



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estudio de Polimorfismos y Biomarcadores
de Remodelado Óseo y de Inflamación
en la Diabetes Mellitus**

D^a M^a Carla Ramírez Ruiz

2017

UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO



TESIS DOCTORAL

**Estudio de polimorfismos y biomarcadores de
remodelado óseo y de inflamación en la Diabetes
Mellitus**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

M^a Carla Ramírez Ruiz

Bajo la dirección de los Doctores:

D^a. Miriam Martínez Villanueva

D. José Antonio Noguera Velasco

D. Antonio Miguel Hernández Martínez

A mis padres
A Eduardo

AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas que merecen mi más profundo agradecimiento por la consecución de este proyecto. En primer lugar agradecer a la Dra. Miriam Martínez Villanueva por haber confiado en mí desde los primeros meses de mi residencia. Porque comenzó siendo mi adjunta, después pasó a ser mi Directora, para finalmente convertirse en mi amiga, gracias por todos los buenos ratos, charlas y consejos compartidos. Gracias por el esfuerzo, dedicación e ilusión por este trabajo que es tan suyo como mío. Al Dr. José Antonio Noguera Velasco, Jefe de Servicio de Análisis Clínicos, porque formarse a su lado es, sinceramente, un regalo. Por su disposición profesional y personal durante mi residencia y especialmente durante la elaboración de esta tesis. Al Dr. Antonio Miguel Hernández Martínez, Jefe de Servicio de Endocrinología, por su disposición, ayuda y orientación en todo momento.

Al servicio de Análisis Clínicos del Hospital Virgen de la Arrixaca, por la formación académica y humana que he recibido durante mis años como residente, por haber sido mi familia durante 4 maravillosos años. En especial a mis compañeros y amigos residentes con quien he compartido estos años irrepetibles llenos de guardias y buenos momentos, dentro y fuera del hospital y por los que nos quedan por compartir.

Mi más sincero agradecimiento al Servicio de Endocrinología del Hospital Virgen de la Arrixaca, en especial a la Dra. Paloma Portillo y Marta Arráez, sin cuya inestimable ayuda en la selección de pacientes y recogida de datos clínicos esta tesis no hubiera sido posible.

A mis padres, M^a Carmen y Miguel Ángel por su amor incondicional y su apoyo constante, a quienes debo todo lo que soy y todo lo que he conseguido en la vida. Me han enseñado con su ejemplo, a poner el corazón en todo lo que hago. A mis hermanos, mis cuñadas y sus retoños, porque también han sido parate esencial en la elaboración de este trabajo, por sus palabras de aliento y por todo el cariño recibido desde que tengo uso de razón. A mi hermano Óscar por ponerme a punto el ordenador y por recuperarme los archivos perdidos y a mi hermao Miguel por todo el tiempo dedicado a la maquetación, gracias a él esta tesis ha quedado así de bonita.

A Eduardo, mi compañero de viaje y pilar insustituible en mi vida. Por toda su confianza depositada en mí, por animarme y cuidarme cada día, por su paciencia, comprensión y apoyo incondicional. Por permitir que nuestro tiempo pudiese estar ocupado en el desarrollo de esta tesis doctoral. No hubiera sido posible sin su ayuda. Gracias por hacerme feliz.

LISTADO DE ABREVIATURAS

25-OH-D	25-hidroxi-vitamina D
A	Adenina
ACV	Accidente cerebrovascular
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGE	Productos finales de la glicación avanzada
Ang-II	Angiotensina-II
AP - 1	Proteína activadora 1
aP2	Proteína de unión de ácidos grasos
ARNm	ARN mensajero
AUC	Área bajo la curva
BMP	Proteína morfogénica ósea
C	Citocina
Ca	Calcio
CaO	Calcio en orina
cHDL	Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
cLDL	Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
COX-2	Ciclooxigenasas
Cp	Crossing point
Crea	Creatinina
CreaO	Creatinina en orina
CTX	Telopéptidos carboxiterminal del colágeno tipo I
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DE	Desviación estandar
DEXA	Absorciometría dual de rayos X
DKK-1	Proteína Dickkopf-1
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMO	Densidad mineral ósea
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DPD	Deoxipiridinolina
DPP-4	Inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV
EAP	Enfermedad arterial periférica
ECLIA	Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia
EDTA-K3	Ácido etilendiaminotetracético tripotásico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPOS	European Prospective Osteoporotic Study
ER	Receptor de estrógenos
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
EVOS	European Vertebral Osteoporotic Study
FA	Fosfatasa alcalina
FAO	Fosfatasa alcalina ósea
FATR	Fosfatasa Ácida Tartrato Resistente
FED	Federación Española de Diabetes

FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FIT	Fracture Intervention Trial
FRAX®	Fracture Risk Assessment Tool
FRET	Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente
FZD	Frizzled
G	Guanina
GH	Hormona del crecimiento
GLDH	Glutamato deshidrogenasa
GLP-1	Análogos del glucagon-like peptide-1
GM-CDF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GRB2	Proteína ligada al receptor del factor de crecimiento
GSK3	Glucógeno sintasa cinasa
GSK3b	Glucógeno sintasa quinasa 3b
GWAS	Whole genome association study
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HTA	Hipertensión arterial
HTR2β	Receptor 5-hidroxitriptamina 2β
I	Insulina
IAPP	Polipéptido amiloide de los islotes pancreáticos
IDI	Índice de discriminación integrado
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IFN-γ	Interferón γ
IGF	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGFBP	Proteínas transportadoras del factor de crecimiento insulínico
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
INFγ	Interferón gamma
IOF	Fundación Internacional de Osteoporosis
IR	Receptor de insulina
ISCD	International Society for Clinical Densitometry
JAK	Janus Quinasa
LRP	Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotáctica monocítica-1
MCS	Mínimo Cambio Significativo
MCSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MGP	Proteína gla de matriz
MRO	Marcadores de remodelado óseo
MSC	Células madres mesenquimales
MURF	Factor de regulación de ubiquitinación
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program
NHANES III	National Health and Nutrition Examination Survey III
NIH	National Institutes of Health
NO	Óxido nítrico
NOF	National Osteoporosis Foundation

NTX	Telopéptidos aminoterminal del colágeno tipo I
OC	Osteocalcina
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPG	Osteoprotegerina
OSX	Osterix
P	Fósforo
P1CP	Propéptido carboxiterminal del procolágeno tipo 1
P1NP	Propéptido aminoterminal del Procolágeno tipo 1
PCR	Proteína C reactiva
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PEG	Solución de polietilenglicol 6.000 al 25% [p/v]
PG	Prostaglandina
PKA	Proteína quinasa
PO	Fósforo en orina
PPAR-γ	Receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas
PTH	Hormona paratiroidea
PTHrP	Proteína relacionada con la PTH
PYR	Piridinolina
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
RAGE	Receptor específico de AGE
RANK	Receptor activador del factor nuclear kappa β
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa β
RIA	Radioinmunoensayo
RLU	Unidades relativas de luz
RUNX2	Factor de transcripción relacionado con Runt 2
SAA	Suero amiloide A
SED	Sociedad Española de Diabetes
SGLT-2	Inhibidores del cotransportador de sodio y glucosa tipo 2
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
SOG	Sobrecarga oral de glucosa
SOST	Esclerostina
STAT	Transductores de señal y activadores de la transcripción
T	Timina
T4L	Tirotóxina libre
TAD	Tensión arterial diastólica
TAS	Tensión arterial sistólica
TBS	Trabecular Bone Score
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
Tm	Temperatura de melting
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor de TNF
TNT	Neurotransmisor
TSH	Tirotropina
TWSG1	Twisted gastrulación
UBE	Unidades de bebida estándar
UMB	Unidad multicelular básica

VDR	Receptor de la vitamina D
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
α-CTX	α -CrossLaps
B-cat	β catenina
β-CTX	β -CrossLaps

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	Diabetes Mellitus	3
1.1.1	Definición	3
1.1.2	Clasificación	3
1.1.3	Epidemiología	5
1.1.4	Criterios diagnósticos	6
1.1.5	Tratamiento	7
1.1.6	Complicaciones agudas de la DM	8
1.1.7	Complicaciones crónicas de la DM	9
1.2	Fisiología del metabolismo óseo, osteoporosis y herramientas diagnósticas	9
1.2.1	Fisiología del metabolismo óseo	9
1.2.2	Osteoporosis	20
1.2.3	Herramientas diagnósticas de la situación estructural y metabólica del hueso. Evaluación del paciente con osteoporosis	35
1.3	Diabetes y osteoporosis	44
1.3.1	Efecto de la DM en las células óseas	44
1.3.2	Efecto de la DM en las células musculares	48
1.3.3	Efecto de la obesidad en las células óseas	49
1.3.4	DMO y riesgo de fractura en DM	50
1.3.5	MRO en pacientes diabéticos	51
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
2.1	Hipótesis	55
2.2	Objetivos	55
3	MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.1	Población y diseño del estudio	59
3.1.1	Criterios de inclusión	59
3.1.2	Criterios de exclusión	59
3.1.3	Grupos de estudio	59
3.1.4	Diseño del estudio	60
3.1.5	Confidencialidad y principio éticos	61
3.2	Estudio clínico	61
3.3	Estudio densitométrico	63
3.4	Estudio de riesgo de fracturas a 10 años	63
3.5	Estudio bioquímico	64
3.5.1	Obtención de muestras	64
3.5.2	Parámetros de estudio y técnicas analíticas	65
3.6	Estudio genético	75
3.6.1	Obtención de muestras	76
3.6.2	Extracción y purificación de ADN genómico	76
3.6.3	Fundamento de la técnica qPCR	77
3.6.4	Protocolo de amplificación por qPCR	80
3.6.5	Lectura e interpretación de los resultados	83
3.7	Estudio estadístico	84

4	RESULTADOS	89
4.1	Objetivo 1: Análisis descriptivo de las características clínicas de los pacientes en el momento del reclutamiento	89
4.1.1	Características generales de los pacientes	89
4.1.2	Características clínicas de la población estudiada	90
4.2	Objetivo 2: Determinar los valores de DMO mediante DEXA en el momento basal y a los 12 meses y calcular el riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX® en la población diabética	93
4.2.1	Pruebas densitométricas para evaluar la DMO de los pacientes	93
4.2.2	Estudio del riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX®	96
4.3	Objetivo 3: Medir las concentraciones de parámetros bioquímicos para evaluar el metabolismo fosfocálcico, la función renal y el metabolismo lipídico e hidrocarbonado, así como los MRO y de inflamación en el momento basal, a los 6 y a los 12 meses del inicio del estudio	96
4.3.1	Parámetros bioquímicos del metabolismo fosfocálcico, función renal, metabolismo glucídico, hormonas y metabolismo lipídico	96
4.3.2	Parámetros bioquímicos de remodelado óseo	102
4.3.3	Parámetros bioquímicos de inflamación	106
4.4	Objetivo 4: Determinar la frecuencia genotípica de los SNPs de los genes VDR, ESR1, OPG, RANKL e IL-6 en los diferentes grupos de diabéticos y compararla entre sí y con las descritas en la población general, así como estudiar las correlaciones existentes con las manifestaciones clínicas, bioquímicas y densitométricas en estos pacientes	108
4.4.1	Prevalencia de los polimorfismos en la población estudiada y comparación con la población control	108
4.4.2	Asociación de los polimorfismos estudiados y la DMO	112
4.4.3	Asociación entre los polimorfismos genéticos y las distintas características clínicas y los diferentes parámetros bioquímicos de la población	117
4.5	Objetivo 5: Estudiar la combinación más adecuada de los marcadores de remodelado óseo, de inflamación y de los SNPs con las variables clínicas para el diagnóstico y seguimiento de la patología ósea en el paciente diabético	127
4.5.1	Modelo con variables clínicas	127
4.5.2	Modelo con OC	129
4.5.3	Modelo con IL-6	130
4.5.4	Modelo con polimorfismos genéticos	131
4.5.5	Evaluación de los modelos	132
5	DISCUSIÓN	137
5.1	Objetivo 1: Análisis descriptivo de las características clínicas de los pacientes en el momento del reclutamiento	137
5.1.1	Características generales de los pacientes	137
5.1.2	Características clínicas de la población estudiada	138
5.2	Objetivo 2: Determinar los valores de DMO mediante DEXA en el momento basal y a los 12 meses y calcular el riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX® en la población diabética	141
5.2.1	Pruebas densitométricas para evaluar la DMO de los pacientes	141
5.2.2	Estudio del riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX®	145
5.3	Objetivo 3: Medir las concentraciones de parámetros bioquímicos para evaluar el metabolismo fosfocálcico, la función renal y el metabolismo lipídico e	

hidrocarbonado, así como los MRO y de inflamación en el momento basal, a los 6 y a los 12 meses del inicio del estudio	146
5.3.1 Parámetros bioquímicos del metabolismo fosfocálcico, función renal, metabolismo glucídico, hormonas y metabolismo lipídico	146
5.3.2 Parámetros bioquímicos de remodelado óseo	150
5.3.3 Parámetros bioquímicos de inflamación	154
5.4 Objetivo 4: Determinar la frecuencia genotípica de los SNPs de los genes VDR, ESR1, OPG, RANKL e IL-6 en los diferentes grupos de diabéticos y compararla entre sí y con las descritas en la población general, así como estudiar las correlaciones existentes con las manifestaciones clínicas, bioquímicas y densitométricas en estos pacientes.	156
5.4.1 Prevalencia de los polimorfismos en la población estudiada y comparación con la población control	156
5.4.2 Asociación de los polimorfismos estudiados y la DMO	161
5.4.3 Asociación entre los polimorfismos genéticos y las distintas características clínicas y los diferentes parámetros bioquímicos de la población	165
5.5 Objetivo 5: Estudiar la combinación más adecuada de los marcadores de remodelado óseo y de inflamación con las variables clínicas para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad ósea en el paciente diabético.	170
5.6 Limitaciones del estudio	172
6 CONCLUSIONES	175
7 BIBLIOGRAFÍA	179
ANEXOS	199
Anexo I: Resolución del Comité Ético	201
Anexo II: Consentimiento informado	203

I INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes Mellitus

1.1.1 Definición

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos crónicos con elevada morbilidad y mortalidad, que se caracterizan por la presencia de niveles elevados de glucosa en sangre debido a los defectos en la secreción de insulina y/o en la acción de la misma. La hiperglucemia crónica afecta a todos los vasos sanguíneos por lo que la DM se asocia con una afectación crónica y progresiva de todo el organismo, manifestándose especialmente a nivel ocular, renal, cardíaco, nervioso y vascular. Varios procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la DM, desde la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, con la consecuente deficiencia de insulina, hasta las anomalías que provocan resistencia a la acción de la misma.

En la DM, la deficiente acción de la insulina sobre los tejidos diana, es la base de las anomalías del metabolismo de los hidratos de carbono, de las grasas y de las proteínas. Los defectos se producen tanto en la secreción, como en la acción de la insulina, en forma de resistencia insulínica, pudiendo coexistir en el tiempo en el mismo paciente o aparecer secuencialmente a lo largo de su historia natural.

La hiperglucemia se manifiesta con los clásicos síntomas cardinales de descompensación diabética, poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso. La hiperglucemia crónica da lugar a complicaciones agudas en forma de cetoacidosis o coma hiperosmolar no cetósico y a la larga a complicaciones crónicas, con afectación de grandes vasos (macroangiopatía) o pequeños vasos (microangiopatía), siendo las manifestaciones clínicas dependientes del territorio afectado (1).

1.1.2 Clasificación

Existen diferentes tipos de DM debido a una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales. La Asociación Americana de Diabetes (ADA) clasifica etiológicamente la DM en cuatro tipos según las posibles causas que originan esta enfermedad (2):

1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) debido a la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, que normalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina.
2. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) causada por una combinación de resistencia a la insulina y una respuesta de secreción compensatoria de insulina inadecuada.
3. La diabetes mellitus gestacional, consecuencia de la resistencia a la insulina que condicionan las hormonas gestacionales.
4. Otros tipos de diabetes, donde se encuentran las genéticas como la diabetes de la gente joven que se comporta como la de la madurez (MODY), y la diabetes secundaria a enfermedades del páncreas exocrino, como las pancreatitis, la fibrosis quística o la cirugía pancreática así como las debidas a fármacos como son los glucocorticoides, algunos retrovirales e inmunosupresores.

La **DM1** se caracteriza por la destrucción de las células β pancreáticas, que tiene como consecuencia la deficiencia absoluta de insulina. Esto hace que el tratamiento necesario desde el inicio de la enfermedad, sea la administración exógena de insulina con el fin de controlar los niveles de glucosa en sangre. La enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, pero suele aparecer en niños o adultos jóvenes menores de 30 años. La mayoría de los casos (95%) son atribuibles a una destrucción autoinmune de las células β del páncreas (DM tipo 1a). Ya en fases precoces de la enfermedad, cuando todavía no hay criterios diagnósticos de DM, aparecen en sangre diferentes tipos de anticuerpos, unos dirigidos contra las propias células (anticuerpos anti-islotos o ICA), otros contra la insulina (anticuerpos anti-insulina) o también contra la descarboxilasa del ácido glutámico (anticuerpos anti-GAD) o contra la tirosin-fosfatasa (anticuerpos anti-IA-2 e IA-2 β). Es ampliamente conocida la asociación de esta patología con determinados patrones de histocompatibilidad. El complejo HLA-DR/DQ puede mostrar diferentes subtipos, unos protectores y otros predisponentes al desarrollo de esta patología. El segundo tipo de DM1 corresponde a una pequeña minoría de los casos que resultan de una destrucción idiopática o fallo de las mismas (DM tipo 1b). Este tipo minoritario de DM1 no presenta anticuerpos conocidos ni asociaciones con HLA (3).

La **DM2** se caracteriza por la presencia de grados variables de resistencia a la acción periférica de la insulina, disminución del efecto incretina y alteración de la producción de insulina y glucosa. Durante la evolución de la enfermedad, el páncreas mantiene una secreción de insulina suficiente para vencer la resistencia insulínica, pero lo habitual es que con el paso de los años, el páncreas vaya claudicando y la secreción de insulina sea insuficiente para controlar la glucemia. La DM2 deriva de la interacción entre factores genéticos (ya sean enzimáticos o a nivel de la insensibilidad de receptores), ambientales y otros factores de riesgo (obesidad, mala

alimentación, falta de actividad física, edad avanzada, etc.) que a través de la epigenética, hacen que se desarrolle la enfermedad. Este tipo de DM afecta principalmente a adultos (más de 40 años), pero cada vez hay más casos de niños y adolescentes (4).

1.1.3 Epidemiología

La prevalencia mundial de la DM se ha incrementado notablemente durante los últimos 30 años (del 4,7% en 1980 al 8,8% en 2015), afectando en la actualidad a más de 422 millones de personas en todo el mundo, en clara relación con el aumento de la obesidad y la forma de vida occidental. Aunque los casos de DM1 y de DM2 están aumentando en todo el mundo, cabe esperar que la DM2 aumente con más rapidez en el futuro debido al incremento de la obesidad y la reducción de la actividad física (5).

La DM2 es la forma más común de DM y representa alrededor del 90% a 95% de todos los pacientes diabéticos, mientras que la DM1 representa el 5-10% del total de casos (6). A nivel mundial, se estima que 65.000 niños menores de 15 años desarrollan la enfermedad cada año, y la incidencia global en los niños sigue aumentando a un ritmo del 3% al año (3). La prevalencia mundial de la DM entre adultos (de 20 a 79 años) será del 10,4% en el año 2040, afectando a 642 millones de adultos (Figura 1).



Figura 1: Número Estimado de personas con diabetes en el mundo y por región en 2015 y 2040 (20-79 años) (7).

Según proyecciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030. La prevalencia es semejante en varones y mujeres en la mayor parte de los grupos de edad, pero es ligeramente más elevada en los varones mayores de 60 años, además existe una considerable variabilidad geográfica en la incidencia de DM1 y DM2, incluso entre las diferentes poblaciones étnicas dentro de un país determinado (7).

En España, para conocer de forma exhaustiva la prevalencia de DM2, se desarrolló el estudio di@bet.es, llevado a cabo por CIBERDEM, la Sociedad Española de Diabetes (SED) y la Federación Española de Diabetes (FED). Este estudio situó la prevalencia de DM2 en el 13,8% de la población española. Además, este estudio señala que un 6% de las personas con DM2 desconoce que sufre esta enfermedad. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 1 (8).

Tabla 1: Diversas prevalencias de personas afectadas mayores de 18 años en población española (8)

Patología/hábitos de salud	%	Número
Diabetes mellitus conocida	8	3.111.641
Diabetes mellitus no conocida	6	1.514.916
Diabetes mellitus total	14	4.626.557
Tolerancia anormal de la glucosa	9	3.028.706
Glucemia basal alterada	3	1.398.183
Obesidad (IMC > 30 kg/m ²)	28	10.863.431
Hipertensión arterial	41	15.889.058
Síndrome metabólico	21	8.022.026
Tabaquismo	28	10.724.238
Ingesta de bebidas alcohólicas a diario	23	8.733.905
Ingesta de aceite de oliva para freír	69	26.583.402
Sedentarismo	50	19.400.237
Microalbuminuria	9	3.469.827

1.1.4 Criterios diagnósticos

Actualmente, la diabetes puede ser diagnosticada basándose en los niveles de glucosa plasmática, ya sea mediante la determinación de glucosa plasmática en ayunas (siendo criterio diagnóstico valores ≥ 126 mg/dl), o mediante la determinación de glucosa plasmática 2 horas después una prueba de sobrecarga oral de glucosa (SOG) con 75 g de glucosa (con valores patológicos ≥ 200 mg/dl) o con la determinación de la hemoglobina glicosilada A1C (HbA1c)

(diagnosticando de DM con valores $\geq 6,5\%$), Tabla 2 (2). Sin embargo la evaluación de la exposición crónica a concentraciones elevadas de glucosa es más informativo que una sola medida de la misma. Debido a esto, la determinación de HbA1c es un buen método diagnóstico ya que proporciona una medida fiable de la concentración de glucosa promedio de los últimos 2-3 meses y correlaciona bien con el riesgo de complicaciones de la DM a largo plazo.

El diagnóstico de DM se lleva a cabo si la concentración de HbA1c es $\geq 6,5\%$, confirmándolo con una repetición de la determinación de HbA1c, salvo que existan síntomas clínicos y/o concentraciones de glucosa >200 mg/dl (>11 mmol/l). La prueba diagnóstica se debe realizar utilizando un método certificado por el National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) y estandarizado para el ensayo Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) (9).

Tabla 2: Criterios para el diagnóstico de diabetes (2)

Glucosa plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l). El ayuno se define como la ausencia de ingesta calórica durante al menos 8 h. *
Glucosa plasmática a las 2 h ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) durante una prueba de SOG. La prueba debe realizarse según lo descrito por la OMS, utilizando una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.*
HbA1c $\geq 6,5\%$ (48 mmol/mol). La prueba debe realizarse en un laboratorio utilizando un método certificado por NGSP y estandarizado para DCCT.*
En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica, una glucosa aleatoria ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol / L).
*En ausencia de hiperglucemia inequívoca, los resultados deben ser confirmados mediante pruebas repetidas.

La determinación de HbA1c tiene varias ventajas en comparación con las otras pruebas ya mencionadas, incluyendo una mayor comodidad (ayuno no requerido), mayor estabilidad preanalítica y menos variaciones debidas al estrés y a la enfermedad (10).

1.1.5 Tratamiento

Los objetivos del tratamiento de la DM de tipo 1 o 2 son eliminar los síntomas relacionados con la hiperglucemia, reducir o eliminar las complicaciones de microangiopatía o macroangiopatía a largo plazo y permitir al paciente un modo de vida tan normal como sea posible.

Debido a que la DM1 es una enfermedad en la que se produce la destrucción de los islotes pancreáticos con el consiguiente déficit de insulina, el tratamiento fundamental de la misma, es la administración exógena de insulina simulando en lo posible su secreción fisiológica. Esta

secreción tiene dos componentes, uno basal continuo y otro agudo desencadenado por la hiperglucemia posprandial. En sujetos no diabéticos, la ingesta de comida produce un rápido aumento de la concentración de insulina plasmática a los 30-45 minutos seguido por una disminución a los valores basales a las 2-3 horas. En la actualidad existen diferentes insulinas con distintos perfiles de acción para poder imitar el patrón fisiológico de secreción de insulina, así, los requerimientos basales de insulina se cubrirán con insulina de acción lenta y para evitar la hiperglucemia posprandial se administrarán insulinas de acción rápida antes de cada ingesta (11). La dosis inicial de insulina se basa en el peso, con dosis comprendidas entre 0,4 y 1,0 unidades de insulina total/kg/día, con mayores cantidades requeridas durante la pubertad (12). Una terapia nutricional adecuada y el ejercicio físico son los otros dos pilares del tratamiento.

El tratamiento de la DM2 tiene como objetivo mantener los niveles de glucosa en sangre dentro de la normalidad para minimizar el riesgo de complicaciones asociadas a la enfermedad. En la actualidad se dispone de ocho grupos de antidiabéticos (además de la insulina), que poseen los siguientes mecanismos de acción:

- Estimulan la secreción de insulina: sulfonilureas, secretagogos de acción rápida (glinidas).
- Restauran el efecto incretina: inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-4) y análogos del glucagon-like peptide-1 (GLP-1).
- Disminuyen la resistencia a la insulina: biguanidas y glitazonas.
- Reducen o enlentecen la absorción de la glucosa: inhibidores de las α -glucosidasas.
- Inhiben la reabsorción de glucosa a nivel renal: inhibidores del co-transportador de sodio y glucosa tipo 2 (SGLT-2) (6).

1.1.6 Complicaciones agudas de la DM

Las complicaciones agudas de la DM no controlada que ponen en peligro la vida del individuo son la hiperglucemia con cetoacidosis y el estado hiperosmolar no cetósico. La cetoacidosis diabética se consideraba antes una piedra angular de la DM1, pero ocurre también en individuos con DM2, mientras que el estado hiperosmolar hiperglucémico se observa de manera primordial en individuos con DM2.

La **cetoacidosis diabética** es la complicación más característica de la DM1, siendo a veces, su forma de debut. Se debe al déficit agudo de insulina, lo que conduce a una hiperglucemia y a la presencia de cuerpos cetónicos resultantes del consumo de grasas como fuente de energía ante

la imposibilidad de consumir la glucosa. Se caracteriza por un cuadro severo de acidosis metabólica y bajo gasto periférico. El **coma hiperosmolar no cetósico** es una complicación propia de la DM2, consecuencia de un déficit relativo de insulina, unida a una situación intercurrente generalmente infecciosa, que conlleva a un cuadro de hiperglucemia severa, deshidratación, deterioro neurológico e hiperosmolaridad. Estos trastornos pueden dar lugar a complicaciones graves o incluso la muerte si no se diagnostican y tratan adecuadamente (13).

1.1.7 Complicaciones crónicas de la DM

Las complicaciones crónicas de la DM pueden afectar a muchos sistemas orgánicos y son responsables de la gran parte de la morbilidad y mortalidad que acompañan a este trastorno. Las complicaciones crónicas pueden dividirse en vasculares y no vasculares. A su vez, las complicaciones vasculares se subdividen en microangiopatía (retinopatía, neuropatía y nefropatía) y macroangiopatía (cardiopatía isquémica, enfermedad vascular periférica y enfermedad cerebrovascular). Las complicaciones no vasculares comprenden problemas como gastroparesia, disfunción sexual y afecciones de la piel. El riesgo de complicaciones crónicas aumenta con la duración de la DM, haciéndose evidentes en el transcurso del segundo decenio de la enfermedad. Como la DM2 puede tener un período prolongado de hiperglucemia asintomática, muchos individuos ya presentan complicaciones en el momento del diagnóstico (13).

Además de las diferentes complicaciones ya mencionadas sobre diferentes partes del organismo, la DM provoca alteraciones metabólicas y endocrinas que afectan a la calidad y a la densidad del hueso. Estos cambios afectan adversamente al esqueleto y se asocian con un **mayor riesgo de osteoporosis y fracturas por fragilidad** (14).

1.2 Fisiología del metabolismo óseo, osteoporosis y herramientas diagnósticas

1.2.1 Fisiología del metabolismo óseo

1.2.1.1 Estructura ósea

El hueso es un tejido firme, duro y resistente que forma parte del endoesqueleto de los vertebrados. Es un tejido dinámico que se remodela constantemente durante toda la vida. La disposición del hueso compacto y del hueso poroso aporta fuerza y densidad suficiente para la

movilidad y la protección del organismo. Además, el hueso constituye un depósito de calcio, magnesio, fósforo, sodio y otros iones necesarios para las funciones homeostáticas. El esqueleto es uno de los sistemas corporales más grandes, constituye la mayor proporción de tejido conjuntivo del organismo, está muy vascularizado (recibe casi 10% del gasto cardíaco) y está integrado por una matriz ósea mineralizada (con componentes orgánicos e inorgánicos) y por un componente celular (15).

