

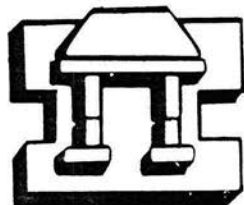


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

UTILIDAD DE LOS MARCADORES BIOQUIMICOS DE
REMODELACION OSEA EN EL ESTUDIO DE LA
OSTEOPOROSIS POSMENOPAUSICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
LEOBARDO ANGELES VICTORIA



IZTACALA

DIRECTOR: DRA. MARIA EUGENIA FONSECA YERENA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

JUNIO 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



U.N.A.M. CAMPUS



La elaboración de este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Fonseca Yerena.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Arturo Zárate Treviño y a la Dra. María Eugenia Fonseca Yerena por el apoyo y asesoría en el presente trabajo.

Para todo el personal de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Siglo XXI.

DEDICATORIAS

A todos aquellos que hicieron posible la realización de esta tesis. No hay tarea humana que sea producto de un solo individuo. Mi agradecimiento sincero a todos ellos.

INDICE.

Contenido.	IZT.	Página.
1. Resumen		1
2. Introducción		2
3. Antecedentes		3
3.1. Generalidades de la anatomía del hueso		3
3.2. Células Óseas		5
3.3. Composición del hueso		8
3.4. Metabolismo de la colágena		10
3.5. Remodelación ósea		12
3.6. Metabolismo del calcio		15
3.7. Hormonas sistémicas de la remodelación ósea		16
3.8. Reguladores de la remodelación ósea		17
3.9. Osteoporosis posmenopáusica		19
3.10. Terapia hormonal de reemplazo		20
4. Marcadores bioquímicos de recambio		21
4.1. Marcadores de formación ósea		21
4.1.1. Fosfatasa alcalina específica de hueso		22
4.1.2. Osteocalcina		23
4.1.3. Propéptidos de procolágena tipo I		24
4.2. Marcadores de resorción ósea		26

4.2.1. Hidroxiprolina	27
4.2.2. Fosfatasa alcalina resistente al tartrato	28
4.2.3. Glicósidos de hidroxilisina	29
4.2.4. Enlaces de piridinolina	30
4.2.5. Telopéptidos unidos a enlaces piridinolina de la colágena tipo I	32
5. Protocolo de investigación	34
5.1. Planteamiento del problema	34
5.2. Justificación	34
5.3. Hipótesis	34
5.4. Objetivos	35
5.5. Diseño del estudio	35
5.6. Variables	35
6. Material y métodos	36
6.1. Material clínico	36
6.2. Criterios de inclusión	36
6.3. Criterios de exclusión	36
6.4. Toma de muestras	37
7. Técnicas analíticas	38
7.1. Quimioluminiscencia	38
7.2. Radioinmunoanálisis	40
7.3. Análisis inmunoradiométrico	44

7.4. Análisis inmunoabsorbente	46
8. Análisis estadístico	48
9. Resultados	49
9.1. Estudio hormonal	49
9.2. Marcadores bioquímicos de remodelación ósea	55
9.3. Correlaciones entre los marcadores de remodelación ósea y estradiol	59
9.4. Correlaciones entre los marcadores de recambio óseo y la GH	63
9.5. Correlación entre los niveles de los marcadores de recambio óseo y la concentración de IGF-I	67
10. Discusión	70
11. Conclusiones	75
12. Bibliografía	77

1. RESUMEN

Se realizó el estudio prospectivo, longitudinal, observacional y comparativo de la utilidad de los marcadores bioquímicos de remodelación ósea en el estudio de la osteoporosis posmenopáusica. Los marcadores de formación ósea estudiados fueron la osteocalcina (OC), la fosfatasa alcalina específica de hueso (BSAP), y la deoxipiridinolina (DPD) y el telopéptido C-terminal de la colágena tipo I (ICTP) como marcadores de resorción ósea. Los marcadores bioquímicos de remodelación ósea son útiles para medir la actividad metabólica del hueso. Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto, la importancia de los marcadores bioquímicos de remodelación ósea para el estudio de la osteoporosis posmenopáusica, ya que permiten valorar la pérdida de hueso y en consecuencia el riesgo de fractura. La osteocalcina y la fosfatasa alcalina específica de hueso tienen una sensibilidad y especificidad capaz de reflejar los cambios que se presentan en la menopausia como resultado del hipoestrogenismo, principal causa del metabolismo negativo del hueso. Sin embargo puede decirse que los resultados de este estudio revelan que la osteocalcina es un mejor indicador de la formación ósea que la fosfatasa alcalina específica de hueso. La deoxipiridinolina, marcador de resorción ósea también manifestó elevada sensibilidad y especificidad para evaluar la actividad de los osteoclastos. Por el contrario el telopéptido C-terminal de la colágena no mostró especificidad, ni diferencias significativas entre los grupos estudiados, por lo que puede decirse que no es un marcador confiable. Se sugieren a los siguientes marcadores (OC, BSAP y DPD) como métodos confiables para evaluar el tratamiento de la osteoporosis.

2. INTRODUCCION

La osteoporosis afecta a millones de personas en todo el mundo, debido al aumento de la edad promedio de vida. En México se estima que existen alrededor de 4 a 5 millones de personas que padecen osteoporosis, lo cual afecta a 1 de cada 3 mujeres posmenopáusicas y a la mayoría de las mujeres ancianas.¹ Esta enfermedad se caracteriza por la pérdida de masa ósea, deterioro en la microarquitectura del hueso, en mayor proporción que la observada en la población normal de igual edad y sexo.² La disminución de la masa ósea es característica del envejecimiento, esta determinada por factores genéticos, hormonales, mecánicos, y nutricionales.^{3,4} La pérdida acelerada de hueso en la mujer es consecuencia de la deficiencia de estrógenos circulantes.⁵

La osteoporosis posmenopáusica es resultado de un desequilibrio en la remodelación del hueso, con predominio de la resorción ósea, desmineralización y fragilidad de los huesos, que predisponen a una mayor ocurrencia de fracturas;⁶ por lo cual la detección temprana de alteraciones en la remodelación ósea es importante para la prevención de fracturas causadas por la osteoporosis. Los marcadores de recambio óseo permiten diagnosticar la pérdida de hueso y el riesgo de fractura, además de tener utilidad para monitorear la terapia de reemplazo hormonal y el tratamiento farmacológico.^{3,7}

3. ANTECEDENTES

3.1. Generalidades de la anatomía del hueso

El hueso es un tejido altamente especializado con una rigidez y dureza especial que junto con el cartílago forma el sistema esquelético,⁸ proporciona soporte a las extremidades, fijación muscular para la locomoción, protección de órganos vitales y formación de células sanguíneas en la médula ósea. Además, el esqueleto es un gran reservorio de iones calcio, fósforo, magnesio y sodio, fundamentales para la vida, que pueden mobilizarse de acuerdo a las necesidades orgánicas o cuando el ambiente externo falla en proporcionarlos.⁹

El esqueleto tiene dos formas principales de hueso; de forma plana, que se encuentra en el cráneo y la escápula, y los huesos largos o cilíndricos localizados en el fémur, tibia y húmero. Los huesos largos están constituidos de una región terminal denominada epífisis cubierta de una fina capa de cartílago articular que permite el movimiento con mínima fricción, la parte media o diáfisis que contiene en su interior la cavidad medular y la médula ósea, asimismo una zona de transición donde se unen la diáfisis y epífisis llamada metáfisis lugar donde el cartílago es sustituido por hueso.¹⁰ (Figura 1).

La superficie externa del hueso está cubierta por periostio (excepto en las articulaciones), el cual está compuesto por una capa externa de fibras de colágena, dispuestas en forma longitudinal e irregular con elevada vascularización, y una capa interna de células osteoprogenitoras. Recubriendo la cavidad medular se encuentra el endostio formado de una monocapa de células osteoprogenitoras y osteoblastos.¹¹

En el esqueleto se encuentran principalmente dos tipos de hueso: cortical o compacto y trabecular o esponjoso. El hueso cortical es un tejido sólido y denso, forma la parte externa de todos los huesos del cuerpo, constituye

alrededor del 80% de la masa ósea;¹² está compuesto por placas de colágena mineralizada, proporciona rigidez y permite que los huesos largos resistan la tensión del peso que gravita sobre ellos.⁹ La unidad funcional del hueso cortical se denomina osteona, formada de capas concéntricas, que rodean al conducto central o conducto de Havers, conectadas entre si por medio de los conductos de Volkmann, dispuestos en sentido oblicuo o perpendicular al conducto de Havers.¹³ El hueso trabecular forma la estructura interna de la metáfisis de los huesos largos y cuerpos vertebrales, compuesto de una intrincada cadena de trabéculas interconectadas diseñadas para resistir las fuerzas de compresión. Aunque sólo representa el 20% del esqueleto, constituye el 80% total del área de superficie ósea, y es metabólicamente más activo que el hueso cortical.¹⁴

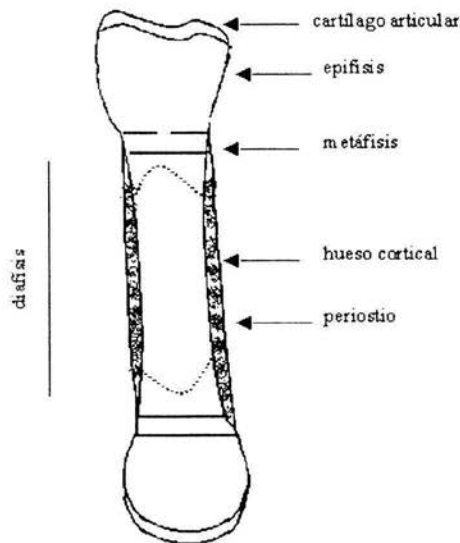


Figura 1. Anatomía ósea

3.2. Células óseas

En el tejido óseo existen cuatro tipos de células: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.¹⁰ Las células osteoprogenitoras derivan de la célula mesenquimatoso-estroma pluripotencial de la medula ósea, posteriormente se replican y diferencian en osteoblastos o células formadoras de hueso,^{15, 16} que mediante distintas etapas de diferenciación adquieren características morfológicas, fenotípicas y biosintéticas diferentes.¹⁷ Se caracterizan por presentar retículo endoplásmico rugoso y complejo de Golgi desarrollados. Estas células sintetizan y secretan las proteínas de la matriz orgánica, principalmente colágena tipo I y proteínas no colágenas, como fosfatasa alcalina y osteocalcina, que es sintetizada únicamente por los osteoblastos; estas dos últimas proteínas se utilizan como marcadores de formación ósea. Cuando el osteoblasto termina su fase secretora se convierte en una célula plana u osteocito, con reducida actividad funcional, sin una pérdida metabólica completa.¹⁶

Los osteocitos quedan atrapados dentro de la matriz ósea mineralizada, en pequeñas lagunas osteocíticas, establecen comunicación con otros osteocitos, osteoblastos y células quiescentes de la superficie del hueso en espacios de formación ósea, a través de largas prolongaciones que forman una red de pequeños canales o canalículos que suministran nutrientes.¹⁸

Los osteoclastos son células multinucleadas formadas por la fusión de progenitores mononucleares de la familia monocito-macrófago, especializadas en la destrucción o resorción del hueso;¹⁹ expresan como marcador específico fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRACP) y receptores para calcitonina. Ultraestructuralmente el osteoclasto tiene numerosos lisosomas, mitocondrias pleomórficas, y complejo de Golgi desarrollado, se caracteriza principalmente por presentar un "borde rugoso" compuesto por finas proyecciones citoplásmicas, rodeado de proteínas contráctiles que le sirven para unirse a la

superficie ósea y sellar el compartimiento de resorción ósea, denominada también zona de sellado.²⁰

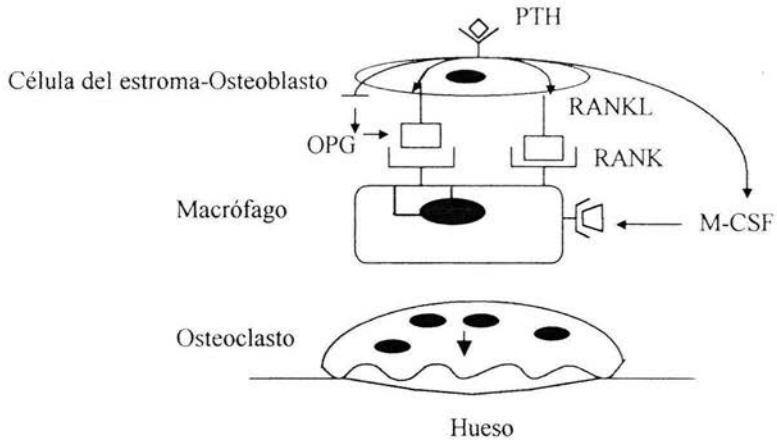


Figura 2. Mecanismos de regulación de la osteoclastogénesis. Las células del estroma y osteoblastos expresan el RANKL y M-CSF, regulan la osteoclastogénesis a través de la interacción con receptores específicos presentes en los precursores de osteoclastos o macrófagos, además sintetizan el OPG, inhibidor de formación de osteoclastos. El exceso de PTH estimula la expresión de RANKL y M-CSF, que aceleran la osteoclastogénesis.

3.3. Composición del hueso

La matriz ósea está formada de compuestos orgánicos e inorgánicos, denominados también como matriz orgánica e inorgánica respectivamente. La matriz inorgánica esta formada principalmente de calcio y fósforo, junto con otros componentes como carbonato de calcio, citrato, magnesio, sodio y potasio. La mayor parte del calcio y fósforo se encuentran en forma de cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, y fosfato de calcio amorfo. La hidroxiapatita esta distribuida de manera ordenada en las fibras de colágena tipo I, interacción que proporciona dureza y resistencia al hueso.¹¹

La colágena tipo I, es la proteína ósea más abundante, constituye aproximadamente el 90% de la matriz orgánica u osteoide,²⁶ es la principal proteína estructural del hueso,²⁷ incluye pequeñas cantidades de proteínas no colágenas como la fibronectina, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína ósea, trombospondina, biglicano y la decorina que representan el 10% del total de las proteínas óseas, relacionadas directamente con la formación de fibras de colágena, mineralización, unión celular y a la matriz ósea y además proveen señales en la remodelación ósea.¹⁶ (Tabla 1).

La osteocalcina es la proteína no colágena más abundante, es sintetizada durante la mineralización del hueso, facilita la diferenciación de osteoclastos y estimula el inicio de la remodelación ósea. La fibronectina se produce al comenzar la formación del hueso, tiene una secuencia de aminoácidos alanina-ácido aspartico-arginina (RDA) que sirve de sitio de adhesión para los receptores (integrinas) de los osteoclastos;²⁶ la sialoproteína ósea, osteopontina, y la trombospondina también contienen secuencias RDA,^{26,28} participan en el inicio y control de la mineralización así como en la adhesión celular y a la colágena tipo I respectivamente, mientras la osteonectina fija calcio iónico y lo deposita en forma de hidroxiapatita.²⁶

Otros componentes de la matriz ósea son los factores reguladores del crecimiento que incluyen el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los factores de crecimiento semejante a insulina (IGFs) y las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), estos son liberados en forma activa durante la resorción ósea, y tienen gran importancia pues regulan la formación del hueso.²⁹

Tabla 1. Principales proteínas no colágenas de la matriz ósea

Nombre	Peso molecular (Kd)	Función principal
Trombospondina	450 (trímero)	Adhesión celular y matriz ósea
Fibronectina	440 (dímero)	Adhesión celular y matriz ósea
Biglicano (proteoglicano I)	170 (monómero)	Desconocida
Decorina (proteoglicano II)	120 (monómero)	Fibrilogénesis de colágena
Sialoproteína ósea	75 (monómero)	Adhesión celular matriz ósea
Osteopontina	50 (monómero)	Adhesión celular
Osteonectina	35 (monómero)	Captura Ca^{2+} y minerales
Osteocalcina	6 (monómero)	Captura Ca^{2+}

3.4. Metabolismo de la colágena

La colágena tipo I, esta compuesta por tres cadenas α plegadas; dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$, conforman una triple hélice que exhibe una composición característica, con un triplete o secuencia repetida de aminoácidos formado principalmente de glicina y alto contenido de lisina y prolina.^{16, 27} Es una molécula rígida e insoluble debido a la existencia de múltiples enlaces covalentes en su estructura molecular, que la hace diferente de la colágena de los tejidos blandos.³⁰

La síntesis de la colágena se lleva a cabo en dos fases: la primera fase incluye una serie de eventos intracelulares, transcripción y traducción que determinan la formación de la procolágena. Así la colágena se produce inicialmente como un precursor o procolágena que contiene una secuencia de propéptidos amino y carboxi-terminal. Al final del proceso de traducción, las lisil y prolilhidroxilasas hidroxilan los residuos de lisina y prolina de las cadenas α nacientes, que proporcionan estabilidad a la molécula, ambas enzimas requieren de α -cetoglutarato, ácido ascórbico, iones hierro y oxígeno molecular.³¹ Antes de la conformación de la triple hélice de procolágena, los residuos hidroxilina son glicosilados por la acción de la galactosil y glucosiltransferasa formando residuos de galactosilhidroxilina y glucosilhidroxilina, después inicia el ensamble de las tres cadenas α -procolágena y simultáneamente se forman enlaces disulfuro intracatenarios.³² Posteriormente la procolágena es transportada del retículo endoplásmico rugoso al aparato de Golgi donde tiene una nueva glicosilación, y después es secretada al espacio extracelular.²⁷

