoyando los datos obtenidos *in vitro*, no se encontraron evidencias de que Remifemin modifique el perfil lipídico ni los niveles de IL-6, como marcador inflamatorio, en el suero de las mujeres posmenopáusicas, por lo que CRi no tiene efecto sobre estos marcadores de riesgo cardiovascular.

Se sabe que el tipo de alcohol utilizado para el proceso de extracción (principalmente isopropanol o etanol) da un patrón de bandas cromatográficas que no se solapan totalmente (Zierau *et al.* 2002). Por lo tanto, no podemos descartar que con el uso de otros tipos de extractos de CR se puedan alcanzar otros datos diferentes a los obtenidos en este estudio con el extracto isopropanólico de CR.

5.7. Efecto de la ovariectomía y de la administración de agonistas del receptor de estrógenos sobre el sistema inmune y óseo del ratón

Uno de los principales resultados observados en el presente estudio es que la modulación del receptor de estrógenos mediante la administración de los agonistas 17β -estradiol, raloxifeno y genisteína, opera de forma similar, aunque con diferentes niveles de eficacia, sobre los efectos que la deficiencia de estrógenos provoca en el sistema inmune. Los datos obtenidos también apuntan hacia la necesidad de ajustar las dosis administradas de los agonistas del receptor de estrógenos para evitar, no sólo los efectos agonistas en el útero, sino también la inmunosupresión como la disminución de los niveles de células T que se describe en la presente Tesis.

Cuatro semanas después de la ovariectomía, el metabolismo óseo en los ratones seguía alterado como lo demuestran los elevados niveles de calcio sérico, los niveles de expresión de la catepsina K en médula ósea y el descenso de los niveles de FA sérica en los ratones OVX (Tabla 4.25 y Figura 4.16). Por otro lado, no se observaron cambios en otros marcadores, lo cual indica que el recambio óseo tiende a estabilizarse (Tabla 4.25). La ovariectomía acelera el remodelado óseo, causando un aumento en la resorción ósea al igual que en la formación. En el ratón, los marcadores bioquímicos de remodelado óseo (incluyendo FA total y FA específica del hueso) aumentan en el primer día tras la ovariectomía y después decrecen. Seguidamente, 4-5 semanas tras la cirugía, los niveles se estabilizaron casi completamente. Según los resultados del presente trabajo, la

disminución de los niveles de FA, un marcador de formación ósea (Weaver *et al.* 1997), implica la disminución en la formación de hueso en el ratón OVX. De acuerdo con ello, también se observó una disminución en la expresión del factor de transcripción de los osteoblastos Runx2 en médula ósea de ratón OVX, indicando una posible disminución en la diferenciación osteoblástica y en la formación ósea. Así pues, los datos sugieren que 4 semanas después de practicar la ovariectomía a los ratones, se produce una disminución en la tasa de formación ósea en el grupo OVX, observándose también un menor potencial osteogénico. De acuerdo con estos resultados, otros grupos también han descrito un descenso en los niveles de FA sérica y en células preosteoblásticas como consecuencia de la deficiencia estrogénica (Eghbali-Fatourehchi *et al.* 2003), al igual que una disminución en la expresión génica de Runx2 y FA en células mesenquimales de médula ósea de ratones OVX y como esta expresión aumentaba debido al efecto de los estrógenos (Zhou *et al.* 2001b) .

En cuanto al resto de marcadores de metabolismo óseo analizados, los niveles de expresión que mostraron, volvían a la normalidad tras la administración de agonistas del receptor de estrógenos, a excepción de la catepsina K, una proteasa que desempeña un papel esencial en la degradación de la matriz orgánica del hueso por acción de los osteoclastos, cuya expresión se normalizó sólo con la administración de E2 y RAL. Otros grupos han descrito cambios en los niveles de expresión de los genes OPG, RANKL y sialoproteínas del hueso en los animales OVX durante la primera y segunda semana tras realizar

la ovariectomía, sin embargo, esos cambios ya no se detectaban en la cuarta semana (Bonnelye *et al.* 2002). Todos estos datos indican que, al igual que ocurre con los marcadores bioquímicos de hueso, los cambios en la expresión génica se producen en las primeras semanas tras la ovariectomía.

En el hueso, la unión de RANKL y RANK en los preosteoclastos, en presencia de M-CSF, es necesaria y suficiente para que se inicie la osteoclastogénesis (Lacey *et al.* 1998). Según los resultados del presente trabajo, la ovariectomía tiende a aumentar el número de células RANKL+ en la médula ósea ($P=0.13$). Este aumento estaría de acuerdo con un estudio previo en el que se demostraba que la deficiencia estrogénica induce un aumento en la expresión de RANKL en la médula ósea (Lacey *et al.* 1998; Eghbali-Fatourehchi *et al.* 2003). En este trabajo, se demuestra que la administración de agonistas del receptor de estrógenos disminuye el número de células RANKL+ en médula ósea inducido por la ovariectomía (Tabla 4.28), de forma similar a lo que ocurre en médula ósea de mujeres tratadas con terapia hormonal (THS) (Lacey *et al.* 1998; Eghbali-Fatourehchi *et al.* 2003).

La deficiencia estrogénica inducida por la ovariectomía, causa una evidente atrofia uterina (Figuras 4.13 y 4.14). Según nuestros resultados, sólo el grupo de ratones E2 recuperó completamente el peso del útero después de cuatro semanas de tratamiento. Aunque el RAL es un compuesto con actividad antagonista en el tejido uterino (Black *et al.* 1994b), en las Figuras 4.13 y 4.14 se puede apreciar cómo tanto RAL como GEN actúan con propiedades agonistas en este órgano. La explicación a este fenómeno parece basarse en que RAL se

comportaría como antagonista al ser administrado a hembras no ovariectomizadas, produciendo así atrofia en el útero (Erlandsson *et al.* 2002a). Los resultados de este trabajo difieren de los de otros trabajos previos que describen que, dosis de RAL y GEN similares a las utilizadas en este trabajo, previenen la pérdida de hueso trabecular y no presentan efectos hipertróficos en el útero. De acuerdo con los datos del presente trabajo, RAL sí mostró efectos agonísticos sobre el útero de los animales ovariectomizados (Black *et al.* 1994b). Además, se ha descrito que la ingesta de elevadas cantidades de fitoestrógenos provoca una disminución en la capacidad reproductiva (Leopold *et al.* 1976). Así pues, de acuerdo con la fisiología uterina, los resultados de este trabajo indican que el comportamiento de la GEN es similar al de RAL, y que para evitar efectos adversos sobre el útero, las dosis administradas de agonistas de receptor de estrógenos deberían ser ajustadas para el uso en humanos.

Como es sabido, las hormonas esteroideas están implicadas en la linfopoyesis. Mientras que la linfopoyesis de células B está suprimida durante el embarazo (Medina *et al.* 1993), en la deficiencia estrogénica la síntesis de células B se ve estimulada (Masuzawa *et al.* 1994). Además, se ha demostrado que los estrógenos son reguladores negativos de la linfopoyesis (Medina & Kincade 1994). En este estudio, la deficiencia estrogénica induce un aumento selectivo de células B y de células CD25+ en la médula ósea. Estos resultados se ajustan a resultados de estudios previos en los cuales se demostraba la existencia de un aumento selectivo de células B tras la deficiencia estrogénica (Masuzawa *et al.* 1994). Posiblemente, este aumento del

número de células B que se produce después de una ovariectomía, nos esté indicando que la célula B participa de forma activa en la pérdida ósea debida a deficiencia estrogénica, por lo que se debería indagar más sobre la participación de las células B en la pérdida de hueso por déficit estrogénico. La pérdida ósea que se produce tras el déficit estrogénico es causado principalmente por una aumento en el número de osteoclastos derivados de la línea mielocítica, aunque de acuerdo con otros estudio previos (Masuzawa *et al.* 1994), en este trabajo no se detectó ningún aumento en el número de células mielocíticas (CD11b+) tras la ovariectomía. Sin embargo, existen datos que apoyan la importancia del papel de la célula B en la pérdida ósea. Por ejemplo, se ha descrito la existencia de células B/macrófagos bipotentes (Cumano *et al.* 1992), osteoclastos que se originan a partir de células B tempranas (Sato *et al.* 2001), expresión de RANKL en precursores de células B (Kanematsu *et al.* 2000) y en células mieloides implicadas en la formación de osteoclastos *in vivo* (Farrugia *et al.* 2003). De acuerdo con datos de estudios previos (Masuzawa *et al.* 1994; Medina & Kincade 1994) que demuestran que el E2 disminuye la linfopoyesis de células B, este trabajo también refleja un descenso en el número de células B a causa de la administración de agonistas del receptor de estrógenos, aunque sólo se alcanzaron diferencias significativas en los grupos en los que se administró E2 y RAL. En bazo, al igual que en la médula ósea, también se observó una disminución en el número de células B a causa de la administración de estradiol.

La ovariectomía induce un aumento en los niveles de células CD25+ en médula ósea. En otros estudios, se describió un aumento en el número de células CD25+ y en el número de células T CD69+ en médula ósea de animales OVX (Cenci *et al.* 2003) y un aumento de células CD25+ y de células T HLA-DR+ en mujeres posmenopáusicas (Yang *et al.* 2000). Todos ellos son marcadores de activación que, parece ser, participan en la base de la pérdida ósea inducida por la ovariectomía. El aumento del marcador CD25 (receptor de la IL-2) que se expresa en células T activadas, células B y macrófagos, no ha quedado muy claro, sobre todo si los niveles de IL-2 no varían con la ovariectomía (Tabla 4.25 y 4.28). Solo el E2 fue capaz de reducir el número de células CD25+, aunque el RAL presentó la misma tendencia.

Como se ha demostrado en otros trabajos, en el timo existen receptores de estrógenos (Barr *et al.* 1982), lo cual sugiere que los agonistas de los receptores de estrógenos pueden modular la linfopoyesis de las células T. En realidad, se ha demostrado que la ovariectomía induce hipertrofia en el timo (Safadi *et al.* 2000), mientras que la administración de estrógenos induce atrofia del timo (Screpanti *et al.* 1989; Safadi *et al.* 2000), del mismo modo que ocurre cuando aumentan los niveles de hormonas esteroideas durante el embarazo (Grossman 1985). No obstante, el efecto que la deficiencia de estrógenos causa en el contenido de células T de los tejidos linfoides, particularmente en la médula ósea, no está totalmente claro. Los resultados de este trabajo indican que la ovariectomía induce hipertrofia del timo (Figura 4.13), y que los agonistas del receptor de

estrógenos tienden a corregirla, aunque sólo la administración de E2 y RAL alcanzaron diferencias significativas. En el presente estudio, la ovariectomía provocó una disminución en el porcentaje de células T, pero no ocurrió lo mismo para los niveles de células T totales utilizando un anticuerpo CD3 de ratón. Los resultados de este estudio apoyan los datos de otros autores los cuales describen que la ovariectomía no induce cambio alguno sobre los niveles de células T en la médula ósea (Masuzawa *et al.* 1994; Erben *et al.* 1998a; Erben *et al.* 1998b; Safadi *et al.* 2000). Sin embargo, existen estudios que confirman un aumento en el contenido de células T en médula ósea tras la ovariectomía (Cenci *et al.* 2000; Roggia *et al.* 2001). El papel de las células T en la pérdida ósea inducida por la ovariectomía es evidente desde que se describió que ratones deficientes en células T no perdían hueso tras la ovariectomía (Cenci *et al.* 2000). Por lo tanto, es necesario un mayor estudio para aclarar el efecto que la deficiencia estrogénica ejerce sobre las células T.

Este estudio ha demostrado que la modulación de los receptores de estrógenos mediante la administración de agonistas induce un descenso en la regulación de células CD3+ en la médula ósea y en el contenido de CD3+/CD4+ en el bazo (Tablas 4.27 y 4.28). Sin embargo, la funcionalidad celular no se vió afectada por la ovariectomía ni por la administración de agonistas del receptor de estrógenos. La funcionalidad celular se evaluó por medio de ensayos de proliferación *in vitro*, por lo que no se puede afirmar que no estén afectadas otras funciones celulares. De hecho, los estrógenos inhiben la citotoxicidad de las células NK y la inflamación mediada por los

granulocitos, y los agonistas de los receptores de estrógenos reducen la funcionalidad de las células T (Hanna & Schneider 1983; Carlsten *et al.* 1989). El incremento que algunos agonistas, especialmente la genisteína, inducen en los niveles de IL-2 en suero, puede ser indicativo de esa pérdida de función de las células T, ya que se sabe que la genisteína induce la inhibición del complejo de endocitosis IL-2/IL-2R en las células T (Yu *et al.* 2000). Además, la administración de agonistas del receptor de estrógenos aumenta la capacidad de apoptosis inducida por la dexametasona (Tabla 4.26). Estos datos, junto con la información referente a las propiedades agonistas que ejercen los agonistas del receptor de estrógenos en el útero de ratas ovariectomizadas, apuntan hacia la necesidad de ajustar las dosis a administrar de los compuestos alternativos a la terapia hormonal para evitar posibles efectos inmunosupresores. Además, se ha descrito recientemente que el raloxifeno y el tamoxifeno disminuyen la diferenciación de las células dendríticas y su activación (Nalbandian *et al.* 2005).

En resumen, 4 semanas después de realizar la ovariectomía, cuando el metabolismo del hueso tiende a la estabilización, todavía persisten algunos cambios en el sistema inmune. Estos cambios afectan, principalmente, al fenotipo de las células de la médula ósea, aunque también se ven afectados otros elementos del sistema inmune. La modulación del receptor de estrógenos mediante la administración de los agonistas, tiende a mejorar todos los cambios inducidos por la ovariectomía tanto en el sistema inmune como en el metabolismo óseo. Se puede decir que, a excepción de algunos aspectos, todos los

agonistas del receptor de estrógenos actúan en la misma dirección, aunque con diferente eficacia y, probablemente, con diferentes efectos adversos sobre la funcionalidad del sistema inmune y la inmunosupresión.

5.8. Efecto de la ovariectomía y de la administración de agonistas del receptor de estrógenos sobre la microestructura ósea del ratón

En el presente trabajo se ha observado que la deficiencia estrogénica inducida mediante ovariectomía, provoca un deterioro tanto en la densidad mineral ósea (DMO), principalmente en la vDMOtrab, como de la calidad ósea, tal y como sugieren los cambios que se producen en casi todos los parámetros microestructurales estudiados. En lo referente al hueso trabecular, la ovariectomía indujo una reducción significativa en el grosor trabecular (Tb.Th), en el número de trabéculas (Tb.N), y en el volumen de hueso trabecular (BV/TV) y un aumento en la separación trabecular (Tb.Sp). Todos estos cambios resultaron en una disminución en la conectividad de las trabéculas como lo indica el aumento de Tb.Pf. A nivel cortical, la ovariectomía provocó un aumento en el perímetro periosteal (Ct.Pe.Pm) y una disminución en el momento polar de inercia (MMI) y el área de hueso media de las secciones transversales (B.Ar)

Los datos también aportaron información sobre el escaso conocimiento que existe acerca del efecto del raloxifeno sobre las propiedades microestructurales del hueso. Se ha propuesto que el raloxifeno mejora las propiedades mecánicas del hueso mediante un mecanismo que no implica un aumento de DMO o de BV/TV (Allen *et al.* 2006). Los resultados del presente trabajo han confirmado que el

raloxifeno mejora el deterioro inducido por la ovariectomía sobre el BV/TV, Tb.N, Tb.Sp, y Tb.Th en el hueso trabecular. Además, el raloxifeno aumentó la conectividad entre las trabéculas y disminuyó el índice de modelo estructural (SMI). Este último efecto es particularmente importante porque el SMI, que se caracteriza por la transición de una arquitectura en placas (o platos) a una arquitectura en tubos, muestra una importancia particular en el hueso trabecular afectado por osteoporosis (Hildebrand & Ruegsegger 1997b). En el grupo RAL se observaron valores pequeños de SMI, lo cual sugirió una estructura tipo plato, que concordaba con la mejora en la solidez ósea. Este trabajo ha sido el primero en reflejar el efecto del raloxifeno sobre el SMI. Los efectos de la ovariectomía fueron menos dramáticos sobre la microestructura del hueso cortical, sin embargo, de nuevo, detectamos que el raloxifeno neutraliza el deterioro estructural inducido por la deficiencia estrogénica.

El estradiol ha mostrado unos efectos más variados. Este tratamiento ha inhibido sólo parcialmente la pérdida de vDMO, pero sin embargo, ha sido el tratamiento que mejor ha actuado sobre la vDMOc. Estos datos se ven apoyados por trabajos publicados recientemente (Andersson *et al.* 2005; Devareddy *et al.* 2006). En cuanto a los parámetros microestructurales, el estradiol inhibió la pérdida de grosor trabecular (Tb.Th) y de la conectividad (Tb.Pf). No se ha encontrado una explicación para este comportamiento, ya que hubiese sido más lógico encontrar una mejora en el número de trabéculas y en la separación trabecular antes que encontrar una

inhibición de la pérdida de conectividad. Para aclarar estas dudas sería necesario realizar estudios adicionales.

Dadas las diferencias observadas para el raloxifeno y el estradiol, podríamos pensar que la dosis de estradiol no fue equipotente con respecto a la del raloxifeno. Sin embargo, las dosis utilizadas de raloxifeno y estradiol en este trabajo corresponderían a 60 mg y 0.3 mg, respectivamente, para una mujer de 60 kg de peso. Estas dosis se ha demostrado que ejercen un efecto protector significativo en el hueso en (Delmas *et al.* 1997; Prestwood *et al.* 2003). Además, también se ha demostrado en otros estudios que dosis de estradiol similares a las utilizadas en este trabajo inhiben la pérdida de DMO inducida por la ovariectomía, aunque en esos estudios, la densidad mineral se calculó por unidad de área (medido por absorciometría dual de Rayos X) en lugar de por unidad de volumen (Cenci *et al.* 2000; Modder *et al.* 2004a). Para apoyar la significación de los datos obtenidos en este trabajo, existen trabajos que afirman que el micro-TC puede detectar diferencias en el contenido mineral del hueso que son comparables o superiores al estándar de oro definido por los valores de la cantidad de ceniza (McNamara *et al.* 2006). Parece concluyente que el raloxifeno fue más efectivo que el estradiol en el modelo del ratón ovariectomizado descrito en el presente trabajo. Por otra parte, existen trabajos que indican que el estradiol, administrado a ratas en dosis similares a las utilizadas en este trabajo no es capaz de mejorar los parámetros microestructurales de la tibia proximal como BV/TV, la densidad de la conectividad, SMI y Tb.Sp (Devareddy *et al.* 2006).

Un estudio previo de nuestro grupo demostró que dosis de estradiol idénticas a las utilizadas en este trabajo previenen tanto la atrofia uterina como la hipertrofia tímica, induciendo al mismo tiempo un aumento de las células B en la médula ósea de ratones ovariectomizados (García-Pérez *et al.* 2006a). Además, en otro estudio, las misma dosis reestablecieron los cambios inducidos por la ovariectomía en el útero, timo y en los niveles de DMO cortical, pero no fueron capaces de rebasar el 20-30% de la respuesta alcanzada con la dosis máxima de estradiol en DMO trabecular en ratones de 8 semanas (Andersson *et al.* 2005). Interesantemente, se ha descrito que la edad del ratón es determinante en este tipo de estudios (Modder *et al.* 2004a). Así, la administración de 5 µg/kg/día de estradiol a ratones de 6 meses de edad previene completamente la pérdida de hueso trabecular sin ejercer efectos estimulativos sobre el útero, mientras que las mismas dosis de estradiol inyectadas a un ratón de 3 meses de edad (la misma edad que los ratones de este trabajo) no evitaban la pérdida ósea y provocaban hipertrofia uterina (Modder *et al.* 2004a), coincidiendo con los datos de nuestro trabajo previo (García-Pérez *et al.* 2006a).

La genisteína fue el tratamiento que menor poder antiresortivo mostró en el presente estudio. Este tratamiento fue incapaz de limitar la pérdida de vDMO o el deterioro microestructural inducido por la ovariectomía en el hueso trabecular, aunque sí que inhibió cambios en el perímetro periostal (Ct.Pe.Pm) y en la superficie cortical (B.Ar) en el hueso cortical. Es poco probable que el pobre efecto de la genisteína en este trabajo fuera debido a una dosis insuficiente. La dosis utilizada

en este trabajo fue una dosis normal para este tipo de estudios (Ishimi *et al.* 1999; Ishimi *et al.* 2000; Wu *et al.* 2001), y sería equivalente a 1500 mg para una mujer de 60 kg de peso, unas 20-25 veces superior a la dosis que se prescribe generalmente. Se ha llegado a describir que las dosis de genisteína de este rango son tóxicas para el tejido (Ishimi *et al.* 1999; Ishimi *et al.* 2000; Wu *et al.* 2001; Newbold *et al.* 2001; Unfer *et al.* 2004; García-Pérez *et al.* 2006c). Los resultados de nuestro trabajo coinciden con los de otros estudios previamente publicados en que el efecto de la genisteína o de otras isoflavonas sobre parámetros microestructurales del hueso son mínimos (Hotchkiss *et al.* 2005; Devareddy *et al.* 2006), aunque existe alguna evidencia a favor de un efecto protector contra la pérdida de hueso inducida por la ovariectomía (Fanti *et al.* 1998; Ishimi *et al.* 2000; Wu *et al.* 2001).

Para dar una respuesta a todas estas cuestiones, en el presente trabajo se han utilizado ratones C57BL/6 como modelo, ya que se trata de una familia de ratones bien establecida para realizar estudios sobre los efectos de la ovariectomía en el hueso. Además, se utilizaron ratones C57BL/6 de 12 semanas de edad que se consideran maduros desde el punto de vista del esqueleto (Somerville *et al.* 2004). Pese a ello, en los ratones de esta edad todavía puede persistir una cierta actividad de modelado y remodelado en el esqueleto. Este estatus metabólico específico ha podido influir en el patrón de respuesta observado para cada agonista del receptor de estrógenos utilizado en nuestro estudio. En realidad, la interacción del agonista del receptor de estrógenos con su propio receptor y factores de transcripción, genera un

amplio despliegue de respuestas tanto de tipo agonista como de tipo antagonista (Riggs & Hartmann 2003). Tampoco se puede descartar la contribución variable de cada compuesto a través de rutas afectadas por la edad del animal o incluso por la fase de crecimiento del esqueleto.

A modo de conclusión del presente trabajo se puede deducir que, a las dosis utilizadas en este estudio para alcanzar el efecto agonista equivalente para cada compuesto, el raloxifeno fue más efectivo que el estradiol o la genisteína en cuanto al mantenimiento de la vDMO y de la microestructura en el ratón adulto ovariectomizado. Pese a que este trabajo es un estudio comparativo, existen limitaciones en cuanto a variables de confusión. Por tanto, no se puede descartar que el uso de rutas alternativas para la administración de los tratamientos, la cepa o familia de ratones utilizados o la edad de los mismos, pudieran influir en los resultados.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

1. El polimorfismo -1025 T>C situado en el promotor P2 del gen *RUNX2* se asocia a cambios en los niveles de DMO de cuello femoral, mostrando los genotipos TC y CC mayor masa ósea. Estos resultados apoyan estudios previos realizados por otros grupos.
2. Variantes genéticas raras o mutaciones que insertan o eliminan glutaminas en el dominio de poli-glutaminas del gen *RUNX2* no se asocian a cambios en la DMO, ni a fracturas, ni inducen un fenotipo compatible con la displasia cleidocraneal.
3. El polimorfismo no-sinónimo Asn19Lys en el gen *OCIL* (*osteoclast inhibitory lectin*) se asocia a cambios en la masa ósea de cuello femoral y columna lumbar, especialmente en mujeres mayores de 53 años. Así, el genotipo CG/GG se asocia a una reducción del 5.6% y del 6.7% en DMO de cadera y columna, respectivamente. Esta es la primera vez que se relacionan *OCIL* y masa ósea en estudios epidemiológicos.
4. Las mujeres homocigotas para el alelo T de un polimorfismo funcional C>T situado en la posición -1 de la secuencia consenso Kozak del gen *CD40* (rs1883832) muestran menor DMO y mayor riesgo de sufrir osteoporosis u osteopenia que las mujeres de genotipo CT/CC.

5. Las mujeres homocigotas para el alelo T de un polimorfismo sinónimo T>C situado en el exon 1 del gen *CD40L* (rs1126535) presentan menor DMO en columna lumbar.

6. Hemos detectado una interacción génica entre los genes *CD40* y *CD40L* con respecto a masa ósea. De esta forma, las mujeres doblemente homocigotas para el alelo T del polimorfismo situado en la secuencia consenso Kozak del gen *CD40* y del polimorfismo del exon 1 del gen *CD40L*, muestran una reducción considerable tanto en la DMO total como en el parámetro Z-score (especialmente en cadera), en modelos multivariados corregidos por varias variables de confusión. El análisis de regresión logística ajustando para estas covariables muestra que las mujeres doblemente homocigotas TT+TT tienen un riesgo de sufrir osteoporosis u osteopenia de 2.76 para cadera y de 2.39 para columna que el resto de las mujeres participantes. Nuestro grupo ha sido el primero en relacionar el sistema CD40-CD40L con calidad ósea en estudios poblacionales.

7. El extracto isopropanólico de *Cimicífuga racemosa* parece tener un efecto protector sobre la pérdida ósea posmenopáusica, ya que disminuye la excreción de NTx y aumenta la producción de fosfatasa alcalina a los tres meses de tratamiento.

8. El suero de mujeres posmenopáusicas tratadas con *Cimicífuga racemosa* añadido a células pre-osteoblásticas de ratón en presencia de

inductores de la diferenciación osteoblástica, no incrementa la producción de fosfatasa alcalina. Tampoco induce cambios en los niveles de expresión de genes relacionados con la diferenciación y activación osteoblástica como el de la propia *fosfatasa alcalina*, el de la *osteocalcina* o *RUNX2*.

9. El extracto isopropanólico de *Cimicífuga racemosa* no parece tener ningún efecto beneficioso ni adverso sobre el metabolismo lipídico en mujeres posmenopáusicas y la adición de suero de mujeres tratadas con extracto isopropanólico de *Cimicífuga racemosa* a células endoteliales humanas no modificó la producción de prostaciclina, lo cual está de acuerdo con que este extracto no posee ningún efecto estrogénico sobre el endotelio vascular.

10. La ovariectomía al ratón provoca una atrofia uterina y una hipertrofia tímica que fueron corregidas en diferente grado por los distintos agonistas del receptor de estrógenos estudiados (estradiol, raloxifeno y genisteína). A las 4 semanas de la ovariectomía persiste un metabolismo óseo alterado como lo muestra los niveles aumentados de calcio sérico y de expresión del gen de la catepsina K y los menores niveles de actividad fosfatasa alcalina. Además, la ovariectomía indujo un incremento de células B y de células activadas (CD25+) y un descenso en el porcentaje de células T y de expresión de Runx2 en médula ósea. Todos los agonistas del receptor de estrógenos corrigieron, aunque en distinto grado, los efectos de la ovariectomía sobre estos parámetros. No obstante, todos ellos

disminuyeron los niveles de células T en médula ósea con lo que es conveniente ajustar sus dosis para evitar inmunosupresión.

11. La deficiencia estrogénica inducida por ovariectomía provoca un deterioro evidente en la DMO y en la microestructura ósea en el ratón. En el hueso trabecular, la ovariectomía indujo una reducción en el grosor trabecular, en el número de trabéculas, y en el volumen y masa ósea trabecular, y un incremento en la separación trabecular, lo cual es compatible con un descenso evidente en la conectividad trabecular. En hueso cortical, la ovariectomía indujo un incremento del perímetro periostal y una disminución en el momento polar de inercia. El raloxifeno evitó prácticamente todos los cambios inducidos por la ovariectomía, mostrándose, al menos en el modelo experimental del presente trabajo, como el tratamiento más eficaz. El estradiol evitó en parte el deterioro en la microestructura ósea y en la DMO volumétrica trabecular, aunque fue el tratamiento más eficaz en evitar la pérdida de DMO volumétrica cortical. La genisteína fue el tratamiento con menor poder antiresortivo en nuestro estudio, evitando únicamente el deterioro en algunos parámetros corticales tales como el perímetro periostal y en la superficie cortical. Estas diferencias no deben ser atribuidas a la dosis ya que se han usado dosis equipotentes en cuanto a la capacidad estrogénica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 2003 The International HapMap Project. *Nature* 426: 789-796.
- Advani, S., D. LaFrancis, E. Bogdanovic, P. Taxel, L. G. Raisz *et al.* 1997 Dexamethasone suppresses in vivo levels of bone collagen synthesis in neonatal mice. *Bone* 20: 41-46.
- Ahuja, S. S., S. Zhao, T. Bellido, L. I. Plotkin, F. Jimenez *et al.* 2003 CD40 ligand blocks apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha, glucocorticoids, and etoposide in osteoblasts and the osteocyte-like cell line murine long bone osteocyte-Y4. *Endocrinology* 144: 1761-1769.
- Allen, M. R., K. Iwata, M. Sato, and D. B. Burr, 2006 Raloxifene enhances vertebral mechanical properties independent of bone density. *Bone* 39: 1130-1135.
- Ammann, P., and R. Rizzoli, 2003 Bone strength and its determinants. *Osteoporos.Int.* 14 Suppl 3: S13-S18.
- Ammann, P., R. Rizzoli, J. P. Bonjour, S. Bourrin, J. M. Meyer *et al.* 1997 Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J.Clin.Invest* 99: 1699-1703.
- Andersson, N., U. Islander, E. Egecioglu, E. Lof, C. Swanson *et al.* 2005 Investigation of central versus peripheral effects of estradiol in ovariectomized mice. *J.Endocrinol.* 187: 303-309.
- Arron, J. R., and Y. Choi, 2000 Bone versus immune system. *Nature* 408: 535-536.
- Balasz, J., 2003 Sex steroids and bone: current perspectives. *Hum.Reprod.Update.* 9: 207-222.

- Baldock, P. A., and J. A. Eisman, 2004 Genetic determinants of bone mass. *Curr.Opin.Rheumatol.* 16: 450-456.
- Barr, I. G., B. A. Khalid, P. Pearce, B. H. Toh, P. F. Bartlett *et al.* 1982 Dihydrotestosterone and estradiol deplete corticosterone sensitive thymocytes lacking in receptors for these hormones. *J.Immunol.* 128: 2825-2828.
- Barrett, J. C., B. Fry, J. Maller, and M. J. Daly, 2005 Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 21: 263-265.
- Black, L. J., M. Sato, E. R. Rowley, D. E. Magee, A. Bekele *et al.* 1994b Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J.Clin.Invest* 93: 63-69.
- Black, L. J., M. Sato, E. R. Rowley, D. E. Magee, A. Bekele *et al.* 1994a Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J.Clin.Invest* 93: 63-69.
- Blake, G. M., and I. Fogelman, 2009 The clinical role of dual energy X-ray absorptiometry. *Eur.J.Radiol.* 71: 406-414.
- Bonde, M., P. Qvist, C. Fledelius, B. J. Riis, and C. Christiansen, 1994 Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin.Chem.* 40: 2022-2025.
- Bonnelye, E., V. Kung, C. Laplace, D. L. Galson, and J. E. Aubin, 2002 Estrogen receptor-related receptor alpha impinges on the estrogen axis in bone: potential function in osteoporosis. *Endocrinology* 143: 3658-3670.