La matriz ósea extracelular consta de un componente orgánico y un componente inorgánico. La **matriz orgánica** está compuesta por fibras colágenas y no colágenas. Las fibras colágenas de tipo 1 constituyen del 90 al 95% de las proteínas del hueso. En la porción no colagenosa de la matriz orgánica encontramos principalmente proteoglicanos, fosfoproteínas y glicoproteínas (osteocalcina (OC), osteonectina, sialoproteína y osteopontina). La **fase mineral** está constituida por calcio y fosfato, formando cristales de hidroxapatita cálcica $[3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2]$ que proporcionan rigidez mecánica y resistencia de carga al hueso.

El componente celular óseo lo integran las células osteoprogenitoras (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos). Los **osteoblastos** son las células responsables de la síntesis de la mayoría de los componentes de la matriz ósea y derivan de células de origen mesenquimatoso (Figura 2A). Los osteoblastos producen otras proteínas no colágenas como glicosaminoglicanos, OC, osteopontina y sialoproteína ósea y son responsables de la regulación del calcio y el fósforo. A medida que el osteoblasto secreta matriz, que luego se mineraliza, la célula se convierte en un **osteocito**, que es la célula ósea madura (es un osteoblasto diferenciado). Los osteocitos son responsables del mantenimiento de la matriz ósea, mediante su actividad sintética y resorptiva (16). Los osteocitos son mecanosensores del hueso y comunican señales a los osteoblastos de la superficie y a sus progenitores a través de la red canalicular.

La mineralización de la matriz, tanto en el hueso trabecular como en las osteonas de hueso cortical compacto (sistemas haversianos), comienza poco después de su secreción (mineralización primaria), pero no terminará hasta después de varias semanas o incluso más tiempo (mineralización secundaria). Aunque esta mineralización aprovecha las altas concentraciones séricas de calcio y fosfato, próximas a la saturación, la mineralización es un proceso muy regulado que depende de la actividad de la fosfatasa alcalina derivada de los osteoblastos, que quizá funciona hidrolizando inhibidores de la mineralización.

Los **osteoclastos** son células cuya función es la resorción ósea, produciendo como consecuencia de su actividad las llamadas lagunas de resorción. Los osteoclastos proceden de las células

madre hematopoyéticas, las cuales van a dar lugar, a través de progenitores mieloides, a los monocitos circulantes y a los macrófagos tisulares (Figura 2B). Los osteoclastos son células gigantes con complejos aparatos de Golgi alrededor de cada núcleo (pueden contener entre 6 y 50 núcleos) y con un citoplasma rico en fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR) (17).

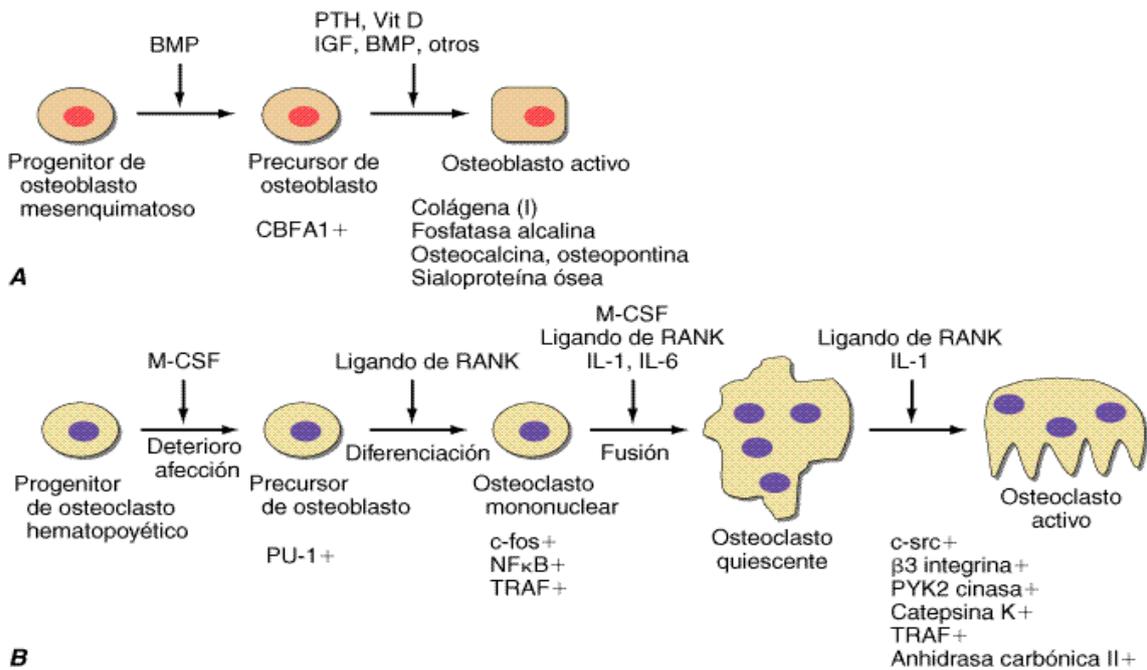


Figura 2: Vías que regulan el desarrollo de los (A) osteoblastos y (B) osteoclastos (15)

Desde el punto de vista anatómico, el hueso se clasifica en compacto (localizado en la parte cortical de los huesos largos) y esponjoso, trabecular o plexiforme (localizado en la parte interna del hueso en el límite de la médula ósea). El hueso cortical está compuesto por una serie de unidades de láminas óseas dispuestas concéntricamente entre sí en un número de 8 a 15, suponiendo casi cuatro veces el volumen de hueso trabecular, distribuyéndose principalmente en la zona diafisaria de los huesos largos. El hueso esponjoso o trabecular está compuesto por un sistema de trabéculas, formando una red tridimensional orientada en función de las cargas que reciben, estando paralelas en cada capa y cambiando de orientación de una capa a otra. Las cavidades formadas por la red trabecular es el asiento de la médula ósea. El hueso esponjoso resulta ser el más activo metabólicamente, caracterizándose por una gran capacidad de remodelado óseo.

1.2.1.2 Remodelado óseo

El hueso es un tejido vivo y metabólicamente activo que está siendo constantemente reparado y remodelado a lo largo de la vida de un individuo. Aproximadamente el 20% del tejido óseo es reemplazado anualmente dependiendo de la localización y tipo de hueso (18). El remodelado del hueso se logra gracias a la acción coordinada de la unidad multicelular básica (UMB), que consta de dos tipos de células características: los osteoclastos, encargados de la resorción de la matriz ósea calcificada y los osteoblastos encargados de producir la matriz ósea. Cada ciclo de remodelado consta de varias fases (Figura 3):

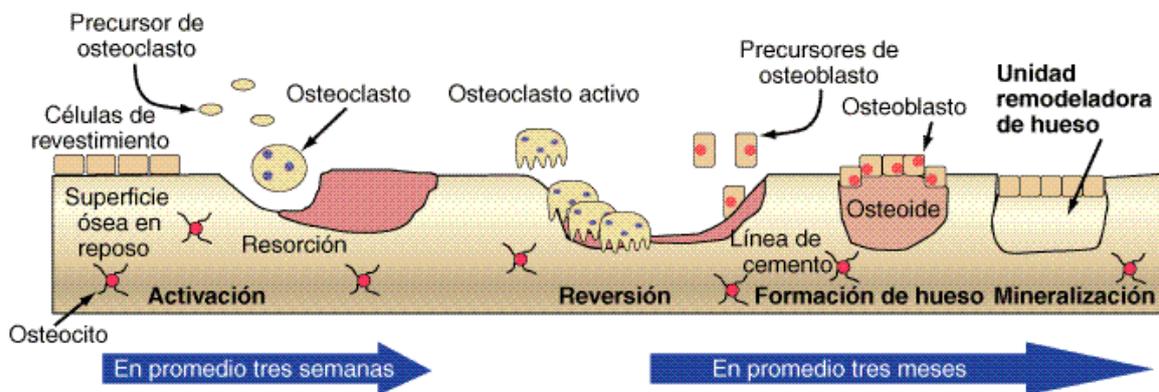


Figura 3: Ciclo de resorción y de formación de hueso (15)

- **Activación** de la superficie del hueso en reposo. Esto se produce a través de señales quimiotácticas, en especial del ligando del receptor activador del factor nuclear kappa β (RANKL), que atrae a los preosteoclastos.
- Reclutamiento de osteoclastos que llevan a cabo la **resorción ósea**, dando lugar a una cavidad denominada laguna de Howship o laguna de resorción.
- **Fase de reposo** o inversión que es un periodo de aparente inactividad que dura aproximadamente 1-2 semanas, donde se produce la reversión del catabolismo al anabolismo.
- **Fase de formación**, donde se reclutan los precursores de los osteoblastos que rellenan la zona excavada por los osteoclastos y depositan matriz ósea no mineralizada u osteoide. Las sales de calcio que se depositan en primer lugar son compuestos amorfos (no cristalinos), constituidos por una mezcla de sales que a lo largo de un período de semanas o meses, van sufriendo cambios en su composición y estructura convirtiéndose finalmente en cristales de hidroxiapatita. A este proceso se le denomina maduración de la matriz (19).

1.2.1.3 Regulación del remodelado óseo

La remodelación ósea está a cargo de la acción combinada de los osteoclastos y los osteoblastos en una acción secuencial y antagónica, aunque independiente, ambos estimulados y modulados por diferentes factores relacionados entre sí, los cuales pueden clasificarse en: genéticos, mecánicos, hormonales y locales.

- **Factores genéticos:** Los factores genéticos son determinantes en el pico de masa ósea ya que entre el 60 y el 80% de la masa ósea se encuentra determinada genéticamente (20). Resulta importante destacar el efecto de los polimorfismos en gen del receptor de la vitamina D (VDR), también se relacionan otros mecanismos de remodelado óseo con mutaciones genéticas en los receptores de estrógenos, diferencias en la transcripción del receptor activador de factor nuclear kappa β (RANK) y polimorfismos del gen de la osteoprotegerina (OPG) (21).
- **Factores mecánicos:** La influencia de los factores mecánicos sobre el remodelado es responsable de la pérdida de masa ósea inducida por la falta de actividad física que inducen un modo de remodelado óseo denominado de “desuso”, incrementándose el recambio en todas las superficies óseas, con pérdida neta de hueso. Por el contrario, el ejercicio físico moderado e intenso tiene un efecto positivo sobre la masa ósea, que se reduce con la edad por el deterioro de las células mecanosensoras del hueso (22). Las fuerzas mecánicas inducidas sobre el hueso son detectadas por los osteocitos conectados entre sí y con las células de revestimiento por un sistema canalicular, y los microdaños por fatiga inducen la apoptosis de osteocitos en las zonas adyacentes, seguida de la resorción de los sitios afectados (23).
- **Factores hormonales:** De entre los factores no mecánicos involucrados en el metabolismo del hueso, las hormonas juegan un papel primordial. La regulación hormonal del metabolismo fosfocálcico se realiza mediante tres hormonas principales: la hormona paratiroidea (PTH), el calcitriol (metabolito activo de la vitamina D₃) (Figura 4) y, en menor medida, la calcitonina y otras cinco hormonas más: hormona del crecimiento (GH), tiroxina, glucocorticoides, esteroides sexuales, leptina e insulina.

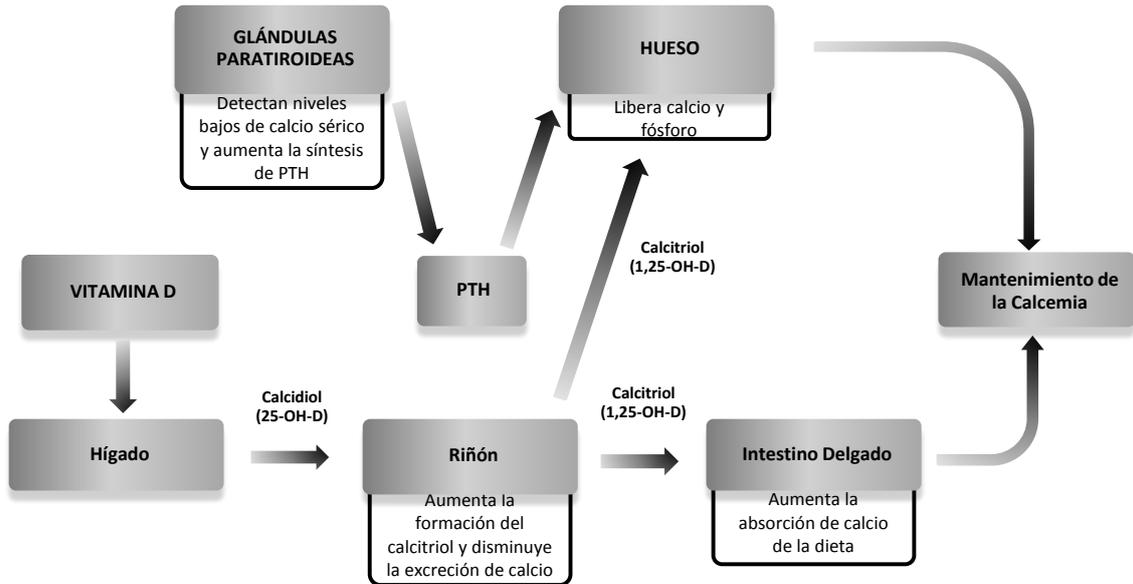


Figura 4: Regulación del metabolismo fosfocálcico por la PTH y la vitamina D (24)

- La **PTH**, producida en las glándulas paratiroides, es el principal regulador de la fisiología del calcio. Realiza su acción a 3 niveles: directamente sobre el hueso, estimulando los osteoclastos y favoreciendo la resorción ósea, una acción ligada a la presencia de vitamina D; en el riñón, incrementando la reabsorción tubular distal de calcio; e indirectamente sobre el intestino, estimulando la síntesis de 1-25 OH colecalciferol que, a su vez, aumenta la absorción de calcio. Induce la secreción del RANKL, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I), interleuquina 6 (IL-6) e interleuquina 11 (IL-11) por los osteoblastos e inhibe la producción de OPG. Administrada de forma continua, la PTH incrementa fundamentalmente el número y la actividad de los osteoclastos, sin embargo, la administración intermitente de esta hormona tiene efectos anabólicos, aumentando el número de osteoblastos(25).
- El calcitriol o **1-alfa-25-dihidroxicolecalciferol** ($1,25-(OH)_2D_3$) es la forma biológicamente activa de la vitamina D (vitamina D_3). En el hueso actúa junto con la PTH estimulando la resorción ósea a través de su acción sobre osteoclastos y sus precursores, posibilitando una mineralización adecuada. Entre sus acciones, también se incluye el aumento de la absorción intestinal de calcio de la dieta (24).
- La **calcitonina**, producida en las células C del tiroides, actúa directamente sobre receptores de los osteoclastos. Posee una actividad inhibitoria de la resorción ósea al reducir el número y actividad de los osteoclastos, por lo que se puede considerar una hormona protectora del tejido óseo (26).

- La **GH** actúa directamente sobre receptores de los osteoblastos, estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, OC y fosfatasa alcalina. También actúa de forma indirecta con el aumento de la síntesis de los factores de crecimiento análogos a la insulina I y II (IGF-I e IGF- II) por los osteoblastos, lo que favorece su proliferación y diferenciación.
- Las **hormonas sexuales** juegan un papel importante sobre el hueso. Las células óseas expresan receptores estrogénicos y androgénicos con independencia de cuál sea el sexo del individuo. Las hormonas sexuales tienden a ejercer un efecto positivo sobre la formación ósea. El efecto más claro de estas hormonas sobre el metabolismo óseo es la inhibición de la resorción pues disminuyen la frecuencia de activación de las unidades de remodelación y favorecen la apoptosis de los osteoclastos. Los estrógenos aumentan los niveles de OPG, proteína inhibidora de la resorción producida por los osteoblastos, por lo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis. Esta actividad explicaría la pérdida de hueso ligada al hipoestrogenismo tras la menopausia. Por su parte, los andrógenos tienen un efecto fundamentalmente anabólico, de forma que facilitan la acción osteoblástica e inhiben la resorción ósea al disminuir la secreción de citoquinas como la IL-6 (27).
- Las **hormonas tiroideas** son esencialmente hipercalcemiantes. En el hueso actúan estimulando a los osteoclastos favoreciendo la resorción y el recambio óseo(24).
- Los **glucocorticoides** inducen la osteoclastogénesis y la resorción ósea por aumento de RANKL en los osteoblastos. Inhiben la replicación de los precursores osteoblásticos por supresión de la señalización Wnt (28).
- La **leptina** inhibe la expresión del RANKL e induce la producción de OPG, por lo que esta hormona liberada desde el tejido adiposo, tiene efecto anabólico favoreciendo la diferenciación osteoblástica, reduciendo su apoptosis e incrementando la síntesis de proteínas de la matriz (29).
- La **insulina** es una hormona con efecto dual en el hueso. Por un lado, estimula la síntesis de proteínas de la matriz y favorece su mineralización; mientras que por otro, se autorregula y regula el metabolismo de la glucosa en parte reduciendo la producción de OPG en los osteoblastos y favoreciendo la resorción ósea. Este proceso libera OC

decarboxilada de la matriz al plasma, que actúa como una hormona induciendo la producción y la secreción de insulina por las células β -pancreáticas (30).

- **Factores locales:** Entre los factores locales de remodelado óseo destacan los factores de crecimiento, las citoquinas y las proteínas de la matriz ósea junto con la producción de las prostaglandinas y óxido nítrico (NO) mediadas por las células del hueso. En la Tabla 3 se esquematizan los principales factores locales y su acción principal sobre la formación o la resorción ósea. Cualquier alteración de estos factores, tendrá como consecuencia la alteración del remodelado óseo (24).

Tabla 3: Principales factores locales reguladores del remodelado óseo (23)

Factor	Estimulan la formación	Estimulan la resorción	Inhiben la resorción
Factores de crecimiento	BMP-2 (Proteína morfogénica ósea 2)	TNF (Factor de necrosis tumoral)	
	BMP-4 (Proteína morfogénica ósea 4)	EGF (Factor de crecimiento epidérmico)	
	BMP-6 (Proteína morfogénica ósea 6)	PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas)	
	BMP-7 (Proteína morfogénica ósea 7)	FGF (Factor de crecimiento fibroblástico)	
	IGF-I (Factor de crecimiento insulínico tipo 1)	M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos)	
	IGF-II (Factor de crecimiento insulínico tipo 2)	GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)	
	TGF-β (Factor transformante de crecimiento β)		
	FGF (Factor de crecimiento fibroblástico)		
	PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas)		
	VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial)		
Citoquinas		IL-1 (Interleuquina 1)	IFN-γ (Interferón γ)
		IL-6 (Interleuquina 6)	IL-4 (Interleuquina 4)
		IL-8 (Interleuquina 8)	
		IL-11 (Interleuquina 11)	
		PGE₂ (Prostaglandina E2)	
		PGE₁ (Prostaglandina E1)	
		PGI₂ (Prostaglandina I2)	
		PGH₂ (Prostaglandina H2)	

1.2.1.4 Sistema RANK/RANKL/OPG

La función del sistema RANK/RANKL/OPG es la interacción entre los miembros de la UMB; induce la diferenciación y activación de osteoclastos u osteoblastos, regulando y equilibrando el ciclo de remodelado óseo entre la formación o resorción para asegurar una adecuada renovación ósea (31).

El **RANK** o receptor activador del factor nuclear kappa β es una proteína transmembrana clasificada como un receptor homotrimérico de tipo I, miembro de la superfamilia del TNF. Es un péptido de 616 aminoácidos, codificado por un gen situado en el cromosoma 18q22.1 que se expresa en la membrana de los osteoclastos maduros y en sus progenitores aislados de médula ósea. También está presente en la superficie de células de la estirpe monocítica-macrófaga, linfocitos B y T, fibroblastos y células dendríticas. Su activación conlleva una reorganización en el citoesqueleto del osteoclasto y cambios fundamentales para su activación, movilidad y establecimiento en la superficie ósea a reabsorber, así como una señal de supervivencia en el osteoclasto maduro (32). El **RANKL** o ligando del receptor activador del factor nuclear kappa β es una proteína homotrimérica, transmembrana expresada por osteoblastos y células mesenquimales. Es un péptido de 317 aminoácidos y al igual que el RANK, pertenece a la superfamilia del TNF.

La **OPG** conocida como factor inhibidor de la diferenciación de osteoclastos, es una proteína homodímera codificada por un gen situado en el cromosoma 8q23-24 y pertenece a la superfamilia del TNF. Se sintetiza como un propéptido de 401 aminoácidos y tras la pérdida de un fragmento de 21 aminoácidos, queda como proteína madura con 380 aminoácidos, momento en el cual pierde sus dominios transmembrana y citoplasmáticos y es secretada como proteína soluble por osteoblastos y células estromales de la médula ósea.

El osteoblasto desempeña un papel fundamental, ya que influenciado por distintos factores pro-resortivos (vitamina D, PTH, proteína relacionada con la PTH (PTHrP), PGE₂, IL-1, IL-6, TNF- α , glucocorticoides, etc.) aumenta la producción de RANKL, que se une con su receptor RANK y desencadena la activación de los precursores de los osteoclastos que tras su diferenciación y maduración, pasan a ser osteoclastos activos capaces de resorber tejido óseo (Figura 5a). Por el contrario, la influencia de factores antiresortivos (estrógenos, calcitonina, BMP, TGF- β , etc.) conducen al osteoblasto a producir OPG, la cual se une al RANKL neutralizando su acción e inhibiendo la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica, a la vez que induce la apoptosis de los osteoclastos (Figura 5b) (33).

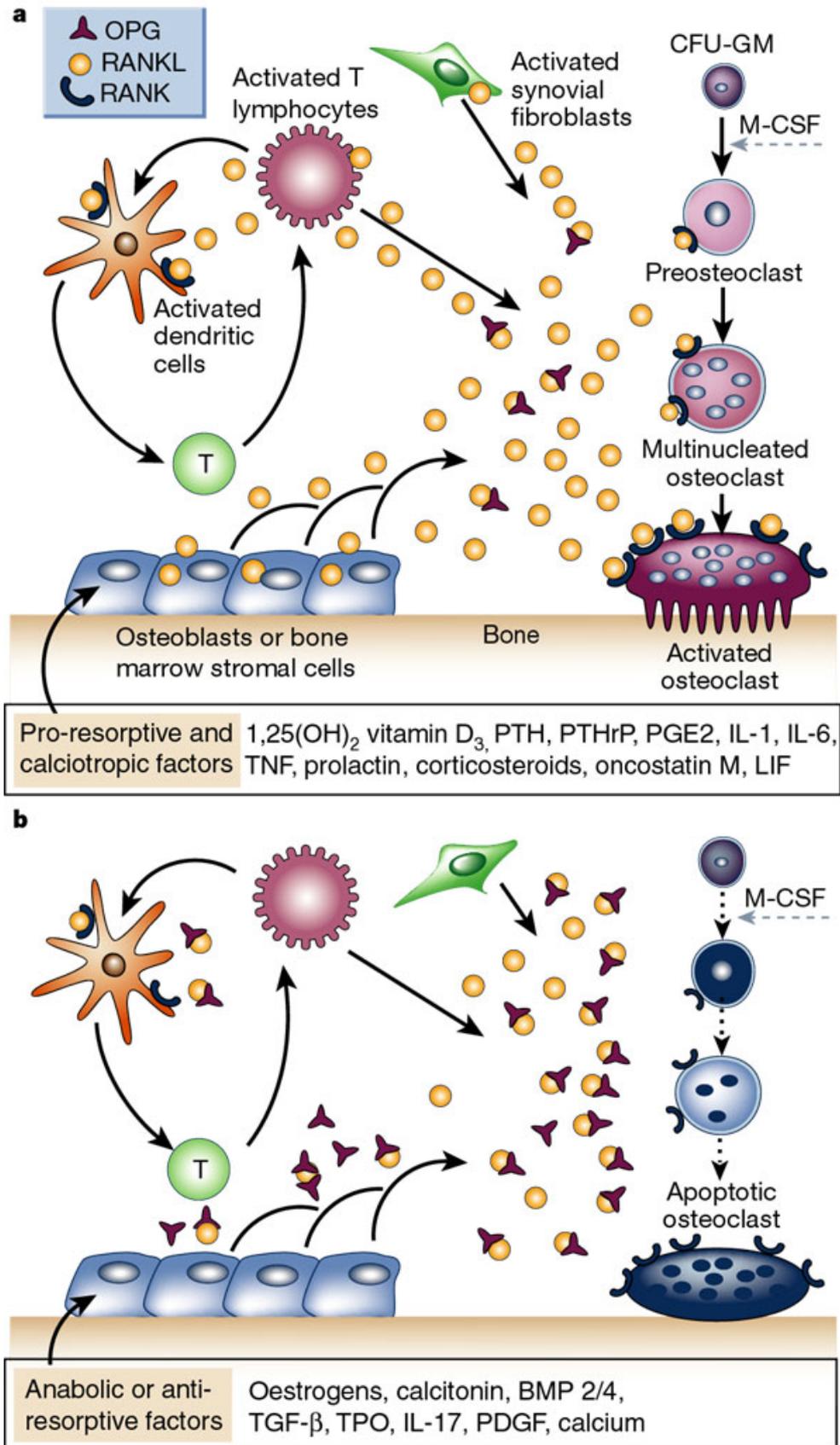


Figura 5: Sistema regulador OPG-RANKL-RANK. Factores pro-resortivos (a), factores anti-resortivos (b) (33).

1.2.1.5 Vía Wnt

La vía Wnt es una vía de señalización celular muy conservada a lo largo de la escala filogenética. No es exclusiva del hueso, sino que interviene también de manera importante en otros procesos, incluyendo la embriogénesis, la organogénesis y la tumorigénesis (33). La activación de esta vía induce diversas señales intracelulares que en conjunto se dividen en dos grandes grupos: la vía canónica o clásica y la vía no canónica.

Se han descrito dos vías de señalización **no canónicas** que además parecen estar implicadas en diversas fases del desarrollo embrionario, la vía dependiente de calcio (Wnt/Ca²⁺) y la de polaridad celular planar, sin embargo su papel real en los mamíferos es todavía discutido.

La **canónica** es la mejor conocida de las vías de transmisión de señales Wnt. El acontecimiento clave en la cascada canónica es la acumulación de la β -catenina en el citoplasma y su posterior translocación al núcleo celular, donde modula la transcripción de diferentes genes. (34). La vía de señalización Wnt/ β -catenina es esencial en la regulación de la osteogénesis.

Los osteoblastos son las dianas celulares principales de la vía Wnt. Esta vía actúa a través de diversos mecanismos:

- Determina que los progenitores mesenquimales se conviertan en osteoblastos inhibiendo su diferenciación a condrocitos.
- Bloquea la adipogénesis, ya que puede inhibir factores de transcripción adipogénica como el receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR- γ).
- Favorece la línea celular osteoblastogénica, estimulando la proliferación del osteoblasto y promueve la mineralización.
- Inhibe la apoptosis del osteoblasto.
- Bloquea la osteoclastogénesis mediante el incremento del ratio OPG/RANKL.

Estos resultados sugieren que la vía canónica Wnt controla los osteoblastos a diferentes niveles: diferenciación, proliferación o apoptosis y función final (33).

1.2.2 Osteoporosis

1.2.2.1 Definición

La osteoporosis se definió en la conferencia de consenso de los National Institutes of Health (NIH) del año 2001 como “aquella enfermedad del esqueleto caracterizada por una resistencia ósea alterada con un aumento del riesgo de fractura” (35).

La osteoporosis es la patología metabólica ósea más frecuente. Es una enfermedad silenciosa caracterizada por una baja masa ósea y alteraciones de la microarquitectura del tejido óseo que conllevan a una disminución de la resistencia del hueso (resultado de la integración de dos variables, la densidad y la calidad del hueso) y un incremento de la fragilidad ósea y de la susceptibilidad a la fractura. La Figura 6 muestra los cambios en el hueso esponjoso como consecuencia de la pérdida ósea. Las placas trabeculares individuales de hueso se pierden, dejando una estructura arquitectónicamente debilitada con una masa significativamente reducida.

Las complicaciones clínicas asociadas a la fractura por fragilidad u osteoporótica incluyen incremento en la morbilidad (dolor, discapacidad física, deterioro en la calidad de vida, etc.), en el riesgo de padecer nuevas fracturas (incluso en un corto período de tiempo) y en la mortalidad. Esta patología es un proceso crónico que se desarrolla con la edad y que está relacionado con diversas enfermedades y tratamientos, e influenciada por factores genéticos y ambientales (36).