La segunda etapa se efectúa en el espacio extracelular, donde la procolágena se convierte en colágena, por acción de amino y carboxiproteasas que remueven los propéptidos amino y carboxi-terminal;^{31,32} que son liberados a la circulación y pueden ser detectados por inmunoensayos específicos y se utilizan

como marcadores de formación ósea.²⁷ Inmediatamente varias moléculas de colágena se ensamblan y constituyen fibras que entran en proceso de maduración,^{31, 33, 34} posteriormente se forman enlaces covalentes (deoxipiridinolina y piridinolina) que se establecen en los residuos de lisina e hidroxilisina.³⁵ La acción de la lisil oxidasa une dos cadena $\alpha 1$ en su región no helicoidal o telopeptídica (carboxilo y aminoterminal) con una cadena $\alpha 2$ de otra molécula adyacente de colágena tipo I en su porción helicoidal.³³ Cabe señalar que los enlaces de deoxipiridinolina y piridinolina son importantes pues proporcionan estabilidad mecánica y fuerza ténsil a las fibras de colágena.³⁵

3.5. Remodelación ósea

La remodelación o recambio óseo,³⁶ es el proceso por el cual el hueso viejo es reemplazado por hueso nuevo,^{14, 36, 37} comienza desde la vida fetal y continua a lo largo de la vida,³⁸ constituye la respuesta fisiológica del esqueleto a las necesidades mecánicas y bioquímicas del organismo, que permiten mantener su integridad estructural,³⁹ y bajo condiciones normales después de concluir el crecimiento longitudinal es el principal mecanismo mediante el cual se forma hueso nuevo.¹⁴

La remodelación ósea se produce en pequeñas zonas del hueso denominadas unidades de remodelación ósea.⁴⁰ El ciclo de remodelación ósea tiene varias etapas altamente reguladas por varias hormonas y factores locales circulantes, que conjuntamente con la comunicación entre las diferentes células óseas, son parte integral de este mecanismo.⁴¹ El recambio óseo inicia con la fase de activación, comprende la desaparición de la "línea de cemento" que cubre al hueso en reposo, que expone la superficie ósea mineralizada, además de la proliferación de vasos sanguíneos necesarios para reclutar osteoclastos.³⁶

Los osteoclastos son células móviles, que en periodos de locomoción no están asociados con la resorción del hueso, solo cuando pierden movimiento. La resorción ósea comienza con la adhesión de los osteoclastos a la superficie del hueso, a través de la interacción de los receptores (integrinas) de su membrana celular con secuencias de aminoácidos alanina-ácido aspártico-arginina (RDA) presentes en las proteínas de la matriz ósea.^{28,37}

Los osteoclastos sintetizan y secretan enzimas proteolíticas e hidrogeniones, estos últimos generados por la anhidrasa carbónica tipo II, son liberados mediante una bomba de protones dependiente de ATPasa, que provee el ambiente ácido óptimo para la degradación de los minerales de la matriz ósea,^{14, 37} posteriormente los componentes orgánicos del hueso

desmineralizado son degradados por enzimas que incluyen colagenasas, metaloproteinasas y catepsinas.^{14, 42, 43} Normalmente la resorción ósea se realiza en 10 días,³⁷ y los productos de la degradación son endocitados, transportados y liberados por los osteoclastos en la superficie del hueso no remodelado.⁴⁴ Durante la degradación del hueso, el TGF- β es liberado, inhibe la resorción y promueve la apoptosis de los osteoclastos,^{29, 36, 37, 45} que posteriormente son fagocitados al inicio de la etapa de reversión, fase intermedia entre la resorción y la formación ósea.³⁶ En esta etapa los osteoclastos son reemplazados por células mononucleares, importantes en la preparación de la superficie del hueso reabsorbido,¹⁴ el cual es cubierto de proteoglicanos y glicosaminoglicanos que forman la denominada "línea de cemento" donde se adhieren los progenitores de los osteoblastos, y sirve de límite entre el hueso viejo y el recién formado.⁴² También los precursores de osteoblastos proveen señales que incluyen el TGF- β , PDGF, fragmentos de colágena tipo I y osteocalcina para la atracción de los osteoblastos hacia la superficie ósea erosionada.^{29, 37} En la proliferación de los osteoblastos participan el IGF-I, IGF-II, TGF- β y PDGF, posteriormente el IGF-I y la BMP-2 están implicados en la diferenciación de los osteoblastos a células maduras.²⁹

La formación de tejido óseo se lleva a cabo en dos etapas; en la primera etapa los osteoblastos sintetizan los componentes de la matriz ósea, que sufren modificaciones prostraduccionales⁴⁶ como la hidroxilación de los residuos de lisina y prolina en la colágena, o la carboxilación de residuos de ácido glutámico en la osteocalcina antes de ser secretadas por los osteoblastos. La colágena tipo I, es depositada en forma de láminas o capas,^{14,16} a los que se incorporan proteínas no colagenas necesarias para la mineralización.¹⁶ Después de un período de maduración de 5 a 10 días,⁴¹ inicia de segunda etapa; la mineralización, que consiste en el depósito de sales de calcio y fosfatos sobre la matriz ósea. La fosfatasa alcalina es esencial en la mineralización y calcificación^{26,47} regula el transporte de fosfato, pues la hipofosfatemia produce mineralización anormal.⁴⁷ Además la 1,25-dihidroxitamina D, la sialoproteína

ósea, la osteopontina, la osteonectina y la osteocalcina intervienen en el proceso de mineralización ósea.²⁶ Al terminar la síntesis y mineralización del hueso una parte de esta población de osteoblastos se transforman en células planas u osteocitos,¹⁶ y otra proporción entra en proceso de apoptosis después de rellenar la cavidad del hueso erosionado.⁴⁸ En condiciones normales la cantidad de hueso formado es exactamente igual a la cantidad de hueso reabsorbido en la remodelación.¹⁴

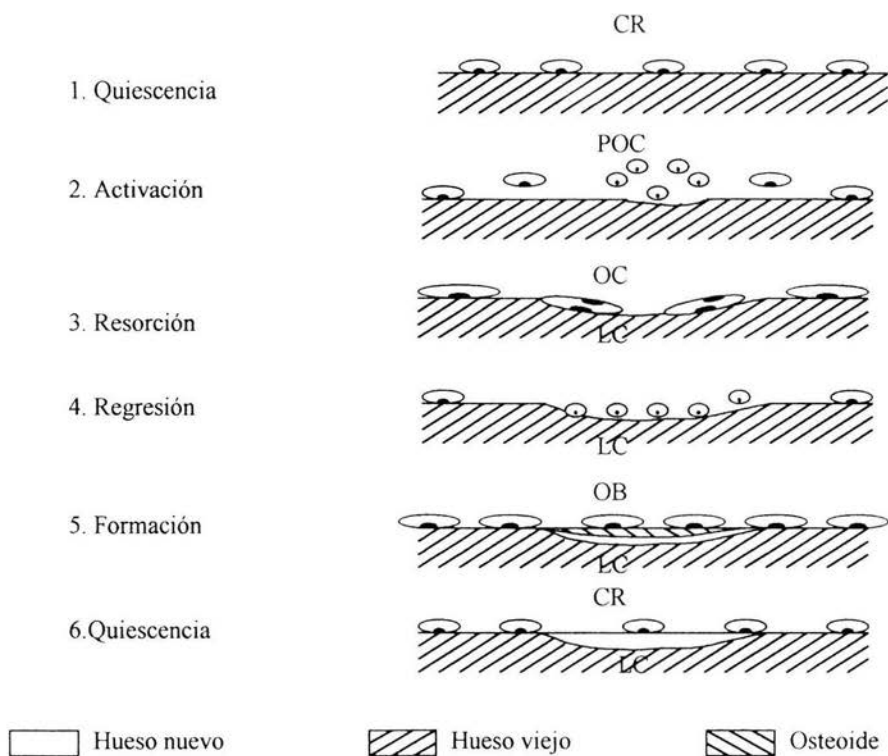


Figura 3. El ciclo del remodelado óseo. CR = célula de revestimiento, POC = preosteoclasto, OC = osteoclasto, LC = línea de cemento, OB = osteoblasto.

3.6. Metabolismo del calcio

En el esqueleto se encuentra el 99% del calcio, solo el 1% circula en el suero en tres formas: 50% ionizado, 40% unido a albúmina y 10% formando complejos con citrato y fosfato. Las concentraciones séricas del calcio iónico, la forma activa, se regulan dentro de límites fisiológicos estrechos; es necesario para el adecuado funcionamiento de varios tejidos, como la excitación y contracción del corazón y los músculos, la transmisión sináptica, las funciones del sistema nervioso, la agregación plaquetaria, la coagulación y la secreción de hormonas en procesos como la excitosis.⁹

Las funciones metabólicas del esqueleto están controladas por tres hormonas calciotrópicas; la hormona paratiroidea (PTH), la 1,25 dihidroxivitamina D₃ (1,25 OH)₂ o vitamina D y la calcitonina,³⁸ mediante efectos concertados sobre sus principales órganos blanco, hueso, intestino y riñón.⁴⁹ La PTH es el principal estimulante de la resorción ósea,³⁸ libera calcio y fosfato a la circulación, estimula la reabsorción de calcio e inhibe la reabsorción de fosfato en los túbulos renales, estimula la síntesis renal de 1 α -hidroxilasa, responsable de la conversión de 25-dihidroxivitamina D a 1,25 (OH)₂D₃.⁴⁹ La concentración de PTH se eleva con la edad, inhibe la síntesis de colágena, aumenta la tasa de remodelación y pérdida de masa ósea; no obstante, de acuerdo a recientes estudios la administración intermitente incrementa la formación ósea, sin embargo esta acción anabólica aún se investiga.³⁸ La vitamina D es necesaria para la absorción intestinal de calcio y fosfato,³⁸ estimula la diferenciación de los osteoblastos, participa en la mineralización de la matriz ósea y acelera la maduración de los osteoblastos.^{2, 49} La calcitonina, principal inhibidor de resorción ósea, disminuye la concentración de calcio sérico,⁵⁰ reduce el tamaño del osteoclasto, que retrae su borde rugoso y posteriormente se desprende de la superficie del hueso.⁴⁹

3.7. Hormonas sistémicas en la remodelación ósea

Los estrógenos son muy importantes para mantener el recambio óseo normal,⁵¹ la deficiencia de estrógenos aumenta la tasa de remodelación y la resorción excede a la formación ósea.⁵² El efecto estimulador de los estrógenos en la matriz ósea se ha demostrado en distintos trabajos que demuestran que la terapia de reemplazo hormonal disminuye la resorción ósea en mujeres menopáusicas, sin embargo el mecanismo mediante el cual actúan no ha sido determinado con exactitud, aunque parece deberse a su acción sobre la síntesis de proteínas óseas, como la colágena y factores de crecimiento.⁵³ En cambio las hormonas tiroideas tienen un efecto adverso en el hueso, reclutan y activan los osteoclastos, son potentes estimulantes de la resorción ósea, particularmente cuando se producen en exceso como en el hipertiroidismo.⁵⁴ La hormona de crecimiento (GH) que tiene efecto directo en la remodelación ósea, aumenta la concentración del IGF-I el cual estimula la proliferación de osteoblastos.⁵⁵ Los glucocorticoides disminuyen la síntesis de proteínas en los osteoblastos, así como su proliferación, acción que se realiza a través de su receptor, el cual regula un número importante de genes que codifican la síntesis de colágena tipo I, osteocalcina, fibronectina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína ósea y fosfatasa alcalina.⁵⁶ La insulina estimula la síntesis de colágena tipo I, tiene efecto similar al IGF-I, y no parece influir en la resorción ósea.⁵⁷

3.8. Reguladores de la remodelación ósea

Las células óseas sintetizan una gran variedad de factores de crecimiento y citocinas.⁵⁸ Los factores de crecimiento semejante a insulina (IGFs), son los más abundantes e importantes reguladores del metabolismo óseo.⁵⁹ Los osteoblastos sintetizan IGF-I e IGF-II, que tienen efectos similares, sin embargo IGF-I es el estimulante más potente de los osteoblastos. Los IGFs incrementan la replicación y diferenciación de los osteoblastos, estimulan la síntesis de colágena tipo I, y proteínas no colágenas de la matriz del hueso, importantes para mantener la masa ósea, las alteraciones en la actividad y síntesis de los IGFs son relevantes en la patogénesis de la osteoporosis y otras enfermedades metabólicas del hueso.^{58, 59} La síntesis de IGF-I, esta regulada por la GH, los estrógenos, PTH, las hormonas tiroideas y el factor de crecimiento epidérmico (EGF).⁵⁹ La concentración de IGF-I sérica disminuye con la edad, en mujeres premenopáusicas su concentración es baja, y en mujeres posmenopáusicas disminuye aún más, disminución que se correlaciona con el decremento de la masa ósea.⁵⁸

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) pertenecen a la misma familia de polipéptidos, tienen acción compleja sobre el metabolismo del hueso. El TGF- β es sintetizado y almacenado en la matriz ósea, liberado durante la resorción del hueso, estimula la formación e inhibe la resorción ósea.⁶⁰ Las BMPs estimulan la replicación de las células óseas e inhiben la resorción ósea.⁶¹ El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), tienen un papel importante no sólo en la remodelación, ya que también están asociados con el desarrollo y regeneración de fracturas óseas.⁶²

Varias citocinas y factores hematopoyéticos tienen un efecto complejo en la remodelación ósea, entre los más importantes factores osteotrópicos se encuentran la interleucina (IL) 1α y β , el factor de necrosis tumoral (TNF) α y β ,

el factor estimulante de colonias (M-CSF), el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF),⁶³ el ligando de osteoprotegerina (TRANCE/RANKL/OPGL), la IL-6 e IL-11.⁴¹ Los monocitos-macrófagos sintetizan la IL-1 y el TNF α , potentes estimulantes de resorción e inhibidores de formación ósea, promueven la resorción *in vitro*, causan pérdida de hueso e hipercalcemia cuando se administran *in vivo*,⁶³ ambas citocinas tienen efecto mitogénico en los osteoclastos, e indirectamente inducen a las células del estroma-osteoblastos la secreción de M-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-11⁴¹ y TRANCE/RANKL/OPGL.⁶⁴ La IL-6 aumenta la osteoclastogénesis aunque no activa su diferenciación,⁶³ la deficiencia de estrógenos aumenta la IL-6 y favorece la activación de la resorción ósea,^{65, 66, 67} la IL-11 es importante en la osteoclastogénesis de manera independiente de la concentración de estrógenos circulantes,⁴¹ en conjunto la IL-6 e IL-11 actúan de forma autocrina en el osteoblasto, estimulan síntesis de TRANCE/RANKL/OPGL y M-CSF, combinación implicada en la diferenciación de los precursores de osteoclastos.^{63, 64} El interferón (INF) γ , la IL-4, IL-10, IL-13, IL-18 y el GM-CSF forman un grupo de citocinas que inhiben la osteoclastogénesis.^{41, 64, 68} La IL-18, expresada por los osteoblastos, estimula la producción INF γ , y el GM-CSF por parte de los linfocitos T, no obstante que representan entre el 2-3% de las células de la médula ósea, son capaces de inducir la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos. Otras citocinas que derivan de los linfocitos T son la IL-4, IL-13, IL-17⁴¹ y la IL-10.⁶⁹

3.9. Osteoporosis posmenopáusicas

La osteoporosis posmenopáusicas es el trastorno óseo más común, es causada por la deficiencia de estrógenos que aumenta la tasa de remodelación con predominio de la resorción ósea, acelera la pérdida de hueso después de la menopausia. El hipoestrogenismo en la mujer es el principal factor para desarrollar osteoporosis.^{70, 71}

La pérdida de masa ósea inicia alrededor de la cuarta década de la vida en la perimenopausia, etapa en la que se pierde entre el 5-15% de hueso;^{72, 73} durante los primeros 5-10 años de la posmenopausia la pérdida de hueso es más acelerada, posteriormente disminuye, sin que se conozcan las causas de este cambio. Durante la posmenopausia se pierde mayor cantidad de hueso trabecular, lo que aumenta la predisposición a fracturas en sitios específicos del esqueleto con elevada cantidad de este tipo de hueso, principalmente en vértebras, la cadera y el antebrazo.⁴⁰

Otros cambios que se presentan en la posmenopausia incluyen el aumento en la concentración de hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), mientras que la GH, el IGF-I y la calcitonina disminuyen.⁷² La deficiencia de estrógenos disminuye la absorción de calcio en el intestino y riñón, aumenta la secreción de PTH que estimula la resorción ósea, y regula la producción de citocinas osteotrópicas como la IL-1, IL-6 y el INF- α .⁷⁰ Los marcadores de formación y resorción ósea aumentan entre un 50-100% a 50-150% respectivamente.⁵²

3.10. Terapia de reemplazo hormonal

El estudio de la menopausia ha alcanzado gran relevancia en la actualidad, debido a que cada día se conocen mejor las acciones de los estrógenos, así como las numerosas alteraciones que resultan de la privación estrogénica. Si se considera que la menopausia se presenta entre los 45-50 años y que la esperanza de vida para la mujer ha alcanzado un promedio de 75 años, significa que la mujer pasará cerca de la tercera parte de su vida en la posmenopausia, en un estado de hipoestrogenismo persistente.⁷⁴ Esto pone de manifiesto la importancia de la terapia de reemplazo hormonal, para tratar de disminuir las alteraciones somáticas, del cerebro, cardiovasculares y cambios metabólicos en especial la osteoporosis,⁷⁵ como tratamiento preventivo de la pérdida de hueso,⁷⁶ proporcionando a la mujer una mejor calidad de vida.⁷⁵

A pesar de los numerosos beneficios de la HRT, existe resistencia entre las mujeres para aceptar el tratamiento, algunas mujeres que inician su tratamiento pronto lo abandonan, probablemente por la falta de información, además de los efectos indeseables como la reanudación del sangrado menstrual o irregularidad de este o por el temor al cáncer mamario, teóricamente relacionado con los estrógenos; son algunas de las causas de resistencia por las cuales abandonan el tratamiento.⁷⁷

Los estrógenos que se utilizan en la terapia de reemplazo hormonal se clasifican de acuerdo con su estructura química: en naturales y en estrógenos sintéticos. Los estrógenos naturales incluyen; el estradiol (E_1), la estrona (E_2), el estriol (E_3),²⁰⁵ sus conjugados, así como estrógenos de origen equino, siendo estos últimos los más utilizados en la HRT; se obtienen de la orina de yegua preñada y constituyen una mezcla de E_1 , E_2 y E_3 , sulfato de estrona E_1-SO_4 además de otros estrógenos.

4. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE RECAMBIO OSEO

Los marcadores bioquímicos de remodelación o recambio óseo, generalmente se clasifican en: a) marcadores de formación y b) marcadores de resorción ósea, que reflejan la actividad de los osteoblastos y osteoclastos respectivamente. Para considerarse como un marcador específico, un compuesto tiene que relacionarse únicamente a la formación o resorción ósea, pero no ambos procesos y ser producido de forma específica en los huesos.

4.1. Marcadores de formación ósea

Los marcadores de formación ósea, son productos de la actividad directa e indirecta de los osteoblastos, durante sus distintas etapas de desarrollo, y reflejan diferentes aspectos de su función en la síntesis del hueso. Todos los marcadores de formación se miden en suero o plasma.

Tabla 2. Marcadores bioquímicos de formación ósea (suero)

Fosfatasa alcalina total

Fosfatasa alcalina específica de hueso

Osteocalcina nativa o total

Osteocalcina descarboxilada

Propéptido amino terminal de la procolagena tipo I (PINP)

Propéptido carboxi- terminal de la procolagena tipo I (PICP)

4.1.1. Fosfatasa alcalina específica de hueso

La fosfatasa alcalina total es el parámetro más antiguo utilizado como marcador óseo,³⁹ consiste en una mezcla de isoenzimas codificadas por cuatro genes; tejido no específico, intestino, placenta y células germinales. El gene del tejido no específico codifica las isoformas de hueso, hígado y riñón, siendo más relevantes las isoformas del hueso y la hepática con diferencias que radican en el patrón de glicosilación postraslacional.^{79, 80} En la circulación en adultos sanos, la fosfatasa alcalina ósea o específica de hueso constituye aproximadamente el 50%, al igual que la isoenzima hepática y sólo se han encontrado pequeñas cantidades de las isoformas intestinal y placentaria, esta última aumenta en los primeros tres meses de embarazo.^{79, 81}

La fosfatasa alcalina específica de hueso es una glicoproteína formada por dos subunidades idénticas, con peso molecular de 160 kDa, unida covalentemente a la membrana de los osteoblastos,²⁶ a través del glicofosfatidilinositol (GPI), es liberada a la circulación por acción de fosfolipasas específicas para GPI, posteriormente actúa como ectoenzima *in situ*.⁴⁷ Su función no está bien definida, pero es importante en la formación y mineralización del hueso,⁸¹ hidroliza ésteres de fosfato, y suministra fosfato que es depositado en la hidroxiapatita. Tiene varias ventajas con respecto a otros marcadores de formación ósea: destaca su prolongada vida media, no es afectada de forma significativa por variación diurna, (en contraste con la osteocalcina que muestra variación diurna del 30%) es más sensible a los cambios que ocurren en la remodelación ósea durante la menopausia, con un aumento del 77% comparado con el 24% de la fosfatasa alcalina total.⁸² Enfermedades con alto recambio óseo como el hiperparatiroidismo, la enfermedad de Paget y la falla renal crónica presentan niveles aumentados, que disminuyen luego del tratamiento con antagonistas de la resorción ósea.⁷⁹

4.1.2. Osteocalcina

La osteocalcina, conocida también como proteína Gla, es la más abundante de las proteínas no colágenas de la matriz ósea, es una proteína pequeña de 49 aminoácidos, con peso molecular de 5,800 Da, sintetizada principalmente por los osteoblastos y en pequeña cantidad por los odontoblastos.⁷⁹ La mayor cantidad de osteocalcina sintetizada se incorpora dentro de la matriz ósea, constituye el 15% de las no colágenas y aproximadamente entre un 10 y 30% se libera a la circulación, fracción detectada por inmunoensayo.⁷⁶ La función de la osteocalcina no está bien definida, pero su estructura química le confiere alta afinidad para unirse a la hidroxiapatita,²⁷ también es importante en el acoplamiento de la formación y resorción ósea.⁷⁹ La característica principal de su estructura primaria es la γ -carboxilación postraslacional en los residuos 17,21 y 24 de ácido glutámico, dependiente de vitamina K. La osteocalcina en el hueso no se encuentra completamente carboxilada, y el nivel de su forma descarboxilada en el suero aumenta con la edad, principalmente en mujeres, por lo cual el aumento de la forma descarboxilada es el mejor índice para medir el riesgo de fractura.^{12, 79} Se ha reportado que aumenta en la fase lútea y durante los tres primeros meses del embarazo.²⁷

La osteocalcina es considerada marcador específico del osteoblasto, sus niveles en la circulación correlacionan con la tasa de formación, sin embargo este péptido es una mezcla de 6 diferentes fragmentos identificados en la circulación; fracción aminoterminal (1-43), carboxiterminal (44-49), aminoterminal (1-19), parte media de la molécula (20-43), carboxiterminal (20-49), y la molécula completa (1-49),¹² que corresponde sólo el 36% de la osteocalcina circulante, además de la fracción descarboxilada.⁸¹ La principal desventaja que presenta este marcador es la variación diurna, pues alcanza su pico máximo por la noche y disminuye en la mañana, además de la rápida degradación y presencia de las distintas fracciones de osteocalcina en el suero con diferente grado de inmunoreactividad.²⁷

4.1.3. Propéptidos de procolágena tipo I

Los propéptidos de la procolágena, el propéptido aminoterminal (PINP) y carboxiterminal (PICP), son precursores derivados de la síntesis de la colágena tipo I,⁷⁹ la procolágena es secretada al espacio extracelular donde tiene modificaciones postraduccionales que incluyen la degradación de ambos propéptidos, amino y carboxiterminal por acción de amino y carboxiproteasas, mismos que son liberados a la circulación durante el proceso de conversión de procolágena a colágena.⁸³ Estos fragmentos son medibles por inmunoensayos y se utilizan como marcadores de formación ósea.

El PINP es un pequeño polipéptido con peso molecular de 70 kDa, con elevada cantidad de prolina e hidroxiprolina, es eliminado de la circulación por receptores para desechos de las células endoteliales. El PICP pesa 115 kDa, tiene enlaces disulfuro que le proporcionan estabilidad a la molécula, y de la circulación es capturada por receptores de manosa de las células endoteliales del hígado.⁸¹

El PINP es más sensible que el PICP, se ha encontrado aumentada en la circulación durante el crecimiento acelerado de la pubertad, la menopausia y la enfermedad de Paget's, con valores significativamente mayores que el PICP y también se ha comprobado su disminución después de la terapia de reemplazo hormonal (HRT) un 40% del PINP comparado con el 20% de PICP.⁷⁹

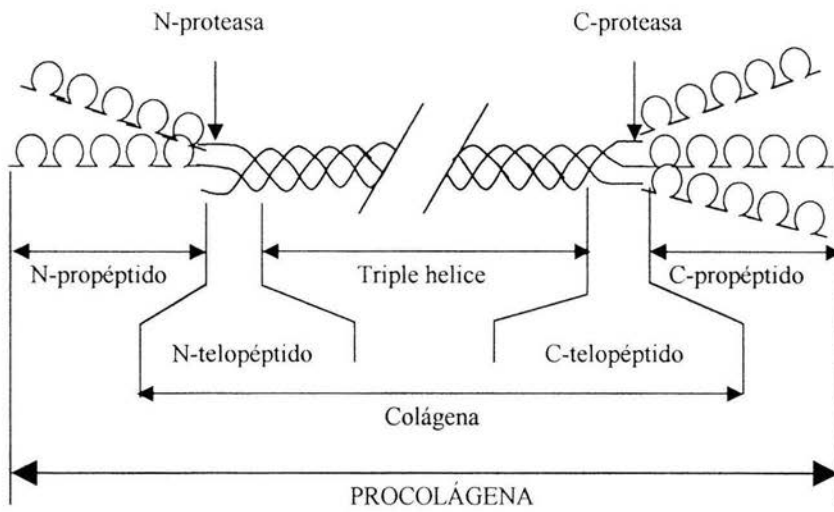


Figura 4. Representación esquemática de la procolágena

4.2. Marcadores de resorción ósea

La mayoría de los marcadores de resorción ósea, son productos de la degradación de la colágena madura del hueso, excepto la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRACP).

Tabla 3. Marcadores bioquímicos de resorción ósea

Orina

Hidroxiprolina

Deoxipiridinolina

Piridinolina

Galactosilhidroxilisina

Glucosilhidroxilisina

Telopéptidos amino-terminal de colágena tipo I

Telopéptidos carboxi-terminal de colágena tipo I

Suero

Fosfatasa alcalina resistente al tartrato

Telopéptidos carboxi-terminal de colágena tipo I

4.2.1. Hidroxiprolina

La excreción de hidroxiprolina en la orina ha sido la medida del índice de recambio óseo más utilizado, a pesar de tener varias desventajas.⁸⁴ La hidroxiprolina se forma por la hidroxilación postraducciona de la prolina, constituye aproximadamente el 12-14% del total de aminoácidos que contiene la colágena madura del hueso. El 90% de hidroxiprolina es liberada a la circulación durante la degradación de la colágena, sin que sea reincorporada a la síntesis de nueva colágena, es metabolizada en el hígado y posteriormente excretada en la orina, donde se encuentra en dos formas; libre y unida a péptidos.⁸¹

La hidroxiprolina es un marcador de resorción ósea poco específico, tiene varias desventajas: a) parte de la hidroxiprolina excretada en la orina deriva de fuentes no óseas; b) es absorbida en la dieta principalmente de la carne y las gelatinas por lo cual deben ser restringidos estos alimentos 2-3 días antes de la recolecta de muestras de orina; c) proviene de la fracción C1q del complemento y la elastina,^{79 81} por lo que esta siendo sustituida por nuevos inmunoensayos.

La excreción de la hidroxiprolina muestra ritmo circadiano, alcanza su pico máximo después de la media noche, por lo cual se recomienda recolectar muestras de orina de 24 horas para ser estandarizadas y obtener los valores de este marcador.²⁷

4.2.2. Fosfatasa ácida resistente al tartrato

Las fosfatasa ácida constituye un grupo de 5 isoenzimas, que son inhibidas por el tartrato, a excepción de la secretada por los osteoclastos, de aquí el nombre de este marcador.⁸¹ La fosfatasa ácida resistente al tartrato es expresada en varios tejidos y células que incluyen el hueso, plaquetas, eritrocitos, macrófagos, la próstata y el bazo. Es posible distinguir las diferentes isoenzimas a través de la movilidad electroforética en gel de poliacrilamida. Mediante esta técnica se encontraron dos subisoformas de la fosfatasa ácida resistente al tartrato la 5a y la 5b, esta última ha mostrado ser específica de los osteoclastos. Sin embargo la función exacta de este marcador de resorción ósea no está bien definida.^{79, 80} Los inconvenientes para la medición rutinaria son su gran inestabilidad térmica, además que la hemólisis de eritrocitos en los sueros interfiere y eleva los niveles de la fosfatasa ácida resistente al tartrato de forma importante.⁸⁵

4.2.3. Glicósidos de hidroxilisina

Los glicósidos de hidroxilisina se forman durante la glicosilación de la hidroxilisina e hidroxiprolina, en la etapa la síntesis de la colágena tipo I se incorporan dentro de la matriz del hueso, y existen en dos formas: galactosilhidroxilisina (Gal-Hyl) y la glucosilhidroxilisina (Glc-Gal-Hyl). Ambos compuestos son liberados a la circulación durante la degradación de la colágena, y excretados en la orina. La ventaja de las formas glicosiladas de la hidroxilisina sobre la hidroxiprolina como marcador de resorción ósea, radica en que no son metabolizadas, y los alimentos que se ingieren en la dieta no aumentan los niveles de ambas formas glicosiladas.⁸¹

La Glc-Gal-Hyl esta presente en la colágena de la piel y en la fracción C 1q del complemento, mientras la Gal-Hyl, tiene mayor especificidad, ya que deriva exclusivamente de la degradación de la colágena tipo I del hueso,⁸¹ se incrementa con la edad, por lo cual se utiliza como marcador de resorción ósea en la osteoporosis, aunque son escasos estos datos.⁸⁶ Existe un estudio realizado en mujeres menopáusicas con terapia de reemplazo hormonal (HRT), en el que la Gal-Hyl no disminuye, por lo cual se requiere de mayor evaluación para ser considerado un marcador confiable de resorción ósea.⁷⁹

IZT.



U.N.A.M. CAMPUS

4.2.4. Enlaces de piridinolina

Los enlaces de piridinolina de la colágena tipo I, están formados de deoxipiridinolina (DPD) y piridinolina (PYR),³⁴ también denominados lisilpiridinolina e hidroxilisilpiridinolina respectivamente,^{27, 87, 88} se forman durante la maduración extracelular de las fibras de colágena.³⁴ La deoxipiridinolina deriva de dos residuos de hidroxilisina y uno de lisina, la piridinolina contiene tres residuos de hidroxilisina.²⁷ La PYR se ha encontrado en cartílago, hueso, vasos sanguíneos, ligamentos y tendones, la DPD esta restringida a la colágena del hueso.³⁴ La tasa de liberación de PYR y DPD del hueso es aproximadamente de 3:1 respectivamente,¹² aunque la DPD se encuentra en pequeña cantidad es más específica y confiable como marcador de resorción ósea.³⁴

Durante la resorción del hueso, los enlaces de piridinolina de la colágena tipo I, son degradados, y los componentes que forman este tipo de enlace son liberados a la circulación y excretados en la orina. La degradación de la colágena tipo I recién formada no afecta los niveles de DPD y PYR, pues los enlaces de piridinolina reflejan de forma específica la degradación de las fibras de colágena tipo I maduras, además los alimentos que se adquieren en la dieta no afectan la concentración de los mismos en contraste con la hidroxiprolina.⁸¹

Los enlaces de piridinolina excretados en la orina, se transportan en sus formas libres (PYR y DPD) y unidos a péptidos provenientes de las regiones amino y carboxiterminal o telopeptídicas de la colágena; en adultos las formas libres se encuentran aproximadamente entre el 40-50% y unida a péptidos entre un 50-60%.⁷⁹

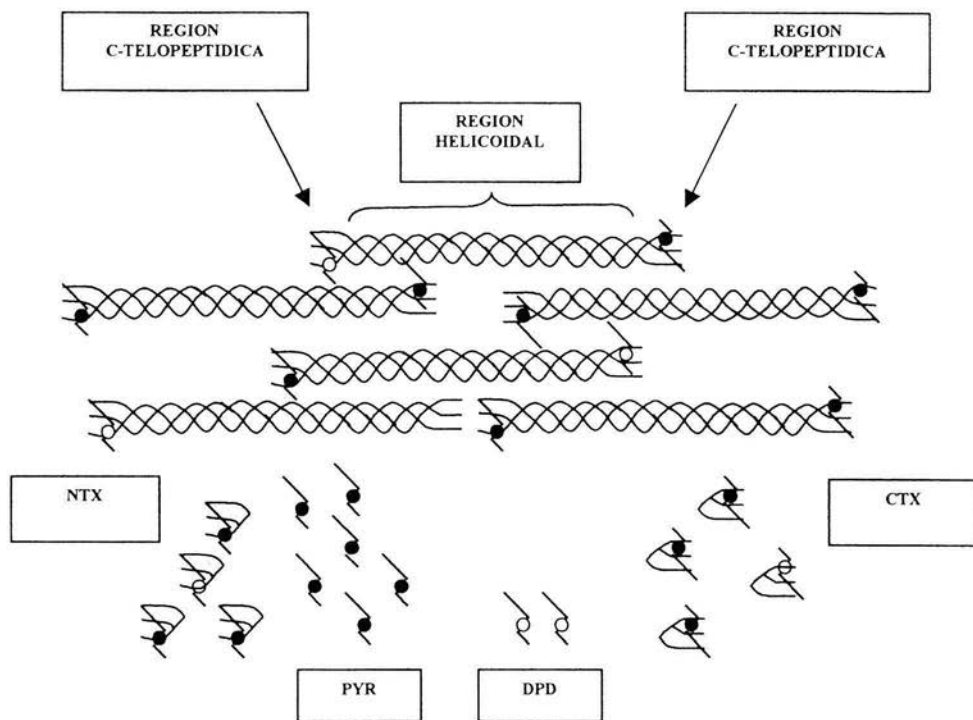


Figura. 5. Estructura y productos de la degradación de la colágena tipo I.