- Borrelli, F., A. A. Izzo, and E. Ernst, 2003 Pharmacological effects of *Cimicifuga racemosa*. *Life Sci.* 73: 1215-1229.
- Boyce, B. F., and L. Xing, 2008 Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch.Biochem.Biophys.* 473: 139-146.
- Boyle, W. J., W. S. Simonet, and D. L. Lacey, 2003 Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342.
- Braga, V., A. Sangalli, G. Malerba, M. Mottes, S. Mirandola *et al.* 2002 Relationship among VDR (BsmI and FokI), COLIA1, and CTR polymorphisms with bone mass, bone turnover markers, and sex hormones in men. *Calcif.Tissue Int.* 70: 457-462.
- Brown, J. P., P. D. Delmas, L. Malaval, C. Edouard, M. C. Chapuy *et al.* 1984 Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1: 1091-1093.
- Bustamante, M., X. Nogues, L. Agueda, S. Jurado, A. Wesselius *et al.* 2007 Promoter 2 -1025 T/C polymorphism in the RUNX2 gene is associated with femoral neck bmd in Spanish postmenopausal women. *Calcif.Tissue Int.* 81: 327-332.
- Cano, A., S. Dapia, I. Noguera, B. Pineda, C. Hermenegildo *et al.* 2008a Comparative effects of 17beta-estradiol, raloxifene and genistein on bone 3D microarchitecture and volumetric bone mineral density in the ovariectomized mice. *Osteoporos.Int.* 19: 793-800.
- Cano, A., S. Dapia, I. Noguera, B. Pineda, C. Hermenegildo *et al.* 2008b Comparative effects of 17beta-estradiol, raloxifene and

- genistein on bone 3D microarchitecture and volumetric bone mineral density in the ovariectomized mice. *Osteoporos.Int.* 19: 793-800.
- Carlsten, H., R. Holmdahl, A. Tarkowski, and L. A. Nilsson, 1989 Oestradiol suppression of delayed-type hypersensitivity in autoimmune (NZB/NZW)F1 mice is a trait inherited from the healthy NZW parental strain. *Immunology* 67: 205-209.
- Carranza-Lira, S., M. Rosas, A. Murillo, N. Martínez, and J. Santos, 2002 Osteoporosis in postmenopausal women (Mexico City): 1. Risk factors. *Int.J.Fertil.Womens Med.* 47: 22-25.
- Cauley, J. A., L. Y. Lui, K. E. Ensrud, J. M. Zmuda, K. L. Stone *et al.* 2005 Bone mineral density and the risk of incident nonspinal fractures in black and white women. *JAMA* 293: 2102-2108.
- Cauley, J. A., D. G. Seeley, K. Ensrud, B. Ettinger, D. Black *et al.* 1995 Estrogen replacement therapy and fractures in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann.Intern.Med.* 122: 9-16.
- Cenci, S., G. Toraldo, M. N. Weitzmann, C. Roggia, Y. Gao *et al.* 2003 Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN-gamma-induced class II transactivator. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 10405-10410.
- Cenci, S., M. N. Weitzmann, C. Roggia, N. Namba, D. Novack *et al.* 2000 Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J.Clin.Invest* 106: 1229-1237.
- Charles, P., J. W. Poser, L. Mosekilde, and F. T. Jensen, 1985 Estimation of bone turnover evaluated by ⁴⁷Ca-kinetics.

Efficiency of serum bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein, serum alkaline phosphatase, and urinary hydroxyproline excretion. *J.Clin.Invest* 76: 2254-2258.

Chen, Z., I. S. Yuhanna, Z. Galcheva-Gargova, R. H. Karas, M. E. Mendelsohn *et al.* 1999 Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J.Clin.Invest* 103: 401-406.

Chesnut, C. H., III, M. R. McClung, K. E. Ensrud, N. H. Bell, H. K. Genant *et al.* 1995 Alendronate treatment of the postmenopausal osteoporotic woman: effect of multiple dosages on bone mass and bone remodeling. *Am.J.Med.* 99: 144-152.

Cheung, A. K., S. C. Manolagas, B. D. Catherwood, C. A. Mosely, Jr., J. A. Mitas *et al.* 1983 Determinants of serum 1,25(OH)₂D levels in renal disease. *Kidney Int.* 24: 104-109.

Christiansen, C., B. J. Riis, and P. Rodbro, 1990 Screening procedure for women at risk of developing postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos.Int.* 1: 35-40.

Clarke, B., 2008 Normal bone anatomy and physiology. *Clin.J.Am.Soc.Nephrol.* 3 Suppl 3: S131-S139.

Cohen, M. M., Jr., 2006 The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am.J.Med.Genet.A* 140: 2646-2706.

Compston, J. E., 2001 Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 81: 419-447.

Conde, L., J. M. Vaquerizas, H. Dopazo, L. Arbiza, J. Reumers *et al.* 2006 PupaSuite: finding functional single nucleotide

polymorphisms for large-scale genotyping purposes. *Nucleic Acids Res.* 34: W621-W625.

Cumano, A., C. J. Paige, N. N. Iscove, and G. Brady, 1992 Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver. *Nature* 356: 612-615.

Delaney, M. F., 2006 Strategies for the prevention and treatment of osteoporosis during early postmenopause. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 194: S12-S23.

Delmas, P. D., N. H. Bjarnason, B. H. Mitlak, A. C. Ravoux, A. S. Shah *et al.* 1997 Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N.Engl.J.Med.* 337: 1641-1647.

Devareddy, L., D. A. Khalil, B. J. Smith, E. A. Lucas, d. Y. Soung *et al.* 2006 Soy moderately improves microstructural properties without affecting bone mass in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Bone* 38: 686-693.

Doecke, J. D., C. J. Day, A. S. Stephens, S. L. Carter, D. A. van *et al.* 2006 Association of functionally different RUNX2 P2 promoter alleles with BMD. *J.Bone Miner.Res.* 21: 265-273.

Ducy, P., 2000 Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev.Dyn.* 219: 461-471.

Duker, E. M., L. Kopanski, H. Jarry, and W. Wuttke, 1991 Effects of extracts from *Cimicifuga racemosa* on gonadotropin release in menopausal women and ovariectomized rats. *Planta Med.* 57: 420-424.

- Ebeling, P. R., L. M. Atley, J. R. Guthrie, H. G. Burger, L. Dennerstein *et al.* 1996 Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 81: 3366-3371.
- Efstathiadou, Z., V. Kranas, J. P. Ioannidis, I. Georgiou, and A. Tsatsoulis, 2001 The Sp1 COLIA1 gene polymorphism, and not vitamin D receptor or estrogen receptor gene polymorphisms, determines bone mineral density in postmenopausal Greek women. *Osteoporos.Int.* 12: 326-331.
- Eghbali-Fatourehchi, G., S. Khosla, A. Sanyal, W. J. Boyle, D. L. Lacey *et al.* 2003 Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J.Clin.Invest* 111: 1221-1230.
- Erben, R. G., G. Harti, and H. Graf, 1998a Ovariectomy does not alter CD4+/CD8+ ratio in peripheral blood T-lymphocytes in the rat. *Horm.Metab Res.* 30: 50-54.
- Erben, R. G., S. Raith, J. Eberle, and M. Stangassinger, 1998b Ovariectomy augments B lymphopoiesis and generation of monocyte-macrophage precursors in rat bone marrow. *Am.J.Physiol* 274: E476-E483.
- Erlandsson, M. C., C. A. Jonsson, M. K. Lindberg, C. Ohlsson, and H. Carlsten, 2002b Raloxifene- and estradiol-mediated effects on uterus, bone and B lymphocytes in mice. *J.Endocrinol.* 175: 319-327.
- Erlandsson, M. C., C. A. Jonsson, M. K. Lindberg, C. Ohlsson, and H. Carlsten, 2002a Raloxifene- and estradiol-mediated effects on uterus, bone and B lymphocytes in mice. *J.Endocrinol.* 175: 319-327.

- Ermakov, S., I. Malkin, M. Keter, E. Kobylansky, and G. Livshits, 2008 Family-based association study of polymorphisms in the RUNX2 locus with hand bone length and hand BMD. *Ann.Hum.Genet.* 72: 510-518.
- Ermakov, S., I. Malkin, E. Kobylansky, and G. Livshits, 2006 Variation in femoral length is associated with polymorphisms in RUNX2 gene. *Bone* 38: 199-205.
- Fanti, P., M. C. Monier-Faugere, Z. Geng, J. Schmidt, P. E. Morris *et al.* 1998 The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos.Int.* 8: 274-281.
- Farrugia, A. N., G. J. Atkins, L. B. To, B. Pan, N. Horvath *et al.* 2003 Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo. *Cancer Res.* 63: 5438-5445.
- Feldkamp, L. A., L. C. Davis, and J. W. Kress, 1984 Practical cone-beam algorithm. *J.Opt.Soc.Am.A.* 1: 612-619.
- Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., M. A. obero-Gracia, M. del-Canto-Pingarron, and L. Blanco-Jerez, 2006 Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal.* 11: E47-E51.
- Garcia-Martínez, M. C., C. Hermenegildo, J. J. Tarín, and A. Cano, 2003 Phytoestrogens increase the capacity of serum to stimulate prostacyclin release in human endothelial cells. *Acta Obstet.Gynecol.Scand.* 82: 705-710.
- García-Pérez, M. A., and A. Cano, 2003 Fisiopatología del hueso, pp. 97-118 in *Moduladores selectivos de los receptores de*

estrógenos (SERM). Aspectos básicos y clínicos, edited by A. Cano, J. Calaf, and J. L. Duenas. SCM Scientific Communication Management, Madrid.

- García-Pérez, M. A., V. R. del, I. Noguera, C. Hermenegildo, B. Pineda *et al.* 2006a Estrogen receptor agonists and immune system in ovariectomized mice. *Int.J.Immunopathol.Pharmacol.* 19: 807-819.
- García-Pérez, M. A., J. Moreno-Mercer, J. J. Tarín, and A. Cano, 2003 Relationship between PTH, sex steroid and bone turnover marker measurements and bone density in recently postmenopausal women. *Maturitas* 45: 67-74.
- García-Pérez, M. A., J. Moreno-Mercer, J. J. Tarín, and A. Cano, 2004 Bone turnover markers and PTH levels in surgical versus natural menopause. *Calcif.Tissue Int.* 74: 143-149.
- García-Pérez, M. A., I. Noguera, C. Hermenegildo, A. Martínez-Romero, J. J. Tarín *et al.* 2006b Alterations in the phenotype and function of immune cells in ovariectomy-induced osteopenic mice. *Hum.Reprod.* 21: 880-887.
- García-Pérez, M. A., R. Noguera, R. Del Val, I. Noguera, C. Hermenegildo *et al.* 2006c Comparative effects of estradiol, raloxifene, and genistein on the uterus of ovariectomized mice. *Fertil.Steril.* 86: 1003-1005.
- Garnero, P., and P. D. Delmas, 1997 Bone markers. *Baillieres Clin.Rheumatol.* 11: 517-537.
- Garnero, P., and P. D. Delmas, 1999 [Biochemical markers of bone turnover : clinical usefulness in osteoporosis]. *Ann.Biol.Clin.(Paris)* 57: 137-148.

- Garnero, P., W. J. Shih, E. Gineyts, D. B. Karpf, and P. D. Delmas, 1994 Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 79: 1693-1700.
- Garnero, P., E. Sornay-Rendu, B. Claustrat, and P. D. Delmas, 2000 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.
- Gauderman, W. J., 2002 Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. *Am.J.Epidemiol.* 155: 478-484.
- Geller, S. E., and L. Studee, 2006 Contemporary alternatives to plant estrogens for menopause. *Maturitas* 55 Suppl 1: S3-13.
- Gorai, I., Y. Taguchi, O. Chaki, M. Nakayama, and H. Minaguchi, 1997 Specific changes of urinary excretion of cross-linked N-telopeptides of type I collagen in pre- and postmenopausal women: correlation with other markers of bone turnover. *Calcif.Tissue Int.* 60: 317-322.
- Grey, A., M. A. Mitnick, U. Masiukiewicz, B. H. Sun, S. Rudikoff *et al.* 1999 A role for interleukin-6 in parathyroid hormone-induced bone resorption in vivo. *Endocrinology* 140: 4683-4690.
- Grossman, C. J., 1985 Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 227: 257-261.
- Gundberg, C. M., 2003 Matrix proteins. *Osteoporos.Int.* 14 Suppl 5: S37-S40.

- Hadjidakis, D. J., and I. I. Androulakis, 2006 Bone remodeling. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1092: 385-396.
- Hahn, M., M. Vogel, M. Pompesius-Kempa, and G. Delling, 1992 Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 13: 327-330.
- Halleen, J. M., M. Karp, S. Viloma, P. Laaksonen, J. Hellman *et al.* 1999 Two-site immunoassays for osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase based on characterization of six monoclonal antibodies. *J.Bone Miner.Res.* 14: 464-469.
- Hanna, N., and M. Schneider, 1983 Enhancement of tumor metastasis and suppression of natural killer cell activity by beta-estradiol treatment. *J.Immunol.* 130: 974-980.
- Hannon, R., and R. Eastell, 2000 Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos.Int.* 11 Suppl 6: S30-S44.
- Hansen, M. A., K. Overgaard, B. J. Riis, and C. Christiansen, 1991 Role of peak bone mass and bone loss in postmenopausal osteoporosis: 12 year study. *BMJ* 303: 961-964.
- Harrigan, T. P., and R. W. Mann, 1984 Characterisation of microstructural anisotropy in orthotropic materials using a second rank tensor. *J.Mater.Sci.* 19: 761-767.
- Henriksen, K., A. V. Neutzsky-Wulff, L. F. Bonewald, and M. A. Karsdal, 2009 Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone* 44: 1026-1033.

- Hermenegildo, C., P. J. Oviedo, and A. Cano, 2006 Cyclooxygenases regulation by estradiol on endothelium. *Curr.Pharm.Des* 12: 205-215.
- Hermenegildo, C., P. J. Oviedo, M. A. García-Pérez, J. J. Tarín, and A. Cano, 2005 Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on prostacyclin production by human endothelial cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 315: 722-728.
- Hermoso de Mendoza, M. T., 2003 [Classification of osteoporosis. Risk factors. Clinical manifestations and differential diagnosis]. *An.Sist.Sanit.Navar.* 26 Suppl 3: 29-52.
- Hildebrand, T., and P. Ruegsegger, 1997a A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J.Microsc.* 185: 67-75.
- Hildebrand, T., and P. Ruegsegger, 1997b Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput.Methods Biomech.Biomed.Engin.* 1: 15-23.
- Hofbauer, L. C., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, T. C. Spelsberg, B. L. Riggs *et al.* 1999 Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 25: 255-259.
- Hoshino, H., K. Kushida, M. Takahashi, K. Yamazaki, M. Denda *et al.* 2000 Changes in levels of biochemical markers and ultrasound indices of Os calcis across the menopausal transition. *Osteoporos.Int.* 11: 128-133.
- Hotchkiss, C. E., C. Weis, B. Blaydes, R. Newbold, and K. B. Delclos, 2005 Multigenerational exposure to genistein does not increase bone mineral density in rats. *Bone* 37: 720-727.

- Hu, Y. S., H. Zhou, D. Myers, J. M. Quinn, G. J. Atkins *et al.* 2004 Isolation of a human homolog of osteoclast inhibitory lectin that inhibits the formation and function of osteoclasts. *J.Bone Miner.Res.* 19: 89-99.
- Hui, S. L., S. Gao, X. H. Zhou, C. C. Johnston, Jr., Y. Lu *et al.* 1997 Universal standardization of bone density measurements: a method with optimal properties for calibration among several instruments. *J.Bone Miner.Res.* 12: 1463-1470.
- Ioannidis, J. P., S. H. Ralston, S. T. Bennett, M. L. Brandi, D. Grinberg *et al.* 2004 Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA* 292: 2105-2114.
- Ishimi, Y., N. Arai, X. Wang, J. Wu, K. Umegaki *et al.* 2000 Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 274: 697-701.
- Ishimi, Y., C. Miyaura, M. Ohmura, Y. Onoe, T. Sato *et al.* 1999 Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology* 140: 1893-1900.
- Jacobson, E. M., E. Concepcion, T. Oashi, and Y. Tomer, 2005 A Graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: a case for translational pathophysiology. *Endocrinology* 146: 2684-2691.
- Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker, and C. R. Minick, 1973 Culture of human endothelial cells derived from umbilical

veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J.Clin.Invest* 52: 2745-2756.

Jarry, H., M. Metten, B. Spengler, V. Christoffel, and W. Wuttke, 2003 In vitro effects of the *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055. *Maturitas* 44 Suppl 1: S31-S38.

Jilka, R. L., G. Hangoc, G. Girasole, G. Passeri, D. C. Williams *et al.* 1992 Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257: 88-91.

Johansen, J. S., B. J. Riis, P. D. Delmas, and C. Christiansen, 1988 Plasma BGP: an indicator of spontaneous bone loss and of the effect of oestrogen treatment in postmenopausal women. *Eur.J.Clin.Invest* 18: 191-195.

Kanematsu, M., T. Sato, H. Takai, K. Watanabe, K. Ikeda *et al.* 2000 Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegrin ligand on pre-B cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J.Bone Miner.Res.* 15: 1321-1329.

Karsenty, G., 2008 Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 9: 183-196.

Kartsogiannis, V., N. A. Sims, J. M. Quinn, C. Ly, M. Cipetic *et al.* 2008 Osteoclast inhibitory lectin, an immune cell product that is required for normal bone physiology in vivo. *J.Biol.Chem.* 283: 30850-30860.

Katagiri, T., and N. Takahashi, 2002 Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 8: 147-159.

- Kearns, A. E., S. Khosla, and P. J. Kostenuik, 2008 Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr.Rev.* 29: 155-192.
- Khosla, S., B. L. Riggs, E. J. Atkinson, A. L. Oberg, C. Mavilia *et al.* 2004 Relationship of estrogen receptor genotypes to bone mineral density and to rates of bone loss in men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89: 1808-1816.
- Kitazawa, R., R. B. Kimble, J. L. Vannice, V. T. Kung, and R. Pacifici, 1994 Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. *J.Clin.Invest* 94: 2397-2406.
- Kleerekoper, M., 2006 Osteoporosis prevention and therapy: preserving and building strength through bone quality. *Osteoporos.Int.* 17: 1707-1715.
- Knothe Tate, M. L., J. R. Adamson, A. E. Tami, and T. W. Bauer, 2004 The osteocyte. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 36: 1-8.
- Kobayashi, H., Y. Gao, C. Ueta, A. Yamaguchi, and T. Komori, 2000 Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 273: 630-636.
- Komori, T., 2003 Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *J.Bone Miner.Metab* 21: 193-197.
- Komori, T., 2006 Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J.Cell Biochem.* 99: 1233-1239.

- Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki *et al.* 1997b Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-764.
- Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki *et al.* 1997a Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-764.
- Kozak, M., 1986 Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44: 283-292.
- Kroger, H., A. Kotaniemi, L. Kroger, and E. Alhava, 1993 Development of bone mass and bone density of the spine and femoral neck--a prospective study of 65 children and adolescents. *Bone Miner.* 23: 171-182.
- Kubota, T., T. Michigami, and K. Ozono, 2009 Wnt signaling in bone metabolism. *J.Bone Miner.Metab* 27: 265-271.
- Lacey, D. L., E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan *et al.* 1998 Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93: 165-176.
- Lakatos, P., J. Foldes, C. Horvath, L. Kiss, A. Tatrai *et al.* 1997 Serum interleukin-6 and bone metabolism in patients with thyroid function disorders. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82: 78-81.
- Lane, N. E., 2006 Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 194: S3-11.

- Lee, H. J., J. M. Koh, J. Y. Hwang, K. Y. Choi, S. H. Lee *et al.* 2009 Association of a RUNX2 promoter polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Calcif.Tissue Int.* 84: 439-445.
- Lee, S. K., and J. A. Lorenzo, 1999 Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140: 3552-3561.
- Leopold, A. S., M. Erwin, J. Oh, and B. Browning, 1976 Phytoestrogens: adverse effects on reproduction in California quail. *Science* 191: 98-100.
- Li, Y., G. Toraldo, A. Li, X. Yang, H. Zhang *et al.* 2007 B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* 109: 3839-3848.
- Lips, P., T. Duong, A. Oleksik, D. Black, S. Cummings *et al.* 2001 A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes of raloxifene evaluation clinical trial. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 86: 1212-1221.
- Liske, E., W. Hanggi, H. H. Henneicke-von Zepelin, N. Boblitz, P. Wustenberg *et al.* 2002 Physiological investigation of a unique extract of black cohosh (*Cimicifugae racemosae rhizoma*): a 6-month clinical study demonstrates no systemic estrogenic effect. *J.Womens Health Gend.Based.Med.* 11: 163-174.

- Looker, A. C., H. W. Wahner, W. L. Dunn, M. S. Calvo, T. B. Harris *et al.* 1998 Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults. *Osteoporos.Int.* 8: 468-489.
- López-Granados, E., S. T. Temmerman, L. Wu, J. C. Reynolds, D. Follmann *et al.* 2007 Osteopenia in X-linked hyper-IgM syndrome reveals a regulatory role for CD40 ligand in osteoclastogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104: 5056-5061.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193: 265-275.
- Lu, Y., T. Fuerst, S. Hui, and H. K. Genant, 2001 Standardization of bone mineral density at femoral neck, trochanter and Ward's triangle. *Osteoporos.Int.* 12: 438-444.
- Luscher, T. F., and G. Noll, 1995 The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 118 Suppl: S81-S90.
- Mackie, E. J., 2003 Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 35: 1301-1305.
- Malarstig, A., B. Lindahl, L. Wallentin, and A. Siegbahn, 2006 Soluble CD40L levels are regulated by the -3459 A>G polymorphism and predict myocardial infarction and the efficacy of antithrombotic treatment in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26: 1667-1673.
- Manolagas, S. C., 2000c Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr.Rev.* 21: 115-137.

- Manolagas, S. C., 2000a Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr.Rev.* 21: 115-137.
- Manolagas, S. C., 2000b Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr.Rev.* 21: 115-137.
- Manolagas, S. C., and R. L. Jilka, 1995 Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N.Engl.J.Med.* 332: 305-311.
- Masuzawa, T., C. Miyaura, Y. Onoe, K. Kusano, H. Ohta *et al.* 1994 Estrogen deficiency stimulates B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J.Clin.Invest* 94: 1090-1097.
- McNamara, L. M., A. G. Ederveen, C. G. Lyons, C. Price, M. B. Schaffler *et al.* 2006 Strength of cancellous bone trabecular tissue from normal, ovariectomized and drug-treated rats over the course of ageing. *Bone* 39: 392-400.
- Medina, K. L., and P. W. Kincade, 1994 Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91: 5382-5386.
- Medina, K. L., G. Smithson, and P. W. Kincade, 1993 Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J.Exp.Med.* 178: 1507-1515.
- Melton, L. J., III, S. Khosla, E. J. Atkinson, W. M. O'Fallon, and B. L. Riggs, 1997 Relationship of bone turnover to bone density and fractures. *J.Bone Miner.Res.* 12: 1083-1091.

- Mikkola, T., V. Ranta, A. Orpana, L. Viinikka, and O. Ylikorkala, 1996 Hormone replacement therapy modifies the capacity of plasma and serum to regulate prostacyclin and endothelin-1 production in human vascular endothelial cells. *Fertil.Steril.* 66: 389-393.
- Milat, F., and K. W. Ng, 2009 Is Wnt signalling the final common pathway leading to bone formation? *Mol.Cell Endocrinol.* 310: 52-62.
- Minisola, S., M. T. Pacitti, E. Ombriccolo, G. Costa, A. Scarda *et al.* 1998 Bone turnover and its relationship with bone mineral density in pre- and postmenopausal women with or without fractures. *Maturitas* 29: 265-270.
- Miyazono, K., Y. Kamiya, and M. Morikawa, 2010 Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J.Biochem.* 147: 35-51.
- Modder, U. I., B. L. Riggs, T. C. Spelsberg, D. G. Fraser, E. J. Atkinson *et al.* 2004a Dose-response of estrogen on bone versus the uterus in ovariectomized mice. *Eur.J.Endocrinol.* 151: 503-510.
- Modder, U. I., B. L. Riggs, T. C. Spelsberg, D. G. Fraser, E. J. Atkinson *et al.* 2004b Dose-response of estrogen on bone versus the uterus in ovariectomized mice. *Eur.J.Endocrinol.* 151: 503-510.
- Monsalve, E., P. J. Oviedo, M. A. García-Pérez, J. J. Tarín, A. Cano *et al.* 2007 Estradiol counteracts oxidized LDL-induced asymmetric dimethylarginine production by cultured human endothelial cells. *Cardiovasc.Res.* 73: 66-72.

- Moro, L., M. Romanello, A. Favia, M. P. Lamanna, and E. Lozupone, 2000 Posttranslational modifications of bone collagen type I are related to the function of rat femoral regions. *Calcif.Tissue Int.* 66: 151-156.
- Morony, S., C. Capparelli, R. Lee, G. Shimamoto, T. Boone *et al.* 1999 A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1beta, TNF-alpha, PTH, PTHrP, and 1, 25(OH)2D3. *J.Bone Miner.Res.* 14: 1478-1485.
- Muller, R., and P. Ruegsegger, 1995 Three-dimensional finite element modelling of non-invasively assessed trabecular bone structures. *Med.Eng Phys.* 17: 126-133.
- Mundlos, S., F. Otto, C. Mundlos, J. B. Mulliken, A. S. Aylsworth *et al.* 1997 Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89: 773-779.
- Nakamura, A., C. Ly, M. Cipetic, N. A. Sims, J. Vieuxseux *et al.* 2007 Osteoclast inhibitory lectin (OCIL) inhibits osteoblast differentiation and function in vitro. *Bone* 40: 305-315.
- Nakashima, K., and C. B. de, 2003 Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet.* 19: 458-466.
- Nakashima, K., X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J. M. Deng *et al.* 2002 The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29.
- Nalbandian, G., V. Paharkova-Vatchkova, A. Mao, S. Nale, and S. Kovats, 2005 The selective estrogen receptor modulators,

tamoxifen and raloxifene, impair dendritic cell differentiation and activation. *J.Immunol.* 175: 2666-2675.

Newbold, R. R., E. P. Banks, B. Bullock, and W. N. Jefferson, 2001 Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res.* 61: 4325-4328.

Nieves, J. W., 2005 Osteoporosis: the role of micronutrients. *Am.J.Clin.Nutr.* 81: 1232S-1239S.

Nishio, Y., Y. Dong, M. Paris, R. J. O'Keefe, E. M. Schwarz *et al.* 2006 Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene* 372: 62-70.

Nisslein, T., and J. Freudenstein, 2003 Effects of an isopropanolic extract of *Cimicifuga racemosa* on urinary crosslinks and other parameters of bone quality in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J.Bone Miner.Metab* 21: 370-376.

Noble, B. S., and J. Reeve, 2000 Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol.Cell Endocrinol.* 159: 7-13.

Otto, F., A. P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K. C. Gilmour *et al.* 1997 *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89: 765-771.

Oviedo, P. J., C. Hermenegildo, J. J. Tarín, and A. Cano, 2005 Raloxifene promotes prostacyclin release in human endothelial cells through a mechanism that involves cyclooxygenase-1 and -2. *Fertil.Steril.* 83: 1822-1829.

- Pacifici, R., 1996 Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J.Bone Miner.Res.* 11: 1043-1051.
- Pacifici, R., 1998 Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology* 139: 2659-2661.
- Pacifici, R., L. Rifas, S. Teitelbaum, E. Slatopolsky, R. McCracken *et al.* 1987 Spontaneous release of interleukin 1 from human blood monocytes reflects bone formation in idiopathic osteoporosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84: 4616-4620.
- Patel, R., G. M. Blake, J. Rymer, and I. Fogelman, 2000 Long-term precision of DXA scanning assessed over seven years in forty postmenopausal women. *Osteoporos.Int.* 11: 68-75.
- Peacock, M., C. H. Turner, M. J. Econs, and T. Foroud, 2002 Genetics of osteoporosis. *Endocr.Rev.* 23: 303-326.
- Pineda, B., C. Hermenegildo, P. Laporta, J. J. Tarín, A. Cano *et al.* 2010 Common polymorphisms rather than rare genetic variants of Runx2 gene are associated with femoral neck BMD in Spanish women. *J.Bone Miner.Metab.* In press.
- Pineda, B., P. Laporta, A. Cano, and M. A. García-Pérez, 2008a The Asn19Lys substitution in the osteoclast inhibitory lectin (OCIL) gene is associated with a reduction of bone mineral density in postmenopausal women. *Calcif.Tissue Int.* 82: 348-353.
- Pineda, B., P. Laporta, C. Hermenegildo, A. Cano, and M. A. García-Pérez, 2008b A C >T polymorphism located at position -1 of the Kozak sequence of CD40 gene is associated with low bone

- mass in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos.Int.* 19: 1147-1152.
- Prestwood, K. M., A. M. Kenny, A. Kleppinger, and M. Kulldorff, 2003 Ultralow-dose micronized 17beta-estradiol and bone density and bone metabolism in older women: a randomized controlled trial. *JAMA* 290: 1042-1048.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly, 2000 Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Proff, P., and P. Romer, 2009 The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. *Clin.Oral Investig.* 13: 355-362.
- Qiu, S. X., C. Dan, L. S. Ding, S. Peng, S. N. Chen *et al.* 2007 A triterpene glycoside from black cohosh that inhibits osteoclastogenesis by modulating RANKL and TNFalpha signaling pathways. *Chem.Biol.* 14: 860-869.
- Raisz, L. G., 1999 Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin.Chem.* 45: 1353-1358.
- Ralston, S. H., 2002 Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87: 2460-2466.
- Ralston, S. H., 2003 Genetic determinants of susceptibility to osteoporosis. *Curr.Opin.Pharmacol.* 3: 286-290.
- Ramensky, V., P. Bork, and S. Sunyaev, 2002 Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res.* 30: 3894-3900.
- Reid, I. R., 1998 Glucocorticoid effects on bone. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83: 1860-1862.

- Richards, J. B., F. Rivadeneira, M. Inouye, T. M. Pastinen, N. Soranzo *et al.* 2008 Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 371: 1505-1512.
- Riggs, B. L., and L. C. Hartmann, 2003 Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N.Engl.J.Med.* 348: 618-629.
- Riggs, B. L., S. Khosla, and L. J. Melton, III, 1998 A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J.Bone Miner.Res.* 13: 763-773.
- Riggs, B. L., and L. J. Melton, III, 1986 Involutional osteoporosis. *N.Engl.J.Med.* 314: 1676-1686.
- Roggia, C., Y. Gao, S. Cenci, M. N. Weitzmann, G. Toraldo *et al.* 2001 Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 13960-13965.
- Rosen, D. B., W. Cao, D. T. Avery, S. G. Tangye, Y. J. Liu *et al.* 2008 Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *J.Immunol.* 180: 6508-6517.
- Ross, R., 1999 Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N.Engl.J.Med.* 340: 115-126.
- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, R. L. Prentice, A. Z. LaCroix, C. Kooperberg *et al.* 2002 Risks and benefits of estrogen plus

progesterin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288: 321-333.

Rubin, M. R., F. Cosman, R. Lindsay, and J. P. Bilezikian, 2002 The anabolic effects of parathyroid hormone. *Osteoporos.Int.* 13: 267-277.

Russell, K. S., M. P. Haynes, D. Sinha, E. Clerisme, and J. R. Bender, 2000 Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 5930-5935.

Safadi, F. F., I. R. Dissanayake, G. G. Goodman, R. A. Jago, A. E. Baker *et al.* 2000 Influence of estrogen deficiency and replacement on T-cell populations in rat lymphoid tissues and organs. *Endocrine.* 12: 81-88.

Sampson, H. W., 2002 Alcohol and other factors affecting osteoporosis risk in women. *Alcohol Res.Health* 26: 292-298.

Sato, T., T. Shibata, K. Ikeda, and K. Watanabe, 2001 Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220+ cells: its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency. *J.Bone Miner.Res.* 16: 2215-2221.

Schiele, F., J. Henny, J. Hitz, C. Petitclerc, R. Gueguen *et al.* 1983 Total bone and liver alkaline phosphatases in plasma: biological variations and reference limits. *Clin.Chem.* 29: 634-641.

Schrum, L. W., I. Marriott, B. R. Butler, E. K. Thomas, M. C. Hudson *et al.* 2003 Functional CD40 expression induced following

bacterial infection of mouse and human osteoblasts. *Infect.Immun.* 71: 1209-1216.

Screpanti, I., S. Morrone, D. Meco, A. Santoni, A. Gulino *et al.* 1989 Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. *J.Immunol.* 142: 3378-3383.

Seeman, E., 2002 Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet* 359: 1841-1850.

Seeman, E., J. L. Hopper, L. A. Bach, M. E. Cooper, E. Parkinson *et al.* 1989 Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. *N.Engl.J.Med.* 320: 554-558.

Seidlova-Wuttke, D., O. Hesse, H. Jarry, V. Christoffel, B. Spengler *et al.* 2003a Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta. *Eur.J.Endocrinol.* 149: 351-362.

Seidlova-Wuttke, D., H. Jarry, T. Becker, V. Christoffel, and W. Wuttke, 2003b Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44 Suppl 1: S39-S50.

Shui, C., T. C. Spelsberg, B. L. Riggs, and S. Khosla, 2003 Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J.Bone Miner.Res.* 18: 213-221.

- Simonet, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang *et al.* 1997 Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309-319.
- Slemenda, C., S. L. Hui, C. Longcope, and C. C. Johnston, 1987 Sex steroids and bone mass. A study of changes about the time of menopause. *J.Clin.Invest* 80: 1261-1269.
- Sole, X., E. Guino, J. Valls, R. Iniesta, and V. Moreno, 2006 SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 22: 1928-1929.
- Somerville, J. M., R. M. Aspden, K. E. Armour, K. J. Armour, and D. M. Reid, 2004 Growth of C57BL/6 mice and the material and mechanical properties of cortical bone from the tibia. *Calcif.Tissue Int.* 74: 469-475.
- Spelsberg, T. C., M. Subramaniam, B. L. Riggs, and S. Khosla, 1999 The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol.Endocrinol.* 13: 819-828.
- Stephens, M., and P. Scheet, 2005 Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am.J.Hum.Genet.* 76: 449-462.
- Stephens, M., N. J. Smith, and P. Donnelly, 2001 A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am.J.Hum.Genet.* 68: 978-989.
- Styrkarsdottir, U., B. V. Halldorsson, S. Gretarsdottir, D. F. Gudbjartsson, G. B. Walters *et al.* 2008 Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N.Engl.J.Med.* 358: 2355-2365.