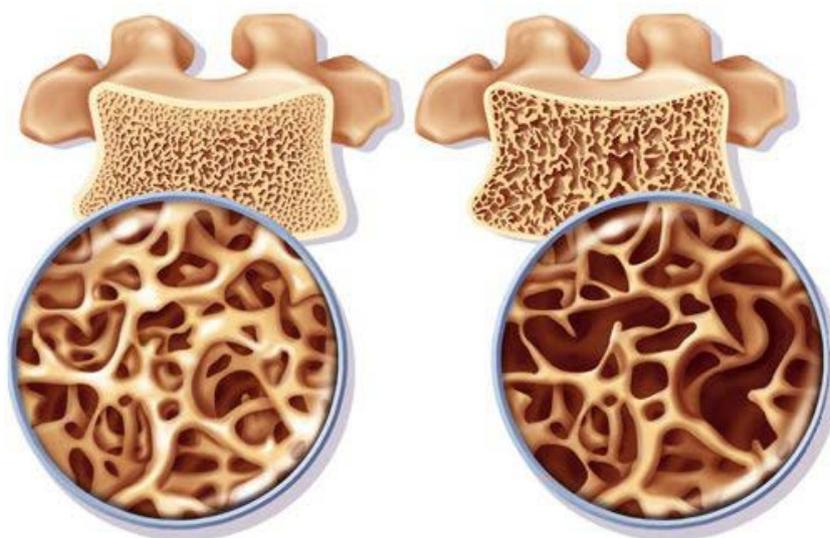


Figura 6: Hueso normal (izquierda), hueso con osteoporosis (derecha).

1.2.2.2 Diagnóstico

En la actualidad, el diagnóstico de osteoporosis se basa en los criterios establecidos por la OMS en 1994, basados en la medición de la densidad mineral ósea (DMO) en columna lumbar, cuello femoral, cadera o tercio distal de radio. Estos criterios establecen como valores de normalidad, una DMO mayor a -1 desviación estándar (DE) con relación a la media de la DMO para jóvenes adultos sanos (T-Score). La osteoporosis se define con valores inferiores a -2,5 DE, mientras que la osteopenia es definida con valores comprendidos entre -1 y -2,5 DE. La osteoporosis grave o establecida se define cuando al criterio de osteoporosis se añade la presencia de fracturas (Tabla 4) (37).

Tabla 4: Diagnóstico de osteoporosis según la OMS basado en la DMO y T-Score

Diagnóstico	T-score
Normal	DMO no mayor a 1 DE por debajo del valor promedio de la población joven sana (T-Score \geq 1,0 DE).
Osteopenia (masa ósea baja)	DMO entre 1 y 2,5 DE por debajo del valor promedio de la población joven sana (T-Score < 1 y $> 2,5$ DE).
Osteoporosis	DMO de 2,5 o más DE por debajo del valor promedio de la población joven sana (T-Score $\leq 2,5$ DE).
Osteoporosis grave	DMO de 2,5 o más DE por debajo del valor promedio de la población joven sana (T-Score $\leq 2,5$ DE), junto con la presencia de una o más fracturas.

Hasta la fecha, esta clasificación densitométrica se considera universalmente aceptada como criterio diagnóstico, pero debe aplicarse sólo a mujeres postmenopáusicas y varones mayores de 50 años. Para la valoración de la DMO en mujeres premenopáusicas, varones menores de 50 años y niños la International Society for Clinical Densitometry (ISCD) recomienda que se utilice la puntuación en la escala Z (Z-Score), que relaciona los valores de DMO del sujeto con los correspondientes a su mismo grupo de edad, sexo y etnia. Se considera un valor normal hasta -2,0 DE y valores inferiores son considerados como “por debajo del rango esperado para su edad” (38).

1.2.2.3 Clasificación

La osteoporosis puede categorizarse según su etiología. La osteoporosis primaria o involutiva es el tipo más frecuente y se establece dicho diagnóstico cuando no se objetiva la causa que provoca la osteoporosis. La osteoporosis secundaria se considera como una consecuencia o bien una manifestación acompañante de otras enfermedades o de su tratamiento.

La **osteoporosis primaria** constituye el grupo más amplio e incluye los casos de osteoporosis en los que no se identifica ninguna enfermedad que la justifique directamente, salvo los procesos fisiológicos como son la menopausia y el envejecimiento.

La osteoporosis idiopática juvenil es un trastorno raro, que se inicia generalmente entre los 8 y los 14 años. Se manifiesta por la aparición brusca de dolor óseo y de fracturas con traumatismos mínimos. El trastorno remite por sí solo en muchos casos y la recuperación ocurre de forma espontánea en un plazo de 4 o 5 años.

La osteoporosis idiopática del adulto joven se observa en varones jóvenes y mujeres premenopáusicas en las que no se objetiva ningún factor etiológico. La evolución es variable y a pesar de que los episodios de fracturas recidivantes son característicos, no se produce un deterioro progresivo en todos los enfermos.

La osteoporosis debida al envejecimiento es consecuencia de la pérdida de hueso por cambios normales relacionados con la edad que se producen en la remodelación ósea, así como por factores intrínsecos y extrínsecos que exageran este proceso. En condiciones normales, el incremento de la producción de hormonas sexuales en la pubertad es imprescindible para que se produzca la maduración máxima del esqueleto, que alcanza su nivel más alto de masa y densidad al principio de la edad adulta, en torno a la segunda o tercera década de la vida.

Otra causa de osteoporosis primaria es la menopausia, debido a los cambios hormonales acontecidos a partir de esta etapa. Los estrógenos, en condiciones normales, constituyen el principal inhibidor endógeno de la resorción ósea y sus efectos sobre las células óseas están mediados por dos clases de receptores expresados en el citoplasma y el núcleo, receptores alfa (presentes en osteoblastos y osteoclastos) y receptores beta (expresados sólo en osteoblastos). Los estrógenos desempeñan su papel a través de diversos mecanismos, reducen el número de osteoclastos in vivo, suprimiendo también a sus precursores; tienen un efecto inhibitorio en las citoquinas proresortivas, IL-1, IL-6 y TNF α . Se ha descrito una acción directa sobre los osteoblastos que incrementan la producción de OPG e inhiben la actividad de RANKL. Estos datos concuerdan con los estudios que muestran que el tratamiento con OPG en ratas ovariectomizadas previene la pérdida de masa ósea (39). Los estrógenos estimulan la producción del TGF- β , que produce la apoptosis de los osteoclastos, y la expresión de catepsina K (proteasa catepsina) que degrada el hueso y permite, tras el bombeo de protones en el área, excavar los túneles en el proceso de remodelación ósea por las UMB. Por lo tanto, el déficit de estrógenos provocado por la interrupción de la función ovárica que se acontece a partir de la

menopausia, produce un desequilibrio en el remodelado óseo, con predominio de la resorción, además de favorecer la apoptosis del osteocito, lo que origina mayor fragilidad ósea (40).

La **osteoporosis secundaria** está causada o exacerbada por otras patologías o tratamientos. Se trata de un proceso prevenible y tratable, pero la falta de signos de alerta previos a la aparición de fracturas, conlleva a que pocos pacientes sean diagnosticados en fases tempranas y tratados de forma efectiva. Así, en algunos estudios se ha comprobado que el 95% de los pacientes que presentan una fractura por fragilidad no presentaba un diagnóstico previo de osteoporosis. Las causas que producen osteoporosis secundaria son numerosas y muy diversas (Tabla 5).

Tabla 5: Causas de osteoporosis secundaria (41)

Origen	Patología
Enfermedades endocrinológicas	Hipogonadismo, amenorrea, hiperprolactinemia, panhipopituitarismo, menopausia precoz, acromegalia, insuficiencia suprarrenal, diabetes mellitus, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, etc.
Enfermedades gastrointestinales	Enfermedad celiaca, gastrectomía, malabsorción, enfermedad hepática, insuficiencia pancreática, enfermedad inflamatoria intestinal, etc.
Trastornos genéticos	Hemocromatosis, osteogénesis imperfecta, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, porfirias, enfermedades de depósito, etc.
Trastornos hematológicos	Mieloma múltiple, leucemia, linfoma, mastocitosis sistémica, anemia perniciosa.
Enfermedades reumáticas	Artritis reumatoide, espondilitis anquilosante.
Transplante de órganos	Transplante de médula, trasplante de riñón, hígado, corazón, pulmón.
Fármacos	Anticoagulantes, ciclosporina, tacrólimus, drogas citotóxicas, glucocorticoides, metotrexate, etc.
Miscelánea	Alcoholismo, amiloidosis, sarcoidosis, esclerosis múltiple, fibrosis quística, insuficiencia cardíaca congestiva, etc.

1.2.2.4 Epidemiología

La osteoporosis es una enfermedad de alta prevalencia pero de difícil estimación por ser asintomática hasta que aparece la fractura, por ello recibe el nombre de “epidemia silente”. Según los datos del estudio NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey III), guía publicada por la National Osteoporosis Foundation (NOF) en 2013, la prevalencia de osteoporosis en América es superior a los 10 millones y la prevalencia de baja densidad ósea de 43,1 millones (42). Aproximadamente, una de cada dos mujeres caucásicas experimentará una fractura relacionada con la osteoporosis en algún momento de su vida, al igual que aproximadamente uno de cada cinco hombres.

En España, en un estudio de Díaz Curriel y cols. (43), se calcula que 2 millones de mujeres y 800.000 varones presentan osteoporosis y se encontró una prevalencia de osteoporosis en mujeres mayores de 50 años del 26,07%. Puesto que la osteoporosis se asocia de manera progresiva a la edad, su frecuencia irá en aumento con el envejecimiento poblacional y, en mujeres mayores de 70 años, la prevalencia llega a ser del 24% en cadera y del 40% en columna lumbar. Los estudios en varones indican que la prevalencia es del 8,1% en mayores de 50 años y asciende con la edad hasta el 11,3% en mayores de 70 años. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 6 (43).

Tabla 6: Prevalencia de osteopenia y osteoporosis en columna lumbar y cuello femoral en la población femenina española por grupos de edad (43).

Edad (Años)	Diagnóstico	L2-L4 (%)	Cuello fémur (%)
20-44 años	Osteopenia	13,80	12,56
	Osteoporosis	0,34	0,17
	Normal	86,57	87,09
45-49 años	Osteopenia	31,90	26,72
	Osteoporosis	4,31	0,00
	Normal	63,79	73,28
50-59 años	Osteopenia	41,99	38,96
	Osteoporosis	9,09	1,30
	Normal	48,92	59,74
60-69 años	Osteopenia	50,00	51,43
	Osteoporosis	24,29	5,17
	Normal	25,71	42,86
70-80 años	Osteopenia	39,39	57,58
	Osteoporosis	40,00	24,24
	Normal	20,61	18,18

Se estima que la población mayor de 50 años en la Unión Europea, aumentará de 21,6 millones en 2010 a 26,2 millones en 2025, lo que corresponderá a un aumento de 21%. Se estima que el número total de fracturas aumentará de 536.000 en 2010 a 682.000 en 2025, correspondiente a un aumento del 27% (44).

La aparición de las fracturas por fragilidad es la consecuencia directa de esta patología. La presencia de fracturas por fragilidad se asocia a un mayor riesgo de presentar nuevas fracturas osteoporóticas, así como a un aumento de la mortalidad y una disminución de la calidad de vida en varones y mujeres.

Las **fracturas de cadera** se consideran las fracturas osteoporóticas más importantes por su alta morbimortalidad, presentan un 10-20% de incremento de mortalidad a lo esperado para su edad, además de generar mayor dependencia y gasto sanitario. En España se estima, en personas

mayores de 60-65 años, una incidencia de 5,1-6,9 fracturas de cadera por fragilidad por 1.000 habitantes/año, de las que tres cuartas partes se presentan en mujeres (45)(46). Un tercio de estas ya habían presentado una fractura previa por fragilidad, incluso el 21% en la otra cadera (45), lo que supone una oportunidad de intervención preventiva. Esta tasa de incidencia es similar a otras declaradas en Europa, aunque inferior a los valores de los países escandinavos y Estados Unidos (44).

La estancia media hospitalaria para estas fracturas es de 16 días y la mortalidad de los pacientes con fractura de cadera alcanza el 5% durante el ingreso y en torno al 20% durante el primer año. Sólo en costes directos, una fractura de cadera osteoporótica por persona en Europa supone entre 8.300 y 9.900 euros, según cada país. Los costes anuales de las fracturas por osteoporosis en España ascienden a 2.900 millones de euros (47).

La prevalencia de **fractura vertebral** es difícil de establecer debido a que no existe un consenso sobre la definición radiológica de las deformidades y a que su presentación habitualmente es asintomática. Las fracturas vertebrales rara vez se presentan en menores de 50 años y aumentan exponencialmente con la edad. En estudios en población europea como el European Prospective Osteoporotic Study (EPOS) y European Vertebral Osteoporotic Study (EVOS), la prevalencia estandarizada por edad de fractura vertebral en Europa es del 12,2% para varones y del 12,0% para mujeres entre los 50 y 79 años de edad (48).

La **fractura de antebrazo** es más frecuente en mujeres, con una relación mujer-varón de 4 a 1. En las mujeres estas fracturas son más frecuentes en la perimenopausia y su incidencia aumenta rápidamente tras la menopausia para estabilizarse a los 65 años. En varones la incidencia permanece prácticamente constante con la edad. Este tipo de fractura solo requiere hospitalización en menos del 20% de los casos, pero incrementan un 50% el riesgo de fractura de cadera (49).

Un reciente estudio con participación de los 27 países de la Unión Europea estima que existen 22 millones de mujeres y 5 millones de varones con osteoporosis, lo que ocasiona 3.500.000 nuevas fracturas anuales (610.000 de las cuales son de cadera; 520.000, vertebrales, y 560.000, de muñeca) (44).

1.2.2.5 Factores de riesgo

Hasta el momento no se dispone de un protocolo de cribado aceptado de forma universal para identificar a la población con mayor susceptibilidad de sufrir osteoporosis y/o fractura por fragilidad, pero se han descrito diferentes factores de riesgo, los cuales se pueden clasificar en dos categorías, no modificables y modificables.

Los **factores de riesgo no modificables** son aquellos constitucionales al individuo y son: la edad (mujeres de ≥ 65 años y varones de ≥ 70 años) siendo uno de los factores de riesgo más importantes. La probabilidad de sufrir una fractura aumenta de manera exponencial a partir de los 50 años y es muy rara antes de esta edad. La historia personal de fractura previa por traumatismo de bajo impacto. La presencia de una fractura vertebral o de cadera previa duplica el riesgo de una nueva fractura de cadera. Los antecedentes familiares de fractura por fragilidad en la madre o el padre constituyen un factor de riesgo independiente de fractura, hasta tal punto que para cualquier DMO el riesgo se multiplica por dos. El sexo femenino, las mujeres sufren una mayor pérdida de masa ósea a partir de la menopausia y tienen una mayor expectativa de vida, hechos que facilitan el desarrollo de mayor fragilidad ósea. Los factores ginecológicos (hipogonadismo femenino). El déficit estrogénico por menopausia precoz (menores de 45 años); menopausia inducida por quimioterapia, radioterapia o cirugía (ooforectomía); amenorrea prolongada (períodos superiores a 1 año); menarquia tardía (mayores de 15 años) o vida fértil inferior a 30 años. La raza. Las mujeres de raza blanca tienen un riesgo de sufrir fractura por fragilidad incrementado en 2,5 con respecto a otras razas. También las mujeres asiáticas padecen un riesgo de fractura incrementado.

En cuanto a los **factores de riesgo modificables**, se encuentran: el IMC bajo (<20 kg/m²) confiere un riesgo sustancial para cualquier fractura por fragilidad, independientemente de la edad y el sexo. El tratamiento con glucocorticoides. Estos son el principal grupo farmacológico relacionado con el descenso de la DMO y la producción de fracturas por fragilidad y constituyen la causa más común de osteoporosis secundaria. Los glucocorticoides inhiben la absorción de calcio, reducen el número y la actividad de los osteoblastos e incrementan la resorción ósea. El consumo de tabaco se correlaciona con una menor DMO, de manera dosis dependiente. El nivel de riesgo disminuye al cesar el hábito y se normaliza en un plazo de 10 años. El consumo de alcohol (≥ 3 unidades/día o ≥ 21 unidades/semana, considerando 1 unidad = 8-10 g de alcohol). Los mecanismos por los que el consumo de alcohol se relacionan con un aumento de fracturas son complejos e incluyen efectos directos sobre las células óseas e indirectos sobre el sistema endocrino, el páncreas y diferentes citoquinas. El ejercicio físico

(inactividad física). La inmovilización completa prolongada produce una pérdida rápida de masa ósea. Los factores nutricionales y dietéticos. El calcio y la vitamina D actúan sobre el pico de masa ósea y sobre la pérdida de masa ósea relacionada con la edad. Además, un nivel bajo de vitamina D se ha asociado a menor fuerza muscular y aumento de las caídas.

Entre todos estos factores, los de mayor evidencia son los antecedentes familiares de fractura de cadera, tener más de 65 años, tener un IMC $<20 \text{ kg/m}^2$, el tratamiento con glucocorticoides, el fallo ovárico prematuro sin tratar, caídas en el último año y trastorno de la conducta alimentaria y malnutrición. El conocimiento de estas variables asociadas a mayor riesgo de padecer osteoporosis y en consecuencia fracturas por fragilidad, sirve para instaurar políticas generales de salud pública, pautas individuales de prevención y para desarrollar métodos de cribado (50)(51)(52).

1.2.2.6 Genética de la osteoporosis

Uno de los factores más importantes implicados en el desarrollo de osteoporosis es la presencia de antecedentes familiares con osteoporosis y fracturas, por lo que debemos destacar la importancia de la genética en la patogénesis de esta enfermedad (53).

La osteoporosis es una enfermedad genéticamente compleja por su carácter multifactorial, con influencia de múltiples genes que regulan factores endógenos (regulación hormonal) sobre los que se añaden factores ambientales.

El estudio genético de la osteoporosis se inició hace más de treinta años, cuando Smith y cols. demostraron que con respecto a la DMO, medida entonces en el antebrazo, existía menos variación en gemelos monocigóticos que en los dicigóticos (54). Varios estudios similares realizados en gemelos y familias, sugieren que entre un 50 y un 85% de la variación en el pico de la masa ósea está genéticamente determinada, mientras que el % restante está modulado por factores ambientales (53).

La investigación genética de la osteoporosis está encaminada hacia la búsqueda de pequeñas variaciones en determinados genes implicados en el metabolismo óseo que permitan no sólo determinar la susceptibilidad genética de los pacientes, sino también desarrollar fármacos específicos o adecuar los ya existentes desarrollando lo que ya se conoce como una nueva rama emergente de la medicina, la “medicina personalizada”.

La mayor parte de los estudios que intentan buscar una correlación entre genética y osteoporosis son referidos a mujeres posmenopáusicas, sin embargo, son muy pocos los estudios existentes que determinen la predisposición genética a una pérdida de masa ósea en nuestra población de estudio, pacientes diabéticos tipo 1 y 2.

En los últimos años, los estudios de asociación del genoma completo (*Whole genome association study*, *GWAS*) han identificado polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con la osteoporosis, la DMO y otros factores determinantes del riesgo de fractura. Las asociación entre algunos de los polimorfismos de genes candidatos y la osteoporosis incluye genes que codifican hormonas calciotropas y sus receptores, proteínas de la matriz ósea y reguladores locales del metabolismo óseo entre otros (Tabla 7).

Tabla 7: Genes implicados en la osteoporosis (21)

Clasificación biológica	Genes
Hormonas relacionadas con el calcio y receptores celulares	VDR, receptor estrogénico, aromatasa, PTH, PTHR1 (receptor tipo 1 de la PTH), receptor de la calcitonina, receptor esteroideo, receptor-sensor del calcio, RANK
Citoquinas, factores de crecimiento y receptores	TGFβ1, IGF1, IL-6, IL-1α, IL-1RA, TNFR2, BMP-4
Matriz ósea	COL1A1, OC, colagenasa, glicoproteína αHS2, OPG
Otros	ApoE, MTHFR, P57 Kip, HLA, PPARγ

- Gen del receptor de la vitamina D (VDR):** La vitamina D juega un papel clave en la regulación del metabolismo óseo y actúa a través de su unión a un receptor nuclear que está codificado por el gen VDR. El gen del VDR se localiza en el cromosoma 12 (12q13.11), tiene 9 exones y 4 regiones polimórficas. En este gen se han identificado varios polimorfismos que participan en la modificación de procesos celulares en el metabolismo óseo y que son detectados por enzimas de restricción. En la región 3' del intrón 9 se han localizado dos sitios polimórficos, BsmI (rs1544410) y ApaI (rs7975232), en el último exón se ha hallado el sitio polimórfico TaqI (rs731236), y en el exón 2 se encuentra el sitio polimórfico FokI (rs2228570) (Figura 7) (55).

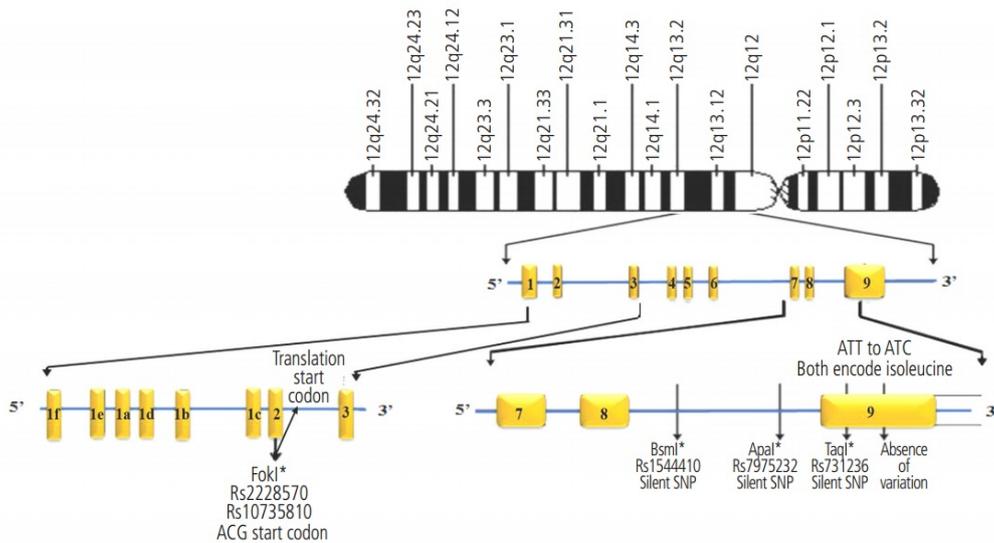


Figura 7: Sitios polimórficos del gen VDR. Los rectángulos amarillos son los exones y los espacios entre ellos los intrones (55).

El polimorfismo **BsmI (rs1544410)** se encuentra en la zona no codificante del extremo 3', en el exón 8, tiene el cambio de una adenina (A) por una guanina (G), donde los genotipos encontrados serán homocigotos AA, GG, y el heterocigoto AG. La primera asociación de la DMO y el gen VDR fue descrita en 1994, por Morrison y cols. (56). En ese estudio realizado en una población de origen anglosajón, el genotipo homocigoto AA del polimorfismo BsmI, fue significativamente mayor en personas con elevados niveles plasmáticos de OC y se asoció la presencia del genotipo AA con una menor DMO en mujeres postmenopáusicas. También demostraron que el genotipo AA predispone a una baja absorción de calcio en el intestino.

El polimorfismo **ApaI (rs7975232)**, al igual que BsmI, está ubicado en el intrón 8 del gen VDR. Se produce un cambio de una adenina (A) por una citosina (C) y los genotipos serán homocigotos AA, CC y heterocigoto AC. Los resultados encontrados en el polimorfismo ApaI son contradictorios. Algunos trabajos encuentran asociación entre el alelo A y el aumento de riesgo de fracturas y del genotipo CC asociado a una mayor DMO (57) mientras que otros no señalan ninguna evidencia de asociación (58).

El polimorfismo **TaqI (rs731236)**, ubicado en el exón 9 del gen VDR, tiene un cambio de una citosina (C) por una timina (T), y los genotipos serán homocigotos CC, TT y el heterocigoto CT. El polimorfismo TaqI, genera un cambio en la secuencia de codificación, pero no produce cambio de aminoácido de la proteína codificada. Varios han sido los estudios que han estudiado el polimorfismo TaqI del gen VDR. Algunos trabajos

encuentran asociación entre el alelo C y el aumento de riesgo de fracturas y del genotipo TT asociado a una mayor DMO (57).

El polimorfismo **FokI (rs2228570)**, localizado en la región codificante del VDR que modifica la secuencia de sitio de inicio de transcripción del exón 2, consistente en un cambio de base de una citosina (C) por una timina (T) que introduce una diana de restricción para la enzima FokI. Así cuando la variante C está presente se pierde el codón de inicio de transcripción, dando lugar a una proteína más corta, utilizándose un lugar de inicio alternativo de la transcripción localizado en el codón 4 (59). El estudio de Lisker y cols. (60) observaron que los sujetos con el genotipo TT tenían una menor DMO en columna lumbar y un incremento de pérdida de masa ósea en cadera.

- **Gen del receptor de estrógenos (ER):** El receptor de estrógenos es un miembro de la familia de los receptores nucleares, que es activado por la hormona 17β -estradiol cuya principal función es la de actuar como factor de transcripción que se une al ADN con el fin de regular la expresión génica. Existen dos formas diferentes del receptor de estrógenos, las formas α y β , ambas codificadas por genes diferentes e independientes (ESR1 y ESR2 respectivamente) situados en el cromosoma 6 (6q25.1) y en el cromosoma 14 (14q), respectivamente (61). Las dos isoformas del ER se expresan en osteoblastos y osteoclastos y en el hueso adulto, siendo el ER α predominante en el hueso cortical. ER α parece tener un efecto más importante en la regulación del remodelado óseo y en el mantenimiento de la masa ósea que ER β .

La deficiencia estrogénica tras la menopausia es un factor de riesgo fundamental para la osteoporosis, por lo que el receptor estrogénico alfa codificado por el gen ESR1 también ha sido estudiado como causa de osteoporosis de origen genético. Este gen está compuesto por 8 exones y 7 intrones. La mayoría de las variantes polimórficas descritas se localizan en el intrón 1, siendo los más estudiados los polimorfismos de restricción PvuII y XbaI (Figura 8) (62).

El polimorfismo **PvuII (rs2234693)** se produce por un cambio de una timina (T) por una citosina (C) y los genotipos serán homocigotos TT, TC y heterocigoto CC. El alelo C se asocia con un mayor beneficio de la terapia hormonal, mientras que individuos con genotipo TT presentan una mayor resistencia al tratamiento hormonal con estrógenos (63).

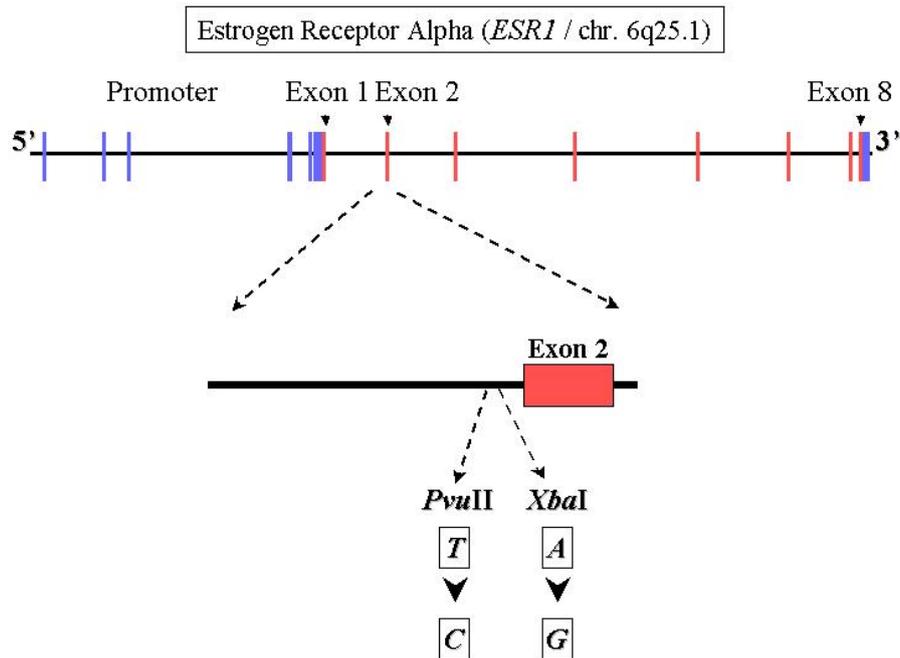


Figura 8: Localización de los polimorfismos PvuII y XbaI en el intrón 1 del gen ESR1.(64)

El polimorfismo **XbaI (rs9340799)** se produce por un cambio de una adenina (A) por una guanina (G) y los genotipos serán homocigotos AA, AG y heterocigoto GG. El proyecto GENOMOS mostró que los individuos homocigotos para el genotipo GG está asociado a un menor riesgo de padecer fracturas (64), encontrándose también dicha relación en el estudio de Khosla y col. (65). Ioannidis y cols. (66) demostró en 2004, que individuos con genotipo AA presentaban una mayor predisposición a una reducción de la masa ósea.

- **Gen de la osteoprotegerina (OPG):** La OPG es una glicoproteína de 401 aminoácidos dispuestos en 7 dominios estructurales. Se encuentra como un monómero de 60 kDa o bien como un dímero de 120 kDa unidos por enlaces disulfuro (67). La OPG es un receptor de citoquinas, miembro de la superfamilia de los TNF, cuya función principal es inhibir la osteoclastogénesis. Ya que la OPG tiene un papel importante en la remodelación ósea, se ha propuesto que el gen OPG podría ser un gen candidato para la predisposición a la osteoporosis. La OPG está codificada por un gen situado en el cromosoma 8q23-24. La región promotora del gen de la OPG está influenciada por factores calciotrópicos que regulan la expresión génica de OPG. Polimorfismos en esta región o regiones cercanas pueden contribuir a la regulación genética de la masa ósea. Han sido varios los SNPs en el gen OPG que se han asociado con DMO o fracturas, entre ellos: T950C, T149C, T245G, C889T, G1181C, A163G, G209A, A6890C, y C1217T (Figura 9) (68).