Deoxipiridinolina



Piridinolina.

4.2.5. Telopéptidos unidos a enlaces piriolina de la colágena tipo I

Durante el proceso de resorción ósea, productos de la degradación de la colágena tipo I, como los fragmentos amino y carboxi-terminal son liberados unidos a enlaces de piridinolina; estos fragmentos se denominan N- telopéptido (NTX) y C- telopéptido (CTX).¹² Ambos fragmentos derivan exclusivamente de la degradación de las fibras de colágena madura del hueso, excretados en la orina.⁸⁸

El NTX se mide por inmunoensayo empleando anticuerpos que reconocen la secuencia glicina-valina-glicina-lisina-glicina-ácido aspartico-tirosina-glutamina (GVGKGDYQ) de la cadena $\alpha 2$ de la colágena, en donde K contiene un enlace de piridinolina, sin embargo el anticuerpo reacciona con varios componentes de la misma secuencia peptídica y la presencia de este tipo de enlace no es esencial para que exista reactividad.^{81, 89} El NTX se considera uno de los marcadores de resorción ósea con mayor especificidad y utilidad, su concentración disminuye con la HRT.⁹⁰

Para cuantificar el telopéptido carboxiterminal se han desarrollado tres tipos de inmunoensayos: el primero reconoce un fragmento de esta región, previamente tratada con metaloproteinasas (CTX-MMP), denominado también telopéptido carboxiterminal unido a enlaces piriolina de la colágena tipo I (ICTP).⁹¹ El ICTP, fragmento de 9 KDa, es liberado al espacio extracelular durante la resorción de la colágena madura del hueso.⁹² El determinante antigénico del ICTP detectable en el suero requiere enlaces piridinolina, que incluyen dos dominios con elevada cantidad de fenilalanina de las dos cadenas $\alpha 1$ que constituyen la colágena, localizada en los residuos derivados de lisina o piridinolina entre el triple dominio helicoidal.⁹³ El ICTP es sensible para detectar resorción ósea, mielomas múltiples, enfermedades metastásicas, y otros procesos que involucran la degradación de la colágena tipo I,⁸¹ sin embargo algunos investigadores no lo

consideran un marcador específico de resorción ósea,⁹⁴ pero si como marcador de recambio óseo, ya que los niveles de ICTP en mujeres menopáusicas con HRT no disminuyen.⁹²

El segundo tipo de inmunoensayo del telopéptido carboxiterminal (CTX) en orina, emplea anticuerpos que reconocen un octapéptido de la cadena $\alpha 1$, de la colágena Alanina-Histidina- ácido aspártico- β -Glicina- Glicina-Arginina (AHD- β -GGR) conjunto de aminoácidos que derivan de la colágena y se encuentran en la orina, se considera marcador específico de resorción ósea,⁹⁰ que disminuye después de la HRT.⁸¹ Recientemente se ha desarrollado el tercer tipo de inmunoensayo para medir en suero el CTX.⁹³

5. PROTOCOLO DE INVESTIGACION

5.1. Planteamiento del problema

No se conoce con exactitud cual es la utilidad de los marcadores bioquímicos de remodelación ósea en la determinación del grado de osteoporosis durante la posmenopausia. El presente proyecto se diseño para estudiar la relación que existe entre los marcadores bioquímicos de remodelación ósea en mujeres posmenopáusicas y su respuesta a la terapia de reemplazo hormonal (HRT).

5.2. Justificación

El número de mujeres con osteoporosis se ha incrementado considerablemente, al igual que el numero de fracturas, muchas de ellas suelen acarrear graves limitaciones funcionales, deterioro en la calidad de vida con un costo elevado por el tipo de atención que necesitan. Esto hace prioritario encontrar alternativas diagnósticas más eficientes que determinen la pérdida de hueso por lo cual los marcadores bioquímicos de remodelación ósea tienen cada vez mayor aceptación como indicadores confiables en el seguimiento de la terapia hormonal de reemplazo.

5.3. Hipótesis

Durante la posmenopausia los niveles de estrógenos disminuyen, así como GH e IGF-I lo que aumenta la resorción ósea, así como las concentraciones de los marcadores de remodelación ósea, por lo cual el metabolismo negativo del hueso en la posmenopausia aumenta y se revierte con la terapia de reemplazo hormonal.

5.4. Objetivos

- 1.- Determinar los marcadores bioquímicos de recambio óseo en mujeres posmenopáusicas antes y después de administrar tratamiento de reemplazo hormonal (HRT).
2. Establecer la relación entre los niveles de los marcadores de remodelación ósea, con los niveles de Estradiol, GH, IGF-I.

5.5. Diseño del estudio

El estudio realizado es de tipo prospectivo, longitudinal, observacional y comparativo.

5.6. Variables

Variable dependiente: Marcadores de remodelación ósea: osteocalcina (OC), fosfatasa alcalina específica de hueso (BSAP), Deoxipiridinolina (DPD), telopéptido C-terminal de la colágena (ICTP).

Variable independiente: Terapia de reemplazo hormonal (HRT).

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Material clínico

El estudio se realizó con 53 mujeres que fueron clasificadas en 3 grupos:

GRUPO I.: Mujeres jóvenes 30-39 años (Testigo) (n=20)

GRUPO II: Mujeres posmenopáusicas sin HRT (Basal) de 50 a 62 años (n=22).

GRUPO III: Mujeres posmenopáusicas de 50 a 62 años, tratadas con 0.625 mg de estrógenos conjugados (HRT), (n=11).

6.2. Criterios de inclusión

Las mujeres jóvenes, con ciclos menstruales regulares ovulatorios y niveles hormonales normales. En el caso de las mujeres posmenopáusicas se incluyeron aquellas con niveles elevados de FSH (< de 50 mUI/mL) y estradiol bajo (> a 30 pg/mL).

6.3. Criterios de exclusión

Se excluyeron pacientes con enfermedades de origen renal y hepático, diabetes mellitus, con riesgo de cáncer mamario, trastornos endocrinos, y aquellas con alguna contraindicación para recibir estrógenos, así como alteraciones menstruales en el caso de las mujeres jóvenes.

6.4. Toma de muestras

En un horario de 7:00 a 8:00 h se tomaron a todas las mujeres muestras de 20 mL de sangre venosa, con ayuno de 10 horas. Cabe señalar que la toma de muestra en las mujeres jóvenes, se realizó a la mitad del ciclo menstrual a diferencia de las mujeres posmenopáusicas en las que la muestra se tomó antes y después de 3 meses de tratamiento. El suero fue separado por centrifugación a 4°C a 1500 rpm durante 10 minutos. Los sueros fueron fraccionados y congelados de inmediato a -35° C hasta el momento de realizar las determinaciones hormonales y de los marcadores de remodelación ósea. En el caso de la osteocalcina se requiere una muestra de plasma, para lo cual parte de la sangre se colectó en un tubo con heparina que después de agitarse fue sumergido en hielo. El plasma obtenido se congeló a -35 °C hasta el momento de su determinación. Para el ensayo de la deoxipiridinolina se utilizó una muestra de la primera orina de la mañana que también se congeló a - 35 °C hasta el momento de la medición.

7. TECNICAS ANALITICAS

Para las determinaciones hormonales y de los marcadores de recambio óseo se utilizaron diferentes métodos denominados inmunoensayos, que se basan en una reacción antígeno (Ag) anticuerpo (Ab) en la cual para cuantificar la reacción, cambia únicamente el marcador empleado; radioisótopo (RIA), enzima (ELISA), quimioluminiscencia (QLA). Se utilizaron los inmunoensayos debido a su alta especificidad, sensibilidad, reproducibilidad, y precisión, difícilmente alcanzada por otras técnicas. Cabe señalar que los diferentes ensayos se realizaron con estuches comerciales de acuerdo al protocolo proporcionado por los respectivos fabricantes.

7.1. Quimioluminiscencia (QLA)

Las determinaciones de FSH, GH, LH, Deoxipiridinolina y Osteocalcina, se realizaron por quimioluminiscencia en el inmunoanализador automatizado Immulite de Diagnostics Products Corporation (Los Angeles, CA., U.S.A.), empleando estuches comerciales de la misma marca.

La quimioluminiscencia es el fenómeno en el cual se obtiene energía luminosa a partir de una reacción química. En las determinaciones realizadas la reacción se lleva a cabo entre la fosfatasa alcalina y el sustrato Dioxetano-PO₄, sustancia orgánica con características luminiscentes cuando se encuentra en un estado electrónicamente excitado.⁹⁵

Los ensayos quimioluminiscentes son de dos tipos: competitivos o inmunométricos. El ensayo competitivo se lleva a cabo entre el marcador óseo a medir en el suero que compite con un marcador óseo marcado con fosfatasa

alcalina, por los sitios de fijación a su anticuerpo específico unido a una fase sólida. Después de llevarse a cabo la reacción inmunológica queda incorporada la enzima al complejo Ag-Ab en la fase sólida por lo que al adicionar el Dioxetano-PO₄ se lleva a cabo la degradación del mismo emitiendo luz.(Fig.7) En este inmunoensayo la cantidad de luz emitida es inversamente proporcional a la concentración del analito presente en la muestra. Mediante esta técnica se cuantificó la Deoxipiridinolina.

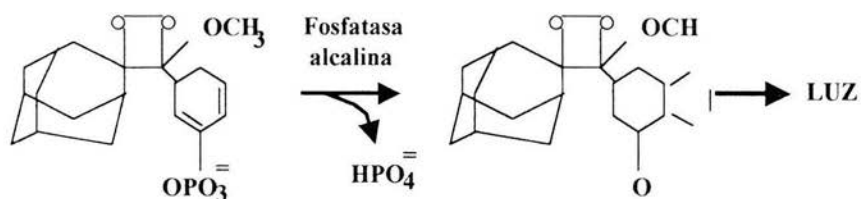


Figura 6. Reacción por QLA.

En el análisis inmunométrico la hormona o marcador óseo a medir se fija a un anticuerpo específico que esta unido a una fase sólida y después a un segundo anticuerpo también dirigido al analito marcado con la fosfatasa alcalina. Posteriormente al adicionar el Dioxetano-PO₄ se lleva a cabo la degradación del mismo emitiendo luz. La cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la cantidad de hormona o marcador óseo a medir. Las determinaciones realizadas mediante este análisis fueron: FSH, GH, LH, y osteocalcina

	Sensibilidad		Precisión	
	Límite de detección	intraensayo	CV interensayo	
LH	0.7 mIU/mL	5.7	9.6	
FSH	0.1 mIU/mL	6.4	7.5	
GH	0.03 ng/mL	5.9	5.8	
Deoxipiridinolina	4.4 nM	9.7	9.7	
Osteocalcina	0.1 ng/mL	3.2	4.7	

Tabla 4.- Control de calidad de las determinaciones por QLA.

7.2. Radioinmunoanálisis (RIA)

Se cuantificaron estradiol y telopeptido carboxi-terminal tipo I unido a enlaces piridinolina (ICTP) por radioinmunoanálisis. El estradiol se determinó por RIA de fase sólida empleando estuches comerciales de Diagnostics Products Corporation (Los Angeles, CA., U.S.A.). El ICTP se determinó por RIA de doble anticuerpo utilizando estuches comerciales de (DiaSorin Stillwater, MN., U.S.A.).

El Radioinmunoanálisis **RIA** emplea moléculas marcadas con radioisótopos que permiten medir cantidades extremadamente pequeñas de antígenos, anticuerpos y complejos antígeno- anticuerpo. La concentración de las moléculas marcadas esta determinada por la medición de la radiactividad más que por análisis químico, que hace la detección y sensibilidad se incremente varios ordenes de magnitud. El desarrollo de este método analítico altamente sensible tiene una amplia gama de aplicaciones en la cuantificación de hormonas, y detección de numerosas sustancias de importancia biológica,⁹⁶ razón por cual Solomon A. Berson y Rosalyn S.Yallow recibieron el premio nobel por cuantificar por primera vez la insulina humana, utilizando anticuerpos anti-insulina humana.⁹⁷

El principio del RIA se basa en la elevada especificidad y afinidad de los anticuerpos por la hormona a medir, que se mezclan en pequeña cantidad con el líquido que contiene la hormona a determinar, y una cantidad apropiada de hormona radiactiva. Por lo tanto la hormona natural y la hormona marcada compiten por los sitios de unión sobre el anticuerpo. Después de alcanzar el equilibrio de está reacción, el complejo antígeno-anticuerpo se aísla del resto de la solución y, mediante técnicas de recuento radiactivo se cuantifica la radiactividad ⁹⁸ (Figura 8). La cantidad de radiactividad emitida es inversamente proporcional a la concentración de la hormona contenida en la muestra. A la vez se prepara una curva estándar que relaciona el grado de unión de la

hormona marcada al anticuerpo en función de la concentración de la hormona en los estándares de concentración conocida. La concentración de la hormona en las muestras se obtiene al relacionar el porcentaje de unión de la hormona marcada. (Figura 9).

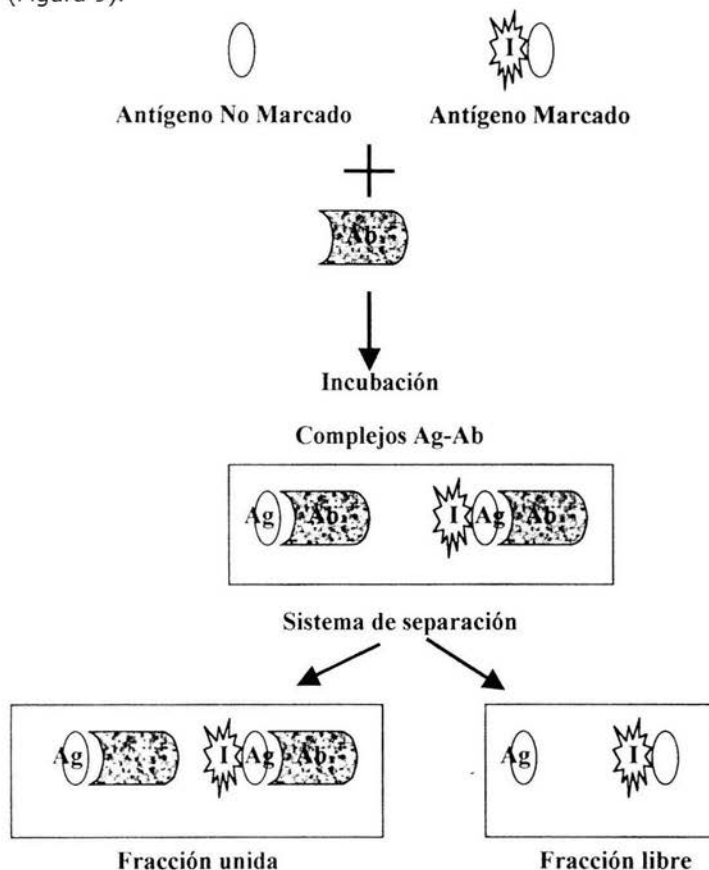


Figura 8. Reacción general del **RIA**.

En el RIA de fase sólida una cantidad determinada de anticuerpo se encuentra adherido a la superficie del tubo. El anticuerpo inmovilizado se unirá a una cantidad finita del antígeno marcado radiactivamente que se ha añadido. Cuánto antígeno marcado presente en la muestra y del antígeno unido, dependerá de la concentración del antígeno y de la afinidad del anticuerpo.⁹⁹

Otra variante del radioinmunoanálisis es el denominado de doble anticuerpo en este tipo de ensayo a diferencia del IRMA, el segundo anticuerpo se une al primer anticuerpo, para la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo.

	Sensibilidad	Precisión	
	Límite de detección	CV intraensayo	CV interensayo
Estradiol	8 pg/mL	5.3	6.4
ICTP	0.5 g/L	4.8	4.7

Tabla 5.- Control de calidad de las determinaciones por **RIA**.

CT	31836	31815	31825	
Bk	28.1	27.1	27.6	
St	cpm		Conc	cpm(X)
1	16316	15580	1	15948
2	14901	14796	10	14848
3	13508	13429	20	13469
4	11269	11121	50	11195
5	7752	7867	150	7810
6	5700	5510	250	5605
7	4237	4020	500	4128

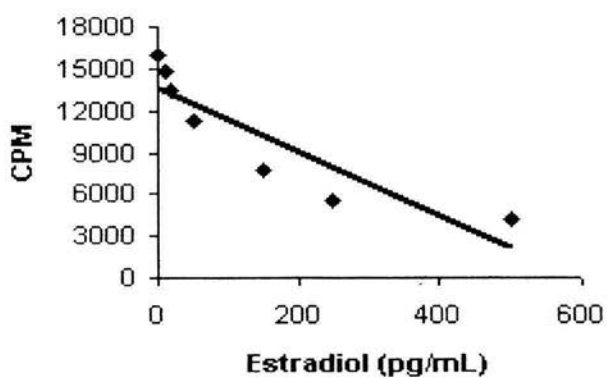


Figura 9. Representación de la curva de calibración de estradiol, por **RIA**.