- Styrkarsdottir, U., B. V. Halldorsson, S. Gretarsdottir, D. F. Gudbjartsson, G. B. Walters *et al.* 2009 New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat.Genet.* 41: 15-17.
- Takahashi, M., K. Kushida, H. Hoshino, M. Miura, T. Ohishi *et al.* 1997 Comparison of bone and total alkaline phosphatase activity on bone turnover during menopause and in patients with established osteoporosis. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 47: 177-183.
- Takayanagi, H., K. Ogasawara, S. Hida, T. Chiba, S. Murata *et al.* 2000 T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 408: 600-605.
- Tedgui, A., and Z. Mallat, 2006 Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 86: 515-581.
- Theill, L. E., W. J. Boyle, and J. M. Penninger, 2002 RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu.Rev.Immunol.* 20: 795-823.
- Theoleyre, S., Y. Wittrant, S. K. Tat, Y. Fortun, F. Redini *et al.* 2004 The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15: 457-475.
- Todaka, T., C. Yokoyama, H. Yanamoto, N. Hashimoto, I. Nagata *et al.* 1999 Gene transfer of human prostacyclin synthase prevents neointimal formation after carotid balloon injury in rats. *Stroke* 30: 419-426.

- Ulrich, D., R. B. van, A. Laib, and P. Ruegsegger, 1999 The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone* 25: 55-60.
- Unfer, V., M. L. Casini, L. Costabile, M. Mignosa, S. Gerli *et al.* 2004 Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil.Steril.* 82: 145-148.
- Usui, T., 2006 Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr.J.* 53: 7-20.
- Uusi-Rasi, K., H. Sievanen, I. Vuori, M. Pasanen, A. Heinonen *et al.* 1998 Associations of physical activity and calcium intake with bone mass and size in healthy women at different ages. *J.Bone Miner.Res.* 13: 133-142.
- Vaananen, H. K., H. Zhao, M. Mulari, and J. M. Halleen, 2000 The cell biology of osteoclast function. *J.Cell Sci.* 113 (Pt 3): 377-381.
- Vaughan, T., J. A. Pasco, M. A. Kotowicz, G. C. Nicholson, and N. A. Morrison, 2002 Alleles of RUNX2/CBFA1 gene are associated with differences in bone mineral density and risk of fracture. *J.Bone Miner.Res.* 17: 1527-1534.
- Vaughan, T., D. M. Reid, N. A. Morrison, and S. H. Ralston, 2004a RUNX2 alleles associated with BMD in Scottish women; interaction of RUNX2 alleles with menopausal status and body mass index. *Bone* 34: 1029-1036.
- Vaughan, T., D. M. Reid, N. A. Morrison, and S. H. Ralston, 2004b RUNX2 alleles associated with BMD in Scottish women;

interaction of RUNX2 alleles with menopausal status and body mass index. *Bone* 34: 1029-1036.

Vaughan, T., D. M. Reid, N. A. Morrison, and S. H. Ralston, 2004c RUNX2 alleles associated with BMD in Scottish women; interaction of RUNX2 alleles with menopausal status and body mass index. *Bone* 34: 1029-1036.

Venkov, C. D., A. B. Rankin, and D. E. Vaughan, 1996 Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation* 94: 727-733.

Viereck, V., C. Grundker, S. C. Friess, K. H. Frosch, D. Raddatz *et al.* 2005 Isopropanolic extract of black cohosh stimulates osteoprotegerin production by human osteoblasts. *J.Bone Miner.Res.* 20: 2036-2043.

Weaver, C. M., M. Peacock, B. R. Martin, G. P. McCabe, J. Zhao *et al.* 1997 Quantification of biochemical markers of bone turnover by kinetic measures of bone formation and resorption in young healthy females. *J.Bone Miner.Res.* 12: 1714-1720.

Weitzmann, M. N., and R. Pacifici, 2006 Estrogen regulation of immune cell bone interactions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1068: 256-274.

Westendorf, J. J., R. A. Kahler, and T. M. Schroeder, 2004 Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 341: 19-39.

Wrana, J. L., 2000 Regulation of Smad activity. *Cell* 100: 189-192.

Wu, J., X. X. Wang, M. Takasaki, A. Ohta, M. Higuchi *et al.* 2001 Cooperative effects of exercise training and genistein

administration on bone mass in ovariectomized mice. *J.Bone Miner.Res.* 16: 1829-1836.

Wuttke, W., C. Gorkow, and D. Seidlova-Wuttke, 2006 Effects of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) on bone turnover, vaginal mucosa, and various blood parameters in postmenopausal women: a double-blind, placebo-controlled, and conjugated estrogens-controlled study. *Menopause.* 13: 185-196.

Wuttke, W., H. Jarry, T. Becker, A. Schultens, V. Christoffel *et al.* 2003a Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* 44 Suppl 1: S9-20.

Wuttke, W., D. Seidlova-Wuttke, and C. Gorkow, 2003b The *Cimicifuga* preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. *Maturitas* 44 Suppl 1: S67-S77.

Yamaguchi, A., T. Komori, and T. Suda, 2000 Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr.Rev.* 21: 393-411.

Yang, J. H., C. D. Chen, M. Y. Wu, K. H. Chao, Y. S. Yang *et al.* 2000 Hormone replacement therapy reverses the decrease in natural killer cytotoxicity but does not reverse the decreases in the T-cell subpopulation or interferon-gamma production in postmenopausal women. *Fertil.Steril.* 74: 261-267.

Yavropoulou, M. P., and J. G. Yovos, 2007 The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones.(Athens.)* 6: 279-294.

- Young, M. F., 2003 Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos.Int.* 14 Suppl 3: S35-S42.
- Yu, A., F. Olosz, C. Y. Choi, and T. R. Malek, 2000 Efficient internalization of IL-2 depends on the distal portion of the cytoplasmic tail of the IL-2R common gamma-chain and a lymphoid cell environment. *J.Immunol.* 165: 2556-2562.
- Yuan, H. Y., J. J. Chiou, W. H. Tseng, C. H. Liu, C. K. Liu *et al.* 2006 FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic Acids Res.* 34: W635-W641.
- Yuhara, S., S. Kasagi, A. Inoue, E. Otsuka, S. Hirose *et al.* 1999 Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. *Eur.J.Pharmacol.* 383: 387-393.
- Zaidi, M., 2007 Skeletal remodeling in health and disease. *Nat.Med.* 13: 791-801.
- Zelzer, E., and B. R. Olsen, 2003 The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 423: 343-348.
- Zhou, H., V. Kartsogiannis, Y. S. Hu, J. Elliott, J. M. Quinn *et al.* 2001a A novel osteoblast-derived C-type lectin that inhibits osteoclast formation. *J.Biol.Chem.* 276: 14916-14923.
- Zhou, H., V. Kartsogiannis, J. M. Quinn, C. Ly, C. Gange *et al.* 2002 Osteoclast inhibitory lectin, a family of new osteoclast inhibitors. *J.Biol.Chem.* 277: 48808-48815.

Bibliografía

- Zhou, S., Y. Zilberman, K. Wassermann, S. D. Bain, Y. Sadovsky *et al.* 2001b Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J.Cell Biochem.* 81: 144-155.
- Zierau, O., C. Bodinet, S. Kolba, M. Wulf, and G. Vollmer, 2002 Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 80: 125-130.

8. DOCUMENTOS

ADJUNTOS

Del trabajo reflejado en la presente Tesis Doctoral se han generado diferentes artículos científicos y se han presentado diversas comunicaciones a Congresos de metabolismo óseo tal y como se muestra a continuación:

COMUNICACIONES EN CONGRESOS

- Congreso de LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN ÓSEA Y METABOLISMO MINERAL (SEIOMM), Madrid Noviembre 2005
 - Comunicación 1: Efectos de la administración de estradiol, raloxifeno o genisteína, sobre el útero, timo, metabolismo ó el sistema inmune del ratón ovariectomizado.

- Congreso de LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN ÓSEA Y METABOLISMO MINERAL (SEIOMM), Málaga, Noviembre 2006
 - Comunicación 1: Estudio comparativo del efecto del 17β-estradiol, raloxifeno, y genisteína sobre el hueso cortical y trabecular de ratones ovariectomizados mediante microtomografía computerizada (μ-TC).
Antonio Cano, Sonia Dapía, Raquel del Val, Inmaculada Noguera, Begoña Pineda, José R. Caeiro, y Miguel Angel García-Pérez.

 - Comunicación 2: Análisis de la asociación de los polimorfismos G>A y delección de 6-Alaninas en el exón 1 del gen Runx2 y del polimorfismo C>G (Asn19Lys) en el gen CLEC2D con el riesgo de osteoporosis posmenopáusica.
Begoña Pineda, Antonio Cano, Rosa María Aliaga, Elvira Calap y Miguel Angel García-Pérez.

- Congreso de LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN ÓSEA Y METABOLISMO MINERAL (SEIOMM), Valencia, Octubre 2007
 - Comunicación 1: Un polimorfismo C>T localizado en la posición -1 de la secuencia Kozak del gen CD40 se asocia con baja masa ósea y osteoporosis posmenopáusica.
Begoña Pineda, Antonio Cano, P.Laporta, Rosa María Aliaga, Elvira Calap, Miguel Angel García-Pérez y J.R Cortes.

- Congreso de LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN ÓSEA Y METABOLISMO MINERAL (SEIOMM), Oviedo, Noviembre 2008
 - Comunicación 1: La sustitución de la Asparagina 19 por lisina en la proteína Ocil (osteoclast inhibitory lectin) se asocia con una reducción de la densidad mineral ósea en mujeres posmenopáusicas.
Begoña Pineda, Rosa María Aliaga, Elvira Calap, P.Laporta, Antonio Cano y Miguel Angel García-Pérez.

- Congreso de LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN ÓSEA Y METABOLISMO MINERAL (SEIOMM), Santander, Octubre 2009
 - Comunicación 1: Una interacción entre los genes CD40 y su ligando CD40L influye de forma importante en la densidad mineral ósea y el riesgo de osteoporosis posmenopáusica
Begoña Pineda, Paz Laporta, Elvira Calap, Rosa Maria Aliaga, Noelia Aliaga, Antonio Cano, Miguel Angel García-Pérez

ARTÍCULOS PUBLICADOS

ESTROGEN RECEPTOR AGONISTS AND IMMUNE SYSTEM IN OVARECTOMIZED MICE

M.A. GARCÍA-PÉREZ¹, R. DEL VAL¹, I. NOGUERA², C. HERMENEGILDO^{1,3},
B. PINEDA¹, A. MARTÍNEZ-ROMERO⁴ and A. CANO⁵

¹Research Unit, Hospital Clínico Universitario of Valencia; ²Research Unit, Faculty of Medicine, University of Valencia; ³Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia; ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Valencia; ⁵Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Received February 10, 2006 - Accepted September 1, 2006

Several data implicate the immune system in bone loss after estrogen deficiency, however, some of the effects on the immune system of estrogen deficiency or of estrogen receptor (ER) modulation are not well established. In this study, the effect of ER agonists on the immune system in ovariectomized mice is analyzed. Mice were ovariectomized and were administered 17 β -estradiol (E2), raloxifene (RAL) or genistein (GEN). The effect of a 4-week treatment on bone turnover and on several parameters that reflect the status of the immune system was studied. Results show that ovariectomy provokes both uterine atrophy and thymic hypertrophy. Although RAL corrected thymic hypertrophy, only E2 corrected both. Ovariectomized mice showed increased levels of serum calcium and cathepsin K gene expression and decreased levels of serum alkaline phosphatase (ALP) activity, which suggests that there is a persistent alteration in bone metabolism. Moreover, ovariectomy increased B-cells and CD25 cells, and decreased the percentages of T-cells and Cbfa1 gene expression in bone marrow (BM). All ER agonists corrected, although to different degrees, changes induced by the ovariectomy. Furthermore, results showed that it is essential to adjust ER agonist doses to avoid immunosuppression, since all ER agonists decreased BM T-cell levels.

Osteoporosis is a major public health problem which is characterized by low bone mass and an increased risk of fracture. It is known that estrogen deficiency is a well-established cause of osteoporosis and a major risk factor for bone loss and fractures, whereas hormone replacement therapy (HRT) prevents, or even reverses, bone loss and reduces fracture risk (1). However, the recent Women's Health Initiative clinical study (2)

shows an increase in the index of cancer appearance and cardiovascular risk in postmenopausal women taking HRT. Therefore, attention has been centered on other therapeutic possibilities with lesser side-effects. Among the products that exert their bone function through estrogen receptor (ERs), it is necessary to underscore the Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) and phytoestrogens.

Key words: immune system, estrogen deficiency, ovariectomy, T-cells, estradiol, raloxifene, genistein

Mailing address: Miguel Angel García-Pérez, Ph.D.,
Research Unit,
Hospital Clínico Universitario,
Av. Blasco Ibáñez, 17,
46010 Valencia, Spain
Tel: +34 96 386 30 87 Fax: +34 96 386 48 15
e-mail: migarpe@uv.es

807

0394-6320 (2006)
Copyright © by BOLIIFE, s.a.
This publication and/or article is for individual use only and may not be further reproduced without written permission from the copyright holder.
Unauthorized reproduction may result in financial and other penalties.

Raloxifene is a SERM used to prevent and to treat osteoporosis in postmenopausal women. It has estrogenic effects on cardiovascular and bone systems, while it is antagonistic on breast and uterus tissue, with few recorded side-effects (3-4). Phytoestrogens are plant-derived compounds that bind to ERs and have an estrogen-like activity (5). Due to their potential benefit in the prevention and treatment of cardiovascular and bone problems and menopausal symptoms, and also because of their low toxicity, they are attracting public and medical attention. Those more broadly used in the laboratory are genistein and daidzein (main components of isoflavone pharmaceutical extracts), although genistein is a known enzymatic inhibitor (6). Consequently, soy isoflavones are considered potential alternatives to HRT.

Evidence that involves the immune system in bone loss have been described. It has been demonstrated that (i) activated T-cells are able to stimulate osteoclastogenesis and bone loss through the RANKL/RANK pathway, (ii) B-cells can generate osteoclasts, (iii) activated T-cells during inflammation stimulate bone loss, and (iv) T-cell deficient mice do not lose bone mass after ovariectomy (OVX) (7-9). In addition, sex steroids can modulate several aspects of the immune system. It has been reported that estrogen deficiency caused by ovariectomy induce thymic hypertrophy (10), whereas an increased estrogen supply induces an atrophy of this gland (11). Moreover, pregnancy reduces B-cell precursors in the bone marrow (BM) of mice (12), and estrogen administration selectively reduces B-cell precursors (13). Nevertheless, the effects of ER agonists on the immune system of estrogen-deprived mice have not been sufficiently studied.

The aim of the present work is to study the effect of ER agonist administration on the immune system of estrogen-deprived mice. Several aspects that reflect the status of the immune system (serum parameters, cell function and phenotype, and gene expression) were analyzed, both in spleen as well as in BM, and the effect of ER agonists was evaluated. To do so, ovariectomized mice were administered 17 β -estradiol, raloxifene or genistein for four weeks, and cell phenotype by means of flow cytometry, cell proliferation as a index of cell-function, several parameters in serum as total calcium, alkaline phosphatase (ALP) activity, TNF- α , IL-6 and IFN- γ ,

and the expression of specific genes were studied.

MATERIALS AND METHODS

Media and reagents

Recombinant murine macrophage colony stimulating factor (M-CSF) was obtained from PeproTech (London, UK). Monoclonal CD3 (clone 145-2C11), CD28 (clone: 37.51), CD3e-FITC (clone: 145-2C11), CD11b-FITC (clone: M1/70), CD4-PE (clone: GK1.5), CD8-PE (clone: 53-6.7), RANKL-PE (clone: IK22/5) and Rat-PE negative control (clone: KLH/G2a-1-1) were from e-Bioscience (San Diego, CA). Monoclonal CD19-FITC (clone: 6D5), CD25-RPE (Clone: PC61.5.3) and rat-FITC negative control (clone: LO-DNP-16) were from Serotec (Oxford, UK).

Cells were obtained in calcium- and magnesium-free phosphate-buffered saline (PBS; Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) and incubated in phenol red-free RPMI-1640 (Gibco) (spleen cells) or in phenol red-free minimum essential medium alpha modified (α -MEM; from Gibco) (BM cells). Media was supplemented with 10% charcoal-stripped, heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin G and 100 μ g/ml streptomycin (all from Gibco, Invitrogen). Polymerase chain reaction (PCR) primers and enzymes for retro-transcription (RT) were from Invitrogen. Unless otherwise stated, all other chemical reagents were from Sigma (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO).

Mice and treatments

The ethical committee of our institution approved all animal procedures. Ten-week-old female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) were either dorsal ovariectomized or falsely operated (SHAM) under general anesthesia by using 150 mg/Kg of ketamine (Merial, Lyon, France) and 5 mg/Kg acepromazine (Calmo Neosan, Pfizer, NY). The animals were kept at 21°C with 12:12-h light-dark cycle and were allowed free access to a pelleted standard mouse laboratory diet containing 0.88% calcium and 0.59% phosphorus (Panlab SL, Barcelona, Spain) and tap water.

The mice were divided into 5 groups of 8 individuals: SHAM, ovariectomized without treatment (OVX), and ovariectomized mice treated with 17 β -estradiol (E2), raloxifene (RAL) and genistein (GEN). Starting from the third day after surgery, the mice were subcutaneously injected 5-times per week with 100 μ l of vehicle (10% DMSO, 90% sesame oil; Sigma Chemicals) to the SHAM and OVX groups, and with 17 β -estradiol (0.1 μ g/mouse/day = 5 μ g/Kg/day), raloxifene (20 μ g/mouse/day = 1 mg/Kg/day) or genistein (0.5 mg/mouse/day = 25 mg/Kg/day), dissolved in vehicle to the remaining groups. The doses were chosen according to the estrogenic capacity of

each compound and the doses frequently used as reported in literature (8, 22-25).

Four weeks after beginning the treatment the mice were sacrificed under halothane anesthesia (Fluothane; Zeneca, Macclesfield, UK) by cardiac puncture exsanguination, and the blood, thymus, uterus, spleen and femora were aseptically removed. The uterus of each mouse was removed and weighed to confirm the success of ovariectomy and to evaluate the effect of treatment. Spleen and femora were processed immediately. Blood was allowed to clot and the serum was separated and frozen at -80°C until analysis.

Tissue collection and cell culture

The spleen cells were isolated by the careful disintegration of spleen with a scalpel in PBS. The BM cells were isolated from the left femur of animals using centrifugation (8). Briefly, after the removal of bone adherent soft tissues, femur ends were cut off with scissors and inserted into a 0.6-ml microcentrifuge tube with a hole punctured in the bottom and placed into a 1.5-ml carrier microcentrifuge tube. Cells were extracted from the bones by centrifugation at 4°C , and resuspended immediately in PBS. Red cells from spleen and femur suspension cells were lysed with a solution containing 150 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , and 0.1 mM EDTA pH 7.4, centrifuged and washed twice with PBS. An aliquot of these cells was used for RNA isolation and frozen immediately at -70°C . The remaining cells were used for cytometric analysis and proliferation assays.

Serum biochemistry

Serum calcium, measured by reaction with o-cresolphthalein, and alkaline phosphatase was assayed using commercial kits (Sigma). Serum total pyridoline crosslinks were measured by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following the manufacturer's instructions (Quidel Corporation, San Diego, CA). Serum levels of IL-6, IFN- γ and IL-2 were measured by EIA (Diacione, Besançon, France). Total tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) was determined by rapid microplate colorimetric assay. Briefly, *p*-nitrophenyl phosphate (10 mM) was used as substrate in a buffer containing 100 mM sodium acetate pH 5.0, 20 mM sodium tartrate and 0.1 % (v/v) Triton X-100. Serum samples (20 μl) were added to 250 μl of substrate and incubated at 37°C for 60 min. The reaction was stopped by the addition of 75 μl of 0.5 M NaOH, and absorbance was read at 405 nm with a microplate reader (Bio-Rad model 550, Richmond, CA).

Cell proliferation and viability analysis

Cell proliferation and viability were evaluated by an

XTT-based colorimetric assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), following the manufacturer's instructions. Briefly, 2×10^5 spleen or 5×10^4 BM cells in 100 μl were placed in 96 well microtitre plates (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium), supplemented with glutamine, antibiotics and 10% FBS at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 during 3 days. The stimuli used are indicated in Table II and were added in triplicate. After incubation, 50 μl of XTT substrate was added to each well and incubated under the above-stated conditions. The absorbance of each well was determined at 450 nm using a microplate reader. Proliferation data in Table II represent the quotient between proliferation of each stimulus (in triplicate) and proliferation of the same cells in the same culture plate incubated with vehicle (RPMI, α -MEM, ethanol or DMSO).

Flow cytometry

Cells were labeled with antibodies at the manufacturer's recommended dilutions and conditions. Spleen and BM cells (1×10^6) were incubated 30 min on ice with indicated antibodies and then washed and resuspended in PBS containing 1% BSA and 0.1% sodium azide. Non-specific signal was estimated by incubation with rat FITC- and PE-conjugated IgG isotype controls. Labeled cells were analyzed with an EPICS-XL flow cytometry system (Beckman Coulter). Data were expressed as percentage of positive cells and as total cells per femur or spleen.

RNA isolation and semiquantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from bone or spleen cells with Trizol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol, and the integrity of the RNA preparations was examined by agarose gel electrophoresis. One microgram of total RNA was reverse transcribed in a 20- μL -reaction volume into single-stranded cDNA with a first-strand cDNA synthesis kit using an oligo-dT primer (Invitrogen). The subsequent polymerase chain reaction (PCR) was performed with specific primers for each gene with Taq polymerase from Sigma. To ensure equal starting quantities of cDNA for the experiment and to allow for semiquantification of the PCR products, reverse transcribed RNA samples were amplified with primers specific for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH). Amplifications were done using a GeneAmp 9600 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), with the temperature cycling set according to the primer length and T_m value. The number of cycles for each primer pair was determined according to a linear amplification curve established from primary experiments. For each PCR reaction, several samples underwent 12-15 extra cycles of amplification to guarantee the semiquantification of the experiment. Amplified PCR products were separated

Table I. Biochemical serum values of SHAM, OVX and OVX-treated mice.

	SHAM	OVX	E2	RAL	GEN
Calcium (mg/dL)	9.5 ± 0.2	9.9 ± 0.1 ^a	9.6 ± 0.2	9.9 ± 0.2	9.7 ± 0.1
ALP (U/L)	69.7 ± 4.6	47.3 ± 8.3 ^a	62.9 ± 6.1	55.4 ± 6.3	56.5 ± 7.3
TRAP (mOD 405nm/mL)	80.8 ± 6.5	91.0 ± 8.4	76.9 ± 5.7	87.6 ± 13.7	80.6 ± 2.6
IL-6 (pg/mL)	8.8 ± 1.5	12.2 ± 2.7	10.7 ± 2.2	9.7 ± 2.1	7.4 ± 0.4
IFN-γ (pg/mL)	20.4 ± 2.1	17.4 ± 2.2	18.6 ± 1.7	14.9 ± 1.7	20.8 ± 1.1
IL-2 (pg/mL)	10.6 ± 1.1	11.0 ± 1.2	11.2 ± 0.4	13.4 ± 0.8 ^a	16.0 ± 0.9 ^{b,c,d}
Serum pyridolines (mM/L)	2.7 ± 0.1	2.4 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.2	2.9 ± 0.2

Values are expressed as the mean ± SEM. ^a $p < 0.05$ vs. SHAM; ^b $p < 0.05$ vs. OVX; ^c $p < 0.01$ vs. E2; ^d $p < 0.001$ vs. SHAM.

Table II. Cell proliferation analysis in spleen and BM cells of SHAM, OVX and OVX-treated mice.

	Spleen				
	SHAM	OVX	E2	RAL	GEN
PHA (10 µg/ml)	1.08 ± 0.02	1.10 ± 0.03	1.03 ± 0.05	1.04 ± 0.04	1.10 ± 0.06
PMA (10 ng/ml)	1.26 ± 0.07	1.32 ± 0.03	1.21 ± 0.05	1.16 ± 0.04 ^b	1.17 ± 0.05 ^b
αCD3 (1 µg/ml) + αCD28 (0.2 µg/ml)	1.37 ± 0.11	1.38 ± 0.09	1.38 ± 0.09	1.25 ± 0.09	1.35 ± 0.14
M-CSF (25 ng/ml)	1.22 ± 0.03	1.35 ± 0.08	1.30 ± 0.05	1.26 ± 0.06	1.32 ± 0.10
LPS (1 µg/ml)	1.31 ± 0.05	1.61 ± 0.06 ^a	1.47 ± 0.08	1.51 ± 0.14	1.60 ± 0.16
Dexamethasone 0.1 µM	0.68 ± 0.04	0.60 ± 0.05	0.56 ± 0.03 ^c	0.54 ± 0.04 ^c	0.51 ± 0.03 ^a
IFNγ (100 ng/ml)	1.00 ± 0.02	1.03 ± 0.04	0.96 ± 0.04	0.93 ± 0.02	1.00 ± 0.04
	Bone Marrow				
	SHAM	OVX	E2	RAL	GEN
PHA (10 µg/ml)	1.28 ± 0.05	1.26 ± 0.07	1.37 ± 0.08	1.26 ± 0.07	1.34 ± 0.08
PMA (10 ng/ml)	1.78 ± 0.03	1.89 ± 0.07	1.75 ± 0.08	1.88 ± 0.08	1.98 ± 0.07
αCD3 (1 µg/ml) + αCD28 (0.2 µg/ml)	1.08 ± 0.02	1.14 ± 0.04	1.11 ± 0.02	1.08 ± 0.02	1.09 ± 0.03
M-CSF (25 ng/ml)	2.39 ± 0.03	2.64 ± 0.17	2.49 ± 0.15	2.58 ± 0.19	2.65 ± 0.13
LPS (1 µg/ml)	1.93 ± 0.07	1.89 ± 0.17	2.13 ± 0.15	2.03 ± 0.14	1.94 ± 0.18
Dexamethasone 0.1 µM	0.77 ± 0.02	0.79 ± 0.02	0.79 ± 0.03	0.85 ± 0.04	0.77 ± 0.03
IFNγ (100 ng/ml)	1.22 ± 0.03	1.32 ± 0.07	1.37 ± 0.06	1.35 ± 0.07	1.43 ± 0.07 ^c

Values are expressed as the mean ± SEM. ^a $p < 0.01$ vs. SHAM; ^b $p < 0.05$ vs. OVX; ^c $p < 0.05$ vs. SHAM.

on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide for visualization. The intensity of ethidium bromide-stained bands was quantified using the histogram function in Adobe PhotoShop version 7.0 (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA) and was normalized with GAPDH housekeeping gene.

The sequence of primers used were the following:

GAPDH sense 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' and antisense 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'; CD25 sense 5'-CTC TCC TAC AAG AAC GGC AC-3' and antisense 5'-TCA CTA GCC AGA AAT CGG TGG-3'; Core binding factor a1 (Cbfa1) sense 5'-CCG CAC GAC AAC CGC ACC AT-3' and antisense 5'-CGC TCC GGC CCA CAA ATC TC-3'; osteoprotegerin (OPG) sense 5'-GCT

Table III. Flow cytometry analysis of spleen cells of SHAM, OVX and OVX-treated mice in Region I.

	SHAM	OVX	E2	RAL	GEN
Percentage of positive cells					
CD3	30.8 ± 1.0	28.4 ± 1.2	28.0 ± 0.9	27.1 ± 0.9 ^a	26.5 ± 1.1 ^b
CD3+/CD4+	18.6 ± 1.0	17.8 ± 1.1	16.8 ± 0.8	16.2 ± 0.6	16.1 ± 0.7 ^a
CD3+/CD8+	12.3 ± 0.5	11.3 ± 0.6	11.4 ± 0.3	11.2 ± 0.5	10.3 ± 0.4 ^b
CD11b	5.3 ± 0.3	6.5 ± 1.0	6.7 ± 0.8	7.5 ± 0.8	6.4 ± 1.0
CD19	57.9 ± 0.8	56.1 ± 0.8	57.0 ± 1.1	54.9 ± 1.9	57.9 ± 0.9
Total number of positive cells (x10⁶/spleen)					
CD3	6.7 ± 1.3	7.2 ± 0.6	5.3 ± 0.7	5.3 ± 0.7	6.2 ± 0.4
CD3+/CD4+	3.8 ± 0.7	4.5 ± 0.4	3.2 ± 0.4 ^c	3.3 ± 0.3 ^c	3.8 ± 0.3
CD3+/CD8+	2.7 ± 0.6	2.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.3	2.4 ± 0.2
CD11b	1.2 ± 0.3	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.3
CD19	12.5 ± 2.7	14.2 ± 1.0	10.9 ± 1.4 ^c	11.1 ± 1.0	13.6 ± 0.6

Values are expressed as the mean ± SEM. The total number of positive cells per spleen was calculated from the total number of spleen cells (cells after red cell lysis) and the percentages of both gated cells (with respect to total cells in each histogram), as well as positive cells. ^a $p < 0.05$ vs. SHAM; ^b $p < 0.01$ vs. SHAM; ^c $p < 0.05$ vs. OVX.

GAG TGT TTT GGT GGA CA-3' and antisense 5'-GCT CGA TTT GCA GGT CTT TC-3'; Cathepsin K sense 5'-CTT GTG GAC TGT GTG ACT-3' and antisense 5'-ACA CTG CAT GGT TCA CA-3'; Osteocalcin (OCN) sense 5'-AAG CAG GAG GGC AAT AAG GT-3' and antisense 5'-AGC TGC TGT GAC ATC CAT AC-3'; RANKL sense 5'-CAT TTG CAC ACC TCA CCA TC-3' and antisense 5'-AAG GGT TGG ACA CCT GAA TG-3'; TRAP sense 5'-ACT TCC CCA GCC CTT ACT ACC-3' and antisense 5'-TCA GCA CAT AGC CCA CAC CG-3'; and IFN- γ sense 5'-TCT TGG CTT TGC AGC TCT TCC-3' and antisense 5'-CGAATC AGC AGC GAC TCC TTT TC-3'.

Statistical Analysis

Untransformed data were analyzed for normality by the Kolmogorov-Smirnov test. If the data were normally distributed, a two-tailed t test was performed to compare the SHAM group with the OVX/vehicle group. A one-way (treatment) ANOVA was performed to ascertain the treatment effect difference between OVX/vehicle or SHAM and the three different treatments (E2, RAL and GEN) groups at an $\alpha = 0.05$ level. If the ANOVA test was significant, Dunnett's test (when the variances were assumed to be equal) or Dunnett's

T3 test (when the variances were assumed to be unequal) was applied to perform *post hoc* pairwise comparisons at $\alpha = 0.05$ level. Levene test was used to test the homogeneity of variance for each dependent variable across all level combinations of the between-subject factors. If the data were not normally distributed, a non-parametric Kruskal-Wallis was performed to determine intergroup differences, if any. The results are presented as means ± SEM. A p value of < 0.05 was considered statistically significant. The entire statistical analysis was carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL), v. 12.0 for Windows.

RESULTS

Effect of ovariectomy and treatment on physical parameters

The effect of ovariectomy and ER agonist administration on mouse weight and on the relationship between uterus and thymus weights *versus* mouse weight is shown in Fig. 1. At the moment of sacrifice there were no weight differences

Table IV. Flow cytometry analysis of BM cells of SHAM, OVX and OVX-treated mice in lymphoid region (R1 region).

	SHAM	OVX	E2	RAL	GEN
Percentage of positive cells					
CD3	7.2 ± 0.5	5.2 ± 0.2 ^a	4.9 ± 0.4 ^b	5.2 ± 0.3 ^c	4.3 ± 0.3 ^b
CD11b	27.0 ± 3.5	24.5 ± 6.0	33.8 ± 4.3	34.9 ± 5.7	32.9 ± 6.6
CD19	23.1 ± 1.7	31.4 ± 3.1 ^a	29.8 ± 3.1	27.8 ± 3.6	33.8 ± 3.4 ^a
CD25	17.0 ± 0.7	24.1 ± 4.4	23.5 ± 2.2	29.6 ± 4.2	30.3 ± 6.7
RANKL	2.8 ± 0.4	3.0 ± 0.2	2.8 ± 0.3	3.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2
Total number of positive cells (x10⁵/femur)					
CD3	2.6 ± 0.7	2.5 ± 0.3	1.2 ± 0.3 ^{d,a}	1.3 ± 0.1 ^{d,a}	1.5 ± 0.2 ^{e,a}
CD11b	8.4 ± 1.2	10.5 ± 1.3	7.6 ± 1.3	8.6 ± 1.6	9.7 ± 0.8
CD19	7.6 ± 1.6	15.9 ± 3.1 ^a	6.8 ± 1.0 ^d	6.7 ± 0.9 ^d	11.3 ± 1.7
CD25	5.8 ± 1.1	9.9 ± 1.2 ^a	5.5 ± 1.0 ^c	7.3 ± 1.2	9.1 ± 0.9
RANKL	0.9 ± 0.2	1.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1 ^d	0.8 ± 0.1 ^d	0.8 ± 0.1 ^d

Values are expressed as the mean ± SEM. The total number of positive cells was calculated from total of BM cells obtained from femur (after red cell lysis) and the percentages of both gated cells (with respect to total cells in each histogram) as well as positive cells. ^a $p < 0.05$ vs. SHAM; ^b $p < 0.001$ vs. SHAM; ^c $p < 0.01$ vs. SHAM; ^d $p < 0.01$ vs. OVX; ^e $p < 0.05$ vs. OVX.

between SHAM and OVX groups. Ovariectomy induced a dramatic uterine atrophy ($p < 0.0001$) as well as a thymic hypertrophy ($p < 0.01$).