El polimorfismo **1181 G/C (rs2073618)** se produce por un cambio de una guanina (G) por una citosina (C). Diferentes autores en el estudio del SNP 1181 G/C encuentran niveles de densidad mineral ósea significativamente inferiores en relación con el alelo G o lo que es lo mismo: parece que la presencia del alelo C actúa como un factor protector de la DMO (69).

El polimorfismo **163 A/G (rs3102735)** se produce por un cambio de una adenina (A) por una guanina (G). Varios autores han demostrado la relación entre el alelo menor de este polimorfismo (G) y menor DMO o mayor frecuencia de fracturas (69).

El polimorfismo **245 T/G (rs3134070)** se produce por un cambio de una timina (T) por una guanina (G). Diversos estudios han demostrado que los sujetos con genotipo homocigoto menor (GG) para este SNP, tienen menores valores de DMO (70) y mayor frecuencia de fracturas vertebrales (71).

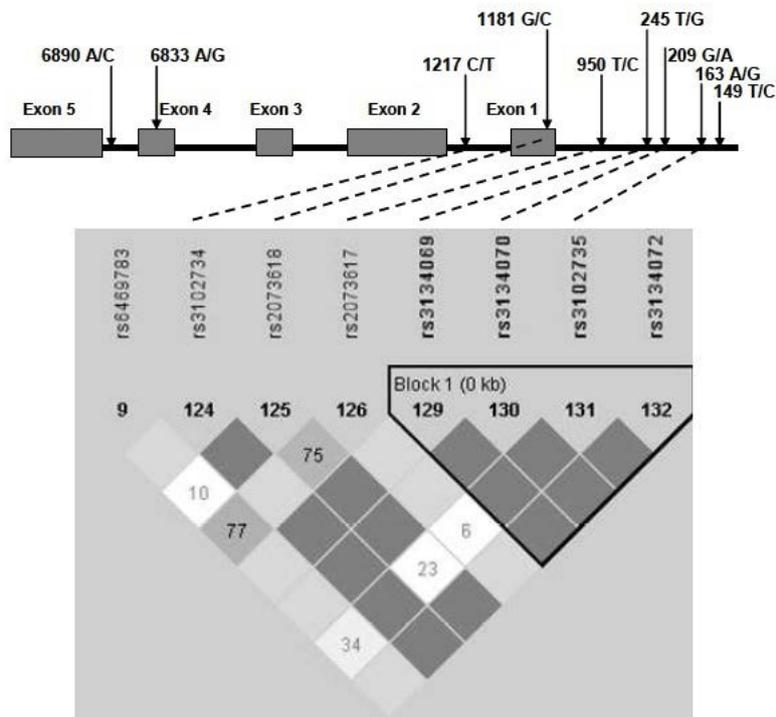


Figura 9: Polimorfismos en la región proximal del gen OPG. Los SNP 245 T/G (rs3134070) y 163 A/G (rs3102735) parecen estar en el mismo bloque haplotípico (promotor) pero en uno diferente del que contiene al SNP 1181 G/C (exón 1) (70).

- **Gen del RANKL:** El RANKL es una proteína de membrana de la célula pre-osteoblástica o secretada por osteocitos que se une al receptor RANK del osteoclasto precursor, promoviendo así la diferenciación y activación de éste a osteoclasto maduro. El gen del RANKL está situado en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14) localizado en una región

no codificada del extremo 5' y está altamente conservado, formado por 5 exones que abarcan 33,9 Kb en humanos. En cuanto al gen RANKL y el hueso, algunos estudios han analizado la asociación de SNPs en este gen (rs9594782 y rs2277438) con la DMO (61).

El polimorfismo **RANKL A/G (rs3134070)** se produce por un cambio de una adenina (A) por una guanina (G). Se ha demostrado que el haplotipo GG se relacionaba con un mayor índice de resistencia a la compresión en cuello femoral calculado a partir de la DMO medida por absorciometría dual de rayos X (DEXA) (72). Sin embargo otros estudios no han encontrado relación entre este SNP y la DMO en columna lumbar o cadera (70).

- **Gen de la IL-6:** El gen de la IL-6 se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 7 (7p21), y codifica a una glicoproteína de 212 aminoácidos, el cual se desdobra en el extremo N-terminal para producir un péptido de 184 aminoácidos con un peso molecular entre 22 y 27 kDa. En su relación con el metabolismo óseo, la IL-6 estimula el desarrollo de los osteoclastos y de este modo, el proceso de resorción ósea, por lo que se es un factor patogénico en la pérdida de masa ósea (73). Para el gen de IL-6, se han descrito diferentes polimorfismos en su región promotora que afectan la transcripción del gen y con ello los niveles circulantes de esta citoquina, como son el -572G>C, el -373A>T, el -597G>A y el -174G>C siendo este último el de mayor prevalencia e importancia biológica (74).

El polimorfismo **174 G/C (rs1800795)** se produce por un cambio de una guanina (G) por una citosina (C). Diferentes estudios han evaluado la asociación entre este SNP y la osteoporosis encontrándose que los individuos con el genotipo GG tenían un valor de DMO significativamente menor que aquellos con genotipo CC en el cuello femoral y radio distal. Además, se encontró que el genotipo CC se asoció con un riesgo reducido de osteoporosis en comparación con el genotipo GG (75).

Asimismo, el polimorfismo 174 G/C de la IL-6 se ha relacionado con una prevalencia elevada de algunas enfermedades, entre las que se encuentran algunas de origen inmunológico, como la artritis crónica juvenil y el linfoma de Hodgkin, y enfermedades degenerativas como el Alzheimer y la osteoporosis (76). Además, las variantes de este polimorfismo se han asociado con la obesidad y con sus comorbilidades, tanto las de origen metabólico, como la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus (77).

El polimorfismo 174 G/C de la IL-6 se ha asociado, en repetidas ocasiones, con índices de obesidad y con sus comorbilidades, siendo el alelo C el que parece estar más relacionado

con la adiposidad (Tabla 8). Así se ha observado, una mayor distribución del alelo G en sujetos delgados (índice de masa corporal $<25\text{kg/m}^2$), presentando además un menor perímetro de la cintura, describiendo además este genotipo GG con una mayor susceptibilidad a la DM1 (78). En cuanto al alelo C, se ha asociado con valores elevados de índice de masa corporal, con niveles elevados de leptina y con índices elevados de masa grasa corporal (79).

Tabla 8: Principales efectos metabólicos atribuidos a los alelos del polimorfismo 174G/C del gen de la IL-6 (80).

EFECTO/FUNCIONES	REFERENCIA
ALELO C	
Mayor sensibilidad a insulina. Menor concentración de glucosa tras sobrecarga. Menor hemoglobina glicosilada y menores niveles de insulina basal.	Fernández-Real y col 2000 (81)
Más frecuente en controles normoglucémicos.	Jahromi y col 2000 (82)
Mayor presión arterial sistólica. Mayor riesgo de enfermedad coronaria.	Ferrari y col 2001(83)
Menor sensibilidad a insulina y niveles basales elevados de la misma.	Berthier y col 2003 (78)
Menor gasto energético y sensibilidad a insulina.	Kubaszek y col 2003 (84)
Mayor riesgo de diabetes mellitus tras interactuar con el genotipo AA del TNF- α .	Kubaszek y col 2003 (84)
Mayores niveles basales de glucosa.	Mckenzie y col 2004 (85)
Mayor IMC y mayor masa grasa corporal. Asociado a sobrepeso, contribuye al desarrollo de obesidad.	Wersterdt y col 2004 (86)
Mayor IMC. Mayor riesgo de desarrollar DM2.	Möhlig y col 2004 (87)
Mayor predisposición a desarrollar DM1 en mujeres adolescentes.	Gillespie y col 2005 (88)
ALELO G	
Más prevalente en sujetos con DM1.	Jahromi y col 2000 (82)
Correlación positiva con triacilglicéridos y ácidos grasos libres. Correlación negativa con cHDL.	Fernández-Real y col 2000 (81)
Más frecuente en diabéticos.	Vozarova y col 2003 (77)
Más prevalente en sujetos delgados, asociado con bajos niveles de glucosa e insulina y con una circunferencia de cintura menor.	Berthier y col 2003 (78)
Menor circunferencia muscular del brazo (niños). Mayores pliegues suprailíacos (niñas).	Gillespie y col 2005 (88)
Mayor riesgo de resistencia a insulina. Asociado con dislipemia.	Hamid y col 2005 (89)
Asociado con DM2 (en delgados y en hombres). Sin diferencias en la respuesta a sobrecarga oral a glucosa.	Illig y col 2005 (90)

La asociación entre el polimorfismo 174 G/C de la IL-6 y la sensibilidad a la insulina puede deberse a que el promotor de la IL-6 está situado muy próximo al promotor de esta hormona. El genotipo CC se ha relacionado con niveles elevados de insulina basal y con una mayor respuesta a esta hormona tras sobrecarga, con una menor sensibilidad a la misma y con un riesgo más elevado de desarrollar DM no insulino dependiente (79).

La participación de la insulina en la utilización de los lípidos ha llevado a investigar la implicación del polimorfismo de la IL-6 en estas rutas metabólicas. Así, se ha observado que los individuos portadores del alelo G presentan niveles circulantes elevados tanto de triglicéridos totales como de la fracción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de ácidos grasos libres, siendo la fracción de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cHDL) más baja que en los portadores del alelo C (87).

1.2.3 Herramientas diagnósticas de la situación estructural y metabólica del hueso. Evaluación del paciente con osteoporosis

1.2.3.1 Evaluación clínica

Debido a que la osteoporosis es una enfermedad asintomática hasta que aparece la fractura, la sospecha clínica inicial siempre vendrá dada tanto por la anamnesis, como en menor grado por los datos correspondientes a la exploración.

La entrevista clínica constituye el eje central del diagnóstico de osteoporosis, recogiendo no sólo aquellos factores de riesgo esqueléticos, sino aquellos que influyen o pueden influir en la frecuencia y en el número de caídas. La NOF recomienda examinar cuidadosamente los antecedentes familiares y personales de endocrinopatías y fracturas previas, historia hormonal y reproductiva (edad de menarquía y menopausia, número de embarazos, lactancia, etc.), encuesta dietética que incluya el consumo de calcio y vitamina D, estilo de vida en el que se especifiquen hábitos tóxicos (consumo de café, alcohol, tabaco), así como la exploración física exhaustiva (deformidades, frecuencia cardíaca, tensión arterial, etc.), con el fin de determinar la necesidad de realizar un estudio densitométrico.

1.2.3.2 Escalas clínicas de riesgo de fractura

Debido a la elevada morbi-mortalidad y al enorme impacto de esta patología, en el ámbito económico, se han desarrollado escalas capaces de discriminar los pacientes candidatos de realizar pruebas de determinación de masa ósea e incluso decidir el inicio del tratamiento farmacológico.

Existen diferentes escalas para la predicción de la presencia de fracturas vertebrales no diagnosticadas así como para el cálculo del riesgo futuro de fractura. La mayoría de ellas se han desarrollado a partir de los datos de grandes ensayos clínicos o de cohortes clásicas.

El análisis de los datos de los pacientes incluidos en el estudio FIT (Fracture Intervention Trial) ha permitido generar un modelo de predicción de la existencia de fracturas vertebrales no diagnosticadas. Incluye los antecedentes de fractura vertebral (+6 puntos), fractura no vertebral (+1 punto), edad (+1 para 60-69, +2 para 70-79; +3 para > 80 años), pérdida de altura (+1 para 2-4 y +2 para > 4 cm) y haber sido diagnosticado de osteoporosis (+1 punto) que, combinados y tomando un punto de corte de 4 puntos, identifica al 60%-65% de las mujeres con fractura vertebral (sensibilidad) con una especificidad del 68%-70%.

De forma similar, el reanálisis de los datos del estudio SOF ha generado modelos de predicción de fractura osteoporótica tanto para pacientes con DMO conocida como para los que no dispongan de medida de masa ósea. A través de este estudio, se desarrolla el índice **FRACTURE**, que incorpora como variables predictivas la DMO expresada en T-score (+1 punto entre -1 y -2; +2 entre -2 y -2,5; +3 si <-2,5), la existencia de fracturas a partir de los 50 años (+1 punto), el peso inferior o igual a 57 kg (+1 punto), el tabaquismo (+1 punto) y la necesidad de emplear los brazos para levantarse de una silla (+2 puntos), además de la edad (+1 punto para 65-69, +2 para 70-74; +3 para 75-79; +4 para 80-84, +5 para \geq 85 años); siendo el punto de corte superior o igual a 6 puntos. Puede aplicarse en caso de no conocer la DMO (punto de corte \geq 4 puntos). Este índice ha sido también validado en la población del estudio EPIDOS, donde también ha sido capaz de identificar a la población de mayor riesgo de fracturas de cadera, vertebral y no vertebrales (91).

Sin embargo, la más conocida y el máximo exponente de escala de riesgo en el momento actual es la herramienta **FRAX®** (Fracture Risk Assessment Tool). Fue desarrollado por el centro colaborador de la OMS para calcular la probabilidad a 10 años de una fractura de cadera y de una fractura osteoporótica mayor (vertebral, cadera, antebrazo o fractura del húmero proximal),

Tiene en cuenta doce factores de riesgo: edad, sexo, IMC, fractura previa, padres con fractura de cadera, fumador actual, glucocorticoides, artritis reumatoide, osteoporosis secundaria (DM1, osteogénesis imperfecta, hipertiroidismo crónico no tratado, hipogonadismo o menopausia prematura, malnutrición crónica y enfermedad hepática crónica), más de 3 unidades de alcohol diarias (una unidad representa 8-10g de alcohol) y DMO del cuello del fémur (opcional, es decir, se puede calcular el riesgo con esta información o sin ella).

Los algoritmos del modelo son confidenciales aunque existe una aplicación en internet en la que el cuestionario FRAX® está disponible: www.nof.org, así como en www.shef.ac.uk/FRAX (Figura 10). Fue validado inicialmente en varones y mujeres de entre 40 y 90 años sin tratamiento para osteoporosis, aunque la última guía de la NOF recomienda limitar su uso para mujeres postmenopáusicas y varones mayores de 50 años.

país: **España** Nombre/ID: [Sobre los Factores de riesgo](#)

Cuestionario:

- Edad (entre 40-90 años) o fecha de nacimiento
Edad: Fecha de Nacimiento: A: M: D:
- Sexo Hombre Mujer
- Peso (kg)
- Estatura (cm)
- Fractura previa No Sí
- Padres con Fractura de Cadera No Sí
- Fumador Activo No Sí
- Glucocorticoides No Sí
- Artritis Reumatoide No Sí
- Osteoporosis secundaria No Sí
- Alcohol, 3 o más dosis por día No Sí
- DMO de Cuello Femoral
Seleccione BMD

Figura 10: FRAX®. Herramienta de Evaluación de Riesgo de Fractura

En nuestro país se han desarrollado varios estudios con el fin de establecer los umbrales de riesgo en nuestra comunidad, a partir de los cuales solicitar densitometría y/o recomendar tratamiento farmacológico. Los resultados publicados hasta ahora muestran que la aplicación del FRAX® en nuestra población conlleva la reducción de casos a tratar en una cohorte de pacientes con fracturas por fragilidad y tiene una adecuada validez diagnóstica para la presencia de osteoporosis en cadera (92).

Un estudio reciente evaluó específicamente la utilidad de la escala FRAX® en una amplia cohorte de pacientes diabéticos. En el mismo, tanto la DMO de cuello femoral como la puntuación del algoritmo FRAX® se asociaron con el riesgo de fracturas osteoporóticas. Sin embargo comparados con los pacientes no diabéticos, el riesgo de fractura fue mayor para un mismo valor de T-score y una misma puntuación del FRAX®. Se observó que los valores de T-score en diabéticos para los que se igualaría el riesgo de fractura de cadera respecto a los pacientes no diabéticos con T-score de -2,5, fueron -1,9 para mujeres y -2,1 para varones. Asimismo la herramienta FRAX® infraestimó las fracturas observadas durante el seguimiento tanto en mujeres como en varones diabéticos (93).

La NOF recomienda iniciar el tratamiento farmacológico en mujeres posmenopáusicas y hombres mayores de 50 años con osteopenia (T-score entre -1.0 y -2.5) en el cuello femoral, cadera o columna lumbar mediante DEXA y en aquellos en los que la probabilidad de fractura a 10 años sea mayor del 3% en cadera y mayor al 20% en otras localizaciones (94).

Posteriormente se ha publicado otro algoritmo de riesgo de fractura, el **QFractureScore**, desarrollado a raíz de una amplia y representativa cohorte británica para la estimación del riesgo individual de fractura de cadera u osteoporótica a 10 años. Se identificaron una serie de variables, en su mayoría clínicas, altamente predictivas e independientemente asociadas al riesgo de fractura (95). Comparado con el FRAX®, los estadísticos de contraste resultaron similares o mejores con este nuevo algoritmo. Esta herramienta hace una valoración más detallada de la ingesta de tabaco y alcohol, cuyos efectos óseos son dosis dependientes, e incluye más factores de riesgo clínicos por lo que puede dar una valoración más individualizada del riesgo de fractura. Destaca entre ellos la recogida de caídas, terapia hormonal sustitutiva, otros tratamientos médicos concomitantes y antecedentes médicos entre los que se incluye la DM2 y la historia de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, esta escala está aún pendiente de ser validada para otras poblaciones fuera del Reino Unido, no hay datos que avalen la aplicabilidad de estos hallazgos a España.

QFractureScore ha tenido una menor difusión por la ausencia de validación fuera de Reino Unido y hay sólo un estudio realizado en población diabética. En este estudio, Rozas y cols. (96) examinaron la utilidad de estas dos herramientas en pacientes con DM2. Pese a la alta prevalencia de fracturas en la muestra de estudio, ambas escalas clasificaron a un bajo porcentaje como candidatos a tratamiento para la osteoporosis.

1.2.3.3 Densitometría ósea

El método más frecuente y preciso es la medición de la DMO mediante el uso de DEXA. Su empleo actualmente abarca el diagnóstico de osteoporosis (según los criterios densitométricos de la OMS), el seguimiento durante el tratamiento y la predicción de fracturas.

La DEXA es la técnica más utilizada, tanto por su versatilidad como por su rendimiento diagnóstico. Consiste en una exploración radiológica especial que se basa en el principio de que la densidad de un material se puede conocer, siempre que conozcamos su naturaleza, mediante el cálculo de la atenuación que experimenta un haz de radiación de baja energía al atravesar ese material. Esta atenuación o absorción parcial de la radiación se puede relacionar con el tipo de átomos y moléculas que componen el material, ya que cada componente atómico tiene una capacidad de atenuación determinada. Una de las características físicas del calcio es que absorbe mucha más energía que el resto de componentes de los tejidos blandos. La medición de la radiación absorbida refleja el contenido mineral óseo o grado de mineralización del tejido óseo. El contenido mineral óseo dividido por el área proyectada o por el volumen del hueso medido es igual a la DMO.

La medición se realiza de manera estandarizada en g/cm^2 a nivel de la columna lumbar (de L1 a L4) y fémur proximal (cuello, trocánter, zona intertrocantérea y triángulo de Ward). Se suele expresar en Z-score (número de desviaciones estándar de la densidad mineral ósea para una persona de su misma edad, sexo y etnia) y en T-score (número de desviaciones estándar de la densidad mineral ósea del paciente con respecto a la densidad mineral ósea que tendría una persona sana de 30 años, de su mismo sexo y etnia), Figura 11 (97).

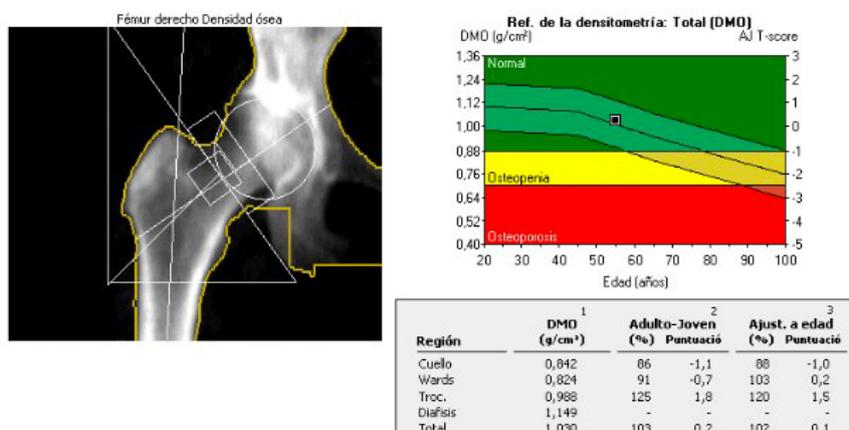


Figura 11: Determinación de la DMO a través de DEXA.

Una de las limitaciones de la DEXA es que ofrece únicamente información cuantitativa del hueso y no cualitativa, de hecho el desarrollo de fracturas por fragilidad en pacientes con grado densitométrico de osteopenia pone de manifiesto que existen otros determinantes en la fractura osteopórotica no valorados por la densitometría y que hace necesaria la utilización de otros métodos de valoración ósea.

Este es el caso de los pacientes con DM2, en los cuales se ha demostrado en la mayoría de estudios epidemiológicos, un aumento de la DMO, a pesar de lo cual existe un riesgo de fractura incrementado de 1,5 para fractura de cadera, humero proximal y radio distal (98). La propia definición de osteoporosis del Instituto Nacional de Salud Americano, destaca que no se trata tan sólo de un problema de densidad del hueso sino también de calidad (35).

Además de ésta, presenta otra serie de limitaciones como ser una técnica de coste elevado que genera una carga económica importante al sistema sanitario y que posee una sensibilidad y un valor predictivo de fractura bajos.

1.2.3.4 Determinaciones analíticas para el despistaje de osteoporosis. Marcadores de remodelado óseo

Los marcadores de remodelado óseo (MRO) son enzimas u otras proteínas secretadas por los osteoblastos u osteoclastos, o bien sustancias producidas durante la formación o la degradación del colágeno tipo 1, la principal proteína que forma la matriz orgánica del hueso. Estas proteínas son liberadas al torrente sanguíneo durante los procesos de formación y/o resorción ósea, pudiendo ser determinadas posteriormente en sangre y/o orina.

La Tabla 9 muestra los MRO empleados en estos momentos según sean de formación o resorción. Se utilizan en combinación los marcadores de formación y los marcadores de resorción que expresan la actividad metabólica de los osteoblastos y los osteoclastos respectivamente (99).

Tabla 9: Marcadores bioquímicos del remodelado óseo (99)

Marcadores de formación	Marcadores de resorción
Suero	
Fosfatasa alcalina total (FA)	Fosfatasa ácida tartrato-resistente (FATR)
Fosfatasa alcalina ósea (FAO)	Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (CTX)
Osteocalcina (OC)	β -CrossLaps (β -CTX)
Propéptido C-terminal del procolágeno tipo I (PICP)	Telopéptido N-terminal del colágeno tipo I (NTX)
Propéptido N-terminal del procolágeno tipo I (PINP)	
Orina	
	Excreción urinaria de calcio
	Hidroxiprolina
	Piridinolina (PYR)
	Deoxipiridinolina (DPD)
	Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (CTX)
	α -CrossLaps (α -CTX)
	Telopéptido N-terminal del colágeno tipo I (NTX)

Los **marcadores de formación ósea** son subproductos de los osteoblastos o enzimas osteoblásticas que reflejan la actividad de los mismos. Los marcadores más ampliamente utilizados en suero o plasma incluyen: FAO, OC y PICP y PINP (99).

La determinación de la actividad **fosfatasa alcalina total** constituye el marcador tradicional de formación ósea. Está producida por células de numerosos tejidos (hígado, hueso, placenta, riñón, etc.) pero más del 95% de la actividad sérica proviene de las formas hepática y ósea. Es una glicoproteína localizada en la membrana celular del osteoblasto y se sabe que interviene al inicio del proceso de mineralización. Como marcador óseo muestra una baja sensibilidad, en la osteoporosis no suele aumentar, y además es poco específico por la variedad de orígenes de producción. La **isoforma ósea** es de utilidad en el estudio del remodelado óseo en la osteoporosis, en la valoración de la actividad en la enfermedad de Paget, osteomalacia, raquitismo, etc. Es el marcador de elección en pacientes con insuficiencia renal puesto que se elimina por metabolismo hepático (100).

El **P1NP** y el **P1CP** son fragmentos peptídicos (amino y carboxiterminales) de la molécula de procolágeno previa transformación, por acción de endopeptidasas, en colágeno. El P1NP se ha posicionado como el marcador de formación más sensible en osteoporosis, demostrando una

gran eficiencia diagnóstica en procesos metabólicos que cursan con aumento del remodelado óseo. El consenso publicado por la NOF y la International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) recomiendan su determinación como marcador de formación ósea referencia en el diseño de estudios observacionales y de intervención (101).

La **OC** es la proteína no colágena más abundante de la matriz ósea (10%), regula la homeostasis del calcio evitando la mineralización excesiva de la matriz ósea. Es sintetizada por el osteoblasto de manera dependiente de la vitamina K. En presencia de calcio, la OC se une a la hidroxiapatita acumulándose en matriz ósea. Aproximadamente el 20% de la OC sintetizada no es incorporada al hueso sino que pasa al torrente sanguíneo y puede ser determinada en suero. Aunque la OC ha sido considerada generalmente como marcador de formación de hueso, varios estudios han demostrado que esta hormona puede actuar sobre la homeostasis del metabolismo energético modulando la producción y acción de la insulina (102).

La mayoría de los **marcadores de resorción ósea** son productos de la degradación del colágeno, con la excepción de **FATR**. Hace años, las investigaciones en metabolismo óseo se basaban principalmente en la determinación de los marcadores urinarios piridinolina (PYD) y deoxipiridinolina (DPD), sin embargo, hoy en día se utilizan principalmente marcadores de suero/plasma. Los principales marcadores son los telopéptidos carboxiterminal y aminoterminal del colágeno tipo I (CTX y NTX respectivamente), considerado el CTX por algunos autores como el marcador de resorción de elección (99).

Las fosfatasa ácidas son un grupo de enzimas lisosomales capaces de hidrolizar ésteres monofosfato en un medio ácido. Se encuentran en el hueso, la próstata, las plaquetas, los eritrocitos y el bazo. La **FATR** es sintetizada por el osteoclasto. Durante el proceso de resorción se libera desde los lisosomas a las lagunas de resorción para ejercer su actividad hidrolítica y de ahí pasa a la circulación. Es el único marcador de remodelado que evalúa la actividad directa del osteoclasto. Su actividad en suero está aumentada en los pacientes con resorción ósea incrementada (103).

Los **NTX** y **CTX** son los telopéptidos aminoterminal y carboxiterminal del colágeno tipo I respectivamente liberados de la degradación de esta molécula durante el proceso de resorción ósea. El CTX ha mostrado ser un buen indicador del estado de resorción ósea. En el adulto, aproximadamente un 70% de las moléculas de colágeno tipo I del tejido óseo se encuentran en su forma isomerizada beta (**β -CTX o beta-CrossLaps**), mientras que el resto se encuentra en su forma natural alfa no isomerizada (**α -CTX**). Por este motivo, la presencia de la forma no

isomerizada en la orina (α -CTX), sería indicativo de resorción del hueso joven recién sintetizado, mientras que la presencia de β -CTX reflejaría la resorción de hueso viejo. β -CTX, al igual que NTX ha mostrado ser un buen marcador de resorción ósea en la mayoría de las patologías óseas a excepción de la enfermedad de Paget, donde debe determinarse la isoforma alfa, debido a la deficiente isomerización del colágeno en el tejido óseo de estos pacientes (104).

Las moléculas de colágeno en la matriz ósea están enlazadas mediante enlaces covalentes de **PYR** y **DPD** formando fibrillas. Son liberadas del colágeno tipo 1 cuando la matriz ósea es degradada por los osteoclastos. Las primeras se encuentran también en el cartílago; sin embargo, las DPD son más específicas del hueso. Expresan bien situaciones de cambio de metabolismo óseo: se elevan en la niñez, menopausia, osteomalacia, hiperparatiroidismo e hipertiroidismo, y descienden bajo el tratamiento con estrógenos y bisfosfonatos (103).

Actualmente se está valorando la utilización de otros productos bioquímicos como posibles nuevos marcadores de remodelado óseo, entre ellos algunos de las vías OPG-RANKL y Wnt que poseen una mayor especificidad para el tejido óseo, sin embargo, a pesar de ser prometedores, su eficacia en la aplicación clínica se desconoce.