7.3. Análisis inmunoradiométrico (IRMA)

El análisis inmunoradiométrico es un ensayo no competitivo, en el que el analito problema es atrapado entre dos anticuerpos, formando un complejo tipo "emparedado". El primer anticuerpo se encuentra inmovilizado en la pared interna de los tubos en donde se lleva a cabo la reacción y se une al antígeno presente en la muestra; el segundo anticuerpo que lleva la marca radiactiva se une al antígeno unido a la fase sólida. La cantidad de radiactividad unida en los tubos es directamente proporcional a la concentración de la hormona contenida en la muestra.¹⁰⁰ El uso de dos anticuerpos generalmente monoclonales eleva de manera notable la especificidad y en gran medida reduce las interferencias de fondo, por lo cual, mejora la sensibilidad de la medición. Mediante esta técnica se cuantificó el IGF-I, empleando estuches de Diagnostics Systems Laboratories (Texas, U.S.A). La curva de calibración de IGF-I se representa en la (figura 10).

	Sensibilidad	Precisión	
	Límite de detección	CV intraensayo	CV interensayo
IGF-I	0.8 ng/mL	2.6	4.4

Tabla 7.- Control de calidad de las determinaciones por **IRMA**.

Sistema inmunoradiométrico

Tubos	cpm	conc.(ng/mL)	cpm X
CT	158803	154552	
Bk	166	178	172
ST 1	1300	1419	0
2	1856	1858	4.5
3	4939	4910	16
4	16530	16786	65
5	38221	33071	200
6	63240	63248	400
7	94913	93585	600

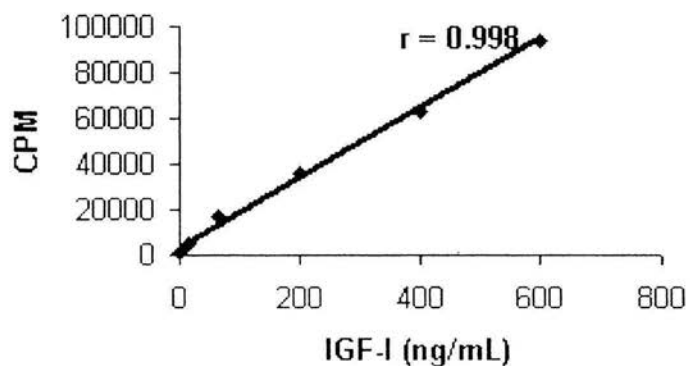


Figura 10. Curva de calibración del factor de crecimiento insulinoide (IGF-I).por el método inmunoradiométrico.

7.4. Análisis enzimático inmunoabsorbente (ELISA)

El análisis inmunoabsorbente ELISA se realizó para la cuantificación de fosfatasa alcalina específica de hueso, utilizando estuches comerciales de Metra Biosystems (Mountain View, CA. U.S.A.).

Este inmunoensayo utiliza microplacas cubiertas de anticuerpos, que fijan al antígeno (fosfatasa alcalina específica de hueso), posteriormente al agregarse el sustrato específico (p-nitro-fenil fosfato), se une covalentemente a la enzima, que convierte el sustrato incoloro en un producto con color, que se cuantifica fotométricamente.⁹⁹ La concentración de fosfatasa alcalina específica de hueso se obtiene interpolando la lectura de la densidad óptica (DO) de los problemas en la curva de calibración que se elabora con cinco diferentes concentraciones de fosfatasa alcalina específica de hueso.

	Sensibilidad		Precisión
	Límite de detección	CV intraensayo	CV interensayo
BSAP	0.7 U/L	5.0	5.9

Tabla 8.- Control de calidad de las determinaciones por **ELISA**.

Inmunoensayo de fosfatasa alcalina especifica de hueso

Tubos	Absorbancia (405 nm)	DO-NSB
ST conc 0 (Bo) (U/L)	0.162	0.161
2	0.186	0.186
20	0.583	0.577
50	1.212	1.161
80	1.924	1.733
140	3.019	2.975

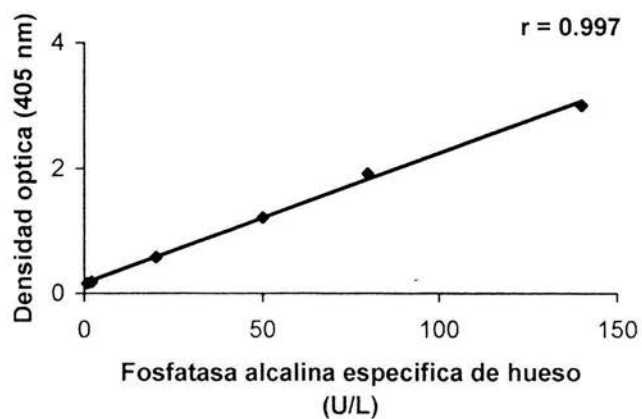


Figura 11. Curva de calibración de fosfatasa alcalina especifica de hueso por **ELISA**.

8. ANALISIS ESTADISTICO

Todos los valores obtenidos se expresan como la media \pm desviación estándar ($M \pm DE$) de los resultados. Las diferencias entre las concentraciones hormonales antes (basal) y después de la HRT se establecieron mediante análisis de varianza simple (ANOVA) a un nivel de significancia de 0.05 y las diferencias entre el grupos; basal, testigo y con HRT se determinaron mediante la prueba post- hoc de Tukey, para lo cual se utilizó el paquete SPSS 10.

9. RESULTADOS

9.1. Estudio hormonal

Los niveles séricos de estradiol disminuyen notablemente en la menopausia ($p < 0.001$), pero con la terapia de reemplazo hormonal (HRT) se restituyen las concentraciones a niveles similares un poco más elevadas que los observados en las mujeres jóvenes del grupo testigo (Figura 12). Los valores del grupo de mujeres menopáusicas (basal) comparados con la concentración del grupo con HRT presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

De manera similar la concentración de GH (Figura 13) se encontró disminuida en la menopausia (basal), pero con la HRT aumentó su concentración a un nivel mayor que el del grupo testigo y la diferencia con este grupo es significativa ($p < 0.05$) debiendo resaltarse que el incremento de GH en respuesta a la terapia de reemplazo hormonal fue muy importante y la diferencia entre los grupos basal vs HRT fue altamente significativa ($p < 0.001$).

La concentración sérica del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I) que se muestra en la Figura 14 disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en el grupo de mujeres menopáusicas (basal), y aumentó con el tratamiento a cifras ligeramente menores que las de las mujeres del grupo testigo, la diferencia entre estos dos grupos no es significativa. Sin embargo el efecto de la HRT sobre los niveles de IGF-I (basal vs HRT) si es significativo ($p < 0.05$).

Los niveles séricos de LH y FSH que se presentan en la Figura 15 muestran que en las mujeres menopáusicas (basal), ambas gonadotropinas se encuentran muy elevadas, en comparación con los niveles del grupo testigo ($p < 0.001$) disminuyendo significativamente ($p < 0.001$) con la HRT. No obstante lo anterior los niveles de gonadotropinas en el grupo con HRT son mayores que los del grupo testigo ($p < 0.05$).

La tabla 8 muestra la concentración ($M \pm DE$) de estas 5 hormonas en las mujeres del grupo testigo y en las mujeres menopáusicas antes (basal) y después del tratamiento (HRT) para su comparación.

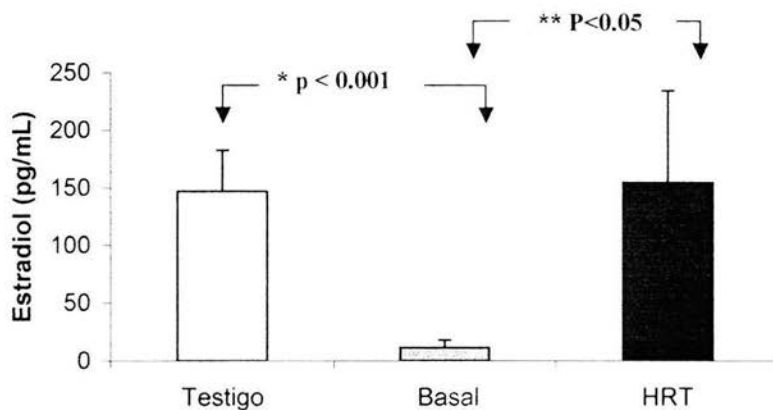


Figura 12. Concentraciones séricas de estradiol en los diferentes grupos de estudio. Se observan en la gráfica las diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos testigo vs basal y basal vs HRT.

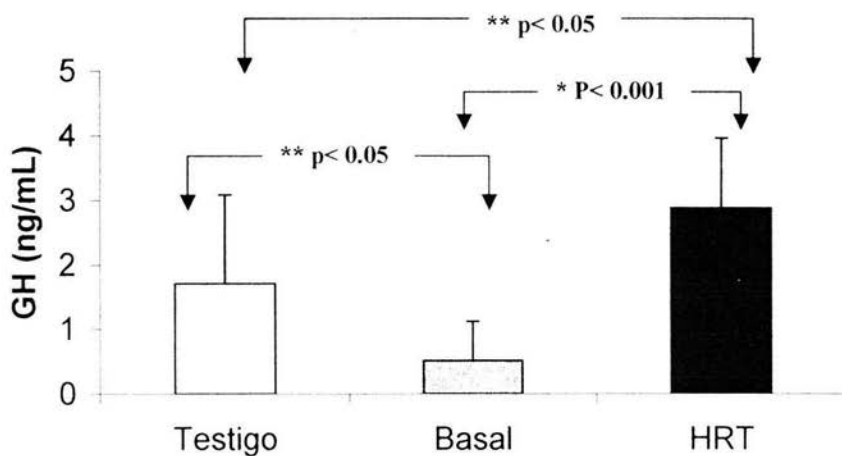


Figura 13. Concentraciones séricas de GH. Se observa en la gráfica la diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos testigo vs basal y testigo vs HRT. Sin embargo la significancia entre los grupo basal vs HRT es doblemente significativa ($p < 0.001$).

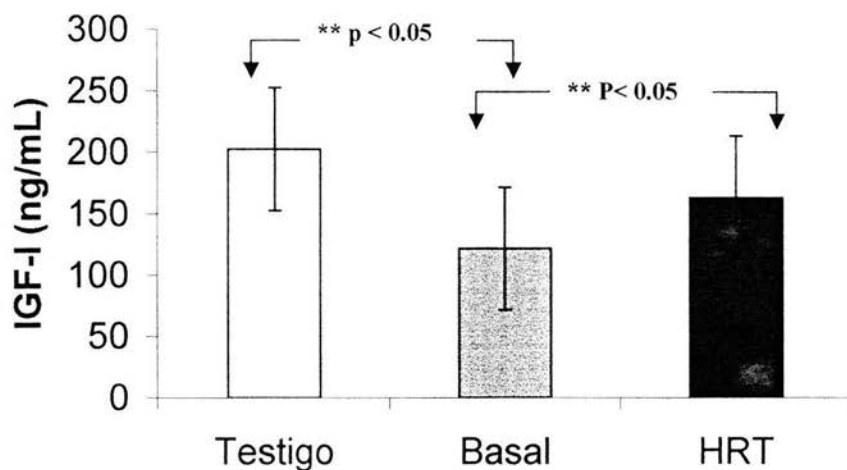


Figura 14. Niveles séricos del IGF-I. Se observa en la gráfica la disminución característica de IGF-I en la menopausia (basal), no obstante su aumentó con la HRT. La diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos testigo vs basal y basal vs HRT.

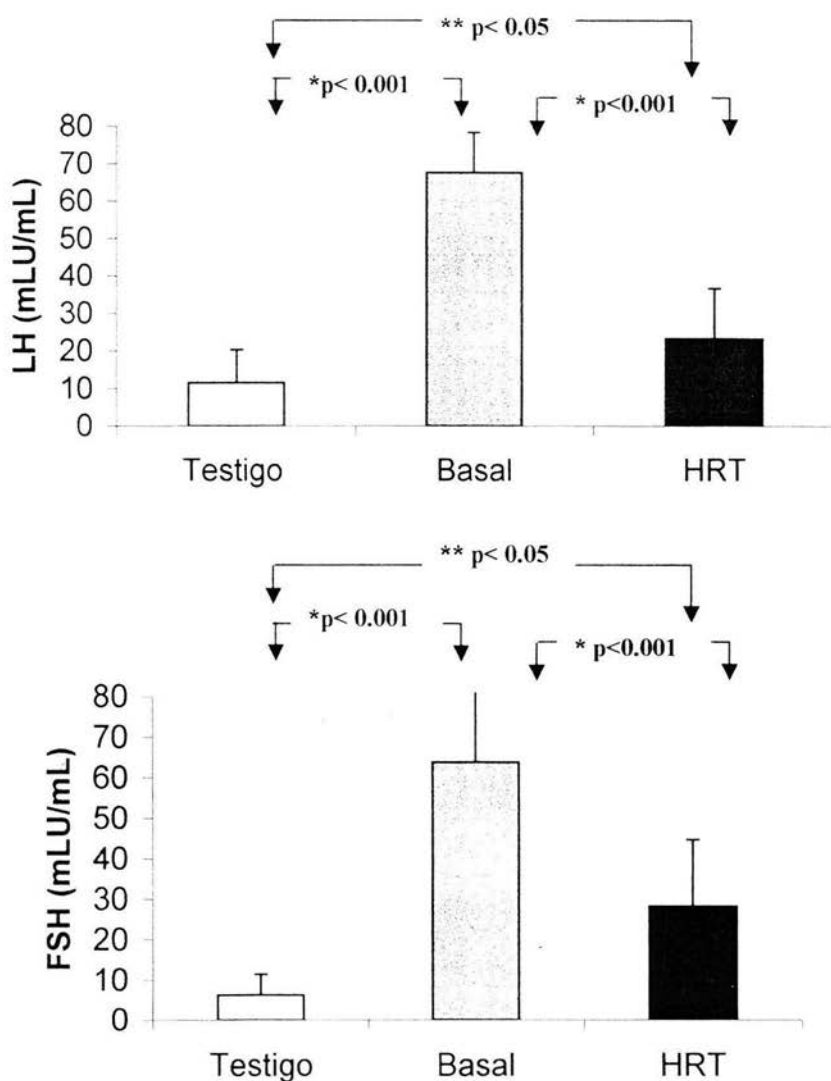


Figura 15. Niveles séricos de LH y FSH. Se observa en la gráfica la elevación característica de LH y FSH en la menopausia (basal), así como su disminución en respuesta a la HRT. La diferencia es significativa ($p < 0.001$) entre los grupos testigo vs basal y basal vs HRT y una $p < 0.05$ para los grupos testigo vs HRT para ambas hormonas.

HORMONA	MENOPAUSIA		
	G. TESTIGO	G. BASAL	G. HRT
LH (mUI/mL)	11.6 ± 8.7	67.7 ± 10.7	23.3 ± 13.4
FSH (mUI/mL)	6.9 ± 5.2	67.4 ± 19.9	21.5 ± 16.5
E2 (pg/mL)	147 ± 35.4	11.5 ± 6.7	154.6 ± 79.7
GH (ng/mL)	1.72 ± 1.4	0.5 ± 0.6	2.9 ± 1.1
IGF-I (ng/mL)	202.7 ± 15.3	119 ± 46.0	158.6 ± 41.6

Tabla 8. Concentraciones hormonales en los tres grupos de mujeres: basal, testigo y HRT con sus respectivas M ± DE.

9.2. Marcadores bioquímicos de remodelación ósea

Las concentraciones de osteocalcina (Figura 16) en el grupo de mujeres menopáusicas sin tratamiento (basal), fueron significativamente mayores que las del grupo testigo (mujeres jóvenes) y disminuyeron con la terapia de reemplazo hormonal (HRT) a valores similares no estadísticamente diferentes de los del grupo testigo. En cambio las diferencias son altamente significativas ($p < 0.001$) entre los grupos testigo vs basal y basal vs. HRT

De igual manera la fosfatasa alcalina específica de hueso (BSAP) se encontró elevada en el grupo de menopausia (basal) en comparación del grupo testigo ($p < 0.05$), disminuyendo con la HRT; sin embargo, entre los niveles de BSAP antes y después del tratamiento la diferencia no es significativa (Figura 17).

Las concentraciones de deoxipiridinolina (DPD) que se muestran en la figura 18 no presentaron cambios importantes a la menopausia (basal) en comparación con los valores del grupo testigo; no obstante disminuyeron significativamente con la HRT ($p < 0.001$), y la diferencia entre los grupos testigo vs HRT también es significativa ($p < 0.001$).

Los niveles séricos del telopéptido C- terminal de la colágena tipo I (ICTP) fueron muy similares en el grupo testigo y en las mujeres menopáusicas (basal) como se observa en la Figura 19; como resultado de la HRT solo disminuyeron ligeramente, sin diferencias significativas entre los valores de los tres grupos.

La tabla 9 presenta las concentraciones ($M \pm DE$) de los 4 marcadores de recambio óseo en el grupo testigo y en las mujeres menopáusicas antes (basal) y después del tratamiento (HRT).