When the effect of ER agonist administration was evaluated, mouse weight was higher in GEN than in OVX mice ($p < 0.05$). All treatments incremented uterus weight compared with the OVX group (E2: $p < 0.0001$; RAL: $p < 0.0001$; and GEN: $p < 0.05$). Only E2 fully recovered uterus weight, however, since RAL and GEN mice still showed a smaller uterus weight than did SHAM mice (both, $p < 0.01$). Regarding thymus size, E2 and RAL corrected thymic hypertrophy induced by ovariectomy ($p < 0.05$) and GEN showed a marked tendency ($p = 0.08$) (Fig. 1).

Effect of ovariectomy and treatment on serum parameters

The effect of ovariectomy and ER agonists on serum parameters is shown in Table I. Four weeks after ovariectomy, serum calcium level was higher in

the OVX than in the SHAM group ($p < 0.05$), while serum ALP activity was lower ($p < 0.05$). Levels of TRAP, serum pyridinoline crosslinks and assayed cytokines remained unchanged.

When the effect of ER agonist administration was evaluated, there were no significant differences in calcium and ALP levels between treated groups and SHAM mice (Table I). Finally, treatment did not modify the levels of assayed cytokines with the exception of IL-2 (Table I). The level of this cytokine was higher in RAL ($p < 0.05$ vs. SHAM) and in GEN mice ($p < 0.05$ vs. OVX, and $p < 0.001$ vs. SHAM).

Cell proliferation analysis

To evaluate the functionality of spleen and BM cells, *in vitro* cell proliferation assays were carried out in response to different stimuli (Table II). Ovariectomy induced an increase in the proliferative response of spleen cells to LPS ($p < 0.01$). This increase was not observed between treated and

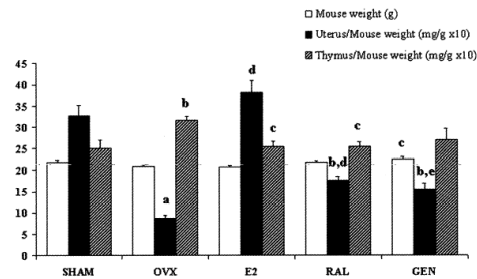


Fig. 1. Mouse weight at the end of experiment, and the relationship between uterus and thymus weights versus mouse weight. Each bar represents the mean \pm SEM. * $p < 0.0001$ vs SHAM; ^b $p < 0.01$ vs SHAM; ^c $p < 0.05$ vs OVX; ^d $p < 0.0001$ vs OVX; ^e $p < 0.05$ vs OVX.

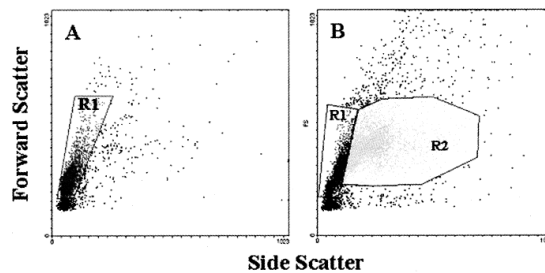


Fig. 2. Representative flow cytometry dot plots sorted from mouse. Forward and side light scatter plot of unstained cells following red cell lysis from spleen (A) and BM (B) cells. The R1 region contains the greatest number of lymphocyte/blast cells in spleen and BM. Region 2 in BM includes most of the myeloid cells, which are larger cells and have more intracellular granules relative to cells in region R1. More than 85% of all cells in myeloid cell gate R2 are positive for monoclonal antibody CD11b recognizing type 3-complement receptor shared by myelomonocytic cells.

SHAM mice (Table II). Moreover, spleen cells from RAL and GEN mice showed a smaller proliferation in response to PMA than did SHAM mice ($p < 0.05$). Finally, 0.1- μ M dexamethasone induced apoptosis in all groups (Table II). This effect was higher in treated animals compared to SHAM mice ($p < 0.05$ for E2 and RAL and $p < 0.01$ for GEN). Proliferation in response to other stimuli, such as IFN- γ , CD3+CD28 mAbs, M-CSF or PHA remained unaffected by ovariectomy or treatment. The *in vitro* cell proliferation rate of BM cells was affected neither

for the ovariectomy nor for ER agonists (Table II).

Flow cytometry analysis of spleen and BM cells

To examine the effects of ovariectomy and ER agonists on hematopoiesis, cells from spleen and BM were analyzed by flow cytometry. A region in the spleen (R1) and two regions (R1 and R2) in BM flow cytometry scattering (Fig. 2) were analyzed. R1 contained the greatest number of lymphocyte/blast cells, whereas R2 contained most of the myeloid cells. The total number of cells remained unchanged

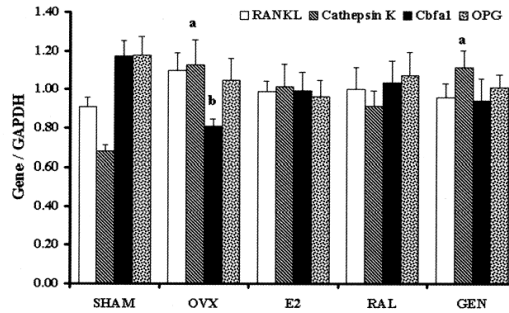


Fig. 3. mRNA expression levels from BM cells of SHAM, OVX, and OVX-treated mice assessed by semiquantitative RT-PCR. This was carried out on RNA samples extracted from femurs of SHAM, OVX and OVX-treated mice 4 weeks after beginning treatment. Values are expressed as the mean \pm SEM, and represent the intensity of ethidium bromide-stained bands from two different retro-transcription experiments quantified using Adobe PhotoShop. Each gene was normalized with GAPDH housekeeping gene (See Methods for details). ^a $p < 0.05$ vs. SHAM; ^b $p < 0.01$ vs. SHAM.

in spleen and BM, although there was a tendency for it to increase by $\approx 20\%$ in the OVX group. All the treatments showed a tendency to reduce total cells per spleen or per femur induced by the ovariectomy, although only E2 showed a significant decrease ($p < 0.05$) in both organs. Treated mice did not show differences with SHAM mice (results not shown).

In spleen, ovariectomy did not modify cell phenotype (Table III). E2 decreased total CD3⁺/CD4⁺ and CD19⁺ cells compared with OVX mice, while RAL mice also showed a CD3⁺/CD4⁺ reduction. In addition, RAL mice showed decreased percentages of CD3⁺ cells ($p < 0.05$) while GEN mice showed significant decreases in percentages of all T-cell subtypes (CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺; Table III) relative to the SHAM group.

OVX caused a more remarkable change in BM cell phenotype. In the lymphoid region of BM (Table IV), ovariectomy induced a decrease in the percentages of CD3⁺ cells ($p < 0.05$) and an increase in CD19⁺ cells ($p < 0.05$). However, only the increase of CD19⁺ cells as well as an increase in CD25⁺ cells (both, $p < 0.05$) were observed in total cells.

All OVX-treated mice showed both a decrease in the percentages of CD3⁺ cells relative to SHAM mice (E2, $p < 0.001$; RAL, $p < 0.01$; GEN, $p < 0.001$) and a decrease in total cells per femur compared with

OVX and SHAM mice (Table IV). In addition, E2 and RAL mice showed decreased amounts of total CD19⁺ cells ($p < 0.01$) compared to OVX mice, while only E2 treatment reduced levels of CD25⁺ cells compared with OVX mice ($p < 0.05$). Finally, all treated mice groups showed lower levels of RANKL⁺ cells ($p < 0.01$) compared with those of OVX mice (Table IV).

Ovariectomy or treatments affected to the phenotype of cells gated in the myeloid region to a much smaller degree (data not shown). Significant differences in total cells were not observed. Only a decrease in the percentage of CD3⁺ cells ($p < 0.05$) in the RAL group compared with the SHAM group, and an increase in the percentage of CD25⁺ cells ($p < 0.05$) in the OVX and E2 groups relative to the SHAM mice were observed.

Gene expression

Fig. 3 shows mRNA expression levels assessed by semiquantitative RT-PCR in RNA samples extracted from BM cells. After 4 weeks of treatment, a high level of cathepsin K expression persisted in the OVX and GEN groups compared with the SHAM mice, but not in E2 and RAL mice. Unexpectedly, it was observed that ovariectomy induced a lower expression level of Cbfa1. Finally, ovariectomy or ER agonists did not affect the expression of other evaluated genes

such as RANKL and OPG (Fig. 3) or CD25, TRAP, osteocalcin, or IFN- γ (data not shown).

DISCUSSION

The major point of the present study is that modulation of ER by the agonists tested (17 β -estradiol, raloxifene and genistein) corrects in similar direction, but with different levels of efficacy, the effects that estrogen deficiency induces on the immune system. Data also point towards the necessity of adjusting ER agonist doses to avoid not only agonistic effects on the uterus, but also immunosuppression like the decreased levels of the T-cells described in this work.

An altered bone metabolism persisted four weeks after ovariectomy, as shown by increased levels of serum calcium and cathepsin K expression in BM and decreased serum levels of ALP in OVX mice (Table I and Fig. 3). Changes in the levels of other markers, however, have not been detected (Table I), which implies that bone turnover tends to stabilize. Ovariectomy accelerates bone turnover, causing an increase in bone resorption as well as in bone formation. In the mouse, these markers (including total and bone-specific ALP) peak the first days post-surgery and then decline. Subsequently, by 4-5 weeks post-surgery, the levels had normalized almost completely (14-16). The decreased levels of ALP, a marker of bone formation (17), imply that bone formation is impaired in OVX mice. In accordance with this, there was a decreased expression of osteoblastic transcription factor Cbfa1 in BM of OVX mice. The data suggest, therefore, that 4 weeks after ovariectomy a decreased level of bone formation and a smaller osteogenic potential exist in OVX mice. In agreement with our data, decreases in serum ALP and in pre-osteoblastic cells in estrogen deficiency (18), and a down-regulation of ALP and Cbfa1 gene expression by ovariectomy and an up-regulation by estrogens in BM mesenchymal stem cells of mice (19), have been described.

Levels of all markers of bone metabolism returned to normality after ER agonist treatment, except for cathepsin K, a protease that plays an essential role in osteoclast-mediated degradation of the organic matrix of bone, whose expression normalized only by E2 and RAL. Changes in rat OPG, RANKL

and bone sialoprotein gene expression the first and second weeks, but not the fourth week, after ovariectomy have been described (20). This indicates that, as for bone biochemical markers, changes in gene expression come about in the first weeks after ovariectomy.

In bone, the binding of RANKL to RANK on pre-osteoclasts, together with M-CSF, is necessary and sufficient to initiate osteoclastogenesis (21). The present data show that ovariectomy tends to increase RANKL+ cells in BM ($p = 0.13$). This increase agrees with a previous study which demonstrates that estrogen deficiency increases RANKL expression in BM (18). The present study shows that all ER agonists tested down-regulate BM RANKL+ cells induced by ovariectomy (Table IV), similar to what occurs in BM of HRT-treated postmenopausal women (18).

Estrogenic deficiency induced by ovariectomy caused dramatic uterine atrophy (Fig. 1). Only E2 totally recovered uterus weight after 4 weeks of treatment. Although RAL have antagonistic activity in uterine tissue (22), Fig. 1 shows that, both RAL as well as GEN display agonistic properties in this organ. It seems, however, that when RAL is administered to intact females, the uterus suffers atrophy, demonstrating its antagonistic properties (23). Our results contrast with those of previous studies in which doses of GEN (24) or E2 (25) similar to those used in the present research, prevented trabecular bone loss without hypertrophic effects on the uterus. In agreement with our data, RAL have shown agonistic effects on the uterus of ovariectomized animals (22). Moreover, the intake of large amounts of phytoestrogens causing impaired reproductive function has been described (26). Therefore, regarding uterine physiology, our results show that the behaviour of GEN is similar to that RAL, and that to avoid adverse effects on the uterus, ER agonist doses should be adjusted for use in humans.

Sex steroids are involved in lymphopoiesis. Whereas B lymphopoiesis is suppressed during pregnancy (12), it is upregulated in estrogen deficiency (27). Additionally estrogens are negative regulators of lymphopoiesis (13). In the present study, estrogen deficiency induced a selective increase in BM B- and CD25+ cells. These results

agree with those of a previous study in which a selective increase in B-cells after estrogen deficiency is demonstrated (27). It is possible that appropriate attention is not given to B-cell increases after ovariectomy, and that these cells participate actively in bone loss under conditions of estrogen deficiency. Bone resorption following estrogen deficiency is caused primarily by increased numbers of bone-resorbing osteoclasts derived from myelopoietic lineage, although, confirming previous results (27), the present study found no increase of myeloid cells (CD11b+) after ovariectomy. Considerable data, however, support the essential role of B-cells in bone loss. For example, the existence of bipotent B/macrophage cells (28), osteoclasts formed from early B-cells (7), pre-B-cells expressing RANKL (29) and multiple myeloma plasma cells expressing RANKL implicated in the formation of osteoclast *in vivo* (30), have been reported. In accordance with previous data (13, 27), where it was demonstrated that E2 decreased B-cell lymphopoiesis, our data show that all ER agonists tested show the same tendency to decrease B-cells, although only the results of E2 and RAL reached statistical significance. In spleen, like BM, estradiol also decreased B-cell levels.

Ovariectomy induced an increase in BM CD25+ cell levels. Increases of CD25+ and CD69+ T-cells in BM of OVX mice (31) and of CD25+ and HLA-DR+ T-cells in postmenopausal women (32), have been described. All of these are activation markers that seem to be in the basis of ovariectomy-induced bone loss. The increase of CD25 marker (IL-2 receptor alpha chain), that is expressed on activated T, B-cells and macrophages, has not been well explained, particularly if IL-2 levels do not change with ovariectomy (Table I). Only estradiol was able to reduce the number of CD25+ cells, although raloxifene also showed the same tendency.

Estrogen receptors have been demonstrated in the thymus (33), suggesting that ER agonists can modulate T-cell lymphopoiesis. In fact, it has been reported that ovariectomy induces thymic hypertrophy (10), whereas estrogen administration induces thymic atrophy (10-11), as occurs during normal pregnancy when high sex steroid levels exist (34). Nevertheless, the effect of estrogen deficiency or ER agonists on the T-cell content of lymphoid tissues, particularly in BM, remains unclear. The

present results demonstrate that ovariectomy induces thymic hypertrophy (Fig. 1), and that ER agonists tend to correct it, although only the results of E2 and RAL reached statistical significance. In the present study, ovariectomy decreased the percentage of T-cells, but not total T-cell levels using a specific CD3 mAb. Results of the study support previous data from other authors which describe ovariectomy as either having no effect on, or reducing BM T-cell levels (10, 27, 35). An increase in BM T-cell content, however, has been described after OVX (8, 36). The role of T-cells in bone loss after ovariectomy is evident since T-cell deficient mice do not lose bone after ovariectomy (8). Therefore, additional studies are needed to establish the effect of estrogen deficiency on T-cells.

This study shows that the modulation of ER with all the agonists tested, induced a down-regulation of BM CD3+ and spleen CD3+/CD4+ T-cell content (Tables III and IV). Cell functionality, however, was not affected by ovariectomy or by ER agonists. Cell functionality was evaluated by means of cell proliferation *in vitro* assays; therefore, it is not possible to conclude that other cellular functions are not affected. In fact, estrogen inhibits NK-cell-mediated cytotoxicity and granulocyte-mediated inflammation, and ER agonists impair T-cell functionality (37-38). The increment in serum IL-2 levels induced by some agonists, especially by genistein, may be indicative of this T-cell function impairment, since inhibition of IL-2/IL-2R complex endocytosis in T-cells by genistein has been described (39). Additionally, ER agonist administration increased dexamethasone-induced apoptosis (Table II). All these data, together with data concerning agonistic properties of ER agonists in the uterus of ovariectomized mice (see Results), point towards the need of adjusting the dose of compounds prescribed as alternatives to HRT to avoid possible immunosuppressant effects. Moreover, it has recently been described that raloxifene and tamoxifen impair dendritic cell differentiation and activation (40).

In summary, 4 weeks after ovariectomy, when bone metabolism tends to normalize, several changes in the immune system persist. These changes mainly affect the phenotype of BM cells, although other compartments of the immune system are altered as well. Modulation of ER by the agonists tested

tends to improve all ovariectomy-induced changes in immune as well as in bone systems. Except for minor aspects, all ER agonists acted in the same direction, although with different force and probably with different side-effects as regards immune system functionality and immunosuppression.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Drs Enrique O'Connor and Guadalupe Herrera for their expert flow cytometry assistance and to Mrs. Rosa Aliaga and Mrs. Elvira Calap for their excellent technical assistance. This work was supported by Grant 01/3051 from Fondo de Investigación Sanitaria (Madrid, Spain) and Grant GV05/141 from Generalitat Valenciana (Valencia, Spain).

REFERENCES

1. **Riggs B.L., S. Khosla and L.J. Melton, III.** 1998. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J. Bone Miner. Res.* 13:763.
2. **Rossouw J.E., G.L. Anderson, R.L. Prentice, A.Z. LaCroix, C. Kooperberg, M.L. Stefanick, R.D. Jackson, S.A. Beresford, B.V. Howard, K.C. Johnson, J.M. Kotchen and J. Ockene.** 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321.
3. **Delmas P.D., N.H. Bjarnason, B.H. Mitlak, A.C. Ravoux, A.S. Shah, W.J. Huster, M. Draper and C. Christiansen.** 1997. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* 337:1641.
4. **Cummings S.R., et al.** 1999. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *JAMA* 281: 2189.
5. **Dang Z.C. and C. Lowik.** 2005. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends Endocrinol. Metabol.* 6:207.
6. **Agarwal R.** 2000. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem. Pharmacol.* 60:1051.
7. **Sato T., T. Shibata, K. Ikeda and K. Watanabe.** 2001. Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220+ cells: its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency. *J. Bone Miner. Res.* 16:2215.
8. **Cenci S., M.N. Weitzmann, C. Roggia, N. Namba, D. Novack, J. Woodring and R. Pacifici.** 2000. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J. Clin. Invest.* 106: 1229.
9. **Kong Y.Y. et al.** 1999. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402:304.
10. **Safadi F.F., I.R. Dissanayake, G.G. Goodman, R.A. Jago, A.E. Baker, A.R. Bowman, D.A. Sass, S.N. Popoff and S. Epstein.** 2000. Influence of estrogen deficiency and replacement on T-cell populations in rat lymphoid tissues and organs. *Endocrine* 12:81.
11. **Screpanti I., S. Morrone, D. Meco, A. Santoni, A. Gulino, R. Paolini, A. Crisanti, B.J. Mathieson and L. Frati.** 1989. Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. *J. Immunol.* 142:3378.
12. **Medina K.L., G. Smithson and P.W. Kincade.** 1993. Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J. Exp. Med.* 178:1507.
13. **Medina K.L. and P.W. Kincade.** 1994. Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:5382.
14. **Jilka R.L., K. Takahashi, M. Munshi, D.C. Williams, P.K. Roberson and S.C. Manolagas.** 1998. Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow. Evidence for autonomy from factors released during bone resorption. *J. Clin. Invest.* 101:1942.
15. **Miyazaki T., T. Matsunaga, S. Miyazaki, S. Hokari and T. Komoda.** 2004. Changes in receptor activator of nuclear factor-kappaB, and its ligand,

- osteoprotegerin, bone-type alkaline phosphatase, and tartrate-resistant acid phosphatase in ovariectomized rats. *J. Cell Biochem.* 93:503.
16. **Tanizawa T., A. Yamaguchi, Y. Uchiyama, C. Miyaura, T. Ikeda, S. Ejiri, Y. Nagai, H. Yamato, H. Murayama, M. Sato and T. Nakamura.** 2000. Reduction in bone formation and elevated bone resorption in ovariectomized rats with special reference to acute inflammation. *Bone* 26:43.
 17. **Weaver C.M., M. Peacock, B.R. Martin, G.P. McCabe, J. Zhao, D.L. Smith and M.E. Wastney.** 1997. Quantification of biochemical markers of bone turnover by kinetic measures of bone formation and resorption in young healthy females. *J. Bone Miner. Res.* 12:1714.
 18. **Eghbali-Fatourehchi G., S. Khosla, A. Sanyal, W.J. Boyle, D.L. Lacey and B.L. Riggs.** 2003. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J. Clin. Invest.* 111:1221.
 19. **Zhou S., Y. Zilberman, K. Wassermann, S.D. Bain, Y. Sadovsky and D. Gazit.** 2001. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J. Cell Biochem.* 81:144.
 20. **Bonnelye E., V. Kung, C. Laplace, D.L. Galson and J.E. Aubin.** 2002. Estrogen receptor-related receptor alpha impinges on the estrogen axis in bone: potential function in osteoporosis. *Endocrinology* 143:3658.
 21. **Lacey D.L. et al.** 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165.
 22. **Black L.J., M. Sato, E.R. Rowley, D.E. Magee, A. Bekele, D.C. Williams, G.J. Cullinan, R. Bendele, R.F. Kauffman, W.R. Bensch, C.A. Frolik, J.D. Termine and H.U. Bryant.** 1994. Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest* 93:63.
 23. **Erlandsson M.C., C.A. Jonsson, M.K. Lindberg, C. Ohlsson and H. Carlsten.** 2002. Raloxifene- and estradiol-mediated effects on uterus, bone and B lymphocytes in mice. *J. Endocrinol.* 175:319.
 24. **Ishimi Y., C. Miyaura, M. Ohmura, Y. Onoe, T. Sato, Y. Uchiyama, M. Ito, X. Wang, T. Suda and S. Ikegami.** 1999. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology* 140:1893.
 25. **Modder U.I., B.L. Riggs, T.C. Spelsberg, D.G. Fraser, E.J. Atkinson, R. Arnold and S. Khosla.** 2004. Dose-response of estrogen on bone versus the uterus in ovariectomized mice. *Eur. J. Endocrinol.* 151:503.
 26. **Leopold A.S., M. Erwin, J. Oh and B. Browning.** 1976. Phytoestrogens: adverse effects on reproduction in California quail. *Science* 191:98.
 27. **Masuzawa T., C. Miyaura, Y. Onoe, K. Kusano, H. Ohta, S. Nozawa and T. Suda.** 1994. Estrogen deficiency stimulates B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J. Clin. Invest.* 94:1090.
 28. **Cumano A., C.J. Paige, N.N. Iscove and G. Brady.** 1992. Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver. *Nature* 356:612.
 29. **Kanematsu M., T. Sato, H. Takai, K. Watanabe, K. Ikeda and Y. Yamada.** 2000. Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ligand on pre-B cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J. Bone Miner. Res.* 15:1321.
 30. **Farrugia A.N., G.J. Atkins, L.B. To, B. Pan, N. Horvath, P. Kostakis, D.M. Findlay, P. Bardy and A.C. Zannettino.** 2003. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation *in vitro* and correlates with bone destruction *in vivo*. *Cancer Res.* 63:5438.
 31. **Cenci S., G. Toraldo, M.N. Weitzmann, C. Roggia, Y. Gao, W.P. Qian, O. Sierra and R. Pacifici.** 2003. Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN-gamma-induced class II transactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:10405.
 32. **Yang J.H., C.D. Chen, M.Y. Wu, K.H. Chao, Y.S. Yang and H.N. Ho.** 2000. Hormone replacement therapy reverses the decrease in natural killer cytotoxicity but does not reverse the decreases in the T-cell subpopulation or interferon-gamma production in postmenopausal women. *Fertil. Steril.* 74:261.
 33. **Barr I.G., B.A. Khalid, P. Pearce, B.H. Toh,**

- P.F. Bartlett, R.G. Scollay and J.W. Funder. 1982. Dihydrotestosterone and estradiol deplete corticosteroid sensitive thymocytes lacking in receptors for these hormones. *J. Immunol.* 128:2825.
34. Grossman C.J. 1985. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 227:257.
35. Erben R.G., G. Harti and H. Graf. 1998. Ovariectomy does not alter CD4+/CD8+ ratio in peripheral blood T-lymphocytes in the rat. *Horm. Metab. Res.* 30:50.
36. Roggia C., Y. Gao, S. Cenci, M.N. Weitzmann, G. Toraldo, G. Isaia and R. Pacifici. 2001. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:13960.
37. Carlsten H., R. Holmdahl, A. Tarkowski and L.A. Nilsson. 1989. Oestradiol suppression of delayed-type hypersensitivity in autoimmune (NZB/NZW)F1 mice is a trait inherited from the healthy NZW parental strain. *Immunology* 67:205.
38. Hanna N. and M. Schneider. 1983. Enhancement of tumor metastasis and suppression of natural killer cell activity by beta-estradiol treatment. *J. Immunol.* 130:974.
39. Yu A., F. Olosz, C.Y. Choi and T.R. Malek. 2000. Efficient internalization of IL-2 depends on the distal portion of the cytoplasmic tail of the IL-2R common gamma-chain and a lymphoid cell environment. *J. Immunol.* 165:2556.
40. Nalbandian G., V. Paharkova-Vatchkova, A. Mao, S. Nale and S. Kovats. 2005. The selective estrogen receptor modulators, tamoxifen and raloxifene, impair dendritic cell differentiation and activation. *J. Immunol.* 175:2666.

A C > T polymorphism located at position -1 of the Kozak sequence of CD40 gene is associated with low bone mass in Spanish postmenopausal women

B. Pineda · P. Laporta · C. Hermenegildo · A. Cano ·
M. A. García-Pérez

Received: 7 September 2007 / Accepted: 22 November 2007
© International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation 2007

Abstract

Summary This study evaluated the association of a polymorphism in the CD40 gene with BMD and risk of osteopenia or osteoporosis in a population of 602 postmenopausal women. Results showed that women with the TT genotype had lower BMD at femoral neck and spine sites and increased risk of osteopenia or osteoporosis.

Introduction Recent findings have demonstrated that the CD40/CD40L system, which is of main importance for the immune system, can also be implied in the regulation of bone metabolism. The main objective of the present work has been to clarify whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting genes of CD40/CD40L system could be linked with abnormalities in the level of bone mineral density (BMD) in menopausal women.

Methods We performed an association study of BMD values with a SNP located at position -1 of the Kozak consensus sequence of CD40 gene (rs1883832; C > T) in a population of 602 postmenopausal women.

Results Women with the TT genotype (8.6% of women) displayed a reduction in femoral neck BMD (FN BMD) and lumbar spine BMD (LS BMD) of 6.2% and of 6.3%, respectively, as compared to women with CC + CT genotype. Logistic regression analysis adjusted for age, weight, and height showed that women with the TT genotype had increased risk for FN (odds ratio: 2.34; 95% CI: 1.12–4.89) and LS (odds ratio: 2.49; 95% CI: 1.19–5.24) osteopenia or osteoporosis.

Conclusions Women with the TT genotype in rs1883832 SNP affecting to Kozak consensus sequence of CD40 gene had lower BMD at FN and at LS sites and increased risk of osteopenia or osteoporosis.

Keywords Bone mass · CD40 gene · Kozak sequence · Osteopenia · Osteoporosis · Polymorphisms

B. Pineda · C. Hermenegildo · M. A. García-Pérez
Research Foundation, Hospital Clínico Universitario,
Av. Blasco Ibáñez, 17,
46010 Valencia, Spain

P. Laporta
Clinical Biochemistry Service, Hospital Clínico Universitario,
Valencia, Spain

C. Hermenegildo
Department of Physiology, University of Valencia,
Valencia, Spain

A. Cano
Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology,
University of Valencia,
Valencia, Spain

M. A. García-Pérez (✉)
Department of Genetics, University of Valencia,
Valencia, Spain
e-mail: migarpe@uv.es

Introduction

The accurate equilibrium between osteoblasts (OBs), the bone-forming cells, and osteoclasts (OCs), the bone-resorbing cells, is critical for bone homeostasis. Precursors for both cell types originate in the bone marrow (BM), where differentiation to one or another cell-line is driven through intervention of systemic hormones, cytokines, and growth factors [1]. The exposure of receptor activator of NF- κ B (RANK)-bearing OCs precursors to the RANK ligand (RANKL) is a crucial step in osteoclastogenesis (OCS) [2].

This process is inhibited by osteoprotegerin (OPG), a soluble decoy receptor of RANKL produced by OB/stromal

cells. Consistent with that balanced role of RANKL and OPG, osteoporosis has been demonstrated in animal models either by administration of RANKL or by genetically conditioned deficiency in OPG. In contrast, osteopetrosis has been demonstrated in RANK- or RANKL-deficient mice or in animals that overexpress OPG [3–6].

Interestingly, some evidences favor the notion of an intervention of the immunological system in the regulation of bone homeostasis. In this wise, activated T-cells have been shown to express RANKL as well as TNF- α and INF- γ , two cytokines involved in OCS [7–10]. Additionally, B-cells have been related with bone loss, although its role in OCS is poorly understood. For example, both early B-cells and myeloma plasma cells have been implicated in OCS, and pre-B-cells have been shown to express RANKL [11–13].

The CD40/CD40L system is crucial for some relevant functions of the immune system, such as macrophage activation and differentiation, antibody isotype switching, or the adequate organization of immunologic memory in B-cells. Recent data have linked the CD40/CD40L system with bone metabolism. Thus, osteoporosis and diminished BM OPG production have been described in CD40 and CD40L KO mice [14]. Moreover, children affected by the hyper-IgM syndrome, a primary immunodeficiency characterized by repeated infections and low IgG levels caused by mutations in CD40L gene, have been diagnosed low bone mass and osteopenia [15].

As a result of those data, we hypothesized that the CD40/CD40L system could be associated with a diminished bone mass in menopausal women. For that, we analyzed the association of a single nucleotide polymorphism (SNP) located at position -1 of the Kozak sequence of CD40 gene with bone mineral density (BMD) in a population of postmenopausal women.

Material and methods

Study population

Six hundred and two postmenopausal women, all of them of Spanish ancestry, were recruited from the population regularly demanding services of health control at our menopause unit, a center that covers an urban area of middle-class population. Healthy women with natural menopause, defined by at least one-year amenorrhea and FSH level above 40 UI/ml, or surgical menopause, were eligible. Women taking drugs affecting bone mass, affected of immobility, or with non-Spanish ancestry were excluded from study. The local ethics committee approved the protocol, and written informed consent was obtained from all women in accordance with regulations of our center's research foundation and ethics committee.

Anthropometric and biochemical measurements

Parity, age at menarche, age at menopause, years since menopause (YSM), type of menopause, tobacco consumption, age, height, and weight were recorded. The body mass index (BMI) was calculated for each subject as the ratio between weight (kg) and square height (m^2).

Basal blood samples were obtained for biochemical measurement of hormones and metabolites, and to obtain DNA. Blood was collected at 8:00–10:00 after an overnight fast and was allowed to clot. Then, the serum was separated and kept at -70°C until analysis. The levels of carboxyterminal telopeptides of collagen I (CTX) were measured by electrochemiluminescence (E170 modular analyzer; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and those of total alkaline phosphatase, intact parathyroid hormone (PTH), testosterone, and 17β -estradiol by routine methods [16, 17]. The intra- and inter-assay coefficients of variation for these methods were lower than 9%.

Bone density measurements

Measurements of BMD were performed at the lumbar spine from L2-L4 (LS BMD) and at the non-dominant proximal femoral neck (FN BMD) with the use of a dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) system (Norland XR-36, Norland Medical Systems Inc; Fort Atkinson, WI, USA). The coefficient of variation (CV) was <1% for spine and <1.2% for femoral neck (based on hydroxyapatite phantom). Norland 2.3 version software was used for data acquisition and analysis. The BMD was calculated by the software program and presented as g/cm^2 . The Z- and T-scores were the number of SDs that a given measurement differed from the mean for a sex- and age-matched population and for a normal young adult reference population, respectively.