En la determinación de estos marcadores siempre ha estado muy cuestionada su aplicabilidad por la variabilidad analítica y biológica que presentan. La variabilidad biológica es secundaria a distintas causas, algunas de ellas controlables (dieta, ejercicio, ritmo circadiano, estado menstrual, toma de determinados fármacos), por lo que podemos minimizar sus efectos mediante la protocolización de estas determinaciones; sin embargo, otras, no lo son (edad, sexo, embarazo, estado menopáusico, fractura reciente) (105).

La variabilidad analítica se ha reducido enormemente desde el desarrollo e implementación de métodos de medida automatizados. Además hay numerosos estudios que mediante modelos matemáticos, valoran la utilidad de un marcador mediante el cálculo del Mínimo Cambio Significativo (MCS). Representa el valor del mínimo cambio que no puede ser debido a un cambio espontáneo en un individuo y se debe calcular para cada laboratorio.

El uso clínico de los MRO aporta numerosas ventajas ya que se trata de una herramienta económica, sencilla, accesible, con poco riesgo para el paciente y aporta gran información sobre el metabolismo óseo y el efecto del tratamiento para la osteoporosis. En cuanto a la predicción de pérdida de masa ósea, diversos estudios han declarado que los marcadores más específicos son la fosfatasa alcalina ósea, la OC, el P1NP y el β -CTX (103).

1.3 Diabetes y osteoporosis

La osteoporosis y la DM son dos enfermedades de alta prevalencia que se asocian a un aumento del riesgo de fracturas por fragilidad, y con un sustancial impacto sobre la morbilidad y mortalidad de la población general. Aunque diversos estudios observacionales han investigado la asociación entre ambas, el mecanismo por el que la DM favorece la aparición de fracturas no se encuentra adecuadamente establecido. Los mecanismos exactos de la fragilidad ósea en la DM pueden diferir, al menos en parte, entre la DM1 y la DM2, no obstante, en ambas enfermedades se altera el proceso dinámico de remodelado óseo y sus vías de regulación, lo que conlleva a una resistencia ósea reducida y un aumento del riesgo de fracturas (106).

1.3.1 Efecto de la DM en las células óseas

La hiperglucemia resultante de la DM ejerce tanto efectos directos sobre las células óseas, especialmente sobre el osteoblasto, como efectos indirectos a través de la formación de productos derivados de la glicación. La DM induce la regulación de los osteoblastos por diversos mecanismos (Figura 12).

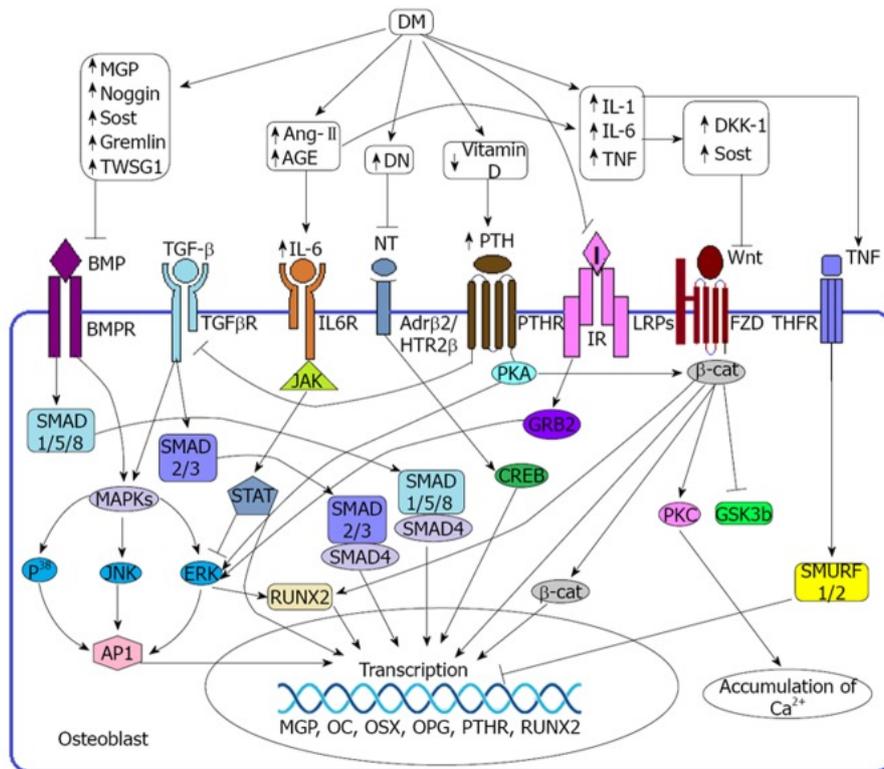


Figura 12: Efectos de la DM sobre el osteoblasto (107).

TNT: Neurotransmisor; HTR2 β : receptor 5 - hidroxitriptamina 2 β ; I: Insulina; IR: receptor de insulina; LRP: proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad; FZD: Frizzled; TNF: Factor de necrosis tumoral; TNFR: receptor de TNF; JAK: Janus Quinasa; STAT: Transductores de señal y activadores de la transcripción; AP - 1: Proteína activadora 1; ERK: Quinasa regulada por señal extracelular; MAPK: proteína quinasas activadas por mitógenos; RUNX2: Factor de transcripción relacionado con Runt 2; PKA: Proteína quinasa A; PKC: Proteína quinasa C; B-cat: β catenina; GSK3b: Glucógeno sintasa quinasa 3b; SMURF: SMAD factor de regulación de ubiquitinación; MGP: Proteína gla de matriz; OC: Osteocalcina; OSX: Osterix; OPG: Osteoprotegerina; DKK-1: Proteína Dickkopf-1; Sost: Esclerostina; TWSG1: twisted gastrulación; Ang- II: Angiotensina- II; AGE: Productos finales de la glicación avanzada; GRB2: proteína ligada al receptor del factor de crecimiento.

En condiciones normales, las BMP, el TGF β , la insulina y la señalización de los neurotransmisores son necesarios para el funcionamiento normal y la supervivencia del osteoblasto, induciendo en el osteoblasto la transcripción de varios inhibidores incluyendo MGP, OPG, y OSX. La unión de BMP con su receptor (BMPR) produce la transcripción del gen correspondiente a través de dos caminos (a) mediante la vía dependiente de proteínas Smads (SMAD 1/5/8) que son una familia de proteínas que actúan a nivel celular como segundo mensajero propagando señales intracelulares que concluyen en la transcripción de diversos genes aguas abajo o (b) por una vía independiente a la vía Smad: en la que se activa el RUNX2 (factor de transcripción clave asociado con la diferenciación de los osteoblastos) o la AP-1 a través de la vía mediada por MAPK-ERK. La vía Wnt-Frizzled regula la expresión génica a través de β -catenina o RUNX2 y media la acumulación de calcio a través de la PKC. El TGF β es también un regulador positivo de la función osteoblástica y ejerce su efecto sobre el gen respectivo a través de la vía dependiente de SMAD 2/3 o de la vía mediada por MAPK-ERK. La unión de neurotransmisores sobre el receptor Adr β 2 o 5HTR activa ERK o CREB para inducir la expresión del gen osteoblástico. La insulina es un factor beneficioso para la formación ósea y ejerce su efecto a través de la vía mediada por GRB2-ERK.

Durante la DM, la hiperglucemia puede inducir la expresión de varios inhibidores de BMP como son MGP, Noggin, esclerostina, Gremlin, TWSG1 así como varios inhibidores de Wnt incluyendo DKK-1 y esclerostina. La DM también induce la producción de diferentes citoquinas proinflamatorias incluyendo IL-6, IL-1 y TNF que regulan negativamente el funcionamiento de los osteoblastos. La DM produce un aumento del TNF que al unirse con TNFR induce a SMURF1/2, por lo tanto inhibe el proceso de transcripción del osteoblasto. La DM también reduce la producción de vitamina D, que a su vez induce la secreción de PTH, la cual se une con su receptor inhibiendo la señalización de TGF- β aunque como contrapartida, active las vías β -Cat y ERK. La hipersecreción de PTH induce la resorción ósea e inhibe la osteoblastogénesis con el fin de mantener un nivel óptimo de calcio y fósforo en la sangre, necesario para el proceso metabólico y las funciones neuromusculares (107).

Además del efecto producido por la DM en la transcripción de los genes asociados a la maduración de los osteoblastos, la **hiperglucemia** característica de la DM puede inducir osteoporosis y fracturas óseas por otros mecanismo recogidos en la Figura 13 (107).

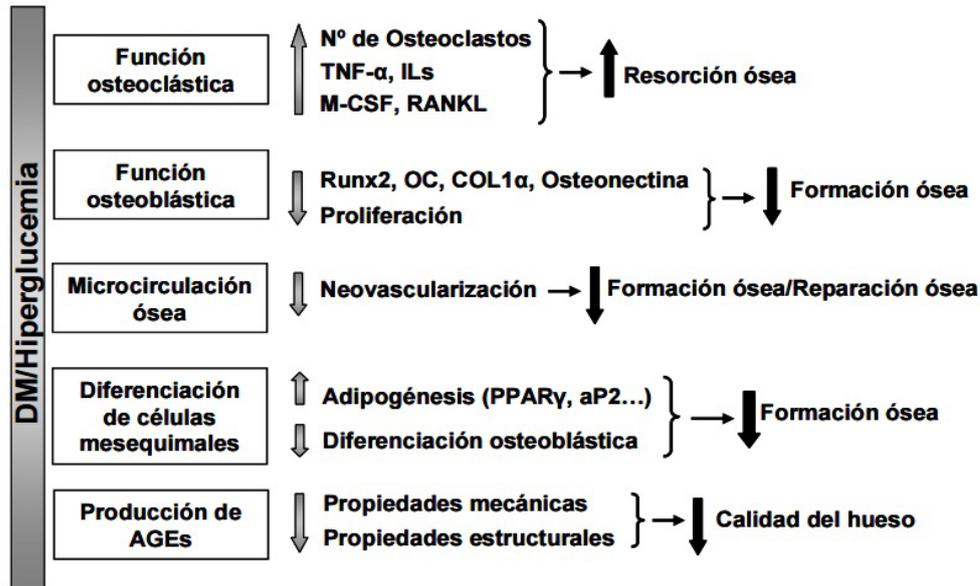


Figura 13: Esquema representativo de los mecanismos subyacentes a la DM y a la hiperglucemia que afectan al metabolismo y a la calidad ósea.(107).

La DM/hiperglucemia induce la sobreproducción del MCSF y del RANKL, ambos son activadores de la proliferación y diferenciación osteoclástica. Además de estos, ciertas citoquinas proinflamatorias TNF α , IL-1, IL-6, ciclooxigenasas (COX-2) y prostaglandinas (E₂), secretadas en estados de hiperglucemia, potencian el reclutamiento y la diferenciación de los pre-osteoclastos (108). El aumento de los niveles de estas citoquinas osteoclastogénicas, conducirá a una más rápida progresión de pérdida de hueso.

La DM/hiperglucemia induce la sobreproducción de IL-6, responsable de la diferenciación y activación de los preosteoclastos a osteoclastos. La IL-6 media la producción de otras citoquinas relacionadas con la osteoclastogénesis como los glucocorticoides. Además el déficit de estrógenos ejerce sus efectos en la osteoclastogénesis a través de la IL-6. Se ha documentado la sobreexpresión del receptor de IL-6 (IL-6R) como antagonista de la diferenciación de osteoblastos ya que la señalización de IL-6 interfiere fuertemente con la actividad de fosfatasa alcalina, que disminuye la expresión de genes osteoblásticos incluyendo RUNX2, Osterix, y OC, y reduce la tasa de mineralización (109).

A nivel celular, altas concentraciones de glucosa suprimen la función y proliferación de los osteoblastos (en parte por la disminución de la expresión del factor de transcripción RUNX2), disminuye la mineralización y la expresión de diversos marcadores osteoblásticos como la OC y la osteonectina, produciendo como resultado una disminución en la formación de hueso (15).

La DM/hiperglucemia produce un aumento en la diferenciación de las células madres mesenquimales (MSC) en adipocitos, produciendo una sobreexpresión de los marcadores adipogénicos, del PPAR- γ , de la proteína de unión de ácidos grasos (aP2), de la resistina y adiposina que tienen como resultado una disminución en la formación de hueso (110).

Una disminución en la neovascularización puede agravar aún más la pérdida de hueso. La calidad ósea también se reduce como resultado de la producción de productos finales de glicación avanzada (AGE), lo que eventualmente puede resultar en baja calidad ósea o fracturas por fragilidad. Los AGE se forman in vivo mediante la reacción de Maillard, una reducción de la glucosa con las proteínas para formar productos lábiles que posteriormente se estabilizan dando lugar a una modificación irreversible, no enzimática y postranscripcional de la proteína involucrada. Los altos niveles de AGEs y su acúmulo juegan un papel esencial en el desarrollo de las complicaciones asociadas a la diabetes. El acúmulo a nivel óseo reduce la actividad del osteoblasto por la unión de los productos AGEs con receptores específicos (RAGE), altera la osteoclastogénesis por el descenso en la síntesis y liberación de RANKL y disminuye la mineralización. El colágeno de la matriz extracelular modificado por los AGEs es más difícil de eliminar por las enzimas hidrolíticas lo que incrementa la fragilidad ósea. Asimismo, la presencia de AGEs interfiere en la interacción entre las células óseas y la matriz extracelular. Por tanto, la glicación en exceso puede afectar las propiedades óseas, y este efecto se evidencia sobre todo a nivel cortical por acúmulo de AGEs como la pentosidina (producto AGE derivado del colágeno tipo 1) en los sitios del esqueleto con menor rotación (108).

Entre los factores endocrinos y locales con acción ósea demostrada, la insulina, producida y secretada por las células β pancreáticas, y el IGF-1, mayoritariamente producido en el hígado pero también en el hueso merecen una especial consideración en la osteoporosis relacionada con la DM. La clara reducción de la masa ósea en algunos pacientes con DM1 ha llevado a la hipótesis de que la insulina tiene efectos osteoanabólicos (Figura 14). La destrucción de las células β pancreáticas en pacientes con DM1 impide la secreción de insulina, del polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) también conocido como amilina y leptina, reduciendo así sus efectos sobre el gen RUNX2 (esta reducción disminuye la proliferación y la diferenciación de las MSC en osteoblastos) limitando la producción de OC (14).

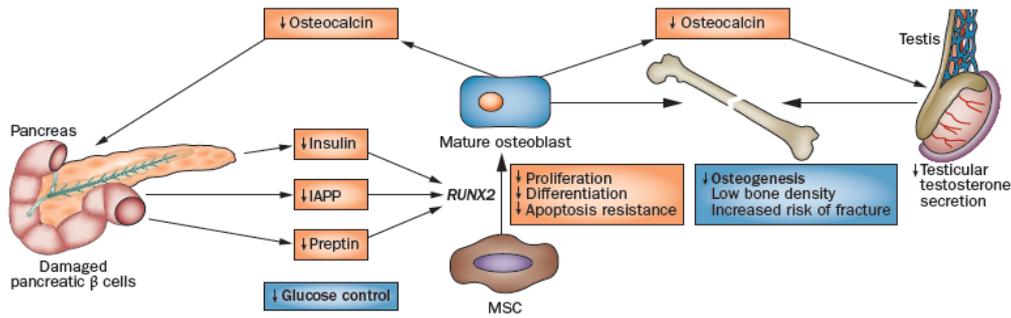


Figura 14: Deterioro de la osteogénesis en la DM (14).

Además, algunos medicamentos antidiabéticos orales pueden dirigirse específicamente a los osteoblastos y afectar a la formación de hueso (Figura 15). La metformina aumenta la diferenciación de las MSC en osteoblastos a través de sus acciones en RUNX2. La metformina y la sulfonilurea tienen efectos protectores sobre las fracturas óseas. Los DPP-4 tienen efectos anabólicos en el hueso. Las glitazonas suprimen simultáneamente RUNX2 y potencian al PPAR γ que impulsa la diferenciación de las MSC en adipocitos, reduciendo de este modo la osteogénesis (114)(115). Las tiazolidinedionas pueden disminuir la formación de hueso y la DMO, y aumentar la resorción ósea, debido a la menor síntesis de fosfatasa alcalina, OC y PINP (113).

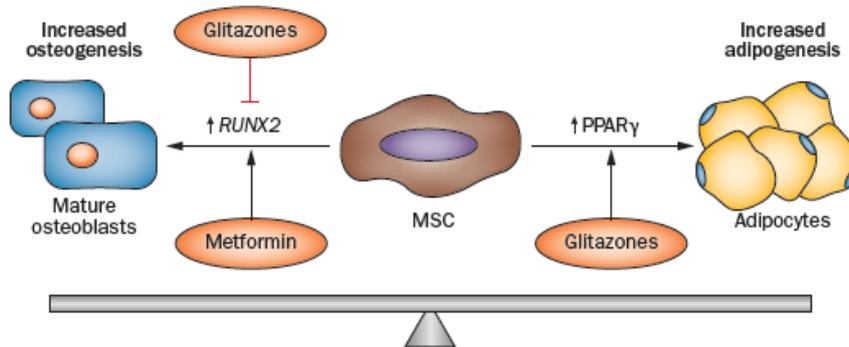


Figura 15: Efectos óseos de los tratamientos farmacológicos de la DM(14).

1.3.2 Efecto de la DM en las células musculares

La debilidad muscular es un factor de riesgo de fracturas óseas. Hay evidencias que muestran que la DM se asocia con la atrofia muscular mediada por la neuropatía diabética o directamente a través de TNF- α , induciendo debilidad muscular (114).

La IL-6 es además, factor potencial de la atrofia muscular. La angiotensina II inducida por la IL-6, regula positivamente la secreción de suero amiloide A (SAA) y ambos factores (IL-6 y SAA)

actúan sinérgicamente para provocar atrofia muscular (115). Las dosis altas o la administración crónica de IL-6 en ratas o ratones causan una mayor degradación de las proteínas en el músculo esquelético. Se ha demostrado que la introducción del gen IL-6 en ratones transgénicos eleva la IL-6 circulante, que está asociada con atrofia muscular severa y que el bloqueo de la señalización de IL-6 por el anticuerpo IL-6R provoca la regeneración del músculo. También se han reportado efectos indirectos de IL-6 sobre la señalización de IGF-1. El incremento de los niveles circulantes de IL-6 se asocia con una disminución significativa de los niveles séricos de IGF-1 y una expresión elevada de ARN mensajero (ARNm) de SOCS3 (supresor de la señalización de citoquinas) en el músculo, lo que sugiere el papel de IL-6 como un regulador negativo de la señalización de IGF-1 (109). Recientemente, se examinaron los niveles de expresión de IL-6 y su receptor, IL-6R, de individuos delgados, con sobrepeso y obesos, y se determinó que los niveles de expresión de IL-6 e IL-6R estaban elevados en individuos obesos y con sobrepeso en comparación con el grupo de individuos delgados (116).

1.3.3 Efecto de la obesidad en las células óseas

Diversos estudios epidemiológicos han propuesto que los efectos adversos sobre la DMO en la DM2 pueden ser debido a los efectos de la obesidad a través del aumento de la carga mecánica y de la síntesis y liberación por parte del tejido adiposo de citoquinas con influencia sobre el metabolismo óseo. La resistencia a la insulina y el aumento de tejido adiposo visceral observado en la DM2 se asocian a un estado de inflamación crónica de bajo grado constituyendo un potencial mecanismo de pérdida ósea y un aumento del riesgo de fracturas. Además, la adiposidad aumenta la expresión de ARNm, de la proteína C reactiva (PCR), de la IL-6 (ya que en el tejido adiposo se sintetiza aproximadamente el 30 % de la IL-6 circulante, cantidad que aumenta proporcionalmente con el incremento de la masa corporal) y del receptor de la IL-6 estimulando la osteoclastogénesis y la resorción ósea (117).

Estos estudios han puesto de manifiesto que el riesgo de padecer diabetes, y presumiblemente resistencia a insulina, aumenta al incrementar el contenido graso del cuerpo. El tejido adiposo no es sólo un sistema de almacén de lípidos, sino que también es un órgano secretor de un número importante de factores circulantes, denominados adipocinas, entre los que se incluyen la leptina, adiponectina, IL-6, IL-10, proteína quimiotáctica monocítica-1 (MCP-1), TNF- α y M-CSF entre otros que ejercen sus efectos mediante la modulación de las vías de señalización en el hueso y el músculo.

Se ha demostrado que estas adipocinas se regulan positivamente o negativamente como resultado de la obesidad y actúan como reguladores negativos de osteoblastos, osteocitos y músculo, así como reguladores positivos de osteoclastos. Estos efectos aditivos de la obesidad en última instancia aumentan el riesgo de osteoporosis y atrofia muscular (109).

1.3.4 DMO y riesgo de fractura en DM

La DM1 y la DM2 afectan a la DMO de forma diferente. Los pacientes con DM1 tienen un alto riesgo de desarrollar osteopenia y osteoporosis a lo largo de su vida. Existe evidencia epidemiológica clara de que la prevalencia de osteoporosis y fractura es mayor en pacientes con DM1 que en la población general. Hay una serie de factores que influyen en la DMO en estos individuos. Diversos estudios han demostrado una disminución de masa ósea en niños y adolescentes con DM1 y se ha asociado esta patología con la reducción de la formación ósea durante el crecimiento esquelético. En adultos con DM1, la DMO femoral está reducida, mientras que en espina lumbar es similar o ligeramente menor que en individuos sin DM (118).

En contraste, adultos con DM2 presentan valores de DMO normales o ligeramente elevados, con valores de T-scores de entre 0,3-0,8 más que en pacientes control sin DM (14). En la mayoría de los estudios, la DMO ha sido mayor en espina lumbar, cadera y radio. Sin embargo, datos de tres estudios prospectivos observacionales en adultos mayores de 73 años con DM2 sugieren que, para una edad y T-score determinados, el riesgo de fractura en estos pacientes es mayor que en individuos sin DM (93).

En España son muy escasos los estudios que han evaluado la masa ósea en pacientes diabéticos. Se ha descrito un incremento del 8% en la DMO de calcáneo medida por DEXA en mujeres con DM2 pero no en varones (119). En un estudio posterior realizado en mujeres postmenopáusicas mayores de 65 años con obesidad, la DM2 se asoció a un incremento de la DMO a nivel lumbar sin diferencias a nivel femoral ni de calcáneo (120). Las discrepancias en los resultados de diversos trabajos pueden deberse a diferencias metodológicas con inclusión de pacientes con duración, gravedad y tratamiento de la enfermedad muy variables.

Un mecanismo importante que explica el aumento del riesgo de fracturas en la DM2 es la predisposición a las caídas en relación con las complicaciones micro y macrovasculares asociadas. Las alteraciones visuales, la afectación de la propiocepción, las hipoglucemias desapercibidas y la nicturia conllevan a un mayor riesgo de caídas en la población diabética de

edad avanzada. Así mismo, los efectos de la DM sobre las fracturas se reducen cuando se controlan las complicaciones asociadas a los traumas, como la retinopatía, los accidentes cerebrovasculares, la neuropatía periférica y la fuerza muscular (121).

Pacientes con DM1 y DM2 tienen un riesgo mayor de sufrir fracturas en la mayoría de las localizaciones esqueléticas. Dos grandes metaanálisis que evaluaron estudios con 1,3 millones de participantes, concluyeron con una odds ratio de 6,3-6,9 para las fracturas de cadera en pacientes con DM 1 y de 1,4-1,7 en los pacientes con DM2, asociado generalmente a una mayor duración de la enfermedad y el uso de insulina y/o antidiabéticos orales (122). La mayoría de estudios de cohortes prospectivos publicados encuentran que a pesar de una mayor DMO, los pacientes con DM2 tienen un mayor riesgo de fractura osteoporótica.

En el mayor estudio de DMO y fracturas en DM2, el Rotterdam Study, llevado a cabo con 6,655 hombres y mujeres de más de 55 años, concluye que aunque los sujetos con DM2 tuvieron una DMO más alta, tuvieron un riesgo elevado de fracturas no vertebrales: riesgo (HR) 1,33 (1,00-1,77), probablemente debido a complicaciones a largo plazo asociadas a la DM (123).

1.3.5 MRO en pacientes diabéticos

Los estudios histomorfométricos en la diabetes han mostrado un bajo reclutamiento de osteoblastos junto a una disminución de las tasas de depósito mineral sin defectos en la mineralización. La evaluación de los MRO en pacientes diabéticos, en general demuestran niveles séricos disminuidos de OC (102). En un metaanálisis de veintidós artículos concluyen que los marcadores óseos OC y CTX fueron significativamente menores entre los pacientes diabéticos que entre los no diabéticos, sin embargo con los otros marcadores no hubo diferencias significativas (124).

Otro estudio que compara los MRO entre DM1 y DM2 concluye que P1NP, OC y RANKL fueron menores en pacientes con DM2 en comparación con DM1, y la OPG fue mayor en DM2. El CTX y la esclerostina fueron similares entre los dos grupos de pacientes (125).

Una reciente revisión sistemática y metaanálisis que incluyeron 66 estudios concluyeron que los marcadores tanto de formación ósea como de resorción ósea disminuyen en los pacientes con diabetes. Esto sugiere que la DM es un estado de bajo remodelado óseo, que a su vez puede

conducir a un hueso más frágil. Los niveles alterados de esclerostina y osteoprotegerina pueden ser responsables de esto (126).

II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La osteoporosis y la DM son dos enfermedades de alta prevalencia que se asocian a un aumento del riesgo de fracturas por fragilidad, y con un sustancial impacto sobre la morbilidad y mortalidad de la población general. Aunque diversos estudios observacionales han investigado la asociación entre ambas, el mecanismo por el que la DM favorece la aparición de fracturas no se encuentra adecuadamente establecido. Los mecanismos exactos de la fragilidad ósea en la DM pueden diferir, al menos en parte, entre la DM1 y la DM2, no obstante, en ambas enfermedades se altera el proceso dinámico de remodelado óseo y sus vías de regulación, lo que conlleva a una resistencia ósea reducida y un aumento del riesgo de fracturas.

En España son muy escasos los estudios que han evaluado la masa ósea y el riesgo de fractura en pacientes diabéticos. Pocos estudios valoran la evolución temporal de la pérdida de masa ósea en la diabetes, ya que se centran principalmente en evaluar el status óseo de los pacientes en un único momento temporal y tipo de DM, principalmente en la DM2.

Considerando los aspectos reseñados anteriormente, en el presente trabajo pretendemos estudiar si la enfermedad ósea es una complicación de la DM, si la inflamación tiene algún papel en el desarrollo de la enfermedad ósea y si las manifestaciones y mecanismos de estas complicaciones son diferentes entre los dos principales tipos de diabetes.

La hipótesis del presente estudio es que la determinación de los MRO y de inflamación, pueden ayudarnos a mejorar la precisión diagnóstica aportada por la densitometría ósea, *gold estándar* como método diagnóstico de osteoporosis, y además de esto y dada la importancia del componente genético en el desarrollo de la patología ósea, pretendemos estudiar diversos aspectos de la genética relacionados con el metabolismo óseo en pacientes diabéticos, estudiando diversos polimorfismos en los genes VDR, ESR1, RANKL e IL-6, que afectan al metabolismo óseo y que podrían modular la respuesta del hueso en la DM.

2.2 Objetivos

El objetivo general del estudio es evaluar el estado óseo del paciente diabético y evaluar la posible pérdida de masa ósea a lo largo del estudio junto con la evaluación de la presencia de

diversos polimorfismos en los genes implicados en la remodelación ósea. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1- Análisis descriptivo de las características clínicas de los pacientes en el momento del reclutamiento.
- 2- Determinar los valores de DMO mediante DEXA en el momento basal y a los 12 meses y calcular el riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX® en la población diabética.
- 3- Medir las concentraciones de parámetros bioquímicos para evaluar el metabolismo fosfocálcico, la función renal y el metabolismo lipídico e hidrocarbonado, así como los MRO y de inflamación en el momento basal, a los 6 y a los 12 meses del inicio del estudio.
- 4- Determinar la frecuencia genotípica de los SNPs de los genes VDR, ESR1, OPG, RANKL e IL-6 en los diferentes grupos de diabéticos y compararla entre sí y con las descritas en la población general, así como estudiar las correlaciones existentes con las manifestaciones clínicas, bioquímicas y densitométricas en estos pacientes.
- 5- Estudiar la combinación más adecuada de los marcadores de remodelado óseo, de inflamación y de los SNPs con las variables clínicas para el diagnóstico y seguimiento de la patología ósea en el paciente diabético.

III MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Población y diseño del estudio

La presente tesis doctoral comprende un estudio longitudinal prospectivo de un año de duración en 165 pacientes en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia. La población fueron pacientes diabéticos que acudieron a la consulta de la Unidad de Diabetes del Servicio de Endocrinología y Nutrición. A continuación, se definen las características principales de la población de estudio, los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes, los diferentes grupos de estudio y el diseño del mismo.

3.1.1 Criterios de inclusión

Se seleccionaron los pacientes en función de los siguientes criterios de inclusión:

- Paciente diagnosticado de DM (tipo 1 ó 2)
- Raza caucásica
- Edad (comprendida entre 18 y 70 años)

3.1.2 Criterios de exclusión

- Edad mayor de 70 años o menor de 18.
- Pacientes con enfermedades oncológicas.
- Diabetes secundaria a otras patologías.
- Antecedentes de tratamiento antirresortivo que pudiera afectar al metabolismo óseo.