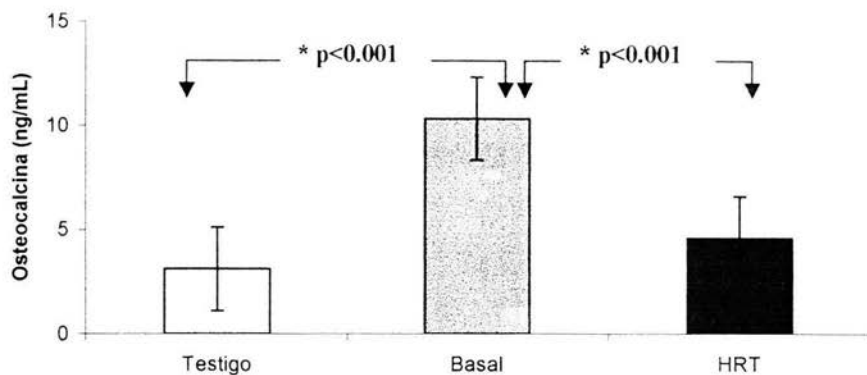


Figura 16. Concentraciones séricas de osteocalcina. En la gráfica se observan diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos testigo vs basal y basal vs HRT.

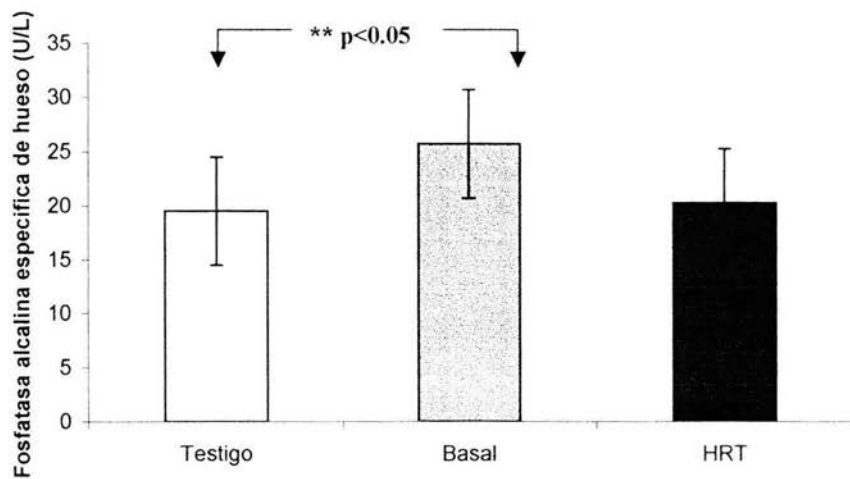


Figura 17. Niveles séricos de fosfatasa alcalina específica de hueso. Entre los diferentes grupos de estudio solo se observa diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos testigo vs basal.

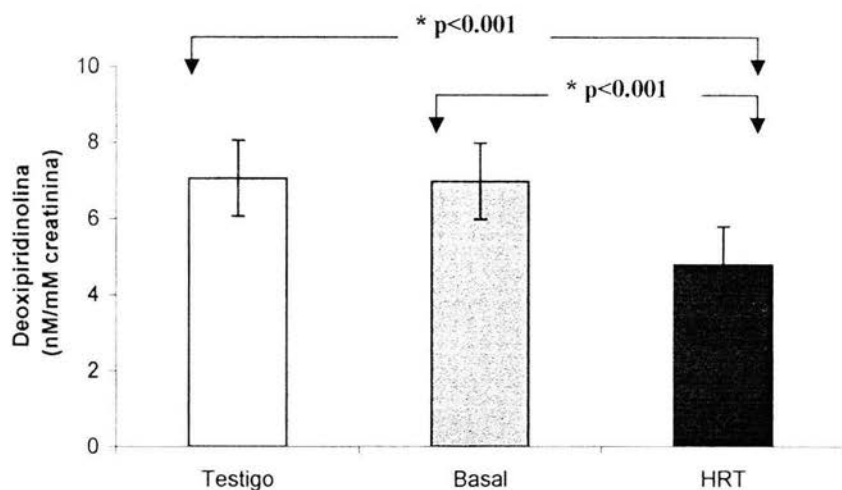


Figura 18. Concentraciones de deoxipiridinolina en orina. Se observa diferencia significativa ($p < 0.001$) entre los grupos: testigo vs HRT y basal vs HRT.

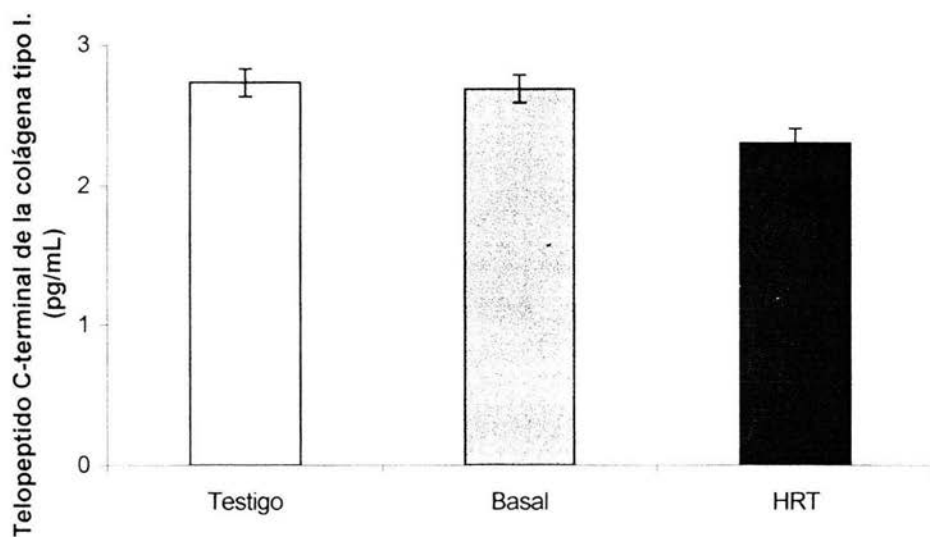


Figura 19. Niveles séricos del telopeptido C-terminal de la colágena tipo I. En esta gráfica no se observan diferencias significativas entre los grupos de estudio.

MARCADOR OSEO	G. TESTIGO	MENOPAUSIA	
		G. BASAL	G. HRT
OC	3.1 ± 1.1	10.3 ± 5.3	4.6 ± 1.4
BSAP	19.5 ± 6.6	25.7 ± 7.3	20.3 ± 7.6
DPD	7.1 ± 1.0	7.0 ± 1.6	4.8 ± 1.5
ICTP	2.7 ± 0.6	2.7 ± 0.7	2.3 ± 1.0

Tabla 9. Concentraciones de los marcadores de remodelación ósea en los tres grupos de mujeres: testigo, basal y HRT con sus respectivas M ± DE.

9.3. Correlaciones entre los marcadores de recambio óseo y el estradiol.

El estudio de la regresión lineal mostró (Figura 20) que la OC tiene una relación lineal negativa ($r = -0.64$) altamente significativa ($p < 0.001$) con los niveles de E_2 . La Figura 21 a su vez representa la relación lineal negativa entre los niveles de BSAP y E_2 ($r = -0.33$) que aunque también significativa ($p < 0.05$) fue menor que en el caso la OC (Figura 22) se observó que cuando solo se consideran los valores obtenidos en las mujeres menopáusicas la relación lineal negativa es mayor ($r = -0.47$).

El estudio de correlación entre los niveles de DPD y E_2 mostraron una baja relación lineal negativa ($r = -0.24$) no significativa (Figura 23), sin embargo en las mujeres menopáusicas con niveles bajos de E_2 (Figura 24) esta relación fue mayor ($r = -0.54$) y altamente significativa ($p < 0.001$). La figura 25 representa los resultados del estudio de la regresión lineal de ICTP con E_2 que como puede verse no muestran una relación importante.

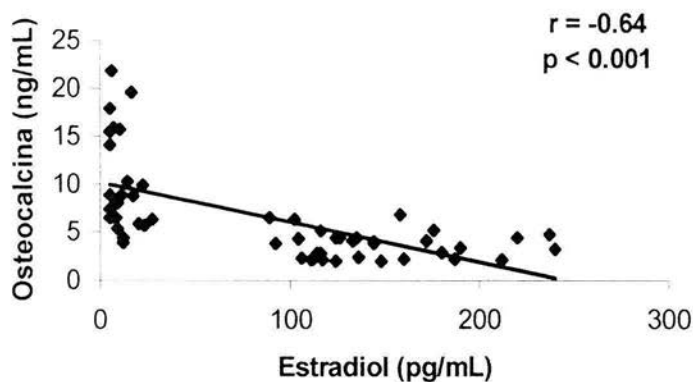


Figura 20. Correlación entre los niveles de osteocalcina con estradiol. Se observan niveles elevados de la osteocalcina a bajas concentraciones de estradiol.

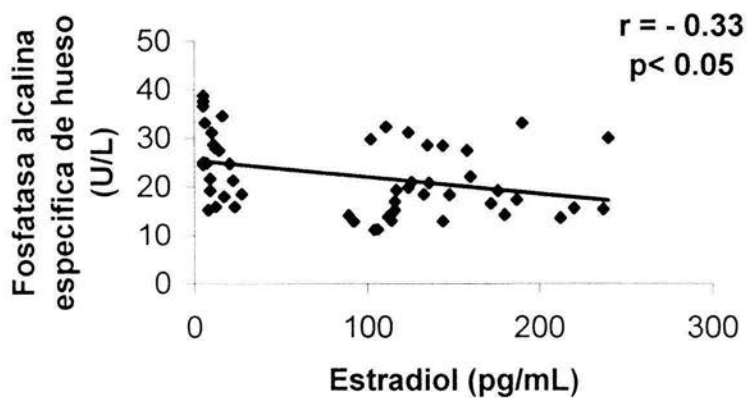


Figura 21. Correlación de los niveles séricos de fosfatasa alcalina específica de hueso y estradiol. Se observa que los niveles de fosfatasa alcalina específica de hueso disminuyen al aumentar la concentración de estradiol.

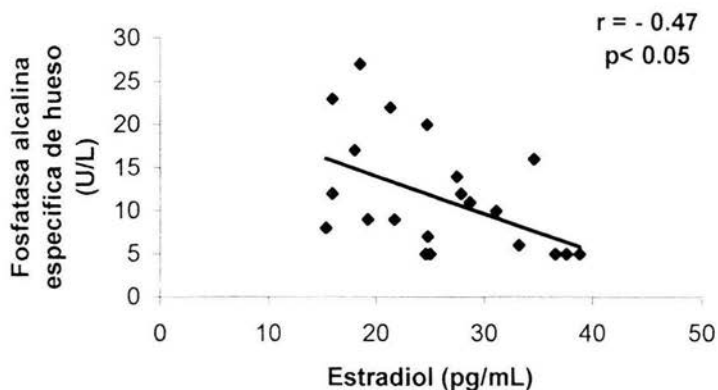


Figura 22. Correlación de los niveles séricos de estradiol y fosfatasa alcalina especifica de hueso en la menopausia. Se observa que al disminuir la concentración de estradiol, aumenta los niveles de la fosfatasa alcalina especifica de hueso.

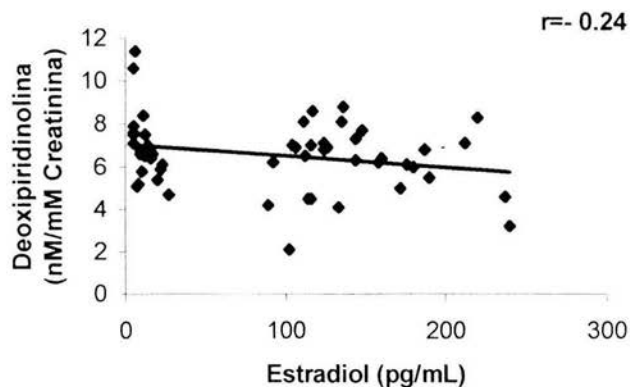


Figura 23. Correlación de los niveles de deoxipiridinolina y estradiol. Se observa una baja relación lineal negativa que no es significativa.

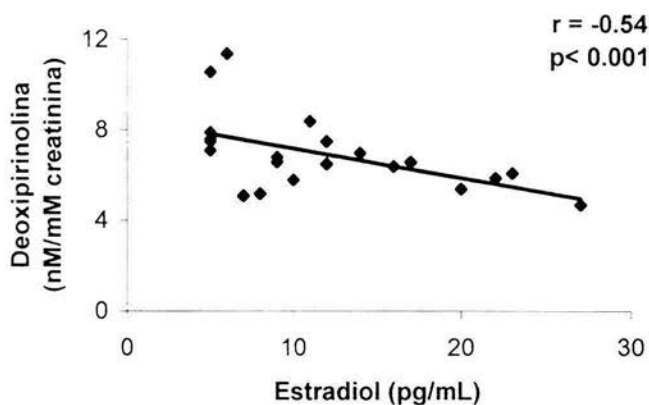


Figura 24. Correlación de los niveles séricos de estradiol vs deoxipiridinolina del grupo de mujeres menopausicas (basal). Se observa una relación lineal negativa por lo que la disminución de la concentración de estradiol aumenta los niveles de deoxipiridinolina.

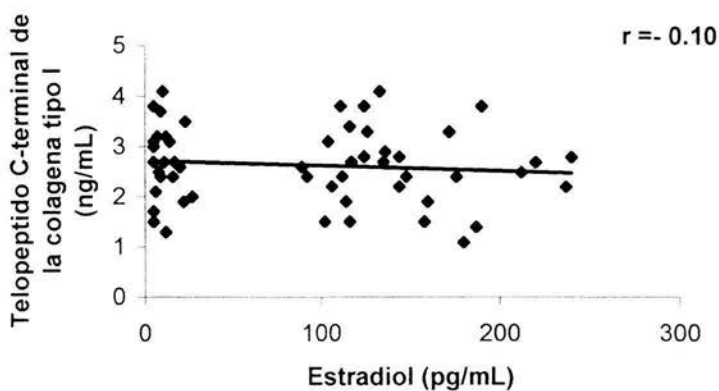


Figura 25. El estudio entre el telopéptido C-terminal de la colágena tipo I y el estradiol no muestra relación.

9.4. Correlaciones entre los marcadores de recambio óseo y la GH.

El estudio de la regresión lineal mostró (Figura 26) que la OC tiene una relación lineal negativa significativa ($r = -0.35$, $p < 0.05$) con los niveles de GH. En la figura 27 se observa como los niveles séricos de BSAP y GH también tienen una relación lineal negativa significativa ($r = -0.33$, $p < 0.05$).

De igual manera la correlación entre los niveles de DPD y GH que se representan en la Figura 28 muestran una relación lineal negativa ($r = -0.31$, $p < 0.05$), que fue mayor ($r = -0.43$) al analizar sólo los valores de las mujeres menopáusicas. (Figura 29) En cambio la figura 30 muestra como entre el ICTP y GH no existe relación ($r = 0.07$)

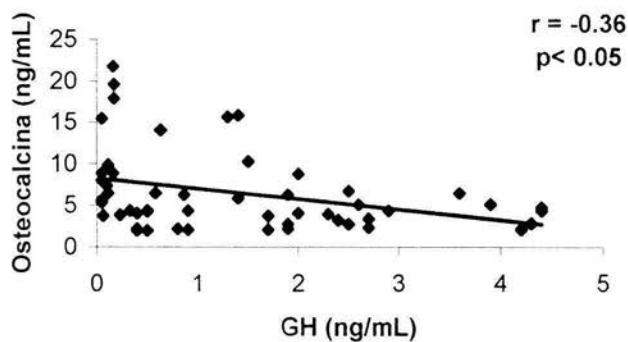


Figura 26. Correlación de la osteocalcina y GH. Se observa una relación lineal negativa, y el aumento en la concentración de GH disminuye los niveles de osteocalcina.

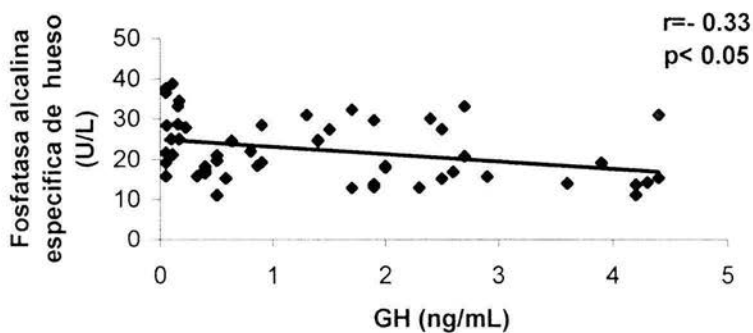


Figura 27. Correlación de los niveles séricos de la fosfatasa alcalina específica de hueso y GH. Se observa que la disminución concentración de la fosfatasa alcalina específica de hueso, esta regulada por el aumento en la concentración de GH.

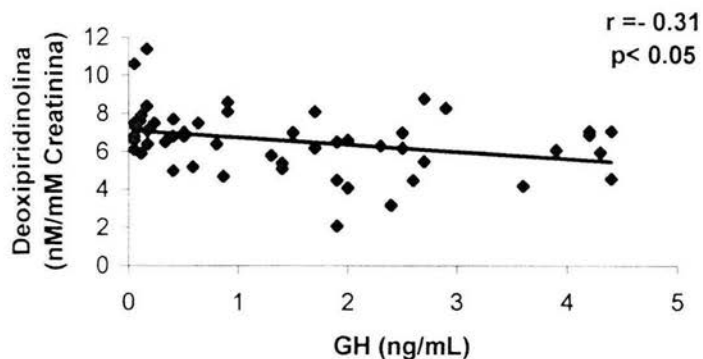


Figura 28. Correlación de los niveles de deoxipiridinolina y GH. Se observa una relación lineal negativa, además de que la concentración de DPD disminuye por el aumento de GH y viceversa.