Single nucleotide polymorphisms and genotyping

The CD40 gene, also known as TNF receptor superfamily member 5 gene, maps to human chromosome 20 at q12-q13.2 region. According with dbSNP database (National Center for Biotechnology Information), there are 117 SNPs in the CD40 gene and in the surrounding regions. Among them, there are eight SNPs located in the translated region of the gene, of which five are non-synonymous SNPs, nine of them maps at 5'- or 3'-UTR regions, and most are in the introns and regions near to the gene. We searched for SNPs that, at least theoretically, influence a phenotype in a measurable way (functional SNPs), such as those causing a change in the peptide sequence or locate in regulatory regions. Among them there is only one SNP that, while maintaining appropriate heterozygosity in Caucasian population, meets the above-

Table 1 Subject's anthropometric characteristics for each genotype

Subject characteristics	C C (304)	C T (246)	T T (52)
Age (years)	57.3±7.9	57.3±7.7	57.8±7.6
YSM (years)	11.4±7.6	11.2±6.8	12.4±8.5
Age at menarche (years)	12.8±1.7	12.7±1.5	12.8±1.3
Age at menopause (years)	46.4±6.2	46.4±5.4	45.5±7.8
Surgical menopause (%)	24.6	22.4	27.5
Parity	1.9±1.1	2.1±1.1	2.0±1.3
Weight (Kg)	65.8±10.9	66.2±11.1	67.7±10.4
Height (cm)	156.4±5.5	156.7±6.0	157.4±6.2
BMI (kg/m ²)	26.8±4.2	26.9±4.3	27.3±4.2
Smoking (%)	24.1	23.7	20.0
Estradiol (pg/ml)	15.6±9.4	15.8±10.3	14.1±7.9
Testosterone (ng/ml)	0.25±0.13	0.27±0.14	0.22±0.13
Intact PTH (pg/ml)	45.9±17.4	46.0±20.9	48.1±22.1
CTx (ng/ml)	0.43±0.23	0.45±0.20	0.44±0.26
Total ALP (U/L)	171.6±48.8	174.0±43.2	181.1±40.5

Values are the mean ± SD. Number of women is shown in brackets

BMI: body mass index; YSM: years since menopause; PTH: parathyroid hormone; CTx: carboxyterminal telopeptide of collagen type I; ALP: alkaline phosphatase

mentioned properties. This SNP locates in 5'-UTR region at position -1 in the Kozak consensus sequence of CD40 gene. The Kozak consensus sequence is a short recognition sequence that facilitates the initial binding of mRNA to the small subunit of the ribosome [18]. The consensus sequence in the most eukaryotic mRNAs is ACCAUGG, while that of CD40 gene is GCCAUGG, being the italic *C* the position of the selected SNP (*C* > *T*; rs1883832) and the AUG the start codon for translation.

Blood samples were collected in tubes containing disodium-EDTA as anticoagulant and stored at 4°C until extraction. Genomic DNA was isolated from nucleated cells after red-blood lysis with ammonium chloride (10 mM KHCO₃, 150 mM NH₄Cl, 0.1 mM EDTA-Na₂, pH 7.4) with a genomic DNA extraction kit (REAL, Durviz, Valencia, Spain), according to manufacturer's instructions. The obtained DNA gave a 260/280-absorbance ratio of 1.6–2.0, indicating high-quality DNA.

Genotyping of SNP were performed by TaqMan allelic discrimination real-time PCR on a 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the protocol provided by the manufacturer. Briefly, 20 ng of genomic DNA was amplified on 96 well plates in the presence of 1X TaqMan probe assay and 1X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Allelic discrimination was performed by using 7900 HT thermocycler software. About 0.5% of the genotypes were ambiguous and samples had to be re-genotyped.

Statistical analysis

The entire statistical analysis was carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL) v. 14.0 for Windows. Fixed-effects designs of analysis of variance (ANOVA) and covariance (ANCOVA) were used for comparisons of means. The Levene test was used

Table 2 Bone mineral density (BMD) and T- and Z-scores of women according to genotype

	C C	C T	T T
FN BMD (g/cm ³)	0.78±0.11 (235)	0.79±0.12 (200)	0.74±0.13 (43) ^a
FN BMD T-score	-1.01±0.92	-0.99±1.00	-1.42±1.10 ^a
FN BMD Z-score	-0.12±0.88	-0.11±0.97	-0.53±0.98 ^b
LS BMD (g/cm ³)	0.99±0.16 (247)	0.99±0.15 (207)	0.92±0.13 (47) ^b
LS BMD T-score	-1.23±1.47	-1.20±1.39	-1.78±1.22 ^a
LS BMD Z-score	-0.26±1.33	-0.26±1.28	-0.78±0.94 ^b

Values are the mean ± SD. Number of women is shown in brackets

^a *P*<0.05 with respect to CC genotype and *P*<0.01 with respect to CT genotype; ^b *P*<0.01 with respect to CC or to CT genotypes

for the homogeneity of variance for each dependent variable across all level combinations of the between-subject factors. Dunnett t test (when the variances were assumed to be equal) or Dunnett's T3 test (when the variances were assumed to be unequal) was applied to perform post hoc pairwise multiple comparisons. The existence of Hardy-Weinberg equilibrium was tested with Haploview 3.2 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>). The frequency distribution of genotypes was compared using cross-tabulation and standard χ^2 tests. Odds ratios (with 95% confidence intervals) were calculated by logistic regression analysis to estimate the relative risk of osteopenia or osteoporosis according to WHO definition (T-score ≤ -1). Values shown in the text and tables are means \pm SD and frequencies, unless specified otherwise. Significance was defined as $P < 0.05$.

Results

Table 1 shows that there were not significant differences for anthropometric data and levels of biochemical markers between women when separated according to genotype.

Table 2 shows BMD data according to genotype. Significant differences between genotypes were detected for FN BMD ($P=0.022$) and LS BMD ($P=0.024$) by ANOVA analysis. Subsequent pairwise comparisons demonstrated that women with the TT genotype had a considerable reduction of FN BMD when compared with women with the CC genotype (5.9%, $P=0.014$) and with women with the CT genotype (6.5%, $P=0.007$). Reductions of similar magnitude (6.2% for CC genotype, $P=0.010$, and 6.2% for CT genotype, $P=0.009$) were detected for LS BMD. The corresponding values for T- and Z-score reproduced the same pattern, with more negative values for women with the TT genotype. The similar BMD values obtained for the CC and CT genotypes suggest a recessive model of inheritance.

Table 3 shows the risk of FN and LS osteopenia or osteoporosis adjusted by confounding variables, such as age, weight, and height, according to genotypes. The prevalence of the TT genotype was higher in women with osteopenia or osteoporosis at either FN or LS. Thus, the odds ratio for the diagnosis of FN osteopenia or osteoporosis in women with the TT genotype was 2.34 (95% CI: 1.12–4.89) when compared with CC + CT women, 2.46 (95% CI: 1.12–5.38) when compared with CC women, and 2.36 (95% CI: 1.09–5.11) when compared with CT women. Similar results were obtained for LS, where the corresponding odds ratios were 2.49 (95% CI: 1.19–5.24), 2.59 (95% CI: 1.20–5.59) and 2.68 (95% CI: 1.19–6.04). Confirming results of BMD, data of regression study also suggest a recessive model of inheritance.

Table 3 Estimation of risk for femoral neck (FN) and lumbar spine (LS) osteopenia or osteoporosis, adjusted by age, weight, and height, according to genotype

Genotype	Normal FN (n=208)		FN osteopenia or osteoporosis (n=270)		P	Odds ratio	95% CI	Genotype	Normal LS (n=199)		LS osteopenia or osteoporosis (n=302)		P	Odds ratio	95% CI
	%	Number with genotype / total	%	Number with genotype / total					%	Number with genotype / total	%	Number with genotype / total			
TT + CT vs. CC	49.0	102/208	52.2	141/270	0.394	1.18	0.80–1.74	TT + CT vs. CC	48.2	98/199	52.3	158/302	0.302	1.22	0.84–1.79
TT vs. CT + CC	5.8	12/208	11.5	31/270	0.024	2.34	1.12–4.89	TT vs. CT + CC	6.0	12/199	11.6	35/302	0.016	2.49	1.19–5.24
TT vs. CC	10.2	12/118	19.4	31/160	0.024	2.46	1.12–5.38	TT vs. CC	10.4	12/115	19.6	35/179	0.015	2.59	1.20–5.59
TT vs. CT	11.8	12/102	22.0	31/141	0.030	2.36	1.09–5.11	TT vs. CT	12.5	12/96	22.2	35/158	0.018	2.68	1.19–6.04
CT vs. CC	45.9	90/196	46.0	110/239	0.887	0.97	0.65–1.45	CT vs. CC	44.9	84/187	46.1	123/267	0.662	0.91	0.61–1.37

CI, confidence interval

We have gathered women in this study with osteopenia or osteoporosis, because our population included a low number of women with osteoporosis at the FN (27 women, six with the TT genotype) or at the LS (111 women, 14 with the TT genotype). Nonetheless, a logistical regression analysis adjusted for age, weight and height, applied to this reduced group of women still detects an odds ratio of 3.87 (95% CI: 1.23–12.18; $P=0.021$) for FN osteoporosis and of 1.61 (95% CI: 0.78–3.34; $P=0.199$) for LS osteoporosis in the TT women.

According to a recessive model of inheritance, women with the TT genotype displayed a lower FN BMD (0.739 vs. 0.787 g/cm²; $P=0.007$) and a lower LS BMD (0.922 vs. 0.987 g/cm²; $P=0.006$) when compared with women with the CC + CT genotypes.

Discussion

The data of the present study show an association of the polymorphism rs1883832 (C > T) located in the position -1 of the Kozak consensus sequence of CD40 gene with BMD in a population of postmenopausal women. Women with the TT genotype (frequency 8.6%) showed a reduction in BMD that exceeded 6% in both the FN and the LS when compared with women having the CC or CT genotype. This difference translates into a more than double risk for either osteopenia or osteoporosis. However, this smaller BMD is not translated in significant differences regarding biochemical markers of bone metabolism analyzed (Table 1).

The SNP analyzed in this work is located in the functional region of the CD40 gene, the Kozak consensus sequence. The molecular details affected by this mutation have been analyzed on B-cells, where expression levels of CD40 were decreased by 39.4% in individuals with the TT genotype when compared with individuals with the CC genotype. This effect resulted from a lower translation efficiency [19].

In agreement with our data, two recent studies have found an association of the CD40/CD40L system with the regulation of bone metabolism. In one of them, children affected by X-linked hyper-IgM syndrome as a consequence of mutations in CD40L gene, displayed osteopenia, in addition to the series of expected abnormalities in the immune system [15]. Activated T-cells from these children express normal levels of RANKL but do not produce IFN γ because of deficient interaction between T cells and antigen-presenting cells. The resulting defective inhibition of osteoclastogenesis leads to osteopenia [15]. In the second study, Li et al. [14] demonstrate that B-cells are a main source of OPG, and that T cells, through the CD40/CD40L system, promote OPG production by B-cells in vivo. Consequently, CD40- and CD40L-deficient mice display osteopenia and osteoporosis. Both works constitute

the starting point of a new research field where the cooperation between T- and B-cells seems crucial in the regulation of bone homeostasis.

Our work further adds data obtained in a normal human population that associate polymorphisms in genes of CD40/CD40L system with higher risk for osteopenia or osteoporosis. However, a limitation of our work is that the study population is only constituted by postmenopausal women. Nevertheless, we think that our findings are consistent because our population is heterogeneous regarding the age and bone status. Anyway, this association should be also demonstrated in men and in premenopausal women.

The linking between a low CD40 expression in cells of women with the TT genotype with low BMD and increased risk of osteopenia or osteoporosis is now unknown. A possibility is that the low CD40 expression in TT women provokes a low production of OPG, a potent inhibitor of osteoclastogenesis [2, 5], by B-cells [14], or other antigen-presenting cells, or even osteocyte/osteoblast cells since these cells also express CD40 [20, 21]. On the other hand, CD40 activation inhibits osteocyte/osteoblast cell death [21]; therefore, a low CD40 expression on these cells could reduce their half life and thus affect bone metabolism. Anyway, it seems that CD40 level on B-cells/osteoblasts/other-cells is implicated in the regulation of bone metabolism.

Acknowledgements The authors are indebted to Mrs. Rosa Alaiaga and Mrs. Elvira Calap for their excellent technical assistance. Grants GV05/141 from Generalitat Valenciana (Valencia, Spain), FIS 06/154 from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, Madrid, Spain) and Red HERACLES RD06/0009 from Instituto Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo; Madrid, Spain) supported this work. MAG-P is a recipient of a research contract from Fondo de Investigación Sanitaria - Conselleria de Sanitat (Generalitat Valenciana).

Conflicts of interest None.

References

- Garcia-Perez MA (2006) Physiological regulation of bone metabolism and estrogen agonism. In: Cano A, Calaf i Alsina J, Dueñas-Diez JL (eds) Selective estrogen receptor modulators: a new brand of multitarget drugs. Springer, Berlin, pp 159–184
- Lacey DL, Timms E, Tan HL et al (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165–176
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I et al (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397:315–323
- Dougall WC, Giacucci M, Charrier K et al (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 13:2412–2424
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309–319

6. Yun TJ, Tallquist MD, Aicher A et al (2001) Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. *J Immunol* 166:1482–1491
7. Roggia C, Gao Y, Cenci S et al (2001) Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13960–13965
8. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C et al (2000) Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* 106:1229–1237
9. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL et al (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175–179
10. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S et al (2000) T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 408:600–605
11. Sato T, Shibata T, Ikeda K et al (2001) Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220⁺ cells: its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency. *J Bone Miner Res* 16:2215–2221
12. Kanematsu M, Sato T, Takai H et al (2000) Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ligand on pre-B cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J Bone Miner Res* 15:1321–1329
13. Farugia AN, Atkins GJ, To LB et al (2003) Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo. *Cancer Res* 63:5438–5445
14. Li Y, Toraldo G, Li A et al (2007) B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* 109:3839–3848
15. Lopez-Granados E, Temmerman ST, Wu L et al (2007) Osteopenia in X-linked hyper-IgM syndrome reveals a regulatory role for CD40 ligand in osteoclastogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5056–5061
16. Garcia-Perez MA, Moreno-Mercer J, Tarin JJ et al (2003) Relationship between PTH, sex steroid and bone turnover marker measurements and bone density in recently postmenopausal women. *Maturitas* 45:67–74
17. Garcia-Perez MA, Moreno-Mercer J, Tarin JJ et al (2004) Bone turnover markers and PTH levels in surgical versus natural menopause. *Calcif Tissue Int* 74:143–149
18. Kozak M (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44:283–292
19. Jacobson EM, Concepcion E, Oashi T et al (2005) A Graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: a case for translational pathophysiology. *Endocrinology* 146: 2684–2691
20. Schrum LW, Marriott I, Butler BR et al (2003) Functional CD40 expression induced following bacterial infection of mouse and human osteoblasts. *Infect Immun* 71:1209–1216
21. Ahuja SS, Zhao S, Bellido T et al (2003) CD40 ligand blocks apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha, glucocorticoids, and etoposide in osteoblasts and the osteocyte-like cell line murine long bone osteocyte-Y4. *Endocrinology* 144:1761–1769

Comparative effects of 17β -estradiol, raloxifene and genistein on bone 3D microarchitecture and volumetric bone mineral density in the ovariectomized mice

A. Cano · S. Dapía · I. Noguera · B. Pineda ·
C. Hermenegildo · R. del Val · J. R. Caeiro ·
M. A. García-Pérez

Received: 23 July 2007 / Accepted: 10 October 2007 / Published online: 30 October 2007
© International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation 2007

Abstract

Summary This study assessed the effect of estradiol, raloxifene and genistein on the preservation of bone 3D-microarchitecture and volumetric bone mineral density (vBMD) in the ovariectomized mouse model. Our results indicated that raloxifene was more effective in preserving bone ovariectomized-induced changes, the advantage being concentrated in both bone microarchitecture and vBMD.

Introduction This study assessed the effect of different estrogen receptor (ER) agonists on the preservation of bone 3D-microarchitecture and volumetric bone mineral density (vBMD) in the ovariectomized (OVX) mouse model.

Methods Twelve-week-old female C57BL/6 mice were randomly assigned to one of five groups: (1) SHAM-operated + vehicle; (2) OVX + vehicle; (3) OVX + 17β -estradiol (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$); (4) OVX + raloxifene (1 mg/kg); (5)

OVX + genistein (25 mg/kg), during 4-weeks. Bone microarchitecture and trabecular, cortical and total vBMD of distal femur were imaged by ex vivo microcomputed tomography (micro-CT).

Results Ovariectomy produced a global deterioration involving both trabecular and cortical 3D-microarchitecture and vBMD. Raloxifene maintained both microarchitecture and vBMD, whereas estradiol prevented deterioration of some microstructural parameters, such as trabecular thickness (Tb.Th), trabecular bone pattern factor (Tb.Pf), and cortical periosteal perimeter (Ct.Pe.Pm), but did not completely block the loss in vBMD. Mice treated with genistein exhibited the less favourable profile in both vBMD and microstructural parameters preserving only cross-sectional bone area (B.Ar) and Ct.Pe.Pm in cortical bone.

A. Cano
Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology,
University of Valencia,
Valencia, Spain

S. Dapía
Trabeculae, Empresa de Base Tecnológica S.L.,
Parque Tecnológico de Galicia,
San Ciprián de Viñas,
Ourense, Spain

I. Noguera
Research Unit, Faculty of Medicine, University of Valencia,
Valencia, Spain

B. Pineda · C. Hermenegildo · R. del Val ·
M. A. García-Pérez (✉)
Research Foundation, Hospital Clínico Universitario,
Av. Blasco Ibáñez, 17,
46010 Valencia, Spain
e-mail: miguel.garcia@uv.es

C. Hermenegildo
Department of Physiology, University of Valencia,
Valencia, Spain

J. R. Caeiro
Trauma and Orthopedic Surgery Service,
Complejo Hospitalario Universitario,
Santiago de Compostela, Spain

M. A. García-Pérez
Department of Genetics, University of Valencia,
Valencia, Spain

Conclusion Our data indicate that, at the selected doses, raloxifene was more effective in preserving bone OVX-induced changes than either estradiol or genistein, the advantage being concentrated in both bone microarchitecture and vBMD.

Keywords Genistein · Osteoporosis · Raloxifene · Three-dimensional microarchitecture · 17 β -estradiol

Introduction

Osteoporosis is a disease characterized by the progressive loss of bone mass, deterioration of cortical and trabecular architecture, and a decrease in mineralization of bone tissue. These changes, among others, may compromise bone strength leading to an increased risk of fracture. The hypogonadic state associated with menopause is the main determinant of postmenopausal osteoporosis, the most frequent form of the disease [1, 2]. Indeed, estrogen deficiency increases bone remodeling within a context where bone resorption prevails over bone formation [3].

Hormone therapy (HT) prevents bone loss and reduces fracture risk [2, 3]. However, recent clinical studies [4, 5] have shown an unfavourable balance for HT when administered to non-symptomatic women. Advances in the knowledge on the molecular details of estrogen receptor (ER) action have made clear that there is a wide array of molecules exhibiting a whole range of agonistic/antagonistic profile on the ER [6]. The recent denomination of selective estrogen receptor modulators (SERMs) reflects this concept. Moreover, an additional source of ER agonists is represented by phytoestrogens, a generic denomination including plant-derived compounds with the ability to bind ER as well.

Raloxifene is a SERM approved for prevention and treatment of osteoporosis in postmenopausal women. Interestingly, together with this agonistic effect on bone, raloxifene displays antagonistic effects on the breast [7, 8]. Genistein (GEN), one main component of the isoflavone family of phytoestrogens, has been shown to have a preferential affinity for the β isoform of the ER [9, 10]. There are data suggesting a beneficial effect of GEN on the cardiovascular tree, on the control of menopausal symptoms, as well as lowering the RANKL/OPG ratio [11, 12].

The aim of the present work was to compare the effects of three different agonists of the ER, estradiol, raloxifene and genistein, on two parameters crucial for bone quality, 3D microarchitecture and volumetric bone mineral density (vBMD) in an animal model of accelerated bone loss by using ovariectomized young female mice. Loss of trabecular connectivity resulting in a shift from plate-like to rod-like trabeculae is a well-established characteristic of osteoporosis [13]. Given that the nature of trabecular

architecture is anisotropic, the study used microcomputed tomography (micro-CT), a technique capable of analyzing 3D images. Ovariectomized mice were used as a model to perform the experiments.

Materials and methods

Mice and treatments

Twelve-week-old female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) were housed in an environmentally controlled laboratory upon arrival and acclimatized for 4 days. The animals were either dorsal ovariectomized or falsely operated (SHAM) under general anesthesia by using 150 mg/kg of ketamine (Merial, Lyon, France) and 5 mg/kg acepromazine (Calmo Neosan, Pfizer, NY). Animals were kept at 21°C with 12:12-h light-dark cycle and were allowed free access to a pelleted standard mouse laboratory diet containing 0.88% calcium, 0.59% phosphorus and 900 IU/kg vitamin D3 (Panlab SL, Barcelona, Spain) and tap water. All procedures for consideration of animal welfare were reviewed and approved by the ethical committee of our institution.

The mice were divided into five groups: SHAM-operated (SHAM, $n=6$), ovariectomized without treatment (OVX, $n=6$), and ovariectomized mice treated with 17 β -estradiol (E2, $n=8$), raloxifene (RAL, $n=8$) or genistein (GEN, $n=8$), all compounds were supplied by Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO). Mice were subcutaneously injected 5-times per week with 100 μ l of vehicle (10% DMSO, 90% sesame oil; Sigma) in the SHAM and OVX groups, and with 17 β -estradiol (0.1 μ g/mouse/day=5 μ g/kg/day), raloxifene (20 μ g/mouse/day=1 mg/kg/day) or genistein (0.5 mg/mouse/day=25 mg/kg/day), dissolved in vehicle for the remaining groups from the third day after surgery. The administered doses suppose equipotent dose according to the estrogenic capacity of each agonist [14, 15] and were chosen based on doses frequently used in the literature [16–20].

Mice were sacrificed 4 weeks after beginning the treatment by cardiac puncture exsanguination under halothane anesthesia (Fluothane; Zeneca, Macclesfield, UK), and the uterus and right femur were aseptically removed. The uterus was weighed to confirm the success of ovariectomy and the femur was cleaned of adherent soft tissues and deposited in a tube with 10% formalin.

Three-dimensional trabecular and cortical microarchitecture analysis by micro-CT

The distal region of femora was analyzed without further sample preparation by micro-CT, (SkyScan 1172), imaged

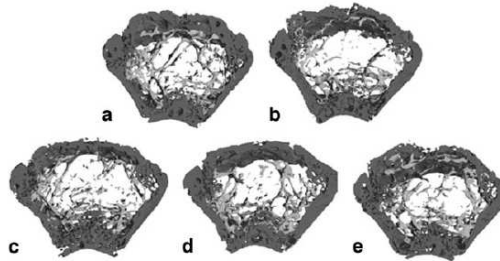


Fig. 1 3D trabecular microarchitectural images of distal mouse femora by means of micro-CT. **a)** SHAM group. **b)** OVX group at 4 weeks postsurgery. **c)** E2 group after 4 weeks of estradiol treatment

d) RAL group after 4 weeks of raloxifene treatment. **e)** GEN group after 4 weeks of genistein treatment

Analysis of data indicates that, as compared with the SHAM group, ovariectomy decreased Tb.N and Tb.Th by nearly 23% ($P<0.01$) and 11% ($P<0.001$), respectively, and increased Tb.Sp by 9% ($P<0.05$, Fig. 2a,c,e). Additional effects of ovariectomy were a 25% decrease in trabecular BV/TV ($P<0.01$, Fig. 2b), and 11% increase in Tb.Pf ($P<0.01$), suggesting a more disconnected trabecular structure (Fig. 2d). There were no significant differences with respect to SMI (Fig. 2f), a variable that quantifies the relative prevalence of rods or plates in a 3D structure such as trabecular bone.

Also in Fig. 2, data were similar for the RAL and the SHAM groups except for SMI, which was slightly lower for RAL ($P<0.05$). However, RAL-treated mice behaved differently from OVX animals in all parameters, clearly demonstrating that this compound inhibited every change induced by ovariectomy in trabecular bone. The effect was more mixed for E2 and GEN (Fig. 2). Estradiol prevented the changes induced by ovariectomy in both Tb.Th ($P<0.0001$) and Tb.Pf ($P<0.05$), but not in Tb.N, Tb.Sp, or BV/TV. GEN, in turn, was unable to correct any change induced by ovariectomy.

Effect of ovariectomy and ER agonist administration on cortical bone microarchitecture

As compared with the SHAM group (Table 1), ovariectomy induced changes in Ct.Pe.Pm (13.1% increase, $P<0.01$), MMI (13.4% decrease, $P<0.01$) and B.Ar (8.2% decrease, $P<0.05$). RAL significantly normalized all the three parameters, while E2 only normalized the Ct.Pe.Pm ($P<0.01$), although a tendency to prevent the B.Ar deterioration ($P=0.06$) was observed. GEN neutralized the changes in Ct.Pe.Pm ($P<0.05$) and B.Ar ($P<0.0001$) (Table 1).

Effect of ovariectomy and ER agonist administration on vBMD

Ovariectomy resulted in a reduction of 34% ($P<0.01$) and 4% ($P<0.01$) in vBMD_{trab} and vBMD_c, respectively, an effect that represents a vBMD_t reduction of approximately 32% ($P<0.001$) (Fig. 3). The different ER agonists prevented, with differing effectiveness, trabecular bone mass loss. Thus, RAL entirely blocked trabecular bone loss after 4 weeks of treatment ($P<0.0001$). Mice treated with E2 and GEN showed vBMD_{trab} that was intermediate between SHAM and OVX animals, an effect implying that they inhibited trabecular bone mass loss only partially (Fig. 3). No treatment inhibited bone loss at the cortical level, although the E2 group nearly reached a favorable difference in relation to the OVX group ($P=0.09$).

In terms of vBMD_t values, RAL, and not GEN, effectively neutralized the loss of bone mass associated with OVX. E2 exhibited an intermediate effect, since vBMD_t was 21.4% higher than in the OVX group, but 14.6% lower than in the SHAM operated animals.

As expected, strong correlations between vBMD_t values and almost all trabecular bone microarchitectural parameters were found. Thus, vBMD_t correlated positively with BV/TV ($r=0.62$, $P<0.001$), Tb.Th ($r=0.60$, $P<0.001$), and Tb.N ($r=0.59$, $P<0.001$) and negatively with Tb.Pf ($r=0.59$, $P<0.001$) and SMI ($r=0.46$, $P<0.01$).

Discussion

In the present study it was observed that estrogen deficiency, as induced by ovariectomy, deteriorated both bone mineral density (mainly vBMD_{trab}) and bone quality,

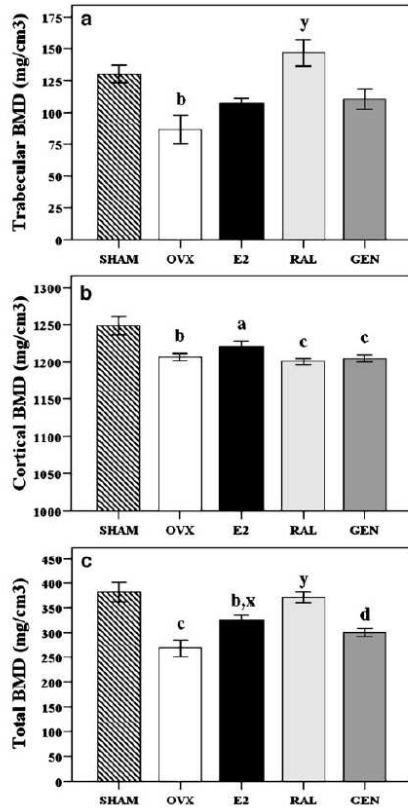


Fig. 3 Volumetric trabecular (vBMD_{trab}; a), cortical (vBMD_c; b) and total (vBMD_t; c) bone mineral density in SHAM, OVX, and OVX treated groups. vBMD was determined by micro-CT scanning as described in Materials and Methods section. Values are expressed as the mean \pm SEM. a: $P < 0.05$ vs. SHAM; b: $P < 0.01$ vs. SHAM; c: $P < 0.001$ vs. SHAM; d: $P < 0.0001$ vs. SHAM; x: $P < 0.01$ vs. OVX; and y: $P < 0.0001$ vs. OVX

as suggested by the important changes in almost all microstructural parameters assayed. Regarding trabecular bone, ovariectomy induced a significant reduction in trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), and trabecular bone volume (BV/TV), as well as an increase in trabecular separation (Tb.Sp), a series of changes that result in a decreased connectivity among trabeculae (increase in Tb.Pf value). At the cortical level,

ovariectomy induced an increment of the periosteal perimeter (Ct.Pe.Pm) and a diminution in the polar moment of inertia (MMI) and cortical surface (B.Ar). These results confirmed that 4-week-old ovariectomized mice presented both a very deteriorated microarchitecture as well as a large reduction in trabecular mass (35%). Therefore, this mouse model of adult young mice seems suitable for investigating phenomena underlying accelerated bone loss and osteoporosis.

To our best knowledge, this is the first report on microstructural comparative effects on bone, as assessed by micro-CT, of estradiol, raloxifene and genistein, administered at equipotent dose to ovariectomized mice. The data confirmed that raloxifene was the most effective treatment, preventing the deterioration of both vBMD as well as trabecular and cortical microarchitectural parameters. Moreover, this treatment not only neutralized the loss in vBMD_{trab}, but, in agreement with published data in rat and in women [7, 16], it further increased this parameter above the levels observed for the control group.

The data add substantial information to the sparse knowledge about the effect of raloxifene on microstructural properties of bone. It has been proposed that raloxifene improves the mechanical properties of bone in ways that do not involve increases in BMD or BV/TV [27]. The present results confirmed that raloxifene improved the deterioration induced by ovariectomy in BV/TV, Tb.N, Tb.Sp, and Tb.Th in trabecular bone. Furthermore, raloxifene increased the connectivity between trabeculae and diminished the SMI. This last effect is particularly important because SMI, which is characterized by a transition from plate-like to rod-like architecture, shows particular importance in trabecular bone affected by osteoporosis [24]. Lower SMI values in the RAL group suggest a more plate-like structure, which is in accordance with improved bone strength. This is the first time that the effect of raloxifene on SMI has been reported. The effects of ovariectomy were less dramatic in cortical bone microstructure but, again, raloxifene neutralized the structural deterioration induced by estrogen deficiency.

Estradiol exhibited a more mixed effect. It only partially avoided vBMD loss, but was the treatment that performed best on vBMD_c. This profile is in agreement with recently published data [28, 29]. Regarding microarchitectural parameters, estradiol inhibited loss in trabecular thickness (Tb.Th) and in connectivity (Tb.Pf). We do not have yet explanation for this behaviour, since a significantly improvement in number and in trabecular separation would be expected before of a inhibition of connectivity loss. Additional studies will be needed to clarify this behaviour.

Given the differences observed for raloxifene and estradiol, it might be argued that the dose of estradiol was not equipotent to that of raloxifene. However, the raloxifene and estradiol dosages used in this work would correspond to 60 mg and 0.3 mg, respectively, for a woman of 60 kg of

weight, levels that have been demonstrated to have significant bone protection effects in humans [30, 31]. Additionally, it has been described that similar doses of estradiol to those used in the current work inhibit BMD loss induced by ovariectomy, although in those studies, bone mineral content was calculated per area unit (measured by dual energy X-ray absorptiometry) instead of per volume unit [17–20]. To further support the significance of the present data, it has been reported that micro-CT can detect differences in mineral content that are comparable or superior to the gold standard defined by ash content values [32]. It seems conclusive, therefore, that raloxifene was more effective than E2 in this ovariectomized mice model. Indeed, it has been described that estradiol, administered to ovariectomized rats at similar doses to those of this study, was unable to improve some proximal tibia microstructural parameters, such as BV/TV, connectivity density, SMI, and Tb.Sp [29].

A previous study demonstrated that identical doses of estradiol as those used in the present one prevented both uterine atrophy and thymic hypertrophy, as well as the increase in B-cells in BM of ovariectomized mice [33]. Moreover, in another study, the same doses reestablished the changes induced by ovariectomy in uterus, thymus, and cortical BMD levels, but were not able to exceed 20–30% of the response achieved with the maximum dose of estradiol in trabecular BMD in eight-week-old mice [28]. Interestingly, it has been described that mouse age is determinant in this type of study [20]. Thus, administration of 5 µg/kg/day estradiol to 6-month-old mice completely prevented the loss of trabecular bone without stimulative effects on the uterus, while the same dose injected to 3-month-old mice (identical age to that of our mice) did not avoid the bone loss, and resulted in uterine hypertrophy [20], which agrees with our published data [33].