3.1.3 Grupos de estudio

Este grupo se dividió en dos, en función el tipo de DM.

- Diabéticos tipo 1
- Diabéticos tipo 2

El reclutamiento de los participantes se hizo de forma consecutiva, comenzando en noviembre de 2012 y finalizando en febrero de 2013. La recogida final de datos del estudio se cerró en febrero de 2014 transcurrido un año del reclutamiento de los últimos pacientes.

3.1.4 Diseño del estudio

Ambos grupos de pacientes fueron valorados al inicio del estudio, a los 6 meses y transcurrido un año (Figura 16):

- Al inicio, una vez informados y dado su consentimiento, se procedió a la recogida de datos clínicos que se realizó mediante una entrevista clínica y un cuestionario. En el momento del reclutamiento se realizó la primera densitometría ósea para valorar el estado óseo del paciente diabético y el cálculo de riesgo de fractura con el FRAX®, junto con la determinación de los MRO, de inflamación, y de los SNPs
- A los 6 meses, se realizó una nueva consulta y una nueva analítica para determinar la evolución.
- Transcurridos doce meses se volvió a citar a los pacientes y se realizó una nueva densitometría ósea y una nueva determinación de MRO y de inflamación.

En todas las visitas se realizó una extracción de sangre venosa para evaluar el metabolismo fosfocálcico y la función renal, marcadores de remodelado óseo y de inflamación. También se ha realizado el genotipado de los polimorfismos en 95 de los pacientes (47 con DM1 y 48 con DM2).

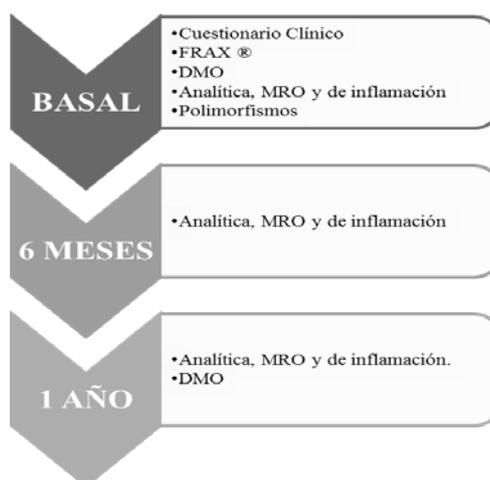


Figura 16: Diseño del estudio en pacientes con DM1 y DM2.

El reclutamiento de los pacientes y la recogida de los datos clínicos fueron llevados a cabo en las consultas externas de la Unidad de Diabetes del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

La obtención de las muestras de sangre se realizó en los Centros de Salud del Área I Murcia-Oeste cuyo hospital de referencia es el Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, desde donde fueron enviados al Servicio de Análisis Clínicos para su procesamiento. Se obtuvieron muestras de suero (sin anticoagulante), de plasma (anticoagulado con citrato sódico), de sangre total (anticoagulada con ácido etilendiaminotetracético tripotásico (EDTA-K3)) y de orina al inicio del estudio, a los 6 y a los 12 meses tras el comienzo del mismo. Las muestras se recogieron tras un ayuno de 12 horas, entre las 8 y las 10 de la mañana (para evitar la variación circadiana).

3.1.5 Confidencialidad y principio éticos

El protocolo del estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (Anexo D). Todos los pacientes seleccionados han sido informados de forma detallada sobre el estudio, procedimientos, así como los potenciales riesgos y beneficios, y necesariamente firmaron el consentimiento informado para su participación (Anexo II).

El almacenamiento de los datos se realizó de forma codificada. Sólo los miembros del equipo investigador (facultativos del servicio de Análisis Clínicos y Endocrinología) tuvieron acceso al almacenamiento de los datos de los voluntarios.

3.2 Estudio clínico

En el momento del reclutamiento, se procedió a la recogida de datos clínicos sobre antecedentes personales y familiares de interés, hábitos tóxicos, actividad física, exposición al sol y medicación consumida. A continuación se describen de manera detallada las variables recogidas al inicio:

- Edad y sexo del paciente.
- Tipo de DM (tipo 1 y tipo 2) y años de evolución.
- Metadiabetes:
 - Nefropatía

- Retinopatía
- Neuropatía
- Cardiopatía isquémica
- Accidente cerebrovascular (ACV)
- Enfermedad arterial periférica (EAP)
- Antropometría:
 - Talla (cm)
 - Peso (kg)
 - Índice de masa corporal (IMC)
 - Cifras de tensión arterial sistólica y diastólica (TAS y TAD)
- Comorbilidades: Se recogieron aquellos trastornos asociados a la DM como son hipertensión arterial (HTA), la dislipemia y la obesidad.
 - La HTA se define como TAS \geq 140 mmHg y/o TAD \geq 90mmHg.
 - La dislipemia, según los criterios Adult Treatment Panel III (127) se define como concentraciones de colesterol total \geq 200 mg/dl, y/o de cHDL $<$ 40 mg/dl, y/o colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) $>$ 100 mg/dl, y/o de triglicéridos $>$ 150 mg/dl, o pacientes que estaban con alguna terapia hipolipemiente en el momento de la inclusión en el estudio.
 - La obesidad definida por la OMS cuando el IMC (cociente entre la estatura y el peso de un individuo al cuadrado) es igual o superior a 30 kg/m².
- Se registró el estatus menstrual de pre/post menopausia y fecha de última regla.
- Exposición al sol: se valoró la exposición al sol de los pacientes catalogándolos en 3 grupos según fuese:
 - Muy baja: prácticamente no expuesto.
 - Suficiente: al menos 15 minutos diarios en zonas fotoexpuestas como cara, brazos y piernas.
 - Alta: en caso de una hora diaria o más de exposición al sol.
- Hábitos tóxicos: se registraron los diversos hábitos tóxicos del paciente como el tabaco, el consumo de alcohol y de café.
 - Tabaco: se clasificó a los pacientes según su situación de fumador, ex fumador o no fumador.
 - Consumo de alcohol: catalogando a los pacientes según su situación de consumidor habitual, antiguo consumidor o no consumidor de alcohol. Se anotó la cantidad de alcohol diaria consumida como unidades de bebida estándar (UBE) para calcular posteriormente el consumo del alcohol en gramos/día mediante la siguiente

equivalencia: una UBE (diez gramos de alcohol) es igual a un vaso de vino, una cerveza o media copa de destilados.

- Café: se registró también el consumo de café anotando el número de tazas diarias.
- Actividad física:
 - Sedentaria: inactiva la mayor parte del tiempo.
 - Ligera: algún ejercicio suave cuatro veces por semana.
 - Moderada: algún ejercicio vigoroso tres veces por semana.
 - Alta: algún ejercicio vigoroso cuatro o más veces por semana.
- Fracturas previas y tipo de hueso (cadera, vertebral u otras localizaciones).
- Antecedentes de padres con fractura.
- Diagnóstico de artritis reumatoide.
- Tratamiento con corticoides, actualmente o 3 meses antes.
- Tratamiento de la diabetes: se recogió información sobre el tratamiento habitual seguido por el paciente de forma crónica para el tratamiento de su patología (insulina, metformina, glitazonas, secretagogos, inhibidores de la DPP-4 y análogos del receptor de GLP-1). Se descartó la utilización de otros medicamentos que pudieran afectar al metabolismo óseo.

3.3 Estudio densitométrico

La determinación de la DMO se realizó mediante DEXA al inicio del estudio y 1 año más tarde. Se midió la DMO en g/cm^2 a nivel de la columna lumbar y fémur proximal (cuello, trocánter, zona intertrocantérea y triángulo de Ward). En la medición de la DMO en la región lumbar se incluyó la región comprendida de L1 a L4, situando al paciente alineado con el eje de la mesa de exploración. Asimismo se realizó la determinación del T-score en ambas localizaciones.

Previamente a su realización se descartó la existencia de cualquier contraindicación como el embarazo, la realización de alguna exploración que utilice contraste en las dos semanas previas, que pudiera alterar los resultados de la prueba.

3.4 Estudio de riesgo de fracturas a 10 años

Al inicio del estudio, y con la información obtenida en la entrevista clínica, se calculó el riesgo de fractura a 10 años, de forma agrupada en las principales localizaciones (vertebra, cadera, húmero y antebrazo) y de forma específica en cadera, utilizando el cuestionario FRAX®.

3.5 Estudio bioquímico

3.5.1 Obtención de muestras

Todas las muestras sanguíneas para el estudio fueron obtenidas mediante punción venosa antecubital y tras 12 horas de ayuno y un periodo de reposo de 20 minutos. La extracción se llevó a cabo por personal de enfermería cualificado.

La sangre se recogió en tubos de vacío vacutainer con diferentes aditivos. Se obtuvieron muestras de suero, recogidas en tubo seco de 10 ml con silicona, plasma (tubo con citrato de sodio) rellenándolo de tal manera que contuviese nueve partes de sangre y una de anticoagulante, y sangre total (EDTA-K3).

Las muestra de sangre total se procesaron sin centrifugar y previa agitación. Las muestras de plasma, y de suero, tras la retracción del coagulo, se centrifugaron durante 20 minutos a 3500 rpm y a 4°C. Las muestras de suero se procesaron, alícuotaron y se congelaron guardando tres alícuotas a -80°C el mismo día de su extracción, para su posterior procesamiento (menos de 2 meses), evitando así la degradación de los marcadores de remodelado óseo y de inflamación. A las muestras de sangre total, tras la determinación de la hemoglobina glicosilada (HbA1c) y un hemograma de control, se les realizó la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN), conservando el mismo a -20°C hasta la posterior determinación de los polimorfismos estudiados.

Se recogió la segunda orina de la mañana en un recipiente sin conservante. Estas muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, procesadas y posteriormente congeladas.

Las muestras han sido sometidas a un solo ciclo de congelación-descongelación previo a la determinación de los marcadores. Todas las técnicas empleadas para su determinación estaban correctamente calibradas y controladas antes de la descongelación de los sueros para asegurar la calidad de los resultados.

La determinación de los MRO y de inflamación se realizó en series de 30-40 muestras, no demorando su determinación en más de 2 meses para evitar la pérdida o degradación de los mismos. Los resultados de todas las muestras analizadas han sido introducidos en una base de datos creada expresamente para el procesamiento de los mismos.

3.5.2 Parámetros de estudio y técnicas analíticas

3.5.2.1 Parámetros bioquímicos del metabolismo fosfocálcico

- Calcio (suero y orina)
- Fósforo (suero y orina)
- PTH (suero)
- 25-OH vitamina D (suero)

Calcio en suero (Ca) y en orina (CaO): utilizamos para su determinación cuantitativa un método espectrofotométrico en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). Bajo condiciones alcalinas, los iones de calcio reaccionan con la o-cresolftaleína complexona (o-CPC) formando un complejo de color violeta. La adición de 8-hidroxiquinolina previene interferencias debido al magnesio y al hierro. La intensidad cromática del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de calcio y se mide por fotometría a una longitud de onda (sub/princ) 376/340 nm.

- Límite de detección: 0,4 mg/dl para suero y 0,6 mg/dl para orina.
- Intervalo de medición: Suero/plasma (0,4-20,0 mg/dl) y orina (0,6-30 mg/dl orina).
- Valores de referencia (población adulta): suero/plasma (8.6-10.2 mg/dl) y orina (6,8-21,3 mg/dl).

Fósforo en suero (P) y en orina (PO): Utilizamos un test in vitro para la determinación cuantitativa del fósforo en suero y orina en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). El fósforo inorgánico se determina a partir de la formación de fosfomolibdato de amonio con posterior reducción a azul de molibdeno. El método se basa en la reacción del fosfato con molibdato de amonio para formar fosfomolibdato de amonio sin reducción. La adición de un acelerador permite obtener una reacción más rápida, mientras que la aplicación de un blanco de muestra proporciona resultados más precisos. En presencia de ácido sulfúrico, el fosfato inorgánico forma un complejo de fosfomolibdato de amonio con el molibdato de amonio que se expresa con la fórmula $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4\text{MoO}_3]_{12}$. La concentración del fosfomolibdato formado es directamente proporcional a la concentración de fosfato inorgánico y se mide fotométricamente a una longitud de onda (sub/princ) 700/340 nm.

- Límite de detección: suero/plasma (0,31 mg/dl) y orina (3,4 mg/dl)
- Intervalo de medición: suero/plasma(0,31-20,0 mg/dl) y orina (3,4-285 mg/dl)

- Valores de referencia (población adulta): suero/plasma (2,5-4,5 mg/dl); orina (40-136 mg/dl)

Hormona paratiroidea en suero (PTH): la determinación cuantitativa de la hormona paratiroidea humana C-terminal en suero, se lleva a cabo por radioinmunoensayo (RIA) con el C-terminal PTH RIA Kit de Diasorin®. El RIA para PTH C-terminal es un procedimiento de desequilibrio que utiliza la adición de un trazador retardado para aumentar la sensibilidad. El anticuerpo es producido contra la PTH vacuna intacta y es reactivo a la secuencia 65-84 de la PTH humana. En este RIA, la muestra y el primer anticuerpo se combinan e incuban durante 16-24 horas (opción A) o 4 horas (opción B) a 2-8°C. Después se agrega el trazador, seguido de una segunda incubación durante 16-24 horas a 2-8°C. La separación se logra mediante el uso de un anticuerpo doble pre-precipitado que se acelera con una solución de polietilenglicol 6.000 al 25% [p/v] (PEG). Este anticuerpo se añade como un solo reactivo con una incubación posterior de dos horas. El cálculo de resultados se realiza a través de una curva de calibración que relaciona el grado de unión con las concentraciones logarítmicas indicadas en los calibradores empleados.

- Límite de detección: 0,1 pg/ml
- Rango de referencia (en adultos): 15-65 pg/ml

25-OH vitamina D en suero: se ha determinado la concentración de Vitamina D total en suero mediante el kit Liaison® 25-OH Vitamin D total de Diasorin®, que emplea la tecnología inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) para la determinación cuantitativa de la 25-hidroxi-vitamina D (25-OH-D). Un anticuerpo específico para la vitamina D recubre las partículas magnéticas (fase sólida) y la vitamina D es conjugada con un derivado de isoluminol. Durante la fase de incubación, la 25-OH-D se disocia de su proteína de unión y compite por los sitios de unión del anticuerpo con la vitamina D marcada. Tras la fase de incubación, el material no unido se elimina mediante un ciclo de lavado. A continuación, se añaden los reactivos Starter que inducen una reacción de quimioluminiscencia instantánea. La señal luminosa, que un fotomultiplicador mide en unidades relativas de luz (RLU), es inversamente proporcional a la concentración de 25-OH-D presente en la muestra.

- Límite de detección: 4,0 ng/ml
- Intervalo de medición: 4,0 - 150 ng/ml
- Valores de referencia (población adulta): deficiencia (0-10 ng/ml), insuficiencia (10-30 ng/ml), suficiencia (30-100 ng/ml), toxicidad (>100 ng/ml)

3.5.2.2 Parámetros bioquímicos de la función renal

- Creatinina (suero y orina)
- Urea (suero)
- Microalbuminuria

Creatinina en suero (Crea) y en orina (CreaO): Para la determinación cuantitativa de la creatinina en suero y orina se utiliza un método espectrofotométrico en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®), basado en el método de Jaffé. En una solución alcalina, la creatinina forma un complejo amarillo-anaranjado con el picrato. La tasa de formación de colorante es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. La prueba emplea la determinación del blanco para minimizar la interferencia por bilirrubina. Para corregir las reacciones inespecíficas por cromógenos no-creatinina en suero y plasma, como las proteínas y cetonas, los resultados para suero o plasma se corrigen en -0.3 mg/dl.

- Límite de detección: 0,17 mg/dl
- Intervalo de medición: suero/plasma (0,17-24,9 mg/dl) y orina (4,2-622 mg/dl)
- Valores de referencia (población adulta): suero/plasma: mujeres (0.50-0.90 mg/dl), hombres (0.70-1.20 mg/dl); orina reciente: mujeres (28-217 mg/dl), hombres (39-259 mg/dl)

Urea en suero: Utilizamos un método enzimático con ureasa y glutamato deshidrogenasa, para la determinación cuantitativa de la urea en suero en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). La urea presente en la muestra es hidrolizada por la ureasa a amonio y carbonato. En una segunda reacción, el 2-oxoglutarato reacciona con amonio en presencia de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) y la coenzima NADH para producir L-glutamato. En esta reacción, por cada mol de urea hidrolizada se oxidan dos moles de NADH a NAD⁺. La velocidad con que la concentración de NADH disminuye es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra y se mide fotométricamente a una longitud de onda (sub/princ) 700/340 nm.

- Límite de detección: suero/plasma (3,0 mg/dl)
- Intervalo de medición: suero/plasma (3,0-240 mg/dl)
- Valores de referencia (población adulta). suero/plasma (16,6-48,5 mg/dl)

Microalbuminuria (Mau): Se usa un prueba inmunoturbidimétrica para la determinación cuantitativa de la albúmina en orina en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). Los anticuerpos anti-albúmina del reactivo reaccionan con el antígeno de la muestra formando un complejo antígeno-anticuerpo que se mide turbidiméricamente después de la aglutinación.

- Límite de detección: orina (0,3 mg/dl)
- Intervalo de medición: orina (0,3-40 mg/dl)
- Valores de referencia: orina (segunda orina de la mañana) Adultos: < 20 mg de albúmina/g de creatinina

3.5.2.3 Parámetros bioquímicos del metabolismo glucídico

- Glucosa (suero)
- Hemoglobina glicosilada (HbA1c) (sangre total)

Glucosa en suero: utilizamos un método enzimático de referencia empleando hexoquinasa por radiación ultravioleta para la determinación cuantitativa de la glucosa en suero en autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). La hexoquinasa cataliza la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato por ATP. En una segunda reacción la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa oxida la glucosa-6-fosfato en presencia de NADP a gluconato-6-fosfato. La velocidad de formación de NADPH durante la reacción, es directamente proporcional a la concentración de glucosa y se determina fotométricamente a una longitud de onda (sub/princ) 700/340 nm.

- Límite de detección: 2 mg/dl
- Intervalo de medición: 2-750 mg/dl
- Valores de referencia: en ayunas 74-106 mg/dl

Hemoglobina glicosilada (HbA1c) en sangre total: La determinación de HbA1c en sangre total se lleva a cabo mediante HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) por intercambio iónico (catiónico), técnica de referencia para NGSP en un HPLC-723G8 de TOSOH®. Este método usa una columna para eluir las diferentes fracciones de la hemoglobina de la muestra (6 fracciones en total), previamente diluida con una solución hemolítica, a distintos tiempos dependiendo de su carga eléctrica, debido a las interacciones iónicas de éstas con el material de la columna. Se utiliza para ello un gradiente escalonado que genera tres tampones de elución

con diferentes fuerzas iónicas. Se mide la absorbancia a 415 nm, con un filtro adicional a 690 nm que corrige la absorbancia de fondo.

- Intervalo de medición: 4,1-16,8 %
- Valores de referencia: 4,3 - 6,3 %

3.5.2.4 Parámetros hormonales

- Tirotropina (TSH) (suero)
- Tirotoxina libre (T4L) (suero)

Tirotropina en suero (TSH): Para la determinación cuantitativa de la TSH en suero utilizamos un inmunoensayo ECLIA en un inmunoanalizador Cobas E602 (Roche Diagnostics®). Es una técnica tipo sándwich con una duración total de 18 minutos. En una primera incubación, 50 µl de muestra, un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-TSH y un anticuerpo monoclonal específico anti-TSH marcado con quelato de rutenio forman un complejo sándwich. Después de incorporar las micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con ProCell/ProCell M. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

- Límite de detección: 0,005 µUI/ml
- Intervalo de medición: 0,005-100 µUI/ml
- Valores de referencia: 0,270-4,20 µUI/ml

Tirotoxina libre en suero (T4L): para la determinación cuantitativa in vitro de T4L en suero se utiliza un inmunoensayo ECLIA en un inmunoanalizador Cobas E602 (Roche Diagnostics®). Mediante el principio de competición, se incuba la muestra (15 µL) con un anticuerpo específico anti-T4 marcado con quelato de rutenio. Tras la incorporación de T4 marcada con biotina y de micropartículas recubiertas de estreptavidina, los puntos de fijación aún libres del anticuerpo marcado se ocupan formándose un complejo anticuerpo-hapteno. El complejo total

se fija a la fase sólida por la interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con ProCell/ProCell M. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

- Límite de detección: 0,5 pmol/l
- Intervalo de medición: 0,3-100 pmol/l
- Valores de referencia: Eutiroides: 12-22 pmol/l (0,93-1,7 ng/dl)

3.5.2.5 Parámetros bioquímicos del metabolismo lipídico

- Triglicéridos (suero)
- Colesterol (suero)
- cHDL (suero)
- cLDL (suero)

Triglicéridos en suero: Se utiliza un método enzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de triglicéridos en suero en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). El presente método se basa en el trabajo de Wahlefeld empleando una lipasa lipoproteica obtenida de microorganismos para hidrolizar completa y rápidamente triglicéridos a glicerol, con la oxidación subsiguiente a dihidroxiacetonafofato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo la acción catalítica de la peroxidasa con la 4-aminofenazona y 4-clorofenol para formar un colorante rojo en una reacción de punto final según Trinder. La intensidad cromática del colorante rojo formado es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos y puede medirse fotométricamente a una longitud de onda (sub/princ) 700/505 nm.

- Límite de detección: 8,85 mg/dl
- Intervalo de medición: 8,85-885 mg/dl
- Valores de referencia: < 200 mg/dl

Colesterol en suero: determinación mediante método enzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa del colesterol en suero en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). Los ésteres de colesterol se desdoblan por la acción de la colesterol esterasa a colesterol libre y ácidos grasos. La colesterol oxidasa cataliza entonces la oxidación de colesterol a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa, el peróxido de hidrógeno formado produce la unión oxidativa del fenol y la 4-aminofenazona para formar un colorante rojo de quinona-imina. La intensidad cromática del colorante formado es directamente proporcional a la concentración de colesterol. Se determina midiendo el aumento de la absorbancia a una longitud de onda (sub/princ) 700/505 nm.

- Límite de detección: 3,86 mg/dl
- Intervalo de medición: 3,86-800 mg/dl
- Valores de referencia: < 200 mg/dl

cHDL en suero: Determinación cuantitativa mediante un test colorimétrico enzimático homogéneo, de la concentración del cHDL en suero en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). En presencia de iones de magnesio, el sulfato de dextrano forma complejos hidrosolubles, selectivamente con LDL, VLDL y quilomicrones resistentes contra las enzimas modificadas con PEG. La concentración del cHDL se determina enzimáticamente mediante la colesterol esterasa y colesterol oxidasa acopladas con PEG a los grupos amínicos (aproximadamente 40 %). La colesterol esterasa provoca el desdoblamiento de los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos.

En presencia de oxígeno, el colesterol es oxidado por la colesterol oxidasa a Δ^4 -colesteno y peróxido de hidrógeno. Bajo la acción catalítica de la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-aminoantipirina y N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-dimetoxianilina sódica para formar un colorante purpúreo azul. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de colesterol que se mide fotométricamente a una longitud de onda (sub/princ) 700/600 nm.

- Límite de detección: 3 mg/dl
- Intervalo de medición: 3-120 mg/dl
- Valores de referencia: mujeres (> 65 mg/dl), hombres (> 55 mg/dl)

cLDL en suero: El cLDL-colesterol es un parámetro calculado a partir de la fórmula de Friedewald:

$$\text{cLDL (mg/dl)} = \text{Colesterol total} - \text{cHDL} - \text{VLDL}$$

Siendo a su vez el colesterol VLDL= triglicéridos/5. Si los triglicéridos tienen un valor superior a 400 mg/dl no se puede emplear la fórmula de Friedewald.

- Valores de referencia en población adulta: 50-200 mg/dl

3.5.2.6 Parámetros bioquímicos de inflamación

- Interleuquina 6 (IL-6) (suero)

Interleucina 6 en suero (IL-6): para la determinación cuantitativa in vitro de la IL-6 en suero se utiliza un inmunoensayo ECLIA, en un autoanalizador Cobas E411 (Roche Diagnostics®). Es una técnica tipo sándwich con una primera incubación de 30 µl de muestra con un anticuerpo monoclonal biotinilado específico anti-IL-6. Tras añadir un anticuerpo monoclonal específico anti-IL-6 marcado con quelato de rutenio (Quelato Tris (2-2'-bipiridina) rutenio (II) (Rubpy)²⁺₃) y micropartículas recubiertas de estreptavidina, los anticuerpos forman con el antígeno de la muestra un complejo sándwich. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

- Límite de detección: 1,5 pg/ml
- Intervalo de medición: 1,5-5000 pg/ml
- Valores de referencia: < 7 pg/ml.

3.5.2.7 Parámetros bioquímicos de remodelado óseo

a) Marcadores de formación

- Osteocalcina (OC) (suero)
- Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo 1 (P1NP) (suero)

Osteocalcina en suero (OC): Se utiliza un test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa del fragmento N-MID de la OC en suero. Este inmunoensayo ECLIA se realiza en un autoanalizador Cobas E411 (Roche Diagnostics®). El test Elecsys N-MID Osteocalcin emplea dos anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra los epítomos del fragmento N-MID y del fragmento N-terminal, detectando con ello tanto el fragmento N-MID estable como la osteocalcina (aún) intacta. El test no depende del inestable fragmento C-terminal (aminoácidos 43-49) de la molécula de osteocalcina y garantiza así resultados de medición constantes. Es una técnica tipo sándwich con una primera incubación: 20 µL de muestra, un anticuerpo biotinilado monoclonal específico anti-osteocalcina N-MID y un anticuerpo específico monoclonal anti-osteocalcina N-MID marcado con quelato de rutenio ([Quelato Tris (2-2'-bipiridina) rutenio (II)] (Rubpy)₂₊₃) que forman un complejo sándwich. Después de incorporar las micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con ProCell/ProCell M. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

- Límite de detección: < 0,500 ng/ml
- Intervalo de medición: 0,500-300 ng/ml

Valores de referencia:

- Mujeres:
 - Premenopausia (> 20 años): 11-43 ng/ml
 - Postmenopausia: 15-46 ng/ml
 - Pacientes con osteoporosis: 13-48 ng/ml

- Hombres:
 - 18 - 29 años: 24-70 ng/ml
 - 51-70 años: 14-42 ng/ml
 - > 70 años: 14-46 ng/ml

Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo 1 en suero (P1NP): la determinación del P1NP en suero se realiza mediante el test total P1NP, un inmunoensayo ECLIA en un autoanalizador Cobas E411 (Roche Diagnostics®). El test Elecsys P1NP detecta tanto la estructura trimérica como la monomérica, por lo tanto se considera un análisis del P1NP total. Para ellos se incubaron 20 µl de muestra y un anticuerpo biotinilado monoclonal específico anti-P1NP. Después de incorporar un anticuerpo monoclonal anti-P1NP marcado con quelato de rutenio, se forma un complejo tipo sándwich que se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con ProCell/ProCell M. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

- Límite de detección: 5ng/ml
- Intervalo de medición: 5-1200 ng/ml

Valores de referencia:

- Mujeres:
 - Premenopausia (> 20 años): 4,5 - 55,7 ng/ml
 - Postmenopausia: 19,6 - 61,2 ng/ml
- Hombres: 11,4 - 80,6 ng/ml

b) Marcadores de resorción

Beta-CrossLaps (β-CTX): para la determinación cuantitativa de los productos de degradación del colágeno de tipo I en suero se utiliza un test inmunológico ECLIA en un autoanalizador Cobas E411 (Roche Diagnostics®). El test Elecsys β-CTX/serum está destinado específicamente para determinar los fragmentos reticulados isomerizados de colágeno de tipo I independientemente de la naturaleza de la reticulación (pirroles, piridinolinas, etc.). La

especificidad del test está garantizada por la aplicación de dos anticuerpos monoclonales que reconocen los octapéptidos lineares β -8AA (EKAHD- β -GGR). El test Elecsys β -CTX/serum cuantifica así todos los fragmentos de la degradación del colágeno de tipo I que contienen el octapéptido β -8AA isomerizado (β -CTX) por partida doble. Es una técnica sándwich con una primera incubación de 50 μ l de muestra y un anticuerpo biotinilado monoclonal anti- β -CTX que se incuban, liberándose de los componentes séricos el antígeno de la muestra. Tras añadir un anticuerpo específico monoclonal anti- β -CTX marcado con quelato de rutenio se forma un complejo sándwich que, con el auxilio de micropartículas recubiertas de estreptavidina, se fija a la fase sólida por la interacción de la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con ProCell/ProCell M. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

- Límite de detección: 0,01 ng/ml
- Intervalo de medición: 0,010-6,00 ng/ml

Valores de referencia:

- Mujeres:
 - Premenopausia (> 20 años): 0 - 0,30 ng/ml
 - Postmenopausia 0 - 0,56 ng/ml
- Hombres: 0 - 0,30 ng/ml

3.6 Estudio genético

El diagnóstico molecular diferencial de los SNPs con mayor vinculación con la pérdida de masa ósea y riesgo de fractura, se llevó a cabo con un sistema de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) en un termociclador LightCycler 2.0® (Roche Diagnostics®).