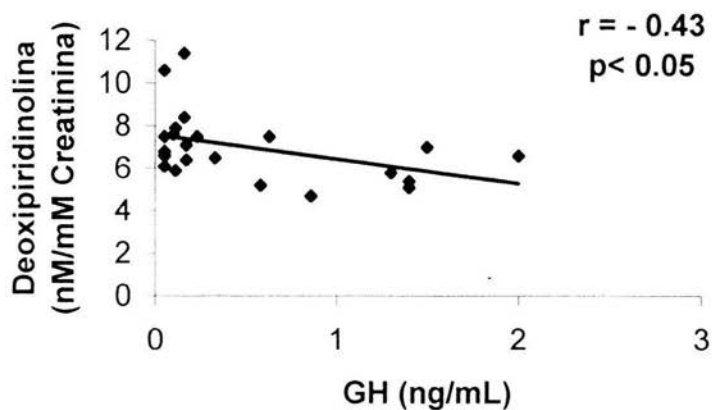


Figura 29. Correlación de los niveles de GH y deoxipiridinolina en el grupo de mujeres menopausias (grupo basal). Se observa una marcada relación entre la deoxipiridinolina y la GH, ya que la elevada concentración de deoxipiridinolina disminuye con el aumento de GH y viceversa.

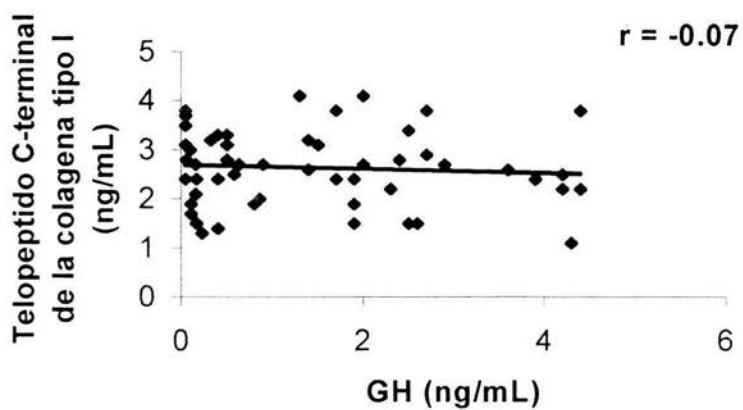


Figura 30. Estudio de correlación entre los niveles del telopeptido C-terminal de la colágena tipo I y GH. No se observa ninguna correlación entre ellos.

9.5. Correlación entre los niveles de los marcadores de recambio óseo y la concentración del IGF-I.

El estudio de la regresión lineal en la Figura 31 muestra que la OC tiene una baja relación lineal negativa ($r = -0.20$) no significativa con los niveles de IGF-I. De manera similar entre los niveles de BSAP y el IGF-I el coeficiente de correlación fue también muy bajo ($r = -0.23$) (Figura 32), así como entre DPD y el IGF-I una ($r = -0.25$). En cambio en el caso del telopéptido C- terminal de la colágena tipo I el estudio de la regresión lineal con IGF-I que se muestra en la figura 34 tiene un coeficiente de correlación mayor ($r = -0.32$) y es significativo ($p < 0.05$).

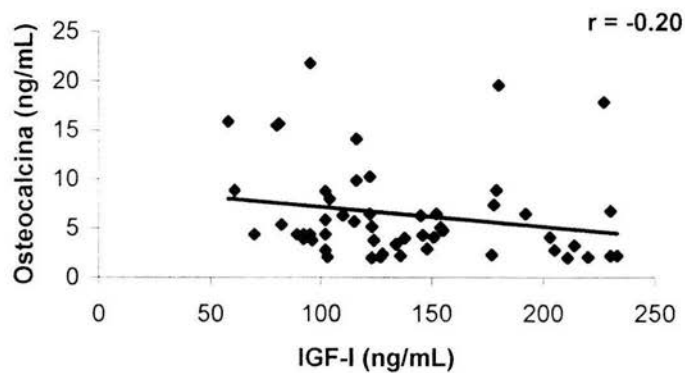


Figura 31. Correlación entre las concentraciones séricas de la osteocalcina y el IGF-I.

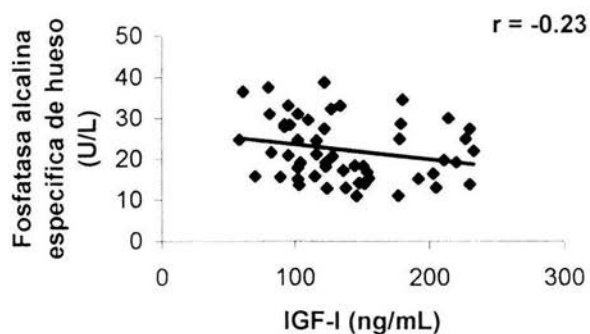


Figura 32. Correlación entre los niveles séricos de la fosfatasa alcalina específica de hueso y el IGF-I.



U.N.A.M. CAMPUS

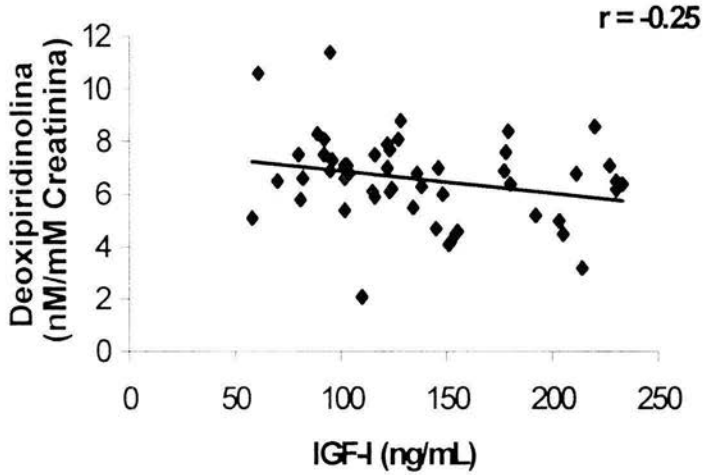


Figura 33. Correlación entre los niveles séricos de la deoxipiridinolina y el IGF-I.

IZT.

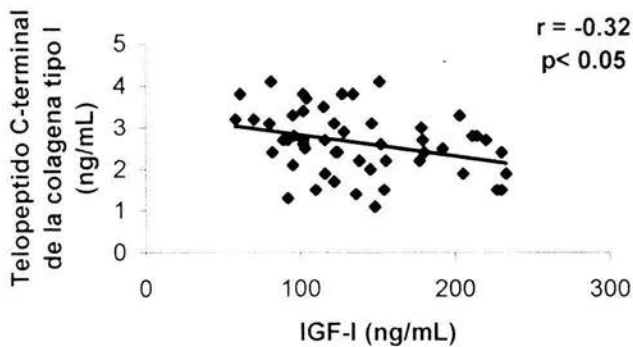


Figura 34.- Correlación entre las concentraciones séricas del telopéptido C-terminal de la colágena tipo I y el IGF-I.

10. DISCUSION

La osteoporosis posmenopáusica es el trastorno óseo más común, siendo la deficiencia de estrógenos el principal factor de riesgo identificado para desarrollar osteoporosis,^{70,71} también esta determinada por factores genéticos, hormonales, mecánicos y nutricionales.^{3,4} La pérdida de hueso inicia en la perimenopausia,^{72,73} y durante la posmenopausia es más acelerada, posteriormente disminuye sin que se conozcan aún las causas de este cambio.⁴⁰

Los resultados del estudio hormonal, realizados están de acuerdo con estudios previos que muestran la disminución de E₂ y la elevación de las gonadotropinas en la menopausia; ambos cambios no suceden de forma brusca sino progresiva, alcanzando su menor y mayor concentración respectivamente en la posmenopausia.⁷² La elevación de FSH y LH es una consecuencia de la falla en los mecanismos de retroalimentación,¹⁰¹⁻¹⁰² pues además de disminuir la concentración de estradiol, el ovario posmenopáusico sintetiza y secreta cada vez menos inhibina, glucoproteína que también inhibe la secreción de gonadotropinas (LH-FSH), preferentemente FSH.^{103, 104} Como resultado de la HRT disminuyeron los niveles séricos de las gonadotropinas que regresaron a concentraciones similares, ligeramente más elevadas que las mujeres con función ovárica normal.

Como ya se mencionó previamente se considera que los estrógenos en la mujer son los más importantes reguladores de la remodelación ósea normal;⁵¹ estimulan la osteoblastogénesis por unión a sus receptores específicos,²³ aumentando la síntesis de colágena tipo HI, osteocalcina y otras proteínas de la matriz ósea,²² a la vez que bloquea la osteoclastogénesis,⁴⁵ controlando además los niveles de PTH e IL-6,⁶⁶ por lo que a la menopausia la deficiencia de estrógenos determina que la resorción exceda a la formación de hueso favoreciendo la pérdida de masa ósea y la osteoporosis.⁵² Normalmente los estrógenos inhiben la pérdida de hueso al bloquear en las células del estroma-osteoblastos la síntesis de citocinas que estimulan la osteoclastogénesis entre

las cuales se encuentran la IL-1, IL-6, IL-11, TRANCE/RANKL/OPGL, M-CSF, GM-CSF, además de estimular la apoptosis de los osteoclastos,^{51, 64} acción que también es regulada por el TGF- β a través de los estrógenos.^{45, 63, 64} La PTH⁶⁷ y la 1, 25 (OH)₂D en cambio favorece osteoclastogénesis al inducir la síntesis de citocinas osteotrópicas.¹⁹

Los resultados de los marcadores bioquímicos de remodelación ósea muestran niveles séricos elevados en las mujeres posmenopáusicas sin tratamiento como consecuencia del incremento de la remodelación ósea y como un mecanismo de compensación por la pérdida acelerada de masa ósea que ocurre en la posmenopausia. En el caso de la osteocalcina los resultados indican que es un marcador de formación ósea muy sensible que mostró cambios altamente significativos en respuesta a la deficiencia de estrógenos así como en respuesta al tratamiento estrogénico su elevación está de acuerdo con los resultados del estudio de correlación que mostró que a menor concentración de estrógenos mayor concentración de osteocalcina. La concentración de OC se ha relacionado positivamente con los resultados de la histomorfometría de la cresta iliaca, uno de los estudios más confiables para evaluar el estado del hueso, por lo que indica que la OC es un buen marcador óseo, tanto en condiciones donde la formación y la resorción se encuentran acopladas como cuando están desacopladas como ocurre en la menopausia.¹⁰⁶ Por esta razón los niveles elevados de osteocalcina se podrían relacionar con la disminución de la masa ósea y con el incremento en el riesgo de fractura después de la menopausia.²⁷ Sin embargo la HRT disminuye los niveles séricos de osteocalcina,²⁷ como se mostró en este estudio y con el tratamiento estrogénico el recambio óseo tiende a volver a la normalidad, por lo que los valores de OC disminuyen y regresan a cifras similares a las observadas en mujeres jóvenes.

La fosfatasa alcalina específica de hueso es una enzima que juega un papel importante en la formación y la mineralización de la matriz ósea.^{80, 81} Los valores obtenidos para este marcador de formación ósea muestran un aumento

de 25-30% de sus niveles en las mujeres posmenopáusicas, en comparación con el grupo de mujeres jóvenes, regresando a valores premenopáusicos con la HRT. Se sabe que la mayor concentración de fosfatasa alcalina específica de hueso se encuentra generalmente en la pubertad por el incremento de la formación ósea y el crecimiento acelerado que ocurre al aumentar los esteroides gonadales, en cambio en los adultos el incremento de la fosfatasa alcalina específica de hueso y otros marcadores se observa que cuando ocurre una pérdida acelerada de hueso es necesario un recambio activo para recuperar la homeostasis. Como ya se mencionó la deficiencia de estrógenos determina la pérdida de masa ósea y en consecuencia estimula una respuesta orgánica para compensar esa pérdida. No se sabe con exactitud si los estrógenos regulan la actividad de esta enzima o si influyen otros factores asociados con la edad y el sexo; sin embargo en este estudio los niveles de fosfatasa alcalina específica de hueso tuvieron una relación negativa con el nivel de estrógenos, aumentaron a la menopausia y disminuyeron con la HRT, lo cual está de acuerdo con lo reportado por otros investigadores.²⁷

Respecto a las concentraciones de deoxipiridinolina en orina; este marcador de resorción ósea, tuvo inexplicablemente concentraciones elevadas en las mujeres del grupo testigo y en las mujeres menopausicas del estudio antes de la terapia estrogénica disminuyendo su concentración después de administrar la HRT. Esto es congruente con los resultados del estudio de correlación en el que bajas concentraciones de E_2 corresponden a niveles elevados de DPD. Otros autores ⁷¹ en un estudio prospectivo seguido de 10 años, encontraron que la velocidad de la pérdida ósea se correlaciona con los niveles de DPD en orina y que sus niveles son más elevados en mujeres con osteoporosis siendo el marcador más sensible que los marcadores de formación ósea para identificar estas mujeres con osteoporosis. También se ha demostrado que después del cese del crecimiento del esqueleto, la excreción de deoxipiridinolina es relativamente constante, pero que en las mujeres aumenta después de la menopausia,²⁷ como ocurrió en este estudio. Cabe señalar que durante la

resorción ósea, la deoxipiridinolina excretada en la orina refleja de forma específica la degradación de fibras maduras de colágena tipo I, y la dieta no influye en la concentración de este marcador. por lo que puede decirse que es un marcador de resorción ósea específico y confiable,³⁴ y que la HRT disminuye los niveles de la deoxipiridinolina en orina a niveles de mujeres premenopáusicas²⁷

Con respecto al telopéptido C-terminal de la colágena tipo I, fragmento de 9 KDa, liberado al espacio extracelular durante la resorción de las fibras maduras de colágena, se ha reportado que es sensible para detectar enfermedades metastásicas, mieloma múltiple y otros procesos que involucran la degradación de las fibras de colágena ósea,⁸¹ sin embargo algunos investigadores no lo consideran un marcador específico de resorción ósea, ya que los niveles del telopéptido C-terminal de la colágena en mujeres menopausicas fueron similares a las concentraciones de las mujeres que recibieron HRT,⁹² resultados similares a los obtenidos en este estudio. Además otros estudios muestran que no hay diferencias significativas entre los niveles de ICTP en mujeres con osteoporosis y mujeres jóvenes y sanas⁹⁴

Por otra parte al analizar las causas de la osteoporosis posmenopáusica es importante considerar que además de los estrógenos, las hormonas del eje somatotrópico (GH-IGF-I) también disminuyen con la edad y alcanzando su concentración más baja en la posmenopausia, disminución que se relaciona con el nivel de estrógenos, sin embargo con la HRT regresan a niveles normales alcanzando cifras aún más elevadas lo cual indica que es la deficiencia estrogénica más que la edad, la responsable del deterioro del eje somatotrópico.¹⁰⁵ A este respecto se sabe que los estrógenos son potentes estimuladores de la la síntesis de GH y esta de IGF-I.^{55, 105} La GH y el IGF-I disminuyeron significativamente en la menopausia, esta disminución sin duda contribuye a los cambios negativos que se presentan en el metabolismo del hueso. Se ha demostrado que la GH tiene un efecto directo en la remodelación

del hueso, incrementando la síntesis de proteínas y factores del crecimiento en especial del IGF-I, que estimula la proliferación de los osteoblastos, la síntesis de colágena tipo I y proteínas no colágenas de la matriz ósea, por lo cual es importante para mantener la densidad ósea; su disminución participa en los mecanismos que determinan la osteoporosis,^{58, 59}

11. CONCLUSIONES

Los marcadores bioquímicos de remodelación ósea son útiles para medir la actividad metabólica del hueso. La osteocalcina y la fosfatasa alcalina específica de hueso tienen una sensibilidad y especificidad capaz de reflejar los cambios que se presentan en la menopausia como resultado del hipostrogenismo, principal causa de acuerdo a del metabolismo negativo del hueso. Sin embargo puede decirse que los resultados de este estudio la osteocalcina es un mejor indicador de la formación ósea que la fosfatasa alcalina específica de hueso.

La deoxipiridinolina, marcador de resorción ósea también manifestó elevada sensibilidad y especificidad para evaluar la actividad de los osteoclastos. Por el contrario el telopéptido C-terminal de la colágena no mostró especificidad, ni diferencias significativas entre los grupos estudiados, por lo que puede decirse que no es un marcador confiable.