Genistein was the treatment with the lowest anti-resorptive power in our study. It was unable to limit vBMD loss or the microstructural deterioration induced by ovariectomy in trabecular bone, although it inhibited the changes in periosteal perimeter (Ct.Pe.Pm) and cortical surface (B.Ar) in cortical bone. It is unlikely that the poor effect of genistein in our study was due to insufficient dosage. That used in our work is normal for this type of study [19, 34, 35], and it would be equivalent to 1500 mg for a woman of 60 kg of weight, 20–25 times superior to the dose generally prescribed. It has been described that genistein dosages around this range are toxic for reproductive tissue [36–38]. Our results agree with some previously published studies of the minimal effect of genistein or other isoflavones on bone microarchitectural parameters [29, 39], albeit some evidence in favor of protection against ovariectomy-induced bone loss has been detected [34, 35, 40].

To give an answer to these questions we used C57BL/6 mice as a model, a mouse strain largely used for

investigating bone effects of ovariectomy. Moreover, we have used twelve-week-old C57BL/6 mice that, with regard to skeleton, are virtually mature [41]. A certain degree of modeling and remodeling activities, however, can still subsist at this age in the skeleton. This specific metabolic status might have influenced the pattern of response observed for each ER agonist tested in our study. In fact, the interaction of ER agonists with either the own receptor and transcription factors generates a wide array of responses from pure agonism to complete antagonism [42]. We cannot discard variable contributions of each compound through pathways affected by the age of the animal or even of the phase of skeleton growth.

In conclusion, at doses that were chosen to achieve equivalent agonistic power for each of the three compounds, raloxifene has been shown to be a more effective treatment than either estradiol or genistein in preserving bone vBMD and microstructure in the adult young ovariectomized mice. Since the present work was a comparative study, it limits the interference of confounding variables. One cannot discard, however, that the use of alternative routes for administering the treatment, mouse strain, or age of the mice, may have influenced the results.

Acknowledgements The authors are indebted to Mrs. Rosa Aliaga and Mrs. Elvira Calap for their excellent technical assistance. This work was supported by the Generalitat Valenciana (Grant GV05/141) and by a research contract (to M.A.G.-P.) from Conselleria de Sanitat de Valencia and Fondo de Investigación Sanitaria (FIS).

References

1. Riggs BL, Melton LJ III (1986) Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 314:1676–1686
2. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ III (1998) A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 13:763–773
3. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ III (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23:279–302
4. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL et al (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321–333
5. Hendrix SL, Wassertheil-Smoller S, Johnson KC et al (2006) Effects of conjugated equine estrogen on stroke in the Women's Health Initiative. *Circulation* 113:2425–2434
6. Marin F, Barbancho MC (2006) Clinical pharmacology of selective estrogen receptor modulators (SERMs). In: Cano A, Calaf J, Alsina I, Dueñas-Diez JL (eds) Selective estrogen receptor modulators. New brand of multitarget drugs. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 49–69
7. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH et al (1997) Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 337:1641–1647

8. Cummings SR, Eckert S, Krueger KA et al (1999) The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. *JAMA* 281:2189–2197
9. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B et al (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252–4263
10. An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC et al (2001) Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem* 276:17808–17814
11. Crisafulli A, Altavilla D, Squadrito G et al (2004) Effects of the phytoestrogen genistein on the circulating soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin system in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 89:188–192
12. Crisafulli A, Altavilla D, Marini H et al (2005) Effects of the phytoestrogen genistein on cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Menopause* 12:186–192
13. Lane NE, Thompson JM, Haupt D et al (1998) Acute changes in trabecular bone connectivity and osteoclast activity in the ovariectomized rat in vivo. *J Bone Miner Res* 13:229–236
14. Sato M, Rippey MK, Bryant HU (1996) Raloxifene, tamoxifen, nafoxidine, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats. *FASEB J* 10:905–912
15. Harris DM, Besselink E, Henning SM et al (2005) Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or Beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 230:558–568
16. Black LJ, Sato M, Rowley ER et al (1994) Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 93:63–69
17. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C et al (2000) Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* 106:1229–1237
18. Erlandsson MC, Jonsson CA, Lindberg MK et al (2002) Raloxifene- and estradiol-mediated effects on uterus, bone and B lymphocytes in mice. *J Endocrinol* 175:319–327
19. Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M et al (1999) Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology* 140:1893–1900
20. Modder UI, Riggs BL, Spelsberg TC et al (2004) Dose-response of estrogen on bone versus the uterus in ovariectomized mice. *Eur J Endocrinol* 151:503–510
21. Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW (1984) Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am A* 1:612–619
22. Hildebrand T, Rueggsegger P (1997) A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microsc* 185:67–75
23. Ulrich D, van RB, Laib A et al (1999) The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone* 25:55–60
24. Hildebrand T, Rueggsegger P (1997) Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. *Comput Methods Biomech Biomed Eng* 1:15–23
25. Harrigan TP, Mann RW (1984) Characterisation of microstructural anisotropy in orthotropic materials using a second rank tensor. *J Mater Sci* 19:761–767
26. Hahn M, Vogel M, Pomesius-Kempa M et al (1992) Trabecular bone pattern factor—a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 13:327–330
27. Allen MR, Iwata K, Sato M et al (2006) Raloxifene enhances vertebral mechanical properties independent of bone density. *Bone* 39:1130–1135
28. Andersson N, Islander U, Egecioglu E et al (2005) Investigation of central versus peripheral effects of estradiol in ovariectomized mice. *J Endocrinol* 187:303–309
29. Devareddy L, Khalil DA, Smith BJ et al (2006) Soy moderately improves microstructural properties without affecting bone mass in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Bone* 38:686–693
30. Prestwood KM, Kenny AM, Kleppinger A et al (2003) Ultra-low-dose micronized 17beta-estradiol and bone density and bone metabolism in older women: a randomized controlled trial. *JAMA* 290:1042–1048
31. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH et al (1997) Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 337:1641–1647
32. McNamara LM, Ederveen AG, Lyons CG et al (2006) Strength of cancellous bone trabecular tissue from normal, ovariectomized and drug-treated rats over the course of ageing. *Bone* 39:392–400
33. Garcia-Perez MA, Del Val R, Noguera I et al (2006) Estrogen receptor agonists and immune system in ovariectomized mice. *Int J Immunopathol Pharmacol* 19:807–819
34. Ishimi Y, Arai N, Wang X et al (2000) Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun* 274:697–701
35. Wu J, Wang XX, Takasaki M et al (2001) Cooperative effects of exercise training and genistein administration on bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 16:1829–1836
36. Garcia-Perez MA, Noguera R, Del Val R et al (2006) Comparative effects of estradiol, raloxifene, and genistein on the uterus of ovariectomized mice. *Fertil Steril* 86:1003–1005
37. Newbold RR, Banks EP, Bullock B et al (2001) Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res* 61:4325–4328
38. Unfer V, Casini ML, Costabile L et al (2004) Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil Steril* 82:145–148
39. Hotchkiss CE, Weis C, Blaydes B et al (2005) Multigenerational exposure to genistein does not increase bone mineral density in rats. *Bone* 37:720–727
40. Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z et al (1998) The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 8:274–281
41. Somerville JM, Aspden RM, Amour KE et al (2004) Growth of C57BL/6 mice and the material and mechanical properties of cortical bone from the tibia. *Calcif Tissue Int* 74:469–475
42. Riggs BL, Hartmann LC (2003) Selective estrogen-receptor modulators - mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 348:618–629

*Corresponding author. Tel.: +49 6131 17 5754;
fax: +49 6131 17 5672
E-mail address: aglyso@kinder.klinik.uni-mainz.de
(G. Kalkum)

1 October 2008

doi:10.1016/j.ejogrb.2009.01.007

No effect of *Cimicifuga racemosa* extract on serum interleukin-6 levels and prostacyclin production by human endothelial cells

Dear Editor,

We found that serum from women having the isopropanolic extract of *Cimicifuga racemosa* (iCR) did not stimulate prostacyclin production, a typical estrogenic outcome, by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Moreover, the production of IL-6, a pro-inflammatory cytokine, was not modified.

The finding is important because iCR has been proposed as an alternative to menopause hormone therapy, although its efficacy is still controversial [1]. We designed an open study with two parallel groups. Between June 2006 and March 2007, we screened 129 women attending our Menopause unit. Middle class Caucasian women with surgical or natural menopause (1-year amenorrhea, FSH > 40 mIU/mL) were eligible. Other requirements were mild estrogen deficiency symptoms and healthy condition, as shown by medical history and by clinical and analytical examination. After informed consent, 100 were selected and divided into two groups, treatment [Remifemin® (bulk batch number 622992), 40 mg/day, 50 women, average age 55.3 years] and untreated control (50 women, average age 55.5 years). Remifemin is composed of tablets containing 2.5 mg of the rootstock extract (propan-2-ol at a concentration of 40%, V/V) of CR, with drug-extract-ratio of 6–11:1, corresponding to 20 mg of herbal drug.

In the treated group, 45 women completed the 6 months of the study, 3 women abandoned, and 2 women were lost to follow up. In the control group the corresponding figures were 37, 10, and 4 women. The reported reasons for discontinuation were fear of the possible risks associated with treatment (2 women) and migraine (1 woman) in the treated group, and request for effective treatment (8 women) and loss of interest in continuing (1 woman) in the control.

Fasting samples of blood were taken at the beginning and at the completion of the 3rd and the 6th month. Basic biochemical parameters and lipid profile were measured by enzymatic methods (autoanalyzer AU-5000 Olympus). Commercial immunoassays were used to measure E₂, FSH, and IL-6. The intra- and inter-assay coefficients of variation were lower than 10%. To minimize variation, samples from the same woman were tested in the same run.

The production of prostacyclin was assayed as previously described [2]. Briefly, serum from women was added to HUVEC and the concentration of 6-keto-prostaglandin F_{1α}, the stable hydrolysis product of prostacyclin, was assessed in triplicate by EIA (Cayman Chemical Ann Arbor, MI, USA). The three samples from the same woman were tested in the same run against the same batch of HUVEC cells.

Repeated measures analysis of variance was used to determine the effects of 'type of treatment' and 'time' (baseline and after 3 and 6 months treatment) variables. Significance was defined as $P \leq 0.05$.

Both groups were comparable concerning clinical and biochemical values, and no abnormality was detected in the subsequent 3-month and 6-month time-points. Table 1 presents the lipid and hormonal parameters in each group. There were no differences between groups for either IL-6 or 6-keto-prostaglandin F_{1α} at baseline; mean IL-6 of the treated group was 1.9 pg/mL (95%

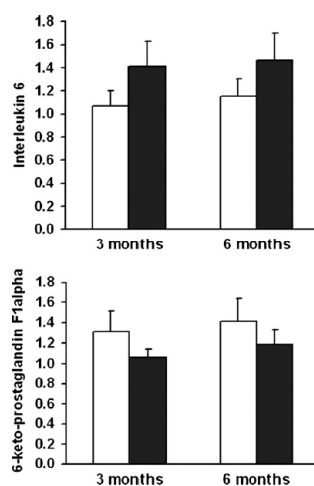


Fig. 1. Effects of isopropanolic extract of *Cimicifuga racemosa* on the serum levels of IL-6 (upper panel) and of serum from women having the extract on the 6-keto-prostaglandin F_{1α} levels produced by HUVEC (lower panel). The data represent the mean \pm SEM and are expressed as the ratio to their corresponding baseline values (1 in both cases by definition, not shown in the figure). White boxes: untreated control. Black boxes: treatment with *Cimicifuga racemosa*.

Table 1

Values [mean (95% confidence intervals)] obtained at each time-point for hormonal and lipid parameters.

	NT (n = 37)			iCR (n = 45)		
	Baseline	3 months	6 months	Baseline	3 months	6 months
Estradiol (pg/mL)	14.4 (10.6–18.1)	14.9 (11.6–18.1)	15.6 (11.6–19.5)	17.9 (13.4–22.4)	12.22 (8.3–16.2)	15.8 (5.9–25.8)
FSH (mIU/mL)	74.0 (61.9–86.0)	78.4 (67.5–89.3)	74.9 (61.8–87.99)	68.4 (58.1–78.7)	69.3 (58.2–80.4)	68.4 (56.4–80.3)
Cholesterol (mg/dL)	224.2 (210.8–237.6)	232.9 (218.8–247.1)	224.6 (210.1–239.1)	219.5 (209.8–229.2)	225.1 (212.8–237.3)	222.1 (212.7–231.6)
HDL (mg/dL)	64.8 (59.6–69.9)	65.5 (60.8–70.3)	64.4 (59.3–69.5)	56.8 (53.3–60.3)	58.2 (53.1–63.3)	56.3 (51.8–60.7)
LDL (mg/dL)	140.1 (129.5–150.6)	146.2 (134.1–158.3)	139.8 (128.3–151.3)	141.1 (132.5–149.7)	141.3 (126.2–156.4)	143.2 (134.5–151.9)
Triglycerides (mg/dL)	96.2 (82.5–109.9)	105.7 (89.8–121.6)	102.3 (85.7–119.0)	104.9 (91.8–118.0)	109.0 (89.6–128.5)	103.9 (88.1–119.8)

NT: no treatment; iCR: isopropanolic extract of *Cimicifuga Racemosa*; FSH: follicle-stimulating hormone; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein.

CI 1.4–2.5) versus 2.0 pg/mL (95% CI 1.4–2.6) in the controls, mean protein of 6-keto-prostaglandin F_1 levels in the treated group was 3.2 ng/mg (95% CI 2.6–3.9) versus 3.1 ng/mg (95% CI 2.5–3.8) in the controls. This lack of statistical difference was maintained at the subsequent time-points (Fig. 1), although this conclusion may be limited by the 31% statistical power of our analysis. Moreover, there were not significant differences either when levels at each time-point were compared with baseline.

In conclusion, serum from women treated with iCR had neutral effects on prostacyclin or IL-6 production by HUVEC. The implications are of interest given the slight estrogenic activity exhibited by a different, ethanolic extract of CR [3].

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

The authors are indebted to Mrs. Rosa Aliaga and Mrs. Elvira Calap for their excellent technical assistance, Grants GV05/141, AP-077/08, and EVES 045/2007 from Generalitat Valenciana (Valencia, Spain), FIS 06/154 from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, Madrid, Spain) and Red HERACLES RD06/0009 from Instituto Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo; Madrid, Spain) supported this work. MAG-P is a recipient of a research contract from Fondo de Investigación Sanitaria - Consellería de Sanitat (Generalitat Valenciana).

References

- [1] NIH NCI/CAAM. HERBS at a Glance. Black Cohosh. Web. July 2005, updated March 2008. <http://nccam.nih.gov/health/blackcohos> (accessed on December 19th, 2008).
- [2] García-Martínez MC, Hermenegildo C, Tarín JJ, Cano A. Phytoestrogens increase the capacity of serum to stimulate prostacyclin release in human endothelial cells. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:705–10.
- [3] Jarry H, Metten M, Spengler B, Christoffel V, Wuttke W. In vitro effects of the *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055. *Maturitas* 2003;44 Suppl. 1:531–8.

Begoña Pineda^a
Miguel Angel García-Pérez^a
Francisco Vázquez^b
María Dolores Juliá^c
Juan J. Tarín^d
Carlos Hermenegildo^{d,e}
Antonio Cano^{d,f}

^aResearch Foundation, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

^bClínica de Ginecología CEOGA, Lugo, Spain

^cService of Gynecology, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

^dDepartment of Functional Biology and Physical Anthropology, University of Valencia, Spain

^eDepartment of Physiology, University of Valencia, Spain

^fDepartment of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, Spain

*Corresponding author at: Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, Facultad de Medicina, Av. Blasco Ibáñez, 15, 46010 Valencia, Spain. Tel.: +34 96 398 30 87; fax: +34 96 386 48 15

E-mail address: antonio.cano@uv.es (A. Cano)

3 April 2008

doi:10.1016/j.ejogrb.2009.01.009

Extrarenal Wilms' tumor of the uterus with ovarian dermoid cyst

Dear Editor,

We encountered a rare clinical entity when a 16-year-old girl who had not yet had intercourse presented with weight loss, abdominal pain, and vaginal bleeding that had lasted for six months. The patient did not permit a vaginal examination. Rectal examination revealed an approximately 6- to 7-cm fixed palpable mass with a firm consistency on the lower middle abdomen and a semi-palpable mass, probably with a cystic component, in the area of the right ovary. Computed thoracic and abdominal tomography (CT) were normal with no evidence of renal or retroperitoneal masses. Pelvic CT revealed an 8-cm × 7-cm pelvic mass pervading the midline structures and concealing the uterine margins with some extension through the uterine cervix, frontward displacement of the urinary bladder and a cystic lesion in the right ovary. Exploratory laparotomy clarified that the solid mass displacing the urinary bladder was located in the corpus uteri extending through the isthmus and parametrial soft tissues. The ligamentum rotundum and sacrouterine ligament were bilaterally thickened. Because caudal borders were not clearly discriminated, subsequent to her family's informed consent, vaginal examination disclosed a fragile necrotic tumor with hemorrhage filling the upper vaginal half, infiltrating the ectocervix, and covering up the external os. Multiple biopsies were taken from the upper vaginal segment, isthmus, and sacrouterine ligament; the cyst in the right ovary was also excised. Frozen section diagnosis was a "malignant small round cell tumor" with a comment that paraffin sections were required for definite histological diagnosis. The case was considered inoperable.

Final microscopic examination revealed a mixture of primitive epithelial, mesenchymal, and blastemal components in an organoid configuration (Fig. 1). The epithelial components consisted of tubular and papillary structures lined by columnar or cuboidal cells. Small cells with ovoid, dark nuclei and scant cytoplasm generated nests of primitive blastema. The stroma was composed of unspecified sarcomatoid spindle cells with dispersed foci of rhabdoid differentiation against a myxomatous background with no anaplastic features.

Immunohistochemically, vimentin was positive in blastemal and mesenchymal components, and desmin and pan-keratin were focally expressed in mesenchymal and epithelial components, respectively. The tumor was diagnosed as an extrarenal

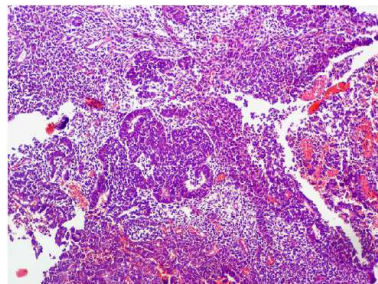


Fig. 1. Triphasic pattern consisting of blastema combined with epithelial structures and stromal elements (H&E, ×200).

The Asn19Lys Substitution in the Osteoclast Inhibitory Lectin (OCIL) Gene is Associated with a Reduction of Bone Mineral Density in Postmenopausal Women

Begoña Pineda · Paz Laporta · Antonio Cano · Miguel Angel García-Pérez

Received: 16 October 2007 / Accepted: 8 April 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract Osteoclast inhibitory lectin (OCIL) is a newly recognized inhibitor of mouse and human osteoclast differentiation whose cellular expression is similar to that of receptor activator of nuclear factor κ B (RANKL). The main objective of the present work was to elucidate whether naturally occurring single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in this gene could be associated with bone mass in postmenopausal women. To that end, we studied the association of bone mineral density (BMD) measured by dual-energy X-ray absorptiometry with two nonsynonymous SNPs in the *OCIL* gene resulting in Asn19Lys and Leu23Val substitutions in a population of 500 postmenopausal Spanish women. A weak association was detected for Asn19Lys SNP with femoral neck (FN) BMD and lumbar spine (LS) BMD in the whole population. When the population was stratified by age, however, the association was strong in older women (≥ 53 years). Thus, in this group of participants, women with *CG/GG* genotype displayed reductions of 5.6% and 6.7% in FN

BMD and LS BMD adjusted by age and body mass index (BMI), respectively, compared to women with *CC* genotype. The Asn19Lys SNP alleles explained about 7% of BMD variance in older women but only 1.7–3.9% in the whole population in regression models including age and BMI. In conclusion, women with a lysine (*GG* genotype) at position 19 of the OCIL protein displayed lower BMD at femoral neck and at lumbar spine sites than women having an asparagine residue. Since the OCIL protein inhibits osteoclast differentiation, this amino acid substitution could have consequences for OCIL functionality.

Keywords Osteoporosis · Genetic polymorphism · Bone mineral density · *OCIL* gene

Osteoporosis is a skeletal disorder characterized by compromised bone strength and increased risk of fracture. Bone mineral density (BMD) is used in diagnosis because this parameter accounts for approximately 70% of bone strength [1, 2]. Despite the involvement of environmental factors in the pathogenesis of osteoporosis, genetic factors are determinant because twin and family studies suggest that they account for about 50–85% of the variance in BMD [3, 4].

Osteoclasts and osteoblasts are capital actors in bone remodelling, but other cells, such as endothelial, stromal, osteocyte, or T cells, also participate [5]. Osteoclasts are derived from hematopoietic stem cells of the monocyte-macrophage lineage, which also produces monocytes and macrophages. Interaction of receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL, also known as tumor necrosis factor related activation-induced cytokine (TRANCE)) on the osteoblast surface with RANK on osteoclast precursors or mature osteoclasts is a necessary step to initiate osteoclastogenesis or osteoclast activation [5].

B. Pineda · M. A. García-Pérez
Research Foundation, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

P. Laporta
Clinical Biochemistry Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

A. Cano
Department of Pediatrics, Obstetrics, and Gynecology, University of Valencia, Valencia, Spain

M. A. García-Pérez
Department of Genetics, University of Valencia, Valencia, Spain

M. A. García-Pérez (✉)
Fundación para la Investigación, Hospital Clínico Universitario, Av. Blasco Ibáñez, 17, 46010 Valencia, Spain
e-mail: migarpe@uv.es

Osteoclast inhibitory lectin (*OCIL*), also known as lectin-like transcript 1 (*LLT1*) and C-type lectin domain family 2, member D (*CLEC2D*, official name), is a type II C-type lectin that binds natural killer (NK) cell-associated receptor *Nkrp1d* (*CD161*) and sulfated glycosaminoglycans [6, 7]. The *OCIL* gene is expressed by several cell types found in bone (osteoblasts, among others) and encodes for a protein that inhibits mouse and human osteoclast differentiation [6, 8]. *OCIL* cellular distribution was identical to that of *RANKL*, an indication suggesting that the *RANKL*/osteoprotegerin (*OPG*) axis may be further influenced by *OCIL* family members [8]. In addition, *OCIL*/*CD161* interaction in the presence of a signal through the T-cell receptor has been shown to enhance production of interferon- γ [9], a bone antiresorptive cytokine, by T cells [10]. Human *OCIL* mRNA expression is upregulated by interleukin-1 α and prostaglandin E₂ (*PGE*₂) in a time-dependent manner but not by dexamethasone or 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [11]. In addition to its capacity to limit osteoclast formation, *OCIL* was able to inhibit bone resorption by mature, giant cell tumor-derived osteoclasts [11]. Moreover, *OCIL* has been demonstrated to inhibit osteoblast differentiation and function *in vitro* [12].

Given the *OCIL* function and its similar location to *RANKL*, we hypothesized that the various nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms (SNPs) described in the *OCIL* gene sequence might affect bone metabolism. To that end, we studied the association of two nonsynonymous SNPs resulting in Asn19Lys and Leu23Val substitutions with BMD in a population of 500 postmenopausal Spanish women.

Materials and Methods

Subjects

Five hundred consecutive unselected postmenopausal women, all of Spanish ancestry, were recruited from the population regularly demanding health-care services at our Menopause Unit, a center that covers an urban middle-class population. Healthy women with natural menopause, defined by at least 1 year of amenorrhea and a follicle-stimulating hormone (FSH) level above 40 IU/mL, or surgical menopause were eligible. Women taking drugs affecting bone mass or with non-Spanish ancestry were excluded from the study. The local ethics committee approved the protocol, and written informed consent was obtained from all women in accordance with regulations of the Research Foundation and Ethics Committee of our center.

Anthropometric and Biochemical Measurements

Age, height, weight, and tobacco consumption were recorded in all participants. Body mass index (BMI) was

calculated for each subject as the ratio between weight (kg) and height (m²).

Basal blood samples were obtained for biochemical measurement of hormones and metabolites and to obtain DNA. Blood was collected at 0800–1000 hours after an overnight fast and allowed to clot. Then, the serum was separated and kept at -70°C until analysis. Most participants (>85%) were assayed for levels of carboxy-terminal telopeptides of collagen I (CTx) by electrochemiluminescence (E170 Modular Analyzer; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and those of total alkaline phosphatase (ALP), FSH, and 17 β -estradiol by routine methods [13, 14].

In addition, in a random sample of 250 women we assayed intact parathyroid hormone (PTH) [13, 14] and 25-hydroxycholecalciferol (vitamin D₃) by electrochemiluminescence (DiaSorin, Madrid, Spain), serum bone-specific ALP by immunoradiometric assay (Tandem R-Ostase; Hybritech Europe, Liege, Belgium), and osteoprotegerin (*OPG*) and *RANKL* by enzyme-linked immunosorbent assay (Bender MedSystems, Vienna, Austria). The intra- and interassay coefficients of variation (CVs) for these methods were <8%.

Bone Density Measurements

Measurements of BMD were performed at the lumbar spine from L2–L4 (LS BMD) and at the nondominant proximal femoral neck (FN BMD) with the use of a dual-energy X-ray absorptiometric (DEXA) system (Norland XR-36; Norland Medical Systems, Fort Atkinson, WI) in all participants. The CV was <1% for LS and <1.2% for FN (based on hydroxyapatite phantom). Norland 2.3 software was used for data acquisition and analysis. BMD was calculated by the software program and presented as grams per centimeter squared. The *Z* and *T* scores were the number of standard deviations (SDs) that a given measurement differed from the mean for a sex- and age-matched population and for a normal young adult reference population of Spanish ancestry, respectively.

SNPs and Genotyping

The *OCIL* gene maps to human chromosome 12 at the 12p13 region, spans about 27 kb, and contains six exons. In agreement with the dbSNP database (National Center for Biotechnology Information [NCBI]), there are 147 SNPs in *OCIL* and in the surrounding regions. Among them, there are only three SNPs located in the translated region of the gene, of which two are nonsynonymous SNPs. For the rest, six of them map to the 3'-untranslated region but without published heterozygosity, and most of the other SNPs are located in the six introns and regions near the gene.

We selected the two nonsynonymous SNPs located at exon 1 (C > G, Asn19Lys, rs16914640) and at exon 2 (C > G, Leu23Val, rs376402). These SNPs were chosen because they conform with two properties; firstly, they are SNPs with predictable changes in OCIL protein sequence and, secondly, they exhibit adequate heterozygosity (0.243 for Asn19Lys and 0.418 for Leu23Val in our population).

Blood samples were collected in tubes containing disodium-EDTA as anticoagulant and stored at 4°C until extraction. Genomic DNA was isolated from nucleated cells after red blood cell lysis with ammonium chloride (10 mM KHCO₃, 150 mM NH₄Cl, 0.1 mM EDTA-Na₂, pH 7.4) with a genomic DNA extraction kit (REAL; Durriz, Valencia, Spain) according to the manufacturer's instructions. The product gave a 260/280 absorbance ratio of 1.6–2.0, indicating high-quality DNA.

Genotyping of SNPs was performed by allelic discrimination using the TaqMan[®] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) according to the protocol provided by the manufacturer. Briefly, 20 ng of genomic DNA was amplified on 96-well plates in the presence of 1 x TaqMan probe assay and 1 x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Allelic discrimination was performed using 7900 HT thermocycler software. Reproducibility was estimated by re-genotyping 5–7% of samples in each plate and was >99%. About 0.5% of the genotypes were ambiguous and samples had to be re-genotyped.

Statistical Analysis

The entire statistical analysis was carried out using the Statistical Package for Social Sciences for Windows (version 14.0; SPSS, Inc., Chicago, IL). Fixed-effects designs of analysis of variance (ANOVA) were used for comparisons of means. If the ANOVA was significant, Dunnett's test was applied to perform post hoc pairwise comparisons at $\alpha = 0.05$. Levene's test was used to test the homogeneity of variance for each dependent variable across all level combinations of the between-subject factors. The frequency distribution of genotypes was compared using cross-tabulation and standard χ^2 tests. Allele frequencies and the existence of Hardy-Weinberg equilibrium were tested with Haploview 3.2 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) [15]. Haplotype reconstruction was performed using PHASE 2.1 software (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>) [16, 17], and haplotype frequencies >0.75 were computed for analysis. Differences in BMD between different OCIL genotypes were tested by analysis of covariance and regression analysis after adjustment for age and BMI. In multivariate models, the proportion of BMD variance explained by each

factor was estimated as the difference between the r^2 coefficient obtained including that factor in the model and the r^2 obtained after removing the factor. Sample size and power estimation were done by QUANTO software (<http://www.hydra.usc.edu/GxE/>) [18]. We estimated a sample size of 520 women as sufficient to attain a 90% power to detect a gene effect at least 2% of BMD variance, according to reported allele frequencies for Asn19Lys SNP. All analyses were two-tailed, and values shown in the text and tables are means \pm SD and frequencies, unless specified otherwise. Significance was defined as $P < 0.05$.

Results

Allele frequencies for G alleles were 14.0% and 31.0% for Asn19Lys and Leu23Val SNPs, respectively. Genotype frequencies were CC 73.8%, CG 23.6%, and GG 2.5% for Asn19Lys SNP and CC 48.4%, CG 41.6%, and GG 10.0% for Leu23Val SNP. These distributions are consistent with Hardy-Weinberg equilibrium, and the two SNPs were in weak linkage disequilibrium ($D' = 0.82$, $\chi^2 = 22.9$, $P = 0.00013$).

A preliminary study by means of ANOVA detected suggestive associations of SNP rs16914640 (C > G, Asn19Lys) with LS BMD ($P = 0.057$) and with FN BMD ($P = 0.108$). Given the low frequency of the GG genotype for Asn19Lys SNP, CG and GG genotypes were combined. The characteristics of the study population are summarized in Table 1. There were no significant differences between Leu23Val SNP genotypes for the variables examined. This varied in the case of the Asn19Lys SNP, where the genotype CG/GG displayed significantly lower FN BMD and OPG levels than the CC genotype ($P < 0.05$). Moreover, a trend for lower LS BMD was detected for the CG/GG genotype compared with the CC genotype ($P = 0.059$, ANOVA).