El ADN genómico se extrae de sangre venosa total (EDTA-K3) con el kit de extracción de CLART®MetaBone (GENOMICA) y se almacena a -20°C hasta su análisis definitivo.

Los genes estudiados en el presente estudio son: el VDR, el ESR1, gen de la OPG, gen del RANKL y gen de la IL-6. Estos genes pueden presentar mutaciones puntuales o SNPs localizados en posiciones específicas del gen, responsables de los síntomas de estos trastornos.

La prevalencia en la población sana de los diferentes polimorfismos estudiados ha sido obtenida del proyecto GENOMOS 1000 (128).

3.6.1 Obtención de muestras

Las muestras de sangre total, recogidas en tubos con EDTA-K3, necesarias para la posterior extracción de ADN, se recogieron tras haber realizado un hemograma de control.

3.6.2 Extracción y purificación de ADN genómico

Para la extracción y purificación de ADN genómico, se utilizó un método de extracción manual en columna con el kit de Extracción y Purificación CLART®MetaBone (GENOMICA) con el siguiente flujo de trabajo (Figura 17).

1. A 200 μ l de sangre total le añadimos 25 μ l de Proteinasa K. Posteriormente añadimos 200 μ l de Solución B3. Mezclamos en vortex durante 20 segundos e incubamos a 70°C durante 30 min.
2. Añadimos 210 μ l de etanol 96% a cada muestra y agitamos en vortex inmediatamente.
3. Preparamos una columna de purificación por muestra y la colocamos en un tubo de recogida de 2 ml. Añadimos la muestra y centrifugamos durante 1 minuto a 12.000 rpm. Descartamos el fluido filtrado. Añadimos 500 μ l de la Solución BW a la columna. Centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto. Descartamos el fluido filtrado. Añadimos 600 μ l de Solución B5 a la columna. Centrifugamos a 12000 rpm durante 1 min. Descartamos el fluido filtrado. Reinsertamos la columna en el tubo de recogida. Centrifugamos a 12.000 rpm durante 1 minuto para eliminar cualquier resto de la Solución B5.
4. Colocamos la columna en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml. Añadimos 60 μ l de la Solución BE (previamente calentada a 70°C) sobre el filtro sin tocarlo. Incubamos esta solución caliente en la columna a temperatura ambiente durante 3 minutos. Centrifugamos a 12.000 rpm. durante 1 minuto. Recuperamos el filtrado que contiene el ADN (aproximadamente 60 μ l) en el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.

5. Cuantificamos el ADN extraído. Verificamos que el ADN extraído fuera de concentración y pureza adecuada. Esto se lleva a cabo mediante espectrofotometría en un NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific) siguiendo los siguientes criterios:

- Para valorar la concentración, se determinó a una absorbancia de 260 nm, a la que absorben los ácidos nucleicos, indicando una buena reproducibilidad con valores comprendidos entre 0,1-0,5.
- Se determinó la relación A260/A280 nm con la finalidad de obtener la calidad del ADN extraído. Valores comprendidos entre 1,7 y 2,0 indican que no hay contaminación con proteínas.

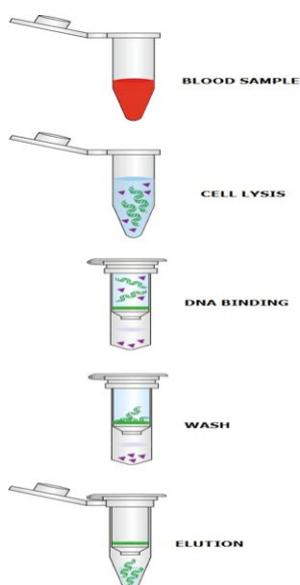


Figura 17: Extracción y purificación de ADN genómico.

Estas muestras se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior procesamiento.

3.6.3 Fundamento de la técnica qPCR

La qPCR es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa convencional, utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación del ADN.

El sistema de LightCycler® HybProbe se basa en el principio de Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET), que consiste en que un fluoróforo dador, que es excitado por una fuente de luz LED, transfiere su energía a un fluoróforo aceptor sólo cuando éste se encuentra situado en proximidad directa con el primero.

Se añaden a la mezcla de reacción dos sondas de hibridación FRET oligonucleotídicas específicas de la secuencia, marcadas con diferentes fluoróforos (donante y aceptor), además de cebadores de PCR. Las sondas de hibridación FRET (HybProbe) consisten en un par de sondas de oligonucleótidos, una marcada con fluoresceína en su extremo 3' terminal (donante o **reporter**) y la otra marcada en su extremo 5' con LC Red 640 (aceptor o **quencher**). Estas sondas están diseñadas para que hibriden muy cerca una de la otra (ente 1 y 5 nucleótidos en “cabeza-cola”), deben localizarse en la misma cadena, situadas en la mitad del amplificado o cerca de la mitad, pero sin solapar con los primers de la cadena complementaria. El fluoróforo donante (fluoresceína) es excitado por la fuente de luz LED y la energía emitida por el colorante donante excita al colorante aceptor unido a la segunda sonda HybProbe, que emite luz fluorescente a una longitud de onda diferente. La luz LED no excita al fluoróforo aceptor.

Dicha FRET no se produce cuando los dos fluorocromos están distantes, causa que se genera cuando se produce la hidrólisis de la sonda debido la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa que avanza amplificando la hebra molde. Por lo tanto cuando el reporter se libera, emite fluorescencia y esta señal es proporcional a la cantidad de producto amplificado. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen, ya que LightCycler® tiene cuatro canales de detección optimizados, a 610nm, a 640 nm, a 670nm y a 705nm. Por lo tanto, la característica fundamental de la qPCR es que a partir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo durante la reacción de la ADN polimerasa, se puede medir la cantidad de ADN sintetizado por la ésta en cada ciclo, ya que la emisión de la fluorescencia producida es proporcional a la cantidad de producto formado (Figura 18).

A medida que se van produciendo más amplificaciones durante la qPCR, la fluorescencia va aumentando. El equipo permite visualizar en cada momento el aumento de fluorescencia, indicativo del crecimiento exponencial de los productos de la reacción. El ciclo a partir del cual se produce un incremento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base, se denomina Cp (crossing point) (Figura 19).

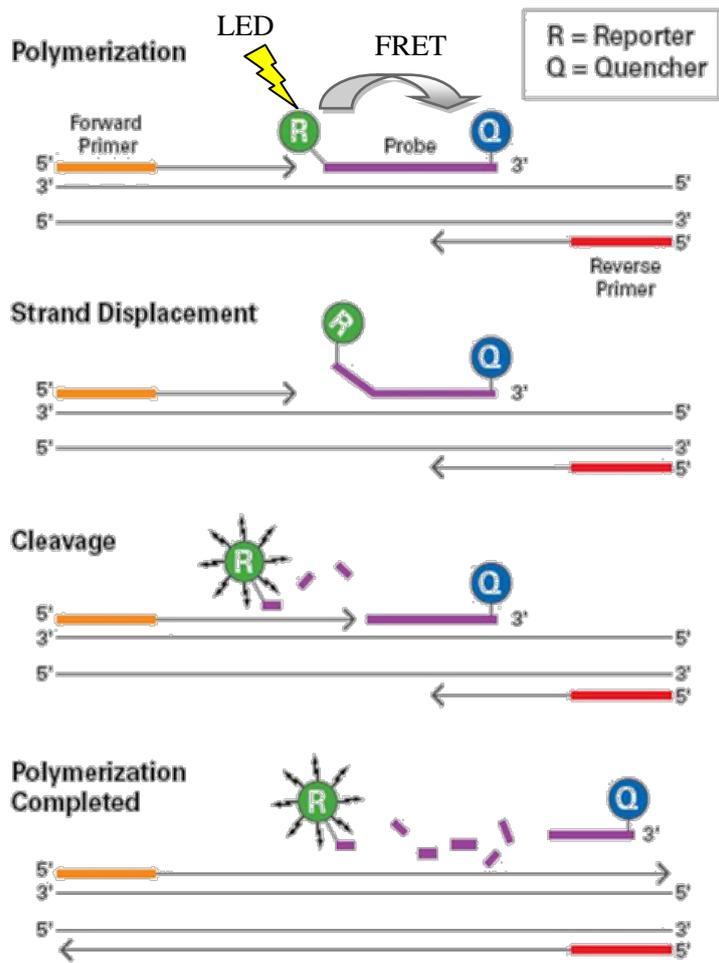


Figura 18: Fundamento de la qPCR (129).

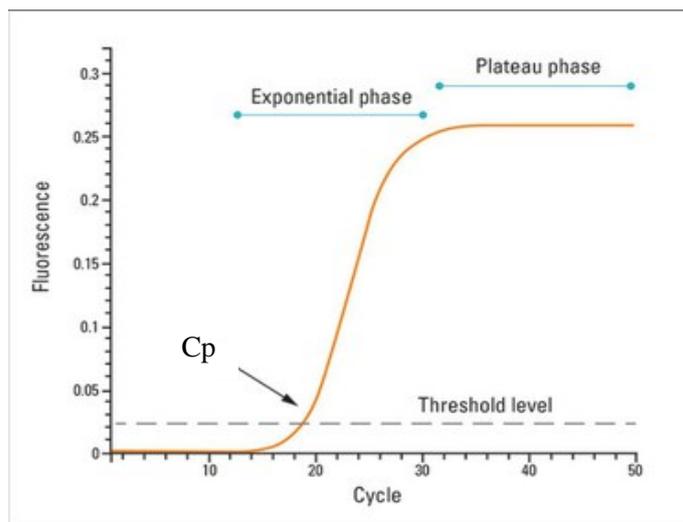


Figura 19: Curva de fluorescencia de la qPCR. La flecha indica el Cp, ciclo umbral a partir del cual la qPCR pasa a fase exponencial y comienza a aumentar de forma significativa la fluorescencia (129).

3.6.4 Protocolo de amplificación por qPCR

La reacción de amplificación, qPCR, se realiza en un Termociclador LightCycler® con una FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics®). Para ello se usan dos oligonucleótidos sintéticos (cebadores o primers) de unas 20 bases complementarias a la zona que se quiere amplificar. Las secuencias utilizadas para el diseño de los primers en los polimorfismos fueron:

- **SNP BsmI del VDR (rs1544410):**
GTTCCCTGGGGCCACAGACAGGCCTGC [A/G] CATTCCAATACTCAGGTCTGCTC
- **SNP ApaI del VDR (rs7975232):**
GAAGGCACAGGAGCTCTCAGCTGGGC [A/C] CCTCACTGCTCAATCCCACCACCCC
- **SNP TaqI del VDR (rs731236):**
CCTGGGGTGCAGGACGCCGCGCTGAT [C/T] GAGGCCATCCAGGACCGCCTGTCCA
- **SNP FokI del VDR (rs2228570):**
TGGCCTGCTTGCTGTTCTTACAGGGA [C/T] GGAGGCAATGGCGGCCAGCACTTCC
- **SNP PvuII del ESR1 (rs2234693):**
TTCATCTGTTCCAAATGTCCCAGC [C/T] GTTTTATGCTTTGTCTCTGTTTCCC
- **SNP XbaI del ESR1 (rs9340799):**
TTTCCCAGAGACCCTGAGTGTGGTCT [A/G] GAGTTGGGATGAGCATTGGTCTCTA
- **SNP 1181 G/C de la OPG (rs 2073618):**
GGTTTCCGGGGACCACAATGAACAA [C/G] TTGCTGTGCTGCGCGCTCGTGGTAA
- **SNP 163 A/G de la OPG (rs 3102735):**
CTCTAGGGTTCGCTGTCTCCCCCAT [A/G] AATCCCTGGTCTAGAAGTTAGACT
- **SNP 245 C/T de la OPG (rs 3134070):**
GGTCTTTCCACTAGCCTCAAGCTAT [C/T] GACAGAAGTTTGGCACTTTGCTCTA
- **SNP A/G del RANKL (rs 2277438):**
TTGTTGGGGACATAAAGACTCTTGC [A/G] AGTATGAATTTTTTGTCTTAAGTC
- **SNP 174 G/C del gen IL-6 (rs1800795):**
CACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGC [C/G] ATGCTAAAGGACGTCACATTGCACA

En el sistema LightCycler® (Figura 20A), la reacción transcurre en capilares de vidrio de 20 µl de capacidad (Figura 20B).



Figura 20: Termociclador LightCycler 2.0® (A), capilares de reacción (B).

Para la realización del ensayo, preparamos la mezcla de reacción, que contiene los elementos necesarios para llevar a cabo la reacción de qPCR (primers específicos, sondas FRET, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), tampón de reacción con $MgCl_2$ y agua), en las cantidades indicadas en la Figura 21. A esta mezcla se le añade la enzima responsable de la amplificación, la FastStart ADN Master (Taq polimerasa) y el ADN problema, ajustando la cantidad en función de su concentración con el objetivo de obtener una concentración aproximada de 50 ng de ADN en los 20 μ l de mezcla.

Preparation of the reaction mix:	
20 μl reaction mixture	
H ₂ O	14.4 – 10.4 μ l
Reagent Mix	1.0 μ l
FastStart DNA Master ⁽¹⁾	2.0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.6 μ l
DNA	1.0 – 5.0 μ l (~ 50 ng)
Final MgCl₂ conc.:	3.0 mM

⁽¹⁾LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

Figura 21: Composición de la mezcla de reacción utilizada.

Para evitar amplificaciones inespecíficas, y durante la preparación del ensayo, todos los reactivos se mantienen en un termobloque a 4°C, evitando así que los cebadores entren en contacto con la muestra de ADN hasta el momento de iniciar la reacción. Una característica especial de esta técnica es que la ADN Polimerasa, FastStart Taq, que es una ADN polimerasa modificada químicamente, está inactiva a temperatura ambiente y se activa a altas temperaturas, por ello la qPCR comienza con una etapa de preincubación a 95°C durante 5-10 minutos. Tras tapar los capilares, se centrifugan a 3000 rpm durante 15 segundos, para concentrar la mezcla de reacción en el fondo del capilar y se colocan en el LightCycler® para iniciar el programa de qPCR diseñado para cada transcrito.

El programa de qPCR es común para todos los SNPs y consta de cuatro etapas distintas (Figura 22):

- Activación enzimática a 95°C de la polimerasa FastStart Taq.
- Amplificación del producto. Incluye las siguientes fases, que se repiten durante 45 ciclos:
 - Desnaturalización del ADN a 95°C, 10s. De esta manera conseguimos romper los puentes de hidrógeno entre las bases y separar las dos hebras.
 - Annealing o hibridación de los primers a 60°C, 10s. Los cebadores se unen a las secuencias de los extremos del fragmento a amplificar. Con los primers usados, la T^a óptima de annealing fue de 60°C en todos los casos.
 - Extensión de los primers por la Taq polimerasa que va a incorporar dNTPs al extremo 3'. Se realiza a 72°C, 15s.
- Melting (temperatura de melting, T_m, o de fusión). En ella se establece un gradiente de temperaturas. En primer lugar, se produce un calentamiento rápido a 95°C seguido de un enfriamiento hasta los 40°C. A partir de este momento se genera un calentamiento lento, a una velocidad de 0,2°C/seg, hasta alcanzar 85°C. En esta fase se va a producir la separación de las hebras de la doble hélice. La T_m representa la temperatura a la cual el 50% de la sonda se ha dissociado de su ADN complementario. La T_m determina la especificidad de la qPCR ya que depende de la longitud del segmento, de la fuerza iónica y de la cantidad de bases G y C que contiene.
- Enfriamiento rápido a 40°C.

Programming LightCycler® 1.x / 2.0 Instruments:

Program:	Denaturation		Cycling			Melting			Cooling
Parameter									
Analysis Mode	None		Quantification			Melting Curves			None
Cycles	1		45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1	
Target [°C]	95	95	60	72	95	40	85	40	
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30	
Ramp Rate [°C/s]	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	0.2	20.0	
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continu.	None	

Figura 22: Programa utilizado con LightCycler 2.0®.

3.6.5 Lectura e interpretación de los resultados

La fluorescencia emitida por cada producto amplificado se midió en cuatro canales de detección, cuyas longitudes de onda fueron 610 nm, 640 nm, 670 nm y 705 nm. Después del programa de amplificación de PCR en tiempo real y el proceso de disociación de sondas, se genera automáticamente un informe de curvas de fusión que permite diferenciar el genotipo del ADN analizado en función de la temperatura a la que se desnaturaliza el producto amplificado (T_m) (Tabla 10). Las sondas se unen en función del genotipo de la muestra, el cual se visualiza a través de las curvas de fusión específicas para cada alelo (Figura 23).

Tabla 10: Temperatura melting de los diferentes alelos de los polimorfismos estudiados

POLIMORFISMO	TM1 (Alelo)	TM2 (Alelo)
BsmI (rs 1544410)	58,55 - alelo A	66,3 - alelo G
ApaI (rs 7975232)	58,54 - alelo T	67,68 - alelo C
TaqI (rs 731236)	62,76 - alelo C	69,89 - alelo A
FokI (rs 2228570)	57,51 - alelo C	63,82- alelo T
PvuII (rs 2234693)	54,66 - alelo T	63,76- alelo C
XbaI (rs 9340799)	52,41 - alelo G	58,14- alelo A
1181 G/C OPG (rs 2073618)	59,10 - alelo C	63,60- alelo G
163 A/G OPG (rs 3102735)	55,01 - alelo T	63,25- alelo C
245 T/G OPG (rs3134070)	55,01 - alelo T	63,25- alelo C
RANKL A/G (rs 2277438)	52,85 - alelo A	61,08- alelo G
174 G/C IL-6 (rs 1800795)	57,39 - alelo C	64,22- alelo G

TM: temperatura melting (°C)

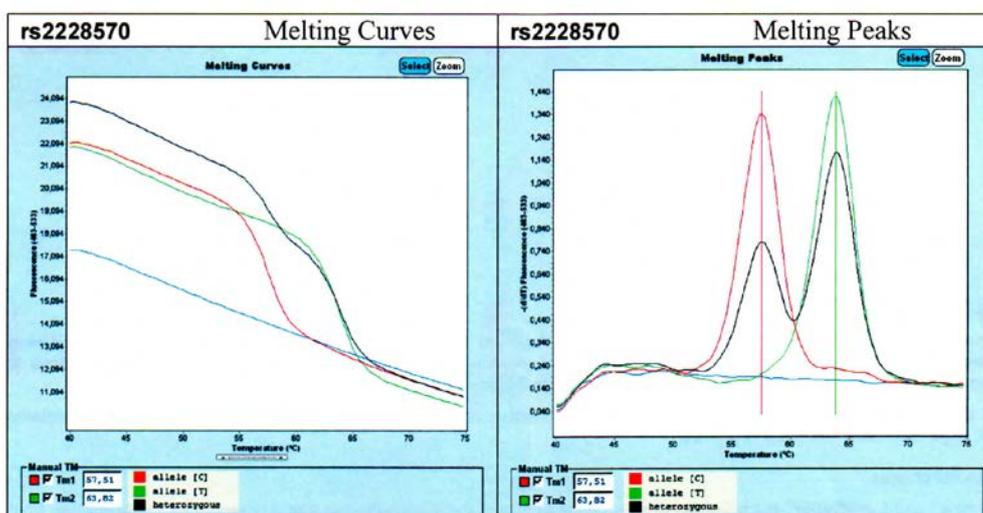


Figura 23: Interpretación de resultados de curvas melting.

En la Figura 23 el gráfico de la izquierda representa la fluorescencia frente a la temperatura, correspondiente a la reacción de disociación (post-amplificación) y el gráfico de la derecha representa la derivada de la fluorescencia frente a la temperatura con su pico de disociación correspondiente a la T_m . La barra vertical representa la T_m . En este ejemplo, la curva roja representa al alelo C con una $T_m = 57.51^\circ\text{C}$ y la curva verde al alelo T con una $T_m = 63.82^\circ\text{C}$. La curva negra pertenece a un sujeto heterocigoto con los dos picos a las dos T_m , la del alelo C y la del alelo T.

3.7 Estudio estadístico

Para realizar el análisis estadístico, los resultados se procesaron mediante el programa estadístico SPSS para Windows, versión 15.0 (Chicago, Illinois, USA).

Se aplicó la prueba de *Kolmogorov-Smirnov* a todas las variables estudiadas, para comprobar que las variables seguían una distribución normal, en el caso de no mostrar una distribución normal se realizaron transformaciones logarítmicas en las que se constató esta distribución. La estadística empleada fue paramétrica, excepto en los casos en los que no se constató esta distribución normal que se emplearon test no paramétricos.

El análisis estadístico descriptivo para cada variable consistió en el cálculo de medidas de centralización y dispersión en el caso de variables de tipo cuantitativo, media y desviación estándar para variables con distribución normal y mediana y rango intercuartílico para las que no mostraron una distribución normal, y distribución de frecuencias en % en el caso de variables de tipo cualitativo.

Las comparaciones entre los dos subgrupos de DM de los parámetros bioquímicos se realizaron mediante el test *t Student*, o mediante el test *U-Mann-Whitney* si las variables no seguían una distribución normal. Las variables cualitativas fueron comparadas mediante test de *Chi-cuadrado* con test *exacto de Fisher*, en caso de ser relevante.

Para estudiar si ha habido diferencias entre las medidas basales y anuales de los diferentes marcadores bioquímicos en pacientes diabéticos tipo 1 y por otro lado, en los tipo 2, se ha aplicado el test de la *T de Student para datos apareados*.

Para las comparaciones entre los diferentes puntos temporales se aplicó el *ANOVA de medidas repetidas*. En el estudio de las correlaciones se ha utilizado el *coeficiente de correlación de Pearson o Spearman*, según siguieran o no, una distribución normal.

Para el análisis de los polimorfismos se ha calculado el *equilibrio Hardy-Weinberg* mediante el test de *Chi-cuadrado*. La comparación entre la prevalencia de los diferentes SNPs estudiados en nuestra muestra y la población sana ha sido realizada mediante el test *Chi-cuadrado*. La relación entre los diferentes polimorfismos y la DMO basal ha sido calculada mediante el *ANOVA*.

Además, se realizó un análisis de regresión logística binaria, tomando como variables dependientes el diagnóstico de osteopenia, y como covariables diversos biomarcadores así como factores clínicos. Se realizó un análisis multivariado de regresión logística, donde se incluyeron, de entre todas las variables con una $p < 0,15$ en el análisis univariado, aquellas que presentaron un mejor nivel de significación y se consideraron clínicamente importantes para el modelo, obteniendo el modelo más reducido posible que explicase los datos, sin compromiso del rendimiento diagnóstico. Así mismo se calculó el índice de discriminación integrado (IDI) para cada modelo y se calculó la Odds Ratio y su intervalo de confianza.

El IDI se define como la diferencia de las medias de las probabilidades del evento (en nuestro caso, patología ósea), estimadas por los diferentes modelos en los pacientes que hacen el evento (pacientes que tienen patología ósea), menos la misma diferencia en aquellos que no hacen el evento (pacientes sin patología ósea). El IDI representa lo que mejora en promedio el nuevo modelo en cuanto a la predicción de más verdaderos eventos, descontando lo que empeora por la predicción de falsos eventos (130).

El nivel de significación estadística utilizado en los contrastes de hipótesis fue de $p < 0,05$.

IV RESULTADOS

4 RESULTADOS

El análisis de los resultados se realizó de forma independiente en los dos grupos de estudio, el grupo compuesto por pacientes con DM1 y el grupo de pacientes con DM2 y posteriormente se intercompararon ambos grupos. Los resultados se abordaron de manera específica para cada uno de los objetivos planteados.

4.1 Objetivo 1: Análisis descriptivo de las características clínicas de los pacientes en el momento del reclutamiento

4.1.1 Características generales de los pacientes

Se realizó un estudio prospectivo en una población formada por 165 pacientes diagnosticados de DM que acuden a consulta para el seguimiento de rutina de su patología en el Servicio de Endocrinología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia). Del total de los pacientes estudiados, 53 presentaban DM1 (28 hombres y 25 mujeres) y 112 DM2 (72 hombres y 40 mujeres).

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución de sexo entre ambos grupos de DM. En la Tabla 11 y Figura 24 se muestran los datos correspondientes a la edad y los años de evolución en ambos tipos de DM. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ambas características entre los dos grupos ($p < 0,001$).

Tabla 11: Edad y años de evolución de los pacientes

VARIABLE	Mediana		Percentil 25 - percentil 75		p
	DM1 (n=53)	DM2 (n=112)	DM1	DM2	
Edad (años)	41	60	31-48	51-66	<0,001
Años de evolución	16	12	12-28	7-18	<0,001

Los datos se expresan como n (número de casos), y mediana y rango intercuartílico.

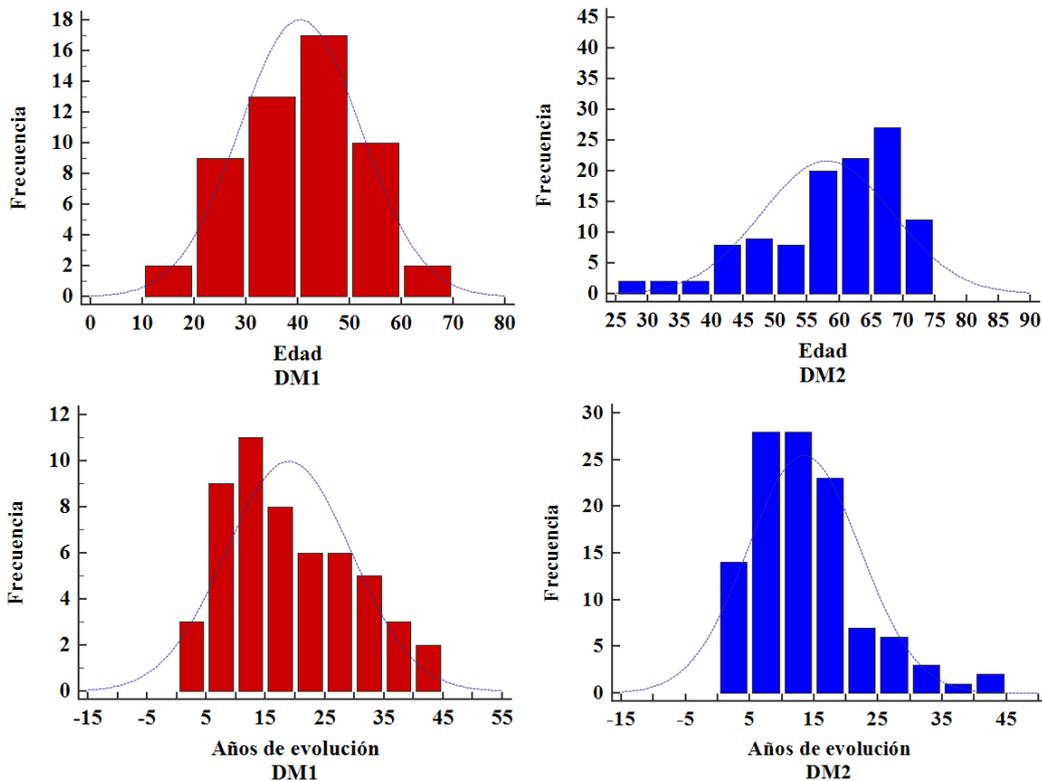


Figura 24: Distribución de edad y años de evolución en DM1 y DM2.

4.1.2 Características clínicas de la población estudiada

Se analizaron los datos clínicos recogidos mediante el cuestionario que todos los pacientes rellenaron en la primera visita médica.

En la Tabla 12 se describe la distribución de frecuencias de estos datos. En la Figura 25 se muestran las frecuencias de aquellas características clínicas de la población estudiada que presentan diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de DM como son la presencia de obesidad ($p < 0,001$), de cardiopatía isquémica ($p = 0,010$), de HTA ($p < 0,001$) y de dislipemia ($p < 0,001$), excluyendo de esta representación las diferencias en el tratamiento de los pacientes.

Tabla 12: Características clínicas de los dos grupos de población a estudio. Los datos se expresan como porcentaje.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	Frecuencia (%)		p
	DM1	DM2	
Presencia de obesidad	15,1	75,9	p<0,001
Bajo peso	3,8	0,0	p<0,001
Normopeso	47,2	6,3	
Sobrepeso	34,0	17,9	
Obesidad tipo 1	13,2	41,1	
Obesidad tipo 2	0,0	24,1	
Obesidad tipo 3	1,9	10,7	
Microangiopatía	5,7	5,4	n.s.
Nefropatía	26,4	24,1	n.s.
Retinopatía	30,2	26,8	n.s.
Accidente cerebrovascular	0,0	0,9	n.s.
Neuropatía	18,9	14,3	n.s.
Cardiopatía isquémica	0,0	11,6	0,010
Enfermedad arterial periférica	3,8	3,6	n.s.
HTA	9,4	59,8	p<0,001
Dislipemia	18,9	75,0	p<0,001
Tabaquismo	30,2	25,0	n.s.
Exposición al sol muy baja	2,3	8,6	n.s.
Exposición al sol suficiente	25	31,2	n.s.
Exposición al sol alta	72,7	60,2	n.s.
Consumo alcohol	0,0	0,9	n.s.
Actividad física sedentaria	15,9	30,2	n.s.
Actividad física ligera	59,1	48,1	
Actividad física moderada	18,2	17,9	
Actividad física alta	6,8	3,8	
Fracturas previas	20,8	30,4	n.s.
Consumo corticoides	5,7	4,5	n.s.
Padres con fractura	13,2	12,5	n.s.
Artritis reumatoide	1,9	3,6	n.s.

n.s.: no significativo (p>0,05).