La terapia con estrógenos produjo una disminución significativa de OC, BSAP y DPD a solo 3 meses de la terapia hormonal de reemplazo, indicando que estos 3 marcadores son útiles en la evaluación de la actividad metabólica del hueso y de la normalización del recambio óseo post-tratamiento por lo que pueden ser utilizados, para el seguimiento de mujeres posmenopáusicas con terapia de reemplazo hormonal, sobre todo en aquellas que desarrollan osteoporosis, casos en los que es muy importante evaluar el resultado del tratamiento administrado. Las ventajas que ofrecen estos marcadores son medirse en sangre u orina, obteniéndose resultados el mismo día, evaluar el resultado del tratamiento en un tiempo corto por técnicas no invasivas a diferencia de la densitometría que aunque es muy útil para el diagnóstico de la osteoporosis solo puede detectar cambios en la arquitectura del hueso después de 12 meses de tratamiento, además de ser métodos diagnósticos más baratos. La determinación repetida de los marcadores en un plazo corto puede ser una gran ayuda para establecer dosis y evaluar el resultado de un tratamiento.

Cabe señalar que en la actualidad, en ausencia de contraindicaciones, se considera a los estrógenos como la terapia de elección para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis y otras alteraciones que sufren las mujeres en la posmenopausia, y que disminuyen la calidad de vida.

En resumen los resultados del presente estudio son importantes porque ponen de manifiesto, la importancia de los marcadores bioquímicos de remodelación ósea para el estudio de la osteoporosis posmenopáusica, ya que permiten valorar la pérdida de hueso y en consecuencia el riesgo de fractura, por lo que se sugieren estos marcadores (OC, BSAP y DPD) como métodos confiables para evaluar el tratamiento de la osteoporosis.

12. BIBLIOGRAFIA.

1. Cons-Molina F, Delezé M, De la Peña MP. Análisis de eficiencia de las estrategias para identificar mujeres posmenopáusicas con osteoporosis en México. *Rev Endocrinol Nutr* 2000; 8:48-55.
2. Consensus development conference; diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993; 94:646-650.
3. Cosman F, Nieves J, Wilkinson C, Schnering D, Shen V, Lindsay R. Bone density changes and biochemical indices of skeletal turnover. *Calcif Tissue Int* 1996; 58:236-243.
4. Peterlik M. Aging, neuroendocrine function, and osteoporosis. *Experimental Gerontology* 1997; 32: 577-586.
5. Peienl P, Griesmacher A, Pointinger P, Marteau R, Hartl W, Gruber W, Bröll H. Association between female sex hormone and biochemical markers of bone turnover in peri- and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 1998; 62:388-394.
6. Akesson K, Vergnaud P, Gineyts E. Impairment of bone in elderly women with hip fracture. *Calcified Tissue Int* 1993; 53:162-169.
7. Pollak-Dresner R, Mayer M, Celiniker-Hochner D. The decrease in serum bone-specific alkaline phosphatase predicts bone mineral density response to hormone replacement therapy in early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2000; 104-107.
8. *Harrison's. Principles of medicine interne*. 13 th ed. New York: McGraw-Hill 1994: 2137-45.
9. Strewler GJ. Metabolismo mineral y enfermedad ósea metabólica. En: Greenspan FS, Strewler GJ. *Endocrinología básica y clínica* 4ª ed. México: Editorial El Manual Moderno, 1998: 299-360.
10. Tortora GJ, Grabowski RS. *Principios de anatomía y fisiología*. 7ª ed. Editorial Hacourt Brace, 1998: 147-162.
11. Gartner LP, Hiatt JL. *Texto atlas de Histología*. México: McGraw-Hill, 1997: 119-140.

12. Watts NB. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin Chem* 1999; 45:1359-1368.
13. Becker L. Principles and practice of endocrinology and metabolism. U. S. A: J. B. Lippincott Company, 1995:1664-1679.
14. Lindsay R, Cosman F. Pathophysiology of bone loss. In Lobo RA. *Treatment of the postmenopausal woman: basic and clinical aspects. 2 nd ed.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999: 305-314.
15. Friedenstein AJ. Marrow stromal fibroblast. *Calcif Tissue Int* 1995; 56 (Suppl 1):S17.
16. Raisz LG, Kream BE, Lorenza JA. Metabolic bone diseases. In: Williams Textobook of the endocrinology. 9 th ed. Philadelphia. W. B. Saunders. 1998: 1211-1240.
17. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and be remodeling. *N Engl J Med* 1995; 332:305-311.
18. Noble BS ,Revé J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *MCE* 2000; 159: 7-13.
19. Steven TL. Bone resorption by osteoclast. *Science* 2000; 289 (5484): 1504-1508.
20. Roodman DG. Advances in bone biology: The osteoclast. *Endocr Rev* 1996; !7: 308-332.
21. Takami M, Woo JT, Nagai K. Osteoblastic cell induce fusion and activation of osteoclast through a mechanism independent of macrophage colony stimulating production. *Cell Tissue Res* 1999;298:327-334.
22. Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC 1994 Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev* 15:275–300
23. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988;241:84-86.
24. Delany AM, Dong Y, Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone cells. *J Cell Biochem* 1994; 56: 295–302.
25. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine*

Rev 2000; 21: 393-411.

26. Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA. Mineralization and expression of the matrix proteins during *in vivo* bone development. *Calcif Tissue Int* 1998; 62: 74-82.

27. Calvo MS, Eyre DR, Gunderg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 1996; 17: 333-368.

28. Robey PG. Bone matrix and proteoglycans and glycoproteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of bone biology*. San Diego. Academic Press, 1996: 155-170.

29. Mundy GR, Boyce B, Hughes D, Wrigth K, Bonewald D, Dallas S, Haarris S, Choundhury-Grosch N, Chen D, Dunstan C, Izbicka E, Yoneda T. The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. *Bone* 1995; 17 (Suppl.2): S71-S75.

30. Voet VD, Voet VJ. *Biochemistry*. U. S. A. Ed. John Wiley & Sons, 1998:141-188.

31. Rosert J, De Combrugghe B. Type I collagen: structure synthesis and regulation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of bone biology*. San Diego. Academic Press, 1996:127-140.

32. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzmán NA. The biosynthesis of collagen and its disorders. *New Engl J Med* 1979;301:13-23.

33. Robins SP. Crosslinking of collagen: isolation structural characterization and glycosilation of piridinolina. *Biochem J* 1983;215:167-173.

34. Robins SP, Woitge H, Hesley R, JU J, Seyedin S, Seibel MJ. Direct, Enzyme-linked immunossay for urinary deoxipiridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J Bone Miner Res* 1994;10:1643-1649.

35. Oxlund H, Mosekilde L, Ortoft. Reduced concentration of collagen reducible cross links in human trabecular bone with respect to age and osteoporosis. *Bone* 1996;19:479-484.

36. Weintein SR, Manolagas CS. Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med* 2000; 108: 153-164.

37. Mundy RG. Cellular and molecular regulation of bone turnover. *Bone* 1999;

24: 35-38.

38. Raisz GL. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 1999; 45:1353- 1358.

39. Leiva BL. Biochemical of markers of bone metabolism. *Rev Med Chile* 1996; 124: 54-60.

40. Riggs BL. Overview of osteoporosis. *West J Med* 1991; 154: 66-77.

41. Li YP, Chen W, Liang YQ, Li E, Stashenko P. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nature Genet.* 1999; 23:447-451.

42. Romas E, Martin TJ. Cytokines in the pathogenesis of osteoporosis. *Osteoporos Int* 1997; 7 Suppl.3: S47-53.

43. Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Field J, Tavira M, Bertoncello I, Drake F, Zavorselk S, Tellis I, Hertzog P, Debouck C, Kola I. Cathepsin K Knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not desmineralization. *J. Bone. Miner. Res.* 1999; 141:1654-1663.

44. Nesbitt SA, Horton MA. Trafficking of matrix collagens through bone resorbing osteoclast. *Science* 1997; 276:266-269.

45. Hughes DE, Tiffie J.C, Li HH. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclast mediated by TGF. *Nature Med* 1996; 7:1132-1136.

46. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, Looker A, Marcus R, Matkovic V, Weaver C. Peak bone mass. *Osteoporos Int* 2000;11:985-1009.

47. Rudberg A, Magnusson P, Joborn H. Serum isoforms of bone alkaline phosphatase increase during physical in women. *Calcif Tissue Int* 2000; 66:342-347.

48. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblast and osteocytes by glucocorticoids: potential mechanism of the deleterious effects on the bone. *J Clin Invest* 1998;102:275-282.

49. Mundy GR, Guise TA. Hormonal control calcium homeostasis. *Clin Chem* 1999; 45: 347-352.

50. Inoue D, Shih C, Galson DL , Goldring SR, Horne WC, Baron R. Calcitonin-

dependent down-regulation of the mouse c1a calcitonin receptor in cells of the osteoclast lineage involves a transcriptional mechanism. *Endocrinol.* 1999; 140: 1060-1068

51. Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis-second decade. *Endocrinology* 1998; 139: 2659-2661.

52. Stepan JJ. Prediction of bone loss in postmenopausal women . *Osteoporos Int* 2000; Supp. 6:S45-54.

53. Friend KE, Hartman ML, Clasey JL, Thorner MO. Both oral and transdermal estrogen increase growth hormone release in osteoporosis posmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2550-2556.

54. Klaushofer K, Varga F. The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and diferentiation. *J Nutr* 1995; 125: 1996-2003.

55. Beshyah SA, Kyt P, Thomas E. The effects prolonged growth hormone replacement on bone metabolism and bone mineral density in hypopituitary adults. *Clin Endocrinol* 1995; 42: 249-254.

56. Reid IR. Glucocorticoids effects on bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 1860-1862.

57. Bouillon R, Bex M, Van Herck E. Influence of age, sex, and insulin on osteoblast function: osteoblast disfunction in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1194-1202.

58. Canalis E, Agnus D. Insuline-like factors and their role in osteoporosis. *Calcif tissue Int* 1996; 58: 133-134.

59. Miyao M, Hosoi T, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y. Polimorphism of insulin-like grow factor I gene and bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 1998; 66: 301-306.

60. Bonewall LF, Dallas SL. Role of active and latent trasforming growth factor β in bone formation. *J Cell Biochem* 1994; 55: 350-357.

61. Sakou T. Bone morphogenetic protein: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998; 22: 591-603.

dependent down-regulation of the mouse c1a calcitonin receptor in cells of the osteoclast lineage involves a transcriptional mechanism. *Endocrinol.* 1999; 140: 1060-1068

51. Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis-second decade. *Endocrinology* 1998; 139: 2659-2661.

52. Stepan JJ. Prediction of bone loss in postmenopausal women . *Osteoporos Int* 2000; Supp. 6:S45-54.

53. Friend KE, Hartman ML, Clasey JL, Thorner MO. Both oral and transdermal estrogen increase growth hormone release in osteoporosis posmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2550-2556.

54. Klaushofer K, Varga F. The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and diferentiation. *J Nutr* 1995; 125: 1996-2003.

55. Beshyah SA, Kyt P, Thomas E. The effects prolonged growth hormone replacement on bone metabolism and bone mineral density in hypopituitary adults. *Clin Endocrinol* 1995; 42: 249-254.

56. Reid IR. Glucocorticoids effects on bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 1860-1862.

57. Bouillon R, Bex M, Van Herck E. Influence of age, sex, and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1194-1202.

58. Canalis E, Agnus D. Insuline-like factors and their role in osteoporosis. *Calcif tissue Int* 1996; 58: 133-134.

59. Miyao M, Hosoi T, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y. Polimorphism of insulin-like grow factor I gene and bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 1998; 66: 301-306.

60. Bonewall LF, Dallas SL. Role of active and latent trasforming growth factor β in bone formation. *J Cell Biochem* 1994; 55: 350-357.

61. Sakou T. Bone morphogenetic protein: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998; 22: 591-603.

62. Inui K, Maeda H, Sano A, Fujioka K, Yutani Y, Sakawa A. Local application of basic fibroblast growth factor minipellet healing of segmental bony defects in rabbits. *Calcif Tissue Int* 1998; 63: 490-495.
63. Pacifici R. Aging and cytokine production. *Calcif Tissue Int* 1999; 65: 345-351.
64. Jilka RL. Cytokines, of bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone*. 1998;23:75-81.
65. Grenfield E M, Bi Y, Miyauchi A. Regulation of osteoclast activity. *Life Sciences* 1999; 11: 1087-1102.
66. Adebajo OA, Moonga BS, Yamate T, Sun L, Minkin C, Abe E, Zaidi M. Mode of action of interleukin- 6 mature osteoclast. *J Cell Biol* 1998; 142:1347-1356.
67. Masiukiewicz US, Mitnick M, Grey AB, Insogna KL. Estrogen modulates parathyroid hormone-induced interleukin-6 production *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 2000; 141: 2526-2531.
68. Udawa N, Horwood NJ, Elliot J, Mackay A, Owens J, Okamura H, Kurimoto M, Chambers TJ, Martin TJ, Gillespie MT. Interleukin-18 (interferon γ inducing factor) is produced by osteoblast and acts via granulocyte/macrophage colony stimulating factor and not via interferon γ to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med*. 1997; 185:1005-1012.
69. Owens JM, Gallaher AC, Chambers TJ. IL-10 modulated formation of osteoclast in murine hetopoietic cultures. *J Immunol*. 1996; 196:936-940.
70. Koshla S, Melton J, Atkinson EJ, O`fallon WM, Klee GS, Riggs BL. Relation between serum sex steroids levels and bone turnover markers with bone mineral density and men and women: a key role for bioavailable estrogen. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83:2266-2274.
71. Mazzuoli G. Annual skeletal balance and metabolic bone marker changes in healthy early postmenopausal women: results of a prospective study. *Bone*. 2000; 26:381-386.
72. Perry HM. The endocrinology of aging. *Clin Chem* 1999; 45: 1369-1376.
73. Raisz LG. The osteoporosis revolution. *Ann Intern Med* 1997; 126: 458-462.
74. Zárate A. Algunas recomendaciones terapéuticas en el manejo médico de la

- menopausia. Rev Fac Med UNAM, 1993; 36:103-105.
75. Limouzin-Lamothe MA, Mairon N, Joyce CR, Le Gal M. Quality of life after the menopause: influence of hormonal replacement therapy. Am J Obstet Gynecol 1994; 170: 618.
76. Bjarnason NH, Alexandersen P, Christiansen C. Number of years since menopause: spontaneous bone loss is dependent but response to hormone replacement therapy is independent. Bone 2002; 30:637-641.
77. Zárata A. Diversidad de estrógenos usados en la terapia de reemplazo en la menopausia. Rev Fac Med UNAM. 1999; 42:197-199.
78. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Mechanism of disease production and actions of estrogens. N Engl J Med 2002;346:340-352.
79. Eastell R, Hannon RA. Biochemical markers of bone turnover. In Lobo RA. *Treatment of the postmenopausal woman: basic and clinical aspects. 2nd ed.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999: 293-303.
80. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J. The use of the markers of bone turnover in osteoporosis. Osteoporos Int 2000;Suppl.6: S2-S17
81. Seibel MJ. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. Osteoporos Int 2000;Suppl. 6:S18-S29.
82. Farley J, Baylink DJ. Skeletal alkaline phosphatase activity in serum. Clin Chem 1995; 41:1551-1553.
83. Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. The effect of carboxyl-terminal propeptide of type I collagen (C-propeptide) on collagen synthesis of preosteoblast and osteoblast. Calcif Tissue Int 2000; 67: 391-399.
84. Worsfold M, Davie MWJ, Haddaway MJ. Age-related changes in body composition, hydroxyproline, and creatinine excretion in normal women. Calcif Tissue Int 1999; 64: 40-44.
85. Cheung CK, Panesar NS, Haines C, Masarei J, Swaminathan R. Immunoassays of a tartrate-resistant acid phosphatase in serum. Clin Chem 1995; 41: 679-686.
86. Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. J Bone Miner Res. 1993; 2(Suppl. 8): S549-S555.

87. Apone S, Lee MY, Eyre DR. Osteoclast generate cross-linked collagen N-telopeptides (NTX) but not free pyridinolines when cultured on human bone. *Bone* 1997; 21: 129-136.
88. Gorai I, Taguchi Y, Chaki O, Nakayama M, Minaguchi H. 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* 1997; 60: 317-322.
89. Robins SP. Collagen crosslinks in metabolic bone disease. *Acta Orthop scandinavian Suppl.* 1995; 266: 171-175.
90. Rosen HN, Moses AC, Garber J, Hoputaife ID, Ross DS, Lee SL, Greenspan SL. Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif Tissue Int* 2000;66:100-103.
91. Delmas PD. Bone marker nomenclature *Bone* 2001;28:575-576.
92. Hassager C, Jensen LT, Podenphant J, Thompsen K, Christiansen C. The carboxy-terminal pyridinoline cross-linked telopeptide of type I collagen in serum as marker of bone resorption: the effect of nandrolone decanoate and hormone replacement therapy. *Calcif Tissue Int* 1994;54:30-33.
93. Rosequist C, Fledelius C, Christgau S, Petersen BJ, Bonde M, Qvist P, Christiansen C. Serum crosslaps one step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I of collagen. *Clin Chem* 1998; 44: 2281-2289.
94. Guerrero R, Diaz Martin MA, Diaz Diego EM, Disla T, Rapado A, de la Piedra C. New markers of bone resorption derived from collagen breakdown the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 1996; 6: 297-302.
95. Clausen J. Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules. 3rd ed. U. S. A.: Elsevier Science Publishers, 1991: 175-190.
96. Benjamini E, Sunshine G, Leskowitz S. Immunology: a short course. 3rd ed. New York:Wiley-Liss, 1996: 124-134.