Since weak associations of Asn19Lys SNP with BMD were detected (ANOVA) in the whole population, we explored whether a more discriminative analysis might bring to light a stronger link. Preliminary regression analyses revealed age as the more potent factor associated with genotype and BMD. Consequently, we explored whether the segmentation of the population according to the median age (53 years) might more adequately disclose the potential association of the Asn19Lys SNP with BMD (Table 2). Values for weight, height, BMI, tobacco use, and biochemical parameters were similar between genotypes in younger (<53 years) and older (≥ 53 years) women, except for age in young women (CC women, 48.2 years; CG/GG women, 49.2 years; $P = 0.046$). We detected, however, a significant association of Asn19Lys alleles with BMD in the subgroup of older women (≥ 53 years). Thus, women

Table 1 Anthropometric and biochemical characteristics of subgroups of women according to genotype

	Asn19Lys			Leu23Val			<i>P</i>
	<i>CC</i> (370)	<i>CG/GG</i> (130)	<i>P</i>	<i>CC</i> (242)	<i>CG</i> (208)	<i>GG</i> (50)	
Age (years)	53.0 (53.0–54.0)	53 (52–55)	0.342	53.0 (52.0–55.0)	53.0 (53.0–54.0)	53.0 (52.0–56.0)	0.900
Weight (kg)	65.9 ± 10.3	65.6 ± 11.3	0.818	66.0 ± 10.3	65.3 ± 10.7	67.9 ± 11.6	0.306
Height (cm)	157.0 ± 5.9	157.0 ± 6.6	0.955	157.7 ± 6.3	156.3 ± 6.0	156.6 ± 4.7	0.063
BMI (kg/m ²)	26.8 ± 4.2	26.6 ± 4.0	0.624	26.6 ± 4.0	26.8 ± 4.1	27.7 ± 4.6	0.212
Smoking (%)	22.5	25.2	0.533	22.5	24.2	19.6	0.783
Estradiol (pg/mL)	14.0 (13.0–15.5)	15.1 (13.1–16.3)	0.921	14.3 (12.8–15.9)	13.4 (11.3–15.8)	14.3 (13.1–18.1)	0.637
FSH (U/L)	79.9 ± 33.4	75.8 ± 28.8	0.221	79.1 ± 32.1	80.6 ± 32.6	74.0 ± 31.9	0.452
CTx (ng/mL)	0.42 (0.37–0.45)	0.42 (0.38–0.47)	0.659	0.44 (0.37–0.47)	0.41 (0.38–0.45)	0.44 (0.29–0.49)	0.572
Total ALP (U/L)	174.4 ± 47.3	172.5 ± 44.4	0.720	171.8 ± 47.9	175.4 ± 45.1	170.8 ± 35.5	0.717
Bone ALP (µg/L)	12.1 ± 5.8	10.5 ± 5.1	0.137	12.0 ± 6.4	11.5 ± 5.0	11.1 ± 5.2	0.825
Intact PTH (pg/mL)	42.2 (37.7–46.3)	38.6 (34.4–45.1)	0.227	39.1 (37.4–46.3)	41.5 (37.3–46.2)	41.5 (29.3–47.2)	0.403
Vitamin D ₃ (ng/mL)	29.9 ± 12.5	31.8 ± 14.0	0.459	30.4 ± 12.5	29.9 ± 11.3	32.8 ± 14.1	0.710
RANKL (pg/mL)	27.6 ± 13.7	30.2 ± 11.0	0.282	29.9 ± 14.4	26.8 ± 12.5	26.6 ± 9.0	0.327
OPG (pg/mL)	91.6 (82.7–99.1)	76.9 (63.8–107.8)	0.048	82.7 (78.2–99.2)	86.3 (75.9–106.5)	91.4 (58.1–108.6)	0.806
BMD (g/cm ³)							
LS	1.000 ± 0.152	0.970 ± 0.163	0.059	0.998 ± 0.157	0.991 ± 0.158	0.989 ± 0.161	0.870
FN	0.802 ± 0.122	0.776 ± 0.124	0.045	0.799 ± 0.126	0.791 ± 0.122	0.799 ± 0.103	0.790

Values are means ± SD if the variable was normally distributed or the median (95% confidence interval) if it was not. Number of women is shown in parentheses

Table 2 Densitometric data stratified according to age (<53, ≥53 years) and Asn19Lys SNP genotype

	Younger (<53 years)			Older (≥53 years)		
	<i>CC</i> (177)	<i>CG/GG</i> (63)	<i>P</i>	<i>CC</i> (193)	<i>CG/GG</i> (67)	<i>P</i>
Femoral neck						
BMD (g/cm ²)	0.826 ± 0.112	0.831 ± 0.121	0.80	0.779 ± 0.128	0.725 ± 0.102	0.0031
<i>T</i> score	−0.691 ± 0.974	−0.669 ± 1.001	0.88	−1.094 ± 1.060	−1.542 ± 0.847	0.0032
<i>Z</i> score	−0.108 ± 0.986	−0.019 ± 1.029	0.55	0.001 ± 1.030	−0.355 ± 0.772	0.015
Lumbar spine						
BMD (g/cm ²)	1.018 ± 0.144	1.030 ± 0.155	0.55	0.977 ± 0.162	0.904 ± 0.140	0.0029
<i>T</i> score	−0.912 ± 1.363	−0.812 ± 1.469	0.63	−1.274 ± 1.509	−1.961 ± 1.315	0.0025
<i>Z</i> score	−0.359 ± 1.296	−0.154 ± 1.288	0.29	−0.016 ± 1.323	−0.631 ± 1.146	0.002

Values are means ± SD. Number of women is shown in parentheses

with *CG/GG* genotype displayed significantly lower LS BMD ($P = 0.0029$) and FN BMD ($P = 0.0031$). The corresponding values for *T* and *Z* scores reproduced the same pattern for both sites, with more negative values for women with *CG/GG* genotype. Figure 1 shows adjusted BMD by age and BMI in older women (≥53 years) according to Asn19Lys SNP genotypes. The difference between individuals with *CG/GG* and *CC* genotypes was 5.6% at FN and 6.7% at LS.

In multiple regression models, the BMD variance explained by Asn19Lys genotypes was 1.7% at FN and 3.9% at LS for the whole population and 6.8% at FN and

7.2% at LS for older women (≥53 years). Regression analysis of age- and BMI-adjusted BMD showed significant associations of Asn19Lys genotypes with LS BMD ($P = 0.0058$) and FN BMD ($P = 0.012$), although given the small number of women homozygous for the *G* allele, we could not test the existence of a gene-dosing effect.

Inferred haplotype frequencies from the analysis of the *OCIL* gene SNPs rs16914640 and rs376402 were 0.543 for *CC*, 0.311 for *CG*, 0.141 for *GC*, and 0.005 for *GG* haplotypes. ANOVA using common haplotypes (*CC*, *CG*, and *GC*) for the whole population showed a weak association of haplotypes with BMD (FN $P = 0.079$, LS $P = 0.035$)

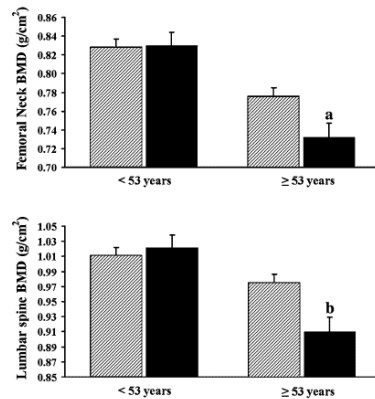


Fig. 1 FN and LS BMD adjusted by age and BMI in younger (<53 years) and older (≥53 years) women according to Asn19Lys SNP genotype. *Dashed bars*, CC genotype; *solid bars*, CG/GG genotypes. Values are means ± SEM. ^a*P* = 0.012, ^b*P* = 0.0058 with respect to CC genotype in the same age group

with women with the CC haplotype showing higher BMD. When the population was segmented by age (<53 or ≥53 years), we detected an association of haplotypes with BMD at both FN (*P* = 0.032) and LS (*P* = 0.0027) for older, but not for younger, women. The association of major haplotypes with BMD is shown in Fig. 2 for older women (≥53 years).

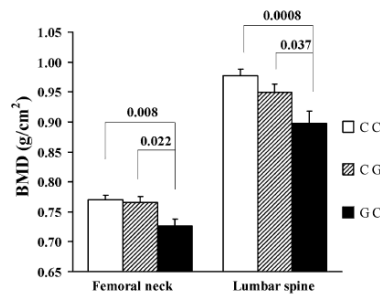


Fig. 2 FN and LS BMD (mean ± SEM) in older women (≥53 years) with common haplotypes of *OCIL* and *P* values after Dunnett's test with adjustment for multiple comparisons

Discussion

The data of the present study show an association of the polymorphism Asn19Lys (*C* > *G*, rs16914640) located in exon 1 of the *OCIL* gene with BMD in a population of Spanish postmenopausal women. Women with the *CG/GG* genotype displayed, in multivariate models adjusted by age and BMI, decreases of 5.6% in FN BMD and 6.7% in LS BMD, with respect to women with the *CC* genotype. The low number of individuals with the *GG* genotype (frequency 2.5%) did not allow us to analyze them as a separate group. This SNP explained about 7.0% of the BMD variance in older women (≥53 years).

The Asn19Lys SNP, however, did not associate with BMD in the younger (<53 years) subgroup of women. Given the number of participants in our study, our analysis reached a statistical power of 94% (to detect an effect of genotype of 2% of BMD variance), which decreased to 70% when the population was divided into two groups. Despite this reduction in statistical power, our data significantly indicated that Asn19Lys SNP was related to bone mass in this group of women. The association with the older group suggests that the Asn19Lys SNP gains relevance in the second half of life, once the peak of bone mass has been reached and bone remodeling becomes the main process for bone cells [19]. This hypothesis acquires meaning in the context of the function of the *OCIL* protein as an inhibitor of osteoclastic differentiation and function [6, 11].

This is, to our knowledge, the first description of an association of genetic polymorphisms in this gene with a human quantitative trait like bone mass. A limitation of the present study, however, is that our population was composed only of postmenopausal women, although it was heterogeneous regarding age and bone status. It might be worth testing whether the association between the Asn19Lys SNP and bone mass is also present in men since it was strongly dependent on age. Another potential limitation of our study is that, despite the importance of vitamin D₃ status, we could not use it as a covariate in linear regression studies due to the lack of this information in some participants. However, we think that our analysis is robust since it was adjusted for age and BMI, probably the two main confounders when analyzing BMD.

The association with BMD was only detected for the Asn19Lys SNP, and not for Leu23Val SNP, despite the fact that both SNPs are in linkage disequilibrium, though not so strong (*D'* = 0.82, χ^2 = 22.9), probably due to considerable distance among them (11,105 bp; according to the NCBI database, Build 36). In agreement with this weak linkage disequilibrium, haplotypic analysis was not much more informative than single-locus analysis. Women with the *CC* or *CG* haplotype displayed better bone parameters

than women with the GC haplotype but only in the older group (Fig. 2). Data seemed to indicate that the presence of a G in rs16914640 SNP (C > G, Asn19Lys), which is the allele for lysine, implied worse bone parameters.

According to the NCBI database, there are two main human OCIL protein isoforms, both displaying an asparagine residue at position 19 and a leucine at position 23 of the protein sequence [11]. We used the PolyPhen server (<http://www.bork.emblheidelberg.de/PolyPhen>) [20], which combines structure- and sequence-based prediction, for prediction of the phenotypic consequences of two SNPs on the OCIL protein. The PolyPhen server predicted that both SNPs are benign and therefore did not alter protein phenotype. However, the phenotype was estimated only by alignment of sequences and not by structure data and, specifically for Asn19Lys SNP, the software assigned a big value for position-specific independent counts. This indicates that the studied substitution is rarely or never observed in the protein family and, therefore, one can expect a poor prediction. Regarding Leu23Val SNP, leucine 23 is conserved in human and murine OCIL proteins and in the murine OCIL-related protein (mOCILrP1) [8]. The substitution of Leu 23 by Val should not cause large structural changes in the protein, given the similar physicochemical characteristics of the two amino acids. In addition, another murine OCIL-related protein (mOCILrP2) possesses in this position a valine, demonstrating that this substitution is tolerated.

In conclusion, the present work describes a strong association of a nonsynonymous SNP (Asn19Lys) with BMD in women ≥ 53 years old. This particular age-dependent association should be related to the inhibitory effect of the OCIL protein on osteoclastic differentiation and function. Although we do not have data on this, it is possible that if the change of Asn 19 by Lys causes some functional loss in the OCIL protein, this effect is only apparent during the specific bone metabolic traits of older age.

Acknowledgements The authors are indebted to Ms. Rosa Aliaga and Ms. Elvira Calap for their excellent technical assistance. This work was supported by grants PI060154 from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, Madrid, Spain) and AP-024/07 from Conselleria de Sanitat and 045/2007 from EVES (Generalitat Valenciana). M. A. G.-P. is a recipient of a research contract from FIS-Conselleria de Sanitat (Generalitat Valenciana).

References

1. Ammann P, Rizzoli R (2003) Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int* 14(Suppl 3):S13–S18
2. Turner CH (2006) Bone strength: current concepts. *Ann N Y Acad Sci* 1068:429–446
3. Ralston SH, de Crombrughe B (2006) Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev* 20:2492–2506
4. Ralston SH (2005) Genetic determinants of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 17:475–479
5. Garcia-Perez MA (2006) Physiological regulation of bone metabolism and estrogen agonism. In: Cano A, Calaf i Alsina J, Dueñas-Díez JL (eds) *Selective estrogen receptor modulators: a new brand of multitarget drugs*. Springer, Berlin, pp 159–184
6. Zhou H, Kartsogiannis V, Hu YS, Elliott J, Quinn JM, McKinstry WJ, Gillespie MT, Ng KW (2001) A novel osteoblast-derived C-type lectin that inhibits osteoclast formation. *J Biol Chem* 276:14916–14923
7. Boles KS, Barten R, Kumaresan PR, Trowsdale J, Mathew PA (1999) Cloning of a new lectin-like receptor expressed on human NK cells. *Immunogenetics* 50:1–7
8. Zhou H, Kartsogiannis V, Quinn JM, Ly C, Gange C, Elliott J, Ng KW, Gillespie MT (2002) Osteoclast inhibitory lectin, a family of new osteoclast inhibitors. *J Biol Chem* 277:48808–48815
9. Aldemir H, Prod'homme V, Dumaurier MJ, Retiere C, Poupon G, Cazareth J, Bihl F, Braud VM (2005) Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol* 175:7791–7795
10. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T (2000) T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 408:600–605
11. Hu YS, Zhou H, Myers D, Quinn JM, Atkins GJ, Ly C, Gange C, Kartsogiannis V, Elliott J, Kostakis P, Zannettino AC, Cromer B, McKinstry WJ, Findlay DM, Gillespie MT, Ng KW (2004) Isolation of a human homolog of osteoclast inhibitory lectin that inhibits the formation and function of osteoclasts. *J Bone Miner Res* 19:89–99
12. Nakamura A, Ly C, Cipetic M, Sims NA, Vieusseux J, Kartsogiannis V, Bouralexis S, Saleh H, Zhou H, Price JT, Martin TJ, Ng KW, Gillespie MT, Quinn JM (2007) Osteoclast inhibitory lectin (OCIL) inhibits osteoblast differentiation and function in vitro. *Bone* 40:305–315
13. Garcia-Perez MA, Moreno-Mercer J, Tarin JJ, Cano A (2006) Similar efficacy of low and standard doses of transdermal estradiol in controlling bone turnover in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 22:179–184
14. Garcia-Perez MA, Moreno-Mercer J, Tarin JJ, Cano A (2004) Bone turnover markers and PTH levels in surgical versus natural menopause. *Calcif Tissue Int* 74:143–149
15. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265
16. Stephens M, Scheet P (2005) Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet* 76:449–462
17. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978–989
18. Gauderman WJ (2002) Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. *Am J Epidemiol* 155:478–484
19. Zaidi M (2007) Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 13:791–801
20. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S (2002) Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 30:3894–3900

Isopropanolic *Cimicifuga racemosa* is favorable on bone markers but neutral on an osteoblastic cell line

Postmenopausal women treated with an isopropanolic extract of *Cimicifuga racemosa* underwent a decrease in the urinary concentration of N-telopeptides, a marker of bone resorption, and an increase in alkaline phosphatase, a marker of bone formation, at the third month of therapy. Serum from treated women did not modify the activity of alkaline phosphatase or the expression of three genes, runt-related transcription factor-2 (Runx-2), alkaline phosphatase, and osteocalcin, when added to the MC3T3-E1 osteoblastic cell line. (Fertil Steril® 2009; 91:1347–50. ©2009 by American Society for Reproductive Medicine.)

There is no equivalent alternative to hormone therapy (HT) in the control of menopause symptoms. However, many symptomatic women do not take HT due to either reservations about potential harmful effects of hormones or poor tolerance of the side effects (1). A series of “natural” alternatives has been proposed; among them, *Cimicifuga racemosa* (CR), or black cohosh, has received attention.

The efficacy of CR in the correction of menopausal symptoms is a matter of debate (2). Differences in the composition of the extracts of CR might explain some of the discrepancies. Some investigators have claimed that the CR extracts may have some bone-sparing effects. There is direct density data in rodents (3) and information on changes in bone metabolic parameters in humans or human cell lines (4, 5). The protective effects of CR have been described in osteoblasts, with increased production of osteoprotegerin (5), and in osteoclasts, whose differentiation was inhibited (6).

Our study of the bone effects of an isopropanolic extract of CR (iCR) had two goals. First, we checked whether women taking the iCR preparation exhibited any changes in a panel of bone biochemical markers. Second, we used an osteoblastic cell line to explore whether serum from treated women was capable of stimulating the cellular function as well as the expression of three capital genes for bone formation: runt-related transcription factor-2 (Runx-2), alkaline phosphatase (ALP), and osteocalcin.

We conducted a 3-month prospective trial on a group of women with surgical or natural menopause, defined as amenorrhea ≥ 1 year and follicle-stimulating hormone (FSH) levels >40 IU/L. Forty-five women were treated with 40 mg/day of iCR (Remifemin; Schaper & Brümmer, Ringelheim, Germany), and 37 women participated as untreated controls. Caucasian origin and low level of menopausal symptoms were additional conditions for eligibility. In addition to the information obtained from their medical history, the women were considered healthy according to a basic as well as a complete gynecologic evaluation and a routine blood analysis. All were non-smokers, nondrinkers, and generally sedentary. Exclusion criteria were immobility, recent bone fractures (<1 year ago), or use of medication known to influence calcium metabolism. Compliance was checked with the use of diary cards.

Our investigation conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki, was approved by the institutional review board at our center, and written informed consent was obtained from all patients. At the beginning of the study and at the completion of the third month of the follow-up period, blood and urine samples were obtained (08:00 to 10:00 AM) after an overnight fast. Serum and urine were immediately frozen at -80°C until assay.

Serum was analyzed for routine biochemical parameters, including ALP and a complete lipid profile with an autoanalyzer (Olympus AV 5200; Olympus, Tokyo, Japan). Also in serum, intact parathyroid hormone (pg/mL) was measured by immunoradiometry (IRMA), and follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol, and testosterone were measured by specific immunoassays as previously described elsewhere (7, 8). Urine was analyzed for creatinine and total calcium with the use of the autoanalyzer Olympus AV 600 (Olympus). The urinary concentration of N-telopeptide of type I collagen (NTx) was measured by an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA), as previously described elsewhere (7).

Measurements of bone mineral density (BMD, g/cm^2) were performed at the lumbar spine from L2 to L4 (LS

Received January 14, 2008; revised and accepted March 17, 2008; published online June 13, 2008.

M.A.G. has nothing to disclose. B.P. has nothing to disclose. C.H. has nothing to disclose. J.J.T. has nothing to disclose. A.C. has nothing to disclose.

Supported by Grants FIS 06/154 from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, Madrid, Spain), Red HERACLES RD06/0009 from Instituto Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo; Madrid, Spain) and 045/2007 from Conselleria de Sanitat (Generalitat Valenciana, Valencia, Spain). M.A.G. is a recipient of a research contract from Fondo de Investigación Sanitaria, Conselleria de Sanitat (Generalitat Valenciana). Reprint requests: Antonio Cano, M.D., Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, Facultad de Medicina, University of Valencia, Av. Blasco Ibañez 17, 46010 Valencia, Spain (FAX: 34-96-3864815; E-mail: antonio.cano@uv.es).

BMD) and at the nondominant proximal femoral neck (FN BMD) with the use of a dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA) system (Norland XR-36; Norland Medical Systems Inc., Fort Atkinson, WI).

The mouse cell line MC3T3-E1 was used to clarify any effect of iCR extract on osteoblastic function. To that end, MC3T3-E1 cells were grown according to previously published conditions (9); when at 90% of confluence, serum from women was added to the medium. After 12 days of culture, the medium was removed, and ALP activity and protein content were measured in the supernatant from sonicated cells. To further confirm that we were using fully mature osteoblasts, a parallel series of experiments was performed in which MC3T3-E1 cells were treated with β -glycerophosphate (10 mM) and ascorbic acid (50 μ g/mL), two osteoblastic differentiation inducers. The activity of ALP was assayed in triplicate by a commercial kit (THERMO Electron Corporation, Louisville, KY) following the manufacturer's instructions.

Also in MC3T3-E1 cells, we used real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) to quantify the expression of three genes related with osteoblastic differentiation and function, Runx-2, ALP, and osteocalcin. The extraction of RNA as well as the reverse transcription procedure was performed as previously described (10). The primers used for the PCR reaction were glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) sense 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' and antisense 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'; Runx-2 sense 5'-CCG CAC GAC AAC CGC ACC AT-3' and antisense 5'-CGC TCC GGC CCA CAA ATC TC-3'; ALP sense 5'-GGT GAA CGG GAA AAT GTC TC-3' and antisense 5'-CTG GAC CTC TCC CTT GAG TG-3'; and osteocalcin sense 5'-CTC TCC TAC AAG AAC GGC AC-3' and antisense 5'-TCA CTA GCC AGA AAT CGG TGG-3'. Amplified PCR products were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide for visualization. The intensity of ethidium bromide-stained bands was quantified using the histogram function in Adobe PhotoShop version 7.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA) and was normalized with the glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene.

The statistical analysis was carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL) v 14.0 for Windows. Kolmogorov-Smirnov one-sample test was used to check whether variables were normally distributed. Fixed-effects (models with only fixed effects and the residual term) designs of analysis of variance (ANOVA) and Student's *t*-test were applied for comparisons of means of data. In addition to parallel comparisons between groups, effects on each participant were compared with her own baseline values. $P \leq .05$ was considered statistically significant.

The treatment was well tolerated, and no patient withdrew from the study due to adverse reactions. Basic clinical

data including age (55.5 ± 5.9 years in the treated group and 55.3 ± 5.1 years in the control), years since menopause (10.4 ± 5.3 vs. 8.5 ± 4.5 , respectively), and body mass index (26.8 ± 3.8 vs. 27.4 ± 4.2 kg/m², respectively) were comparable in both groups. Values for LS BMD and FN BMD were within the normal range for the age, and were similar in both groups. There were no differences between the groups for routine biochemical parameters, lipids or hormones (estradiol, testosterone, FSH, and parathyroid hormone) at each time-point of the study, or when values at 3 months were compared with baseline within each group.

The whole profile of the effects of iCR on bone is presented in Figure 1. Women treated with iCR exhibited statistically significant differences for NTx, which was decreased, and ALP, which was increased (panel A). No difference between groups was detected, however, for data obtained with the use of MC3T3-E1 cells. Moreover, ALP remained unchanged when cells were treated with serum alone or with serum plus β -glycerophosphate and ascorbic acid (panel B). Consistent with this data, there were no statistically significant changes in any of the three studied genes (Runx-2, ALP, or osteocalcin) when compared with the GAPDH constitutive gene (panel C).

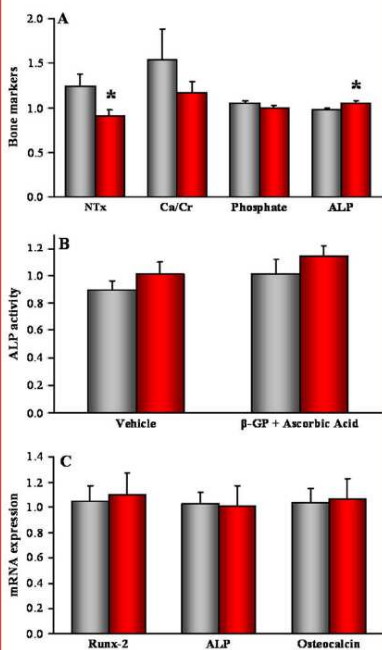
Our data confirm that the use of an iCR extract was well tolerated and did not alter analytical parameters. This neutrality included the lipid profile, in contrast to the recognized changes induced by oral estrogens. Moreover, the treatment was not associated with changes in the reproductive hormones FSH, testosterone, or estradiol.

The bone changes consisted of a dual protective effect, with reduction in the levels of NTx, an indicator of bone resorption, and increase in ALP, an indicator of bone formation. The mechanism used by the iCR extract to limit bone remodeling is unknown at present. Nevertheless, a recent experimental study has shed some light by showing that 25-acetylclimigenol xylopyranoside, a triterpenoid glycoside isolated from CR, potently blocks the osteoclastogenesis induced by either receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) or tumor-necrosis factor- α (6). Further information has been provided by another study in which an iCR extract increased the production of osteoprotegerin by cultured osteoblasts (5). The counterbalancing effects of osteoprotegerin on osteoclastogenesis might influence the reduction in the bone-remodeling activity observed in our study.

Experiments with MC3T3-E1 cells, an osteoblastic cell line, were designed to further clarify the mechanism used by the iCR extract. For this purpose, we used serum from women, a model whose advantage resides in that it most faithfully reproduces conditions similar to the physiologic environment (11, 12). In contrast to the changes in bone markers, there was no change in ALP activity. The use of RT-PCR to explore changes in the expression of genes

FIGURE 1

Effects of *Cimicifuga racemosa* on bone as reflected by changes in bone markers in women (panel A), or cell activity and gene expression (panels B and C, respectively) in the MC3T3-E1 osteoblastic cell line. The data represent the mean \pm standard error of the mean and are expressed as the ratio to their corresponding baseline values. White boxes: untreated control. Black boxes: treatment with *Cimicifuga racemosa*. NTx: N-telopeptide of type I collagen. Ca/Cr: calcium-creatinine ratio. ALP: alkaline phosphatase. β -GP: β -glycerophosphate. Runx-2: Runt-related transcription factor-2. * $P < .05$ when comparing both groups.



García-Pérez, Correspondence. *Fertil Steril* 2009.

involved in osteoblast differentiation and function gave a negative result as well. There is no clear explanation for the discrepancy with the bone markers data in women. Po-

tential hypotheses might include the murine origin of the cell line or the increased local concentrations of iCR metabolites on bone in vivo.

There has been some debate on whether some CR actions might be mediated by a hypothetical agonism on estrogen receptors (ER), but experiments exploring the affinity of an ethanolic extract concluded in a lack of affinity for either ER α or ER β . We have not performed specific experiments to discern whether there is any binding affinity of our isopropanolic extract on ER, but the poor modulation ability on bone metabolism as well as the lack of effect on the levels of FSH reduces support to this hypothesis. Similar findings have been reported by other investigators (13).

We detected biochemical changes consistent with a small protective effect of iCR against the increased bone loss that occurs after menopause. Experiments with a murine osteoblastic cell line did not confirm any effect on osteoblasts. We cannot discard that the outcome might be different with another CR preparation because the bands obtained with thin-layer chromatography do not overlap for the most common ethanolic and isopropanolic extracts (14).

Acknowledgments: The authors thank Rosa Aliaga, B.Sc. and Elvira Calap, B.Sc., for their excellent technical assistance.

Miguel Angel García-Pérez, Ph.D.^a
Begoña Pineda, B.Sc.^a
Carlos Hermenegildo, M.D., Ph.D.^{ab}
Juan J. Tarín, Ph.D.^c
Antonio Cano, M.D., Ph.D.^d

^aResearch Foundation, Hospital Clínico Universitario,
^bDepartment of Physiology, ^cDepartment of
Functional Biology and Physical Anthropology, and
^dDepartment of Pediatrics, Obstetrics and
Gynecology, University of Valencia, Valencia, Spain

REFERENCES

- Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA* 2002;288:872-81.
- Mahady GB. Black cohosh (*Actaea/Cimicifuga racemosa*): review of the clinical data for safety and efficacy in menopausal symptoms. *Treat Endocrinol* 2005;4:177-84.
- Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Pitzel L, Wuttke W. Effects of estradiol-17 β , testosterone and a black cohosh preparation on bone and prostate in orchidectomized rats. *Maturitas* 2005;51:177-86.
- Wuttke W, Gorkow C, Seidlova-Wuttke D. Effects of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) on bone turnover, vaginal mucosa, and various blood parameters in postmenopausal women: a double-blind, placebo-controlled, and conjugated estrogens-controlled study. *Menopause* 2006;13:185-96.
- Viereck V, Grundker C, Friess SC, Frosch KH, Raddatz D, Schoppert M, et al. Isopropanolic extract of black cohosh stimulates osteoprotegerin production by human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2005;20:2036-43.
- Qiu SX, Dan C, Ding LS, Peng S, Chen SN, Farnsworth NR, et al. A triterpene glycoside from black cohosh that inhibits osteoclastogenesis by modulating RANKL and TNF α signaling pathways. *Chem Biol* 2007;14:860-9.

7. García-Pérez MA, Moreno-Mercer J, Tarín JJ, Cano A. Similar efficacy of low and standard doses of transdermal estradiol in controlling bone turnover in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:179–84.
8. Oviedo PJ, Hermenegildo C, Tarín JJ, Cano A. Therapeutic dosages of raloxifene do not modify myeloperoxidase and F2 α -isoprostane levels in postmenopausal women. *Fertil Steril* 2005;84:1789–92.
9. Matsuzaki E, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Hirata M, Watanabe Y, Sato N, et al. Differentiation-inducing factor-1 alters canonical Wnt signaling and suppresses alkaline phosphatase expression in osteoblast-like cell lines. *J Bone Miner Res* 2006;21:1307–16.
10. García-Pérez MA, Del VR, Noguera I, Hermenegildo C, Pineda B, Martínez-Romero A, Cano A. Estrogen receptor agonists and immune system in ovariectomized mice. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006;19:807–19.
11. Mikkola T, Ranta V, Orpana A, Viinikka L, Ylikorkala O. Hormone replacement therapy modifies the capacity of plasma and serum to regulate prostacyclin and endothelin-1 production in human vascular endothelial cells. *Fertil Steril* 1996;66:389–93.
12. Oviedo PJ, Hermenegildo C, Tarín JJ, Cano A. Raloxifene promotes prostacyclin release in human endothelial cells through a mechanism that involves cyclooxygenase-1 and -2. *Fertil Steril* 2005;83:1822–9.
13. Liske E, Hanggi W, Henneicke-von Zepelin HH, Boblitz N, Wustenberg P, Rahlfs VW. Physiological investigation of a unique extract of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* rhizoma): a 6-month clinical study demonstrates no systemic estrogenic effect. *J Womens Health Gend Based Med* 2002;11:163–74.
14. Zierau O, Bodinet C, Kolba S, Wulf M, Vollmer G. Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80:125–30.

Common polymorphisms rather than rare genetic variants of the *Runx2* gene are associated with femoral neck BMD in Spanish women

Begoña Pineda · Carlos Hermenegildo ·
Paz Laporta · Juan J. Tarín · Antonio Cano ·
Miguel Ángel García-Pérez

Received: 21 January 2010 / Accepted: 14 March 2010
© The Japanese Society for Bone and Mineral Research and Springer 2010

Abstract RUNX2 is a transcription factor essential for osteoblast differentiation and skeletal morphogenesis. Its mutation creates cleidocranial dysplasia (CCD), a disorder characterized by skeletal abnormalities and bone mineral density (BMD) alterations. The purpose of the present study has been to clarify whether polymorphisms affecting this gene could be associated with changes in BMD in women. To that end, we performed an association study of BMD values from 776 women with two single nucleotide polymorphisms (SNPs) located at P2 promoter (-1025 T>C) and at exon 2 (+198 G>A), and with a deletion polymorphism (17Ala>11Ala), also located at exon 2. We found an association of -1025 T>C SNP with femoral neck BMD (FN-BMD), being the women of TC/CC genotype who have higher BMD than women of TT genotype ($P = 0.006$). This association was independent of age, weight, menopausal status, or hormone replacement therapy (HRT) use as shown

by regression analysis. When women of highest versus lowest quartile of BMD were compared, this association became more evident ($P = 0.002$), extending also to +198 G>A SNP (GA/AA women with higher FN-BMD; $P < 0.05$). In addition, we describe herein three novel rare variants in the polyglutamine domain of RUNX2 protein: an in-frame insertion and two deletions in exon 2, resulting in the insertions of 7 and deletions of 7 and 5 glutamines, respectively. These variants do not produce CCD, increased frequency of bone fracture, or BMD alterations. In conclusion, common polymorphisms in *Runx2* are associated with FN-BMD. Nevertheless, rare variants that modify the polyglutamine domain of RUNX2 neither have any effect on BMD nor produce the CCD phenotype. These results underscore the significance of polymorphisms in the 5'-region of *Runx2* in the determination of FN-BMD.

Keywords Osteoporosis · *Runx2* · Bone mineral density · Association · Alleles

B. Pineda · M. Á. García-Pérez (✉)
Research Foundation, Hospital Clínico Universitario,
Av. Blasco Ibáñez, 17, 46010 Valencia, Spain
e-mail: migarpe@uv.es

C. Hermenegildo
Department of Physiology, University of Valencia,
Valencia, Spain

P. Laporta
Clinical Biochemistry Service, Hospital Clínico Universitario,
Valencia, Spain

J. J. Tarín
Department of Functional Biology and Physical Anthropology,
University of Valencia, Valencia, Spain

A. Cano
Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology,
University of Valencia, Valencia, Spain

Introduction

Osteoporosis is a skeletal disease characterized by reduced bone mineral density (BMD) and increased risk of fragility fractures, which worldwide affects an elevated percentage not only of women but also of men [1]. Genetic factors have been recognized as playing an important role in the pathogenesis of osteoporosis, although, as a multifactorial disease, it is influenced by other parameters such as diet, physical activity, medication use, and lifestyle [1, 2]. According to the key role of genetic factors in the pathophysiology of postmenopausal osteoporosis, twin, family, and epidemiological studies have shown high heritability of BMD and other determinants of fracture risk, such as the

ultrasound properties of bone, skeletal geometry, and bone turnover [3, 4].

A proper selection of phenotype is mandatory in genetic studies of such complex or multifactorial pathologies as osteoporosis [3]. In the present work, we have analyzed the association of polymorphisms with BMD because this is the main predictor of bone fracture [5–7], being more independent than other phenotypes of nonrelated bone factors such as neurological disease or accidents [3]. Presently, given the advances in high-throughput genotyping methods, genome-wide association studies (GWAS) are being carried out in several populations to look for genes associated with BMD or bone fracture [8–10]. Nevertheless, this type of study, besides being extremely expensive, has low statistical power, and eventually explains but a very small percentage of the variation in BMD, although giving new insights into the genetics of complex disorders such as osteoporosis. In contrast, analysis of candidate genes selected according to their function and according to observed phenotypes in animal models or in spontaneous mutations in humans remains a valid approach [11].

Runt-related transcription factor 2 (*Runx2*) gene, also named Core-binding factor a1 (*Cbfa1*), meets all the conditions for study as a candidate gene in the genetics of postmenopausal osteoporosis. *Runx2* is a member of the RUNX family of transcription factors that encodes a nuclear protein with a Runt DNA-binding domain. RUNX2 contains a region of glutamine and alanine repeats in the N-terminal region (polyQ/polyA domain), the central Runt domain, and a C-terminal proline/serine/threonine-rich (PST) activation domain [12, 13]. RUNX2 is essential for osteoblastic differentiation and skeletal morphogenesis, as demonstrated in mice lacking the *Runx2* gene [14]. Mice homozygous for a mutation in *Runx2* die after birth without breathing and show complete lack of ossification of the skeleton, whereas heterozygous mice show specific skeletal abnormalities characteristic of cleidocranial dysplasia [15]. Cleidocranial dysplasia (CCD, OMIM 119600) is a rare autosomal-dominant disease characterized by hypo- or aplastic clavicles, open fontanelles, supernumerary teeth, and short stature [13]. The presence of heterozygous mutations in some CCD families advanced the conclusion that heterozygous loss of RUNX2 function is sufficient to produce CCD. To date, several mutations located at polyQ/polyA, PST, and mainly at the Runt domain, have been described [13, 16, 17]. The considerable phenotypic variability, nonetheless, has impaired a clear genotype–phenotype correlation [16, 17]. This phenotypic variability includes the full-blown phenotype plus osteoporosis to isolated dental anomalies or brachydactyly [13].

Mutations and naturally occurring polymorphisms in *Runx2* have been associated with alterations in bone

mineral density (BMD) and increased risk of fracture without displaying the overt CCD phenotype. Thus, mutations or rare variants that may be related to low BMD and fractures have been observed within the glutamine repeat [18], and several polymorphisms affecting mainly the P2 promoter and exon 2 have been related to low BMD and risk of fracture [18–20]. For these reasons, our aim was to study the association of genetic polymorphism in this gene with BMD in a cohort of women.

Materials and methods

Subjects

The study group were women of Spanish ancestry from a population-based cohort that we regularly analyze in epidemiological studies of osteoporosis and bone health [21, 22]. All the women were living in Valencia and were recruited from the population regularly receiving health care services at the Menopause Unit of our hospital. Women were classified as postmenopausal if they were older than 40 years, with amenorrhea for at least 1 year and with a follicle-stimulating hormone (FSH) level above 40 U/ml, or if they were subjected to a surgical bilateral ovariectomy performed before menopause; as perimenopausal if the menstruation was irregular and/or up to 6 months had elapsed since their last period; and as premenopausal if they were menstruating regularly. Women with a history of bone disease other than primary osteoporosis or who had used any medication known to alter bone mass or bone metabolism, except for hormone replacement therapy (HRT), were excluded from the study.

A total of 776 women accepted to participate in the study and underwent genotyping, constituting a study group of 689 postmenopausal and 87 pre-perimenopausal (80% perimenopausal) women. The participants completed a questionnaire on osteoporosis risk factors such as age, menopausal status, height and weight, cigarette smoking, and use of hormone replacement therapy (HRT) or medication known to affect bone metabolism, and data were recorded. Age, weight, HRT use, HRT duration, and menopausal status were used as covariates in the analysis of the data. The local ethics committee approved the study and protocol, and written informed consent was obtained from all women in accordance with the regulations of the Research Foundation and Ethics Committee of our center.

Anthropometric and biochemical measurements

Age, years since menopause (ysm), height, weight, and tobacco consumption were recorded for all participants in the study. The body mass index (BMI) was calculated for

each subject as the ratio between weight (kg) and square height (m²). Basal blood samples were obtained for biochemical measurement of hormones and metabolites and to obtain DNA for genotyping and sequencing. Blood was collected between 8:00 and 10:00 A.M. after an overnight fast and was allowed to clot. Then, the serum was separated and kept at -70°C until analysis. The levels of carboxy-terminal telopeptides of collagen I (CTX) and 25-hydroxycholecalciferol (25(OH)D₃) were measured by electrochemiluminescence (E170 Modular Analyser; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Levels of osteoprotegerin (OPG) were assayed by an instant enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Levels of total alkaline phosphatase (ALP), 17β-estradiol, FSH, total calcium and phosphate, thyroid-stimulating hormone (TSH), and 17β-estradiol were measured using routine methods [21, 22].

Bone density measurements

Measurements of bone mineral density (BMD) were performed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) at the lumbar spine from L2 to L4 (LS-BMD) and at the non-dominant proximal femoral neck (FN-BMD) with Norland XR-36 (Norland Medical Systems, Fort Atkinson, WI, USA) or Lunar DPX (GE Lunar Corporation, Madison, WI, USA) densitometers. The BMD was calculated by the software program and presented as g/cm². The Z and T scores were the number of SDs that a given measurement differed from the mean for a sex- and age-matched population and for a normal young adult reference population, respectively. To use DXA measurements obtained from equipment from two different manufacturers, standardized BMD (sBMD) was calculated according to previous work [23, 24].

Single nucleotide polymorphisms and genotyping

The *Runx2* gene is located at 6p21, spanning 124.8 kb of genome, and contains two promoters (P1 and P2) and seven exons, giving two distinct isoforms, RUNX2-I and -II, both expressed in human osteoblasts and osteoblastic precursors [25]. The polymorphisms were chosen after looking for SNPs previously associated with BMD in public databases. Thus, we selected a SNP (+198 G>A, rs6921145; chromosome position, 45,498,489) in the region of alanine repeats in the N-terminal region (polyA domain) of the RUNX2 protein [18, 19] and a functional SNP (-1025 T>C, rs7771980; chromosome position, 45,497,267) located at promoter P2 [26]. Notably, the +198 G>A SNP is located within another deletion polymorphism (rs11498192) with alleles 17Ala (wild type) and 11Ala at the alanine repeat of RUNX2 protein [18, 19].

Blood samples were collected in tubes containing disodium-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant and stored at 4°C until extraction. Genomic DNA was isolated from nucleated cells after red cell lysis with an ammonium chloride commercial kit (REAL, Durviz, Valencia, Spain) according to the manufacturer's instructions.

Genotyping of -1025 T>C SNP was performed by allelic discrimination using TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on a 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) according to the protocol provided by the manufacturer [21, 22]. Allelic discrimination was performed using 7900 HT thermocycler software. Reproducibility was estimated by re-genotyping 7% of samples in each plate and was higher than 99%. Between 0.5% and 3.0% of the genotypes (depending on SNP) were ambiguous, mainly because of poor amplification, and these samples had to be re-genotyped.

Genotyping of deletion polymorphism (17Ala>11Ala) and the synonymous SNP +198 G>A was performed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using the *MspA1I* restriction enzyme as described previously [19]. Briefly, isolated genomic DNA was amplified with the primers forward 5'-CCG GCA AAA TGA GCG ACG-3' and reverse 5'-GGG CCG TGT AGC CTC TTA CCT T-3' in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). The presence of wild-type allele (336 bp; 17Ala) and the 6-alanine deletion allele (318 bp; 11Ala) was visualized by electrophoresis on 3% agarose gels. These PCR products then underwent enzymatic digestion using *MspA1I* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) to genotype the +198 G>A SNP [19]. Therefore, for this system there are 6 possible genotypes: homozygous for 17Ala allele+ GG or GA or AA for another SNP; heterozygous 17Ala/11Ala and G- or A- allele (11Ala has lost the target sequence to *MspA1I*), or 11Ala/11Ala homozygous. Between 1% and 3.0% of the genotypes were ambiguous, and samples had to be re-genotyped.

Sequencing of rare variants in the RUNX2 polyQ/polyA domain

Samples presenting a pattern of bands different from that expected, according to gene sequence [19], were sequenced after the separation of two bands by polyacrylamide gel electrophoresis and reamplification with the same primers to obtain separated, purified molecules. PCR products were prepared for cycle-sequencing after purification with the use of Sephadex G-50 molecular exclusion resin (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Cycle-sequencing reactions were assembled using 0.3 μl cycle-sequencing

premix (BigDye, version 3.1; Applied Biosystems), 6 pmol primer, 0.6 μ l 5 \times sequencing dilution buffer, 3% dimethyl sulfoxide (DMS), and 2 μ l PCR product in a final volume of 5 μ l. An initial denaturation step at 96°C for 10 min was followed by 40 cycles of 96°C for 30 s, 62°C for 4 min, with a final step at 72°C for 15 min. Cycle-sequencing reactions were purified using Sephadex G-50 and dried at 95°C for 45 min. The dried DNA was resuspended in 5 μ l Hi-Di Formamide (Applied Biosystems). Afterward, it was electrophoretically analyzed using a DNA Analyzer 3730 (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Fixed-effects designs of analysis of variance (ANOVA) and covariance (ANCOVA) were used for comparisons of means in normally distributed data. Continuous variables that did not fit a normal distribution, e.g., age, weight, body mass index (BMI), estradiol, TSH, CTx, total calcium and phosphate, total ALP, and 25(OH)D₃, were analyzed using the Kruskal–Wallis test to evaluate the effect of genotype. To compare the association of the –1025 T>C SNP among women of extreme BMD, we divided the population in four groups according to the BMD values and analyzed the association of the –1025 T>C SNP in women of highest versus lowest quartile of BMD. Differences in BMD between different *Rumx2* genotypes were evaluated using analysis of covariance and regression analysis after adjusting for age, weight, HRT use and duration, and menopausal status, and the quantitative variables that were significantly different between groups of women according to genotype (total ALP and total calcium; see Table 3). In multivariate models, the proportion of BMD variance explained by each factor was estimated as the difference between the r^2 coefficient obtained, including in the model that factor, and the r^2 obtained after removing the factor. Population structure was examined using STRUCTURE version 2.2 [27]. Each STRUCTURE analysis was performed without any prior population assignment and was performed at least five times with similar results using 10,000 replicates and burn-in cycles under the admixture model. Estimation of the correct number of populations (K) was based on visual inspection of the respective probabilities and of the distribution of the populations among the inferred clusters.

The frequency distribution of genotypes was compared using cross-tabulation and standard χ^2 tests. Allele frequencies and the existence of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) were tested with Haploview 3.2 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) [28]. The model of inheritance (codominant, dominant, overdominant, and recessive) was analyzed with SNPstats software (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpsstats>) [29].

We estimated a sample size of 594 women as sufficient to attain an 85% power to detect a gene effect at least 1.5% of BMD variance, according to reported allele frequencies for –1025 T>C SNP, by using the QUANTO software (<http://hydra.usc.edu/GxE/>) [30]. Values shown in the text and tables are mean \pm SD and frequencies, unless specified. All analyses were two-tailed and significance was defined as $P < 0.05$. The statistical analysis was carried out using the Statistical Package for Social Sciences (version 15; SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Association between BMD and *Rumx2* genotypes

The main characteristics of the 776 participants in the study are listed in Table 1. Genotype and allele frequencies for three polymorphisms of *Rumx2* gene are shown in Table 2. Note that the genotype for +198 G>A SNP data refers to common 17Ala/17Ala women ($n = 643$) because the restriction site for *MspAII* is lost in the 11Ala allele [18, 19]; this is probably the reason for the departure from Hardy–Weinberg equilibrium for this SNP seen in our population (Table 2). On the other hand, the two SNPs +198 G>A and –1025 T>C were in strong linkage disequilibrium ($D' = 0.97$; $\chi^2 = 1100$). Finally, the STRUCTURE software was used to check for possible population substructure. Data were consistent with the existence of a unique population (probability = 0.996), and models assuming two to five populations showed negligible probability.

A preliminary study by means of ANOVA detected no associations of the 17Ala>11Ala length polymorphism or

Table 1 Characteristics of the Spanish women cohort

	<i>n</i>	Value
Age (years)	776	52.0 (52–53)
Weight (kg)	776	65.0 (64.5–66)
Height (cm)	776	157.6 \pm 6.2
BMI (kg/m ²)	776	26.2 (26.0–26.7)
Smoking (%)	776	23.3
Estradiol (pg/ml)	740	13.3 (12.5–14.0)
FSH (U/l)	740	76.4 \pm 34.1
TSH (U/l)	738	2.02 (1.93–2.11)
BMD (g/cm ²)		
Lumbar spine (LS)	703	0.997 \pm 0.150
Femoral neck (FN)	686	0.799 \pm 0.116

Values are the mean \pm SD if the variable was normally distributed, the median (95% confidence interval) if it was not, or percentage. *BMI* body mass index, *FSH* follicle-stimulating hormone, *TSH* thyroid-stimulating hormone, *BMD* bone mineral density

Table 2 Genotypic and allele frequencies and HWE *P* values for polymorphism analyzed

Polymorphism	Genotype	<i>n</i> (%)	Allele (frequency)	HWE <i>P</i> value
17Ala>11Ala	17Ala/17Ala	643 (82.9)	17Ala (0.91)	0.332
	17Ala/11Ala	123 (15.8)	11Ala (0.09)	
	11Ala/11Ala	10 (1.3)		
+198 G>A ^a	G G	568 (88.3)	G (0.94)	0.022
	G A	68 (10.6)	A (0.06)	
	A A	7 (1.1)		
-1025 T>C	T T	685 (88.3)	T (0.94)	0.124
	T C	84 (10.8)	C (0.06)	
	C C	7 (0.90)		

^a Data for +198 G>A (rs6921145) refer to women with the 17Ala/17Ala genotype because the 11Ala allele has no polymorphic restriction site for *Msp*AI and consequently cannot be genotyped for the +198 G>A polymorphism

Table 3 Anthropometric, biochemical, bone characteristics, and menopausal status data of our study population according to -1025 T>C polymorphism genotypes

	<i>n</i>	Genotype		<i>P</i>
		TT	TC/CC	
Age (years)	776	52.0 (52.0–53.0)	52.0 (50.0–53.0)	0.902
Ysm (years)	776	5.0 (4.0–5.0)	5.0 (4.0–7.0)	0.966
Weight (kg)	776	65.0 (64.5–66.0)	66.5 (63.5–68.6)	0.272
Height (cm)	776	157.5 ± 6.2	158.7 ± 6.3	0.085
BMI (kg/m ²)	776	26.2 (25.9–26.7)	26.6 (25.5–27.3)	0.881
Estradiol (pg/ml)	740	13.4 (12.7–14.4)	14.5 (12.9–16.5)	0.275
HRT user (%)	776	34.2	36.7	0.639
Surgical menopause (%)	776	27.5	23.6	0.525
Postmenopausal status (%)	776	86.9	86.2	0.866
CTx (ng/ml)	776	0.41 (0.38–0.43)	0.41 (0.35–0.47)	0.945
Total ALP (U/l)	776	168.0 (163.0–172.0)	152.0 (142.0–162.0)	0.003
Calcium (mg/dl)	776	9.6 (9.5–9.6)	9.7 (9.5–9.8)	0.030
Phosphate (mg/dl)	776	3.6 (3.5–3.6)	3.6 (3.5–3.7)	0.654
OPG (pg/ml)	450	89.5 ± 29.4	97.5 ± 31.6	0.080
25(OH)D ₃ (ng/ml)	410	22.8 (21.6–24.5)	25.8 (22.1–32.9)	0.117
FN-BMD (g/cm ²)	686	0.796 ± 0.116	0.833 ± 0.113	0.006
LS-BMD (g/cm ²)	703	0.996 ± 0.149	1.019 ± 0.148	0.182

Values are the mean ± SD if the variable was normally distributed, the median (95% confidence interval) if it was not, or percentage
BMI body mass index, *HRT* hormone replacement therapy, *CTx* carboxy-terminal telopeptides of collagen I, *ALP* alkaline phosphatase, *OPG* osteoprotegerin, *25(OH)D₃* 25-hydroxycholecalciferol, *BMD* bone mineral density

of the +198 G>A SNP with FN- or LS-BMD in our population. Nevertheless, to verify the previously described association of GA/AA genotype for +198 G>A SNP with FN-BMD, mainly in women with higher body mass index (BMI) [18, 19], we conducted an analysis according to median BMI (≤ or >26.3 kg/m²). Again, we did not find an association with FN-BMD, although a trend was evident both for FN-BMD (GG women: 0.784 ± 0.118 vs. GA/AA women: 0.820 ± 0.111 g/cm²; *P* = 0.087), as well as for LS-BMD (GG women: 0.974 ± 0.143 vs. GA/AA women: 1.018 ± 0.143; *P* = 0.087). In our population this trend occurred only for women with BMI ≤ 26.3 kg/m² (*n* = 337 and 353, for FN- and LS-BMD, respectively).

We did find, however, an association between -1025 T>C SNP genotypes and FN-BMD (*P* = 0.021), the women with C allele having a higher FN-BMD, but not for LS-BMD (*P* = 0.296). Given the low frequency of the CC genotype (<1%, Table 2), and that a preliminary study with SNPstats software [29] showed a dominant inheritance, TC and CC genotypes were combined in subsequent studies. Table 3 shows anthropometric, biochemical, bone characteristics, and menopausal status data of our women according these genotypes (TT vs. TC/CC). There were no anthropometrical or menopausal status differences among groups of genotypes. Regarding biochemical data, TT women showed higher total serum ALP (*P* = 0.003) and

lower total serum calcium ($P = 0.030$) than women with TC/CC genotype. Finally, TC/CC women displayed higher FN-BMD ($P = 0.006$; Table 3) than did women with the TT genotype, and, consequently, the T and Z scores were more negative for women of TT genotype (not shown).

To study the association of -1025 T>C SNP with FN and LS-BMD among women of extreme BMD, the population was divided into quartiles of BMD. When we selected only the women of the highest and lowest BMD quartiles, the association of this SNP with BMD was more evident for FN (BMD TT women: 0.797 ± 0.159 vs. TC/CC women: 0.876 ± 0.142 g/cm²; $P = 0.002$). Interestingly, the association of $+198$ G>A with FN-BMD reached a weak but positive statistical significance (BMD GG women: 0.798 ± 0.160 vs. GA/AA women: 0.857 ± 0.141 g/cm²; $P = 0.049$) in this analysis regarding women of extreme BMD.

As has been described in many studies, age, weight, HRT use, and menopausal status were significantly related to FN-BMD and LS-BMD (results not shown). In addition, there were differences between groups with respect to total alkaline phosphatase and total calcium levels (Table 3); therefore, we used an ANCOVA analysis to evaluate the effect on BMD of -1025 T>C SNP using all these parameters as covariates. Figure 1 shows that the FN-BMD adjusted for age, weight, HRT use, HRT duration, menopausal status, and total calcium and alkaline phosphatase levels for women with TC/CC genotype is 3.9% higher than those for women with TT genotype (0.798 ± 0.116 vs. 0.830 ± 0.112 g/cm²; $P = 0.021$, for TT and TC/CC women, respectively). There were no significant differences with regard to LS-BMD (Fig. 1). The percentage of FN-BMD variance explained by -1025 T>C SNP genotypes was 1.2% in multivariate models adjusted for these covariates.

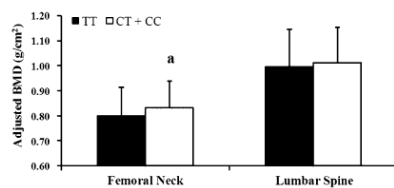


Fig. 1 Femoral neck and lumbar spine bone mineral density (BMD) adjusted by age, weight, hormone replacement therapy (HRT) use, HRT duration, and menopausal status, and levels of total calcium and total alkaline phosphatase in our population according to the -1025 T>C genotype. Values are mean \pm SD. * $P = 0.021$, with respect to the TT genotype

Rare variants in exon 2 and BMD

We detected three PCR products of abnormal size from a total of 1,366 chromosomes while genotyping the 17Ala>11Ala and $+198$ G>A polymorphisms [18, 19]. In those three cases, the wild-type 336-bp band was detected together with another band of greater or smaller size, suggesting one insertion and two deletions in PCR products. One of them consisted of an insertion of a fragment of 21 bp (CAG CAG CAG CAG CAA CAG CAG) in the polyQ region of the gene, leading to a total of 30 glutamine residues as opposed to 23 residues in the wild-type sequence (Fig. 2). The second variant was an in-frame deletion of 15 bp (CAA CAG CAG CAG), which caused a deletion of 5 glutamines in the polyQ region of the gene (mutation 18Q). Finally, the third rare variant consisted of an in-frame deletion of 21 bp (CAA CAG CAG CAG CAG CAG CAG), which led to a deletion of 7 glutamines in the polyQ region of the gene (mutation 16Q). These rare variants were not accompanied by BMD alterations because none of the woman showed osteopenia ($T < -1$) or osteoporosis ($T < -2.5$) at the femoral neck, and only one showed osteopenia ($T = -2.4$) at the lumbar spine site. Additionally, the patient with the insertion of 7 glutamines agreed to an X-ray study to determine if her genotype was compatible with the CCD phenotype. She underwent a normal radiologic exploration of bones and teeth, and the only observations made by the radiologist were of a slight right dorsal scoliosis, hyperostosis frontalis interna, and prominent ulnar styloids, all of which were considered as variations unrelated to CCD and of little clinical significance. The clinical examinations of two different patients disproved the existence of any phenotype compatible with CCD.

Discussion

In the present study, we have demonstrated that the -1025 T>C polymorphism, located at the P2 promoter of the *Runx2* gene, is associated with FN-BMD in a population of Spanish women. Thus, C-carrier allele women (genotypes CC or TC) for this SNP show higher BMD at the femoral neck site than do homozygous carriers for the T allele, revealing, therefore, a dominant inheritance (analyzed with SNPstats software [29]). The nominal P value for the difference in BMD among groups (TT vs. TC/CC) would remain significant ($P = 0.006$) even after applying the Bonferroni correction for multiple comparisons with three analyzed polymorphisms ($P = 0.017$). This difference among genotypes for FN-BMD became more evident when we performed the analysis in women with their BMD in the two quartile extremes, which demonstrate the strength of

departure from Hardy–Weinberg equilibrium (see Table 2). However, because the analysis with STRUC-TURE software demonstrates that our population does not have substructures, we assume that the cause of this departure, which could have prevented the detection of an association of +198 G>A SNP with BMD, is caused by the bias that we have introduced by only considering women with the 17Ala/17Ala genotype and not those with the 17Ala/11Ala or 11Ala/11Ala (representing 17.1% of the population), because the 11Ala allele has lost the restriction site for the *MspA11* enzyme and, therefore, the +198 G>A SNP. For this reason, we did not conduct a haplotype analysis for these two SNPs. Indeed, if we consider the system as a polymorphism with three alleles, that is, G, A, and 11Ala, the system was in Hardy–Weinberg equilibrium ($P = 0.124$; results not shown). Finally, when we selected women of extreme BMD (highest and lowest quartile of BMD), the association of +198 G>A with FN-BMD reached a weakly positive statistical significance, showing the relevance of this SNP with FN-BMD [18, 19, 26]. Alternatively, although the FastSNP software assigns a low to medium risk for this 17Ala>11Ala polymorphism, probably because of the reduction of alanine residues and the possible conformational change of RUNX2 protein, which can alter its binding capacity to target sequences, our data confirm that this change is not associated with BMD as was previously published [19].

Women with the TC/CC genotype who show a higher BMD also possess smaller levels of ALP and higher levels of total calcium than do women with smaller BMD (TT women). This behavior is expected because the levels of ALP correlate negatively with those of BMD in all skeletal sites. ALP levels are increased in osteoporotic women, and these increases are associated with a high risk for osteoporotic fracture [32–34]. These biochemical data reinforce the results between genotype and BMD in our population of women. However, a point that we cannot explain is that women with higher levels of ALP possess lower levels of calcium, as both levels correlate positively in different studies (in our population, $r = 0.113$, $P = 0.005$). A possible explanation can be that, in the present study, we have not assayed the BAP (see above), although it can also be by pure chance because the differences in calcium levels among genotypes are very small ($P = 0.03$). Finally, and unexpectedly, we have detected a trend in women with the TC/CC genotype of displaying greater height than do TT women ($P = 0.085$). This trend could be a casual finding or could reflect previous studies in which associations have been described among polymorphism in the *Runx2* gene with hand bone length or femoral length [35, 36].

In the present study, we describe three new heterozygous mutations or very rare variants in the *Runx2* gene. The rare variants consist of an in-frame insertion of 21 bp or a

deletion of 21 or 15 bp in the polyglutamine region of the gene, resulting in the addition of 7 glutamine residues or of deletion of 7 and 5 glutamine residues to the protein. Both deletions cannot be precisely localized because one can find the same 5 or 7 triplets, respectively, immediately to the left of each underlined deletion in Fig. 2.

Therefore, the RUNX2 protein for our patients had 30, 18, or 16 glutamines (30Q, 18Q, or 16Q) residues instead of 23Q as in wild-type protein [13]. These genotypic changes did not affect hip or spine BMD, as indicated by the *T* and *Z* scores, and only one patient showed a BMD compatible with osteoporosis at the lumbar spine ($T = -2.4$), although this value is normal for her age, as confirmed by the *Z* score (-0.8). Moreover, these rare variants did not produce a CCD phenotype, not even in its more benign form, which would only affect the teeth or produce brachydactyly [13].

The literature describes a wide range of variations in the polyQ/polyA region, including insertions, deletions, and missense mutations that produce the full CCD phenotype [13, 16]. Nevertheless, it has been described that rare mutations (30Q, 24Q, and 16Q) in the glutamine repeat without the CCD phenotype in individuals from an Australian fracture cohort [18]. The authors concluded that glutamine mutations (representing 0.9% of the population) may be correlated with reduced BMD and fracture [18]. In the present study, we have amplified the region polyQ/polyA from 1,366 chromosomes, and we have found only the three cases described here. This result represents a frequency of 0.2%, sensibly smaller than that for the Australian population. Therefore, these genetic changes should not be considered as common polymorphisms but rather as mutations or very rare variants. The data of Vaughan et al. [18], together with ours, indicate that in-frame insertions and/or deletions are tolerated in the polyQ region without inducing the CCD phenotype. The effect of these tolerated mutations on the BMD should be established, although, in our patients, it does not seem to affect BMD.

In conclusion, the present study replicates previous studies that have described that the -1025 T>C functional polymorphism at the P2 promoter of the *Runx2* gene are associated with FN-BMD. Rare variants that insert or eliminate glutamine residues into polyglutamine domain of the RUNX2 protein, however, have no effect on BMD, nor do they produce the CCD phenotype.

Acknowledgments The authors are indebted to Mrs. R. Aliaga and Mrs. E. Calap for their excellent technical assistance and to Dr. F.J. Chaves and Dr. S. Blesa for sequencing the rare variants. This work was supported by Grants PI06/154 from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, Madrid, Spain), AP-024/07, EVES 045-2007, and AP-077/08 from Conselleria de Sanitat (Generalitat Valenciana), Red HERACLES RD06/0009 from Instituto Carlos III (Ministerio de

Ciencia e Innovación: Madrid, Spain), and Fundación Santiago Dexeus Font (Barcelona, Spain). MAG-P is a recipient of a research contract from Fondo de Investigación Sanitaria—Conselleria de Sanitat (Generalitat Valenciana).

References

- Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, Rizzoli R (2008) European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 19:399–428
- Ralston SH, de Crombrughe B (2006) Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev* 20:2492–2506
- Duncan EL, Brown MA (2008) Genetic studies in osteoporosis—the end of the beginning. *Arthritis Res Ther* 10:214
- Videman T, Levalahti E, Battie MC, Simonen R, Vaininen E, Kaprio J (2007) Heritability of BMD of femoral neck and lumbar spine: a multivariate twin study of Finnish men. *J Bone Miner Res* 22:1455–1462
- Cauley JA, Hochberg MC, Lui LY, Palermo L, Ensrud KE, Hillier TA, Nevitt MC, Cummings SR (2007) Long-term risk of incident vertebral fractures. *JAMA* 298:2761–2767
- Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, Johansson H, Johnell O, Jansson B, Oden A, Zethraeus N, Pileger B, Khaltayev N (2005) Assessment of fracture risk. *Osteoporos Int* 16:581–589
- Kanis JA, Oden A, Johnell O, Johansson H, De Laet C et al (2007) The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporos Int* 18:1033–1046
- Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N et al (2008) Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 371:1505–1512
- Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Center JR, Nguyen TV, Bagger Y, Gulcher JR, Eisman JA, Christiansen C, Sigurdsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K (2008) Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med* 358:2355–2365
- Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Snorrardottir S, Center JR, Nguyen TV, Alexandersen P, Gulcher JR, Eisman JA, Christiansen C, Sigurdsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K (2009) New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet* 41:15–17
- Uitterlinden AG, van Meurs JB, Rivadeneira F, Pols HA (2006) Identifying genetic risk factors for osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6:16–26
- Geoffroy V, Corral DA, Zhou L, Lee B, Karsenty G (1998) Genomic organization, expression of the human CBFA1 gene, and evidence for an alternative splicing event affecting protein function. *Mamm Genome* 9:54–57
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR (1997) Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89:773–779
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755–764
- Otto F, Thomell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765–771
- Otto F, Kanegane H, Mundlos S (2002) Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat* 19:209–216
- Zhou G, Chen Y, Zhou L, Thirunavukkarasu K, Hecht J, Chitayat D, Gelb BD, Pirinen S, Berry SA, Greenberg CR, Karsenty G, Lee B (1999) CBFA1 mutation analysis and functional correlation with phenotypic variability in cleidocranial dysplasia. *Hum Mol Genet* 8:2311–2316
- Vaughan T, Pasco JA, Kotowicz MA, Nicholson GC, Morrison NA (2002) Alleles of RUNX2/CBFA1 gene are associated with differences in bone mineral density and risk of fracture. *J Bone Miner Res* 17:1527–1534
- Vaughan T, Reid DM, Morrison NA, Ralston SH (2004) RUNX2 alleles associated with BMD in Scottish women: interaction of RUNX2 alleles with menopausal status and body mass index. *Bone (NY)* 34:1029–1036
- Bustamante M, Nogues X, Agueda L, Jurado S, Wesselius A, Caceres E, Carreras R, Ciria M, Mellibovsky L, Ballells S, Diez-Perez A, Grinberg D (2007) Promoter 2–1025 T/C polymorphism in the RUNX2 gene is associated with femoral neck BMD in Spanish postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 81:327–332
- Pineda B, Laporta P, Hermenegildo C, Cano A, Garcia-Perez MA (2008) A C>T polymorphism located at position –1 of the Kozak sequence of CD40 gene is associated with low bone mass in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int* 19:1147–1152
- Pineda B, Laporta P, Cano A, Garcia-Perez MA (2008) The Asn19Lys substitution in the osteoclast inhibitory lectin (OCIL) gene is associated with a reduction of bone mineral density in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 82:348–353
- Hui SL, Gao S, Zhou XH, Johnston CC Jr, Lu Y, Gluer CC, Grampp S, Genant H (1997) Universal standardization of bone density measurements: a method with optimal properties for calibration among several instruments. *J Bone Miner Res* 12:1463–1470
- Lu Y, Fuerst T, Hui S, Genant HK (2001) Standardization of bone mineral density at femoral neck, trochanter and Ward's triangle. *Osteoporos Int* 12:438–444
- Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S (2003) Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 18:213–221
- Doecke JD, Day CJ, Stephens AS, Carter SL, van Daal A, Kotowicz MA, Nicholson GC, Morrison NA (2006) Association of functionally different RUNX2 P2 promoter alleles with BMD. *J Bone Miner Res* 21:265–273
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265
- Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22:1928–1929
- Gauderman WJ (2002) Sample size requirements for association studies of gene–gene interaction. *Am J Epidemiol* 155:478–484
- Lee HJ, Koh JM, Hwang JY, Choi KY, Lee SH, Park EK, Kim TH, Han BG, Kim GS, Kim SY, Lee JY (2009) Association of a RUNX2 promoter polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Calcif Tissue Int* 84:439–445

32. Melton LJ III, Khosla S, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL (1997) Relationship of bone turnover to bone density and fractures. *J Bone Miner Res* 12:1083–1091
33. Lips P, Duong T, Oleksik A, Black D, Cummings S, Cox D, Nickelsen T (2001) A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes of raloxifene evaluation clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1212–1221
34. Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B, Delmas PD (2000) 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
35. Ermakov S, Malkin I, Keter M, Kobylansky E, Livshits G (2008) Family-based association study of polymorphisms in the RUNX2 locus with hand bone length and hand BMD. *Ann Hum Genet* 72:510–518
36. Ermakov S, Malkin I, Kobylansky E, Livshits G (2006) Variation in femoral length is associated with polymorphisms in RUNX2 gene. *Bone (NY)* 38:199–205

Actualmente está pendiente de ser publicado en la revista *Osteoporosis International* el artículo titulado

"Gene-Gene Interaction between CD40 and CD40L Reduces Bone Mineral Density and Increases Osteoporosis Risk in Women"

Begoña Pineda ¹, Juan J. Tarín ², Carlos Hermenegildo ³, Paz Laporta ⁴, Antonio Cano ⁵, and Miguel Ángel García-Pérez ^{1,6}

¹ Research Foundation, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

² Department of Functional Biology and Physical Anthropology, University of Valencia, Spain

³ Department of Physiology, University of Valencia, Spain

⁴ Clinical Biochemistry Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

⁵ Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, Spain

⁶ Department of Genetics, University of Valencia, Spain