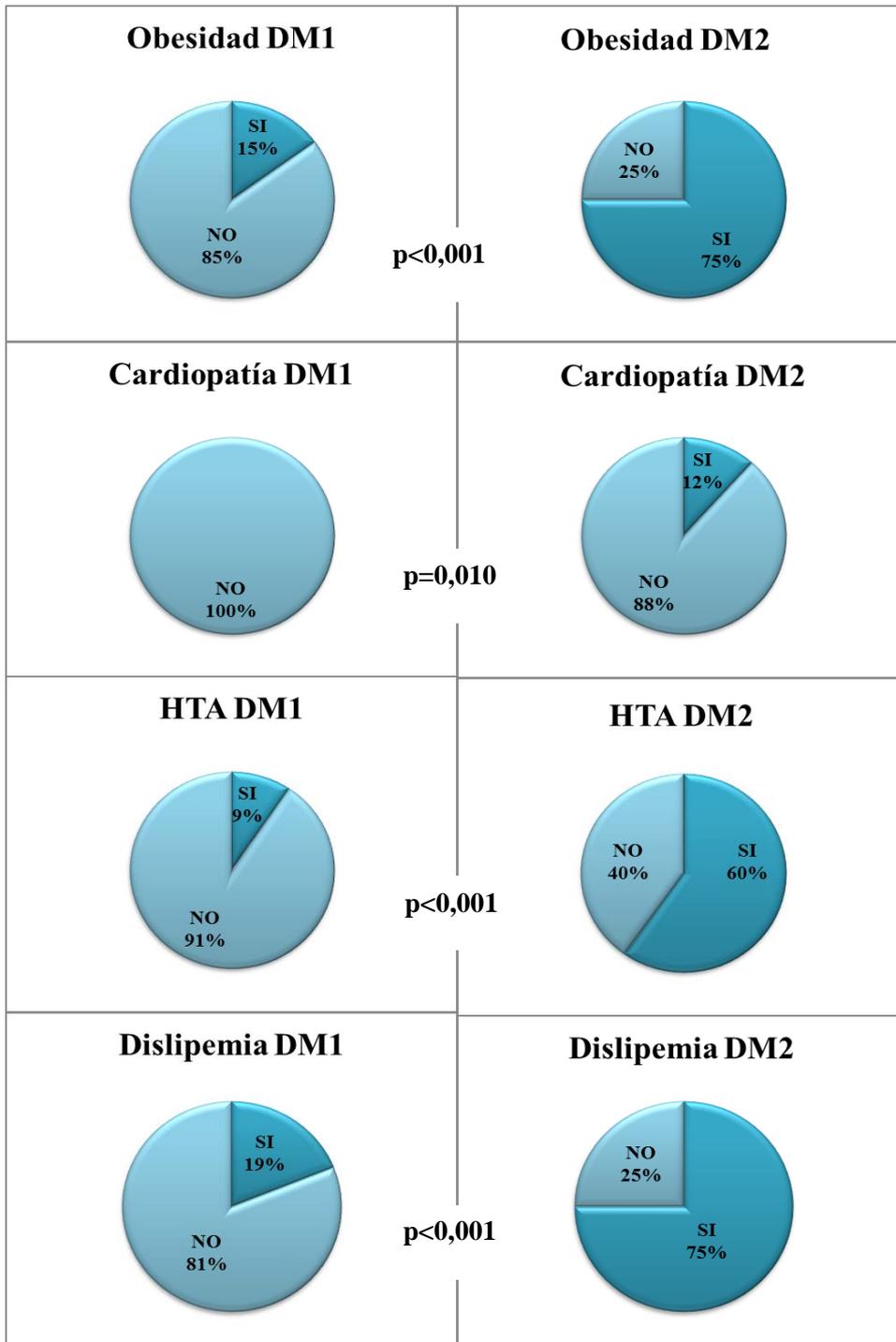


Figura 25: Distribución en % de las variables clínicas con diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$

4.2 Objetivo 2: Determinar los valores de DMO mediante DEXA en el momento basal y a los 12 meses y calcular el riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX® en la población diabética

4.2.1 Pruebas densitométricas para evaluar la DMO de los pacientes

Se evaluó mediante DEXA la DMO de los pacientes en el momento del reclutamiento y a los 12 meses, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la medida de la DMO en cadera entre los pacientes con DM1 y con DM2 tanto en la determinación basal como en la anual, y con tendencia a la significación en DMO lumbar, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la medida basal y la anual en cada uno de los grupos estudiados. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los valores de DMO en función del sexo, ni en DM1 ni en DM2. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 13.

Tabla 13: Valores de DMO por DEXA en los dos grupos de población a estudio expresados como T-score.

DENSIDAD MINERAL ÓSEA	DM 1		DM 2		p
	Media	DE	Media	DE	
T-score cadera basal	0,61	1,23	0,01	1,48	0,032
T-score lumbar basal	0,60	1,52	1,04	1,83	n.s.
T-score cadera anual	0,59	1,28	-0,15	1,32	0,036
T-score lumbar anual	0,39	1,60	0,97	1,83	n.s.

DE: desviación estándar. n.s.: no significativo (p>0.05).

Cuando se aplicaron los criterios de la OMS para el diagnóstico de osteopenia y osteoporosis basados en el T-score, el 22,5% de los pacientes con DM1 tenían osteopenia en el momento del reclutamiento y el 77.5% tenían una DMO normal. En cuanto a los DM2 el 23,7% se diagnosticó con osteopenia, frente al 72% de los normales, encontrándose presencia de osteoporosis en DM2 en el 4,3% de los pacientes estudiados.

En la Tabla 14 se muestran los datos obtenidos de la comparación de la población de ambos tipos de diabetes clasificados según presentaran o no osteopenia. No se observan diferencias significativas entre las características clínicas de la población entre los pacientes osteopénicos y con DMO normal.

Tabla 14: Características de la población diabética dividida en dos grupos según el criterio densitométrico de osteopenia

VARIABLES CLÍNICAS		% DM1			% DM2		
		Normal	Osteopenia	p	Normal	Osteopenia	p
Obesidad	No	69,0	31,0	n.s.	56,0	44,0	n.s.
	Sí	100,0	0,0		77,4	22,6	
Tipo obesidad	Bajo peso	0,0	0,0	n.s.	0,0	0,0	n.s.
	Normopeso	63,2	36,8		40,0	60,0	
	Sobrepeso	81,8	18,2		66,7	33,3	
	Tipo 1	100,0	0,0		78,6	21,4	
	Tipo 2	-	-		60,0	40,0	
Tipo 3	100,0	0,0	87,5	12,5			
Microangiopatía	No	71,0	29,0	n.s.	69,9%	30,1%	n.s.
	Sí	100,0	0,0		80,0	20,0	
Nefropatía	No	79,2	20,8	n.s.	69,5	30,5	n.s.
	Sí	60,0	40,0		73,7	26,3	
Retinopatía	No	75,0	25,0	n.s.	64,9	35,1	n.s.
	Sí	70,0	30,0		85,7	14,3	
Accidente cerebrovascular	No	73,5	26,5	n.s.	70,1	29,9	n.s.
	Sí	0,0	0,0		100,0	100,0	
Neuropatía	No	75,0	25,0	n.s.	68,7	31,3	n.s.
	Sí	66,7	33,3		81,8	18,2	
Cardiopatía isquémica	No	73,5	26,5	n.s.	73,1	26,9	n.s.
	Sí	0,0	0,0		54,5	45,5	
Enfermedad arterial periférica	No	72,7	27,3	n.s.	70,7	29,3	n.s.
	Sí	100,0	0,0		66,7	33,3	
HTA	No	74,2	25,8	n.s.	76,7	23,3	n.s.
	Sí	66,7	33,3		66,7	33,3	
Dislipemia	No	74,1	25,9	n.s.	72,2	27,8	n.s.
	Sí	71,4	28,6		70,0	30,0	
Tabaquismo	No	63,6	36,4	n.s.	68,3	31,7	n.s.
	Sí	91,7	8,3		77,8	22,2	
Exposición al sol	Muy baja	-	-	n.s.	100,0	0,0	n.s.
	Suficiente	85,7	14,3		62,5	37,5	
	Alta	66,7	33,3		64,7	35,3	
Consumo alcohol	No	73,5	26,5	n.s.	70,5	29,5	n.s.
	Sí	-	-		-	-	
Actividad física	Sedentaria	100,0	0,0	n.s.	65,2	34,8	n.s.
	Ligera	65,0	35,0		71,4	28,6	
	Moderada	66,7	33,3		76,9	23,1	
	Alta	50,0	50,0		0,0	100,0	
Fracturas previas	No	75,0	25,0	n.s.	76,5	23,5	n.s.
	Sí	62,5	37,5		54,2	45,8	
Consumo corticoides	No	69,0	31,0	n.s.	68,3	31,7	n.s.
	Sí	100,0	0,0		100,0	0,0	
Padres con fractura	No	73,1	26,9	n.s.	66,1	33,9	n.s.
	Sí	60,0	40,0		80,0	20,0	
Artritis reumatoide	No	71,9	28,1	n.s.	68,9	31,1	n.s.
	Sí	-	-		100,0	0,0	

n.s.: no significativo (p>0.05).

Se estudió el grado de asociación entre las variables clínicas y los valores de DMO por DEXA, expresados como T-score, utilizando para ello el coeficiente de correlación de Spearman. Se observa una correlación significativa y positiva con el peso y la presencia de obesidad, demostrando una mayor DMO lumbar en pacientes obesos en ambos tipos de DM (DM1: $r=0,646$ y $p=0,002$, DM2: $r=0,306$ y $p=0,005$) (Figura 26).

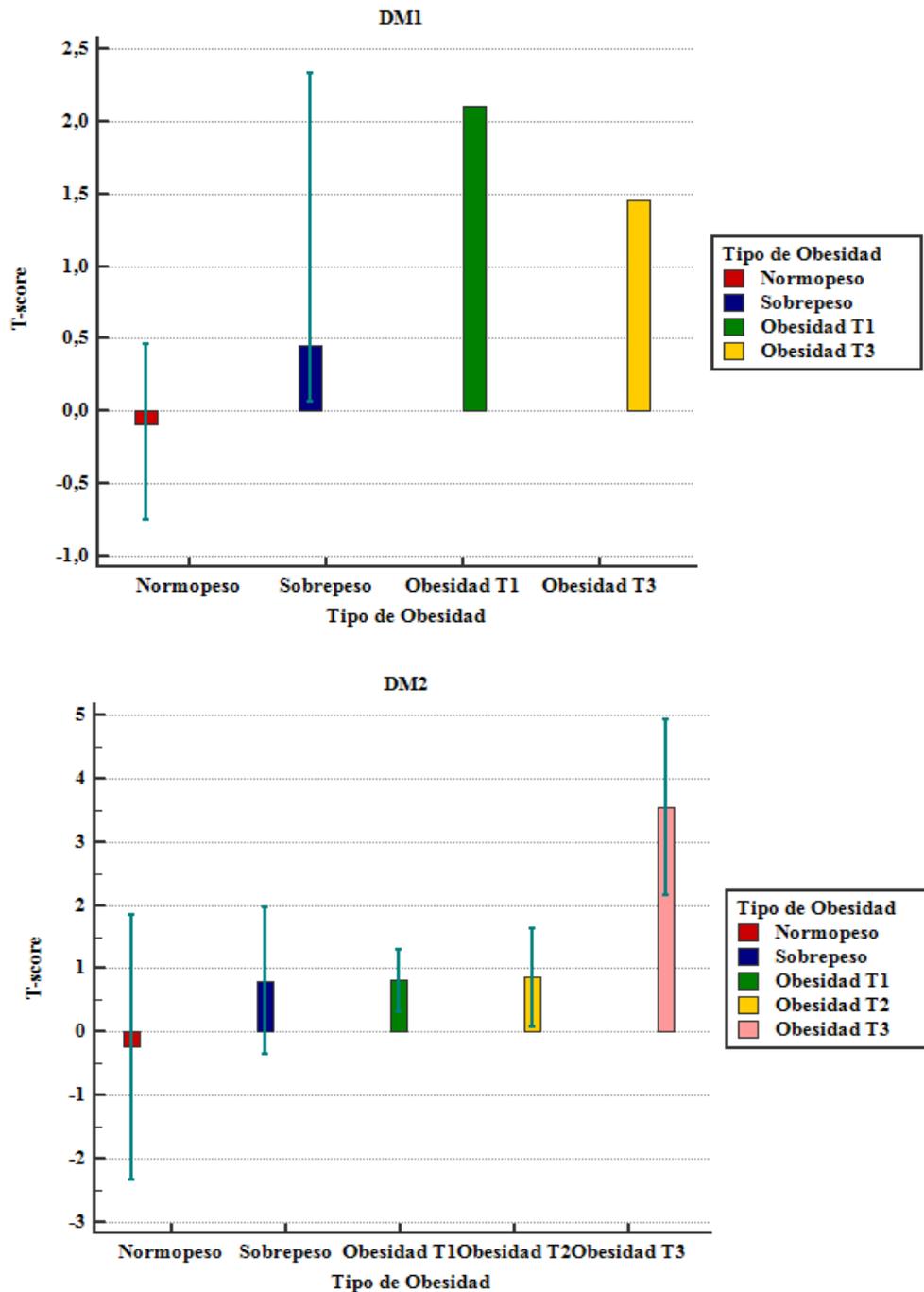


Figura 26: Distribución de la DMO lumbar en función del tipo de obesidad en cada tipo de DM.

4.2.2 Estudio del riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX®

Se calculó la probabilidad a 10 años de una fractura de cadera y de una fractura osteoporótica en otra localización (vertebral, cadera, antebrazo o fractura del húmero proximal), teniendo en cuenta doce factores de riesgo: edad, sexo, IMC, fractura previa, padres con fractura de cadera, fumador actual, tratamiento con glucocorticoides en los últimos tres meses, artritis reumatoide y presencia de osteoporosis secundaria, junto con los datos de DMO del cuello del fémur. Se observan diferencias significativas entre los dos tipos de DM, siendo mayor la probabilidad de fractura en la DM2 (Tabla 15).

Tabla 15: Valores de riesgo de fractura evaluados con el algoritmo FRAX® en los dos grupos de población a estudio expresados como %.

RIESGO DE FRACTURA (%)	DM1			DM2			P
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Riesgo fractura osteoporótica	3,50	2,60	5,73	5,30	3,20	8,40	0,002
Riesgo fractura de cadera	0,20	0,10	0,38	0,50	0,10	1,20	0,001
Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico. Se consideran estadísticamente significativos valores de p inferiores a 0,05.							

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el riesgo de fractura entre diferentes sexos, tanto el grupo total como en cada grupo en particular.

4.3 Objetivo 3: Medir las concentraciones de parámetros bioquímicos para evaluar el metabolismo fosfocálcico, la función renal y el metabolismo lipídico e hidrocarbonado, así como los MRO y de inflamación en el momento basal, a los 6 y a los 12 meses del inicio del estudio

4.3.1 Parámetros bioquímicos del metabolismo fosfocálcico, función renal, metabolismo glucídico, hormonas y metabolismo lipídico

Se determinaron los parámetros bioquímicos del metabolismo fosfocálcico, función renal, metabolismo glucídico, hormonas y metabolismo lipídico en el momento de basal, a los 6 y a los 12 meses del inicio del estudio.

4.3.1.1 Metabolismo fosfocálcico

Se determinaron las concentraciones de calcio (en suero y orina), fósforo (en suero y orina), PTH y vitamina D. A continuación se muestran estos resultados en la Tabla 16. Se realizó el análisis de ANOVA para medidas repetidas en cada uno de los grupos de pacientes estudiados sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas en la evolución de los marcadores en función del paso del tiempo.

Tabla 16: Estudio del metabolismo fosfocálcico en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos

PARÁMETRO		DM 1				DM 2				p
		Media	DS	Min	Máx.	Media	DS	Min	Máx.	
Calcio (mg/dl)	basal	9,65	0,39	8,9	10,8	9,64	0,42	7,7	10,6	n.s.
	6 meses	9,57	0,38	8,8	10,4	9,66	0,5	8,8	12	n.s.
	1 año	9,58	0,41	8,8	10,7	9,56	0,44	8,1	10,7	n.s.
Calcio Orina (mg/dl)	basal	14,56	9,69	1	48,5	16,93	12,26	0,5	75,7	n.s.
	6 meses	14,52	7,94	3,5	30,7	14	10,69	0,5	40,1	n.s.
	1 año	14,76	9,32	1,6	37,1	15,62	10,28	1,9	48,9	n.s.
Fósforo (mg/dl)	basal	3,88	0,8	0,7	5,2	3,74	0,77	2,2	9,5	n.s.
	6 meses	3,89	0,63	2,3	5,7	3,61	0,63	1,3	5,4	0,019
	1 año	3,88	0,91	1	6,2	3,62	0,68	2,2	6,8	n.s.
Fósforo Orina (mg/dl)	basal	83,54	39,11	7,5	191,5	65,21	38,51	7,5	204,6	0,006
	6 meses	94,33	47,39	22,5	218,2	63,35	37,22	9,9	209,9	<0,001
	1 año	86,05	48,7	19,5	235,7	59,56	33,63	3,4	189,8	0,013
PTH (pg/ml)	basal	25,52	8,4	12	46	31,17	18,15	9	124	n.s.
	6 meses	23,9	6,24	12	36	33,73	20	11	153	0,005
	1 año	24,04	13,01	10	71	31,61	24,28	4	151	n.s.
Vitamina D (ng/ml)	basal	21,71	7,09	5,6	37,7	19,05	6,74	5,2	36,6	0,029
	6 meses	19,13	6,81	4,8	29,9	18,34	6,57	4,9	40,6	n.s.
	1 año	22,15	5,94	7,9	32,7	19,46	6,65	3,5	37,7	0,064

n.s.: no significativo (p>0.05).

Se compararon los valores de estos marcadores en función del tipo de DM. En general no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes en los tres puntos temporales, salvo en la determinación del fósforo en orina, siendo estos valores menores en el grupo de DM2.

En cuanto a las determinaciones de PTH, sólo se observan diferencias significativas en la segunda determinación, a los 6 meses de comenzar el estudio, sin embargo, se obtienen valores

más elevados de PTH en la DM2 con tendencia a la significación. En la DM1 no existe la presencia de hiperparatiroidismo, sin embargo el 6% de los pacientes con DM2 tienen hiperparatiroidismo, aunque estos datos no muestran una diferencia significativa.

En cuanto a los valores de vitamina D son significativamente menores en la determinación basal y anual en la DM2 y con tendencia a la significación en la determinación a los 6 meses.

En el estudio de correlaciones, mediante el coeficiente de correlación de Spearman, merece la pena destacar la correlación negativa entre la obesidad y la vitamina D ($r = -0,237$, $p = 0,003$).

4.3.1.2 Parámetros bioquímicos de la función renal

Tras la determinación de los parámetros de función renal, resultados mostrados en la Tabla 17, y el posterior análisis de ANOVA para medidas repetidas en cada uno de los grupos de pacientes estudiados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la evolución de los marcadores en función del paso del tiempo.

Tabla 17: Estudio de los parámetros de la función renal en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos.

PARÁMETRO		DM 1				DM 2				P
		Media	DS	Min	Máx.	Media	DS	Min	Máx.	
Crea (mg/dl)	basal	0,81	0,17	0,44	1,41	0,93	0,41	0,47	4,14	0,016
	6 meses	0,8	0,14	0,53	1,09	0,93	0,32	0,46	2,81	0,004
	1 año	0,8	0,14	0,55	1,17	0,97	0,57	0,4	5,38	0,010
CreaO (mg/dl)	basal	121,42	56,41	24,3	268,6	103,32	53,45	27,3	308,7	0,050
	6 meses	121,6	55,36	35,4	247,8	98,4	53,16	12,2	297,6	0,023
	1 año	119,31	45,48	35,8	247,3	98,22	47,1	32,9	259,1	0,030
Mau/Cre aO (mg/dl)	basal	30,93	67,14	4	306,3	59,79	140,02	1,9	924,5	0,038
	6 meses	66,04	217,02	4,3	819,9	74,6	154,24	3,3	944,8	0,019
	1 año	49,3	141,95	3	521,3	88,32	156,41	3,7	581,7	0,041
Urea (mg/dl)	basal	33,7	7,2	18	56	41,31	20,29	12	157	0,003
	6 meses	34,07	9,12	17	58	39,49	16,48	18	152	0,038
	1 año	36,67	17,16	22	132	41,26	20,55	15	160	n.s.

n.s.: no significativo ($p > 0,05$).

Tras comparar estos valores en función del tipo de DM, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes en los tres puntos temporales en prácticamente todos los

parámetros estudiados, salvo en la comparación de los valores de urea en la determinación anual (Figura 27).

En el estudio de correlaciones, mediante el coeficiente de correlación de Spearman, merece la pena destacar la correlación positiva entre la creatinina y la edad ($r= 0,274$, $p=0,001$) y la correlación negativa con el sexo ($r= -0,489$, $p<0,001$)

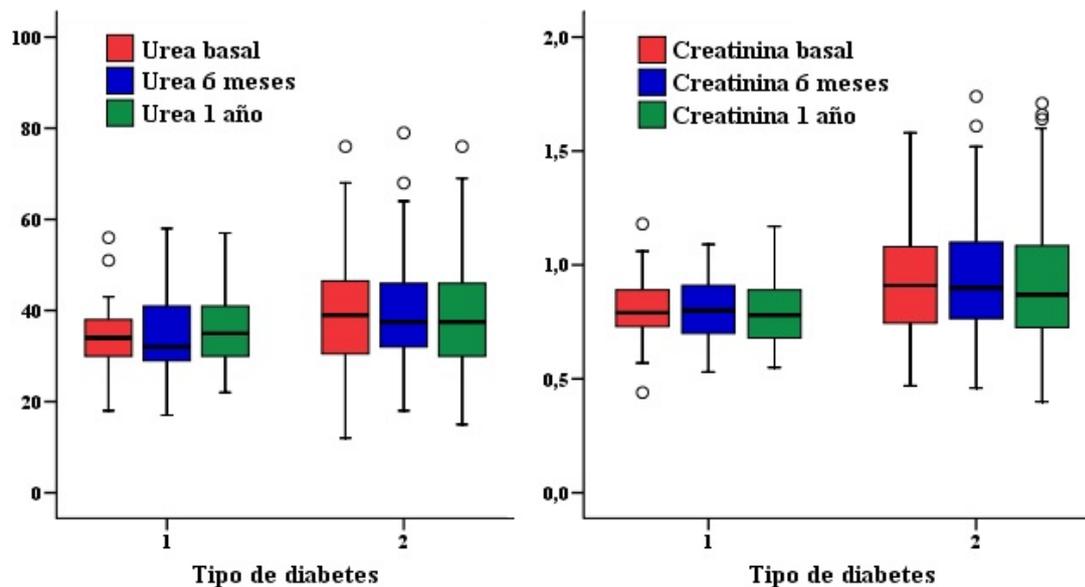


Figura 27: Representación gráfica de los diferentes valores de creatinina y urea en función del tipo de diabetes y del momento temporal.

4.3.1.3 Parámetros bioquímicos del metabolismo glucídico

Cuando se evaluaron los parámetros bioquímicos del metabolismo glucídico, resultados mostrados en la Tabla 18.

En el posterior análisis de ANOVA para medidas repetidas en cada uno de los grupos de pacientes estudiados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la evolución de los marcadores en función del paso del tiempo en ninguno de los grupos estudiados. Sin embargo, tras comparar estos valores en función del tipo de DM, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes en la determinación de HbA1c, pero no en la determinación de glucosa en ayunas.

Tabla 18: Estudio de los parámetros del metabolismo glucídico en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos

PARÁMETRO		DM 1				DM 2				P
		Media	DS	Min	Máx.	Media	DS	Min	Máx.	
HbA1c (%)	basal	8,14	1,12	5,5	11,4	7,76	1,28	5,6	14	n.s.
	6 meses	7,92	1,24	4,7	11	7,38	1,27	4,6	11,9	0,022
	1 año	8,14	1,47	5,3	11	7,48	1,3	5,4	13,1	0,010
Glucosa (mg/dl)	basal	160,34	81,9	52	361	144,99	39,28	67	304	n.s.
	6 meses	151,32	73,59	22	330	141,13	49,54	55	385	n.s.
	1 año	157,41	84,2	31	414	148,09	44,77	68	283	n.s.

n.s.: no significativo (p>0.05).

4.3.1.4 Parámetros hormonales

Se determinaron las concentraciones de TSH Y T4L en ambos grupos de estudio, en los tres puntos temporales del mismo. A continuación se muestran estos resultados en la Tabla 19. Se realizó el análisis de ANOVA para medidas repetidas en cada uno de los grupos de pacientes estudiados sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas en la evolución de los marcadores en función del paso del tiempo.

Se compararon los valores de estos marcadores en función del tipo de DM, sin observarse diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes en los tres puntos temporales.

Tabla 19: Estudio de los parámetros hormonales en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos

PARÁMETRO		DM 1				DM 2				P
		Media	DS	Min	Máx.	Media	DS	Min	Máx.	
TSH (μUI/ml)	basal	2,82	2,31	0,02	11,62	2,6	1,65	0,03	10,49	n.s.
	6 meses	2,64	2,37	0,15	15,29	2,64	1,52	0,09	8,66	n.s.
	1 año	3,23	5,23	0,09	33,43	2,79	1,98	0,13	12,05	n.s.
T4L (ng/dl)	basal	1,18	0,19	0,84	1,69	1,19	0,18	0,79	2,01	n.s.
	6 meses	1,18	0,19	0,84	1,8	1,19	0,18	0,8	1,71	n.s.
	1 año	1,2	0,22	0,76	1,67	1,24	0,19	0,89	1,95	n.s.

n.s.: no significativo (p>0.05).

4.3.1.5 Parámetros bioquímicos del metabolismo lipídico

Tras la determinación de los parámetros del metabolismo lipídico, resultados mostrados en la Tabla 20, y el posterior análisis de ANOVA para medidas repetidas en cada uno de los grupos de pacientes estudiados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la evolución de los marcadores en función del paso del tiempo.

Al comparar estos valores en función del tipo de DM, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes en los tres puntos temporales en la determinación de colesterol, triglicéridos, cHDL y cLDL (Figura 28).

En el estudio de correlaciones, mediante el coeficiente de correlación de Spearman, merece la pena destacar la correlación negativa con la edad y el colesterol ($r = -0,275$, $p = 0,001$), el cHDL ($r = -0,309$, $p < 0,001$) y el cLDL ($r = -0,258$, $p = 0,002$) y la correlación positiva con los triglicéridos ($r = 0,447$, $p < 0,001$). Además los triglicéridos correlacionan positivamente con la presencia de fracturas previas ($r = 0,276$, $p = 0,001$) y de forma negativa con la vitamina D ($r = -0,354$, $p < 0,001$). El cHDL correlaciona positivamente con la vitamina D ($r = 0,365$, $p < 0,001$) y el cLDL correlaciona positivamente con el T-score en cadera ($r = 0,330$, $p = 0,002$).

Tabla 20: Estudio de los parámetros de metabolismo lipídico en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos.

PARÁMETRO		DM 1				DM 2				p
		Media	DS	Min	Máx.	Media	DS	Min	Máx.	
Colesterol (mg/dl)	basal	190,43	35,25	126	312	172,47	32,08	111	292	0,001
	6 meses	181,45	29,28	130	236	165,43	32,87	91	259	0,007
	1 año	186,84	30,46	120	255	158,77	25,66	105	262	<0,001
Triglicéridos (mg/dl)	basal	85,25	44,27	35	214	152,12	79,05	37	461	<0,001
	6 meses	91,5	60,49	32	284	165,84	90,58	35	532	<0,001
	1 año	97,98	63,54	33	285	153,87	83,52	27	442	<0,001
cHDL (mg/dl)	basal	64,87	16,98	35	119	48,71	13,35	6	86	<0,001
	6 meses	64,11	18,77	31	105	46,38	11,91	28	90	<0,001
	1 año	64,65	16,35	31	94	49,12	14,67	27	96	<0,001
cLDL (mg/dl)	basal	108,96	26,22	60	172	92,57	27,93	37	196	<0,001
	6 meses	99,2	22,84	46	157	85,95	26,5	28	152	0,005
	1 año	99,14	26,41	43	161	79,39	21,14	41	150	<0,001

Se consideran estadísticamente significativos valores de p inferiores a 0,05.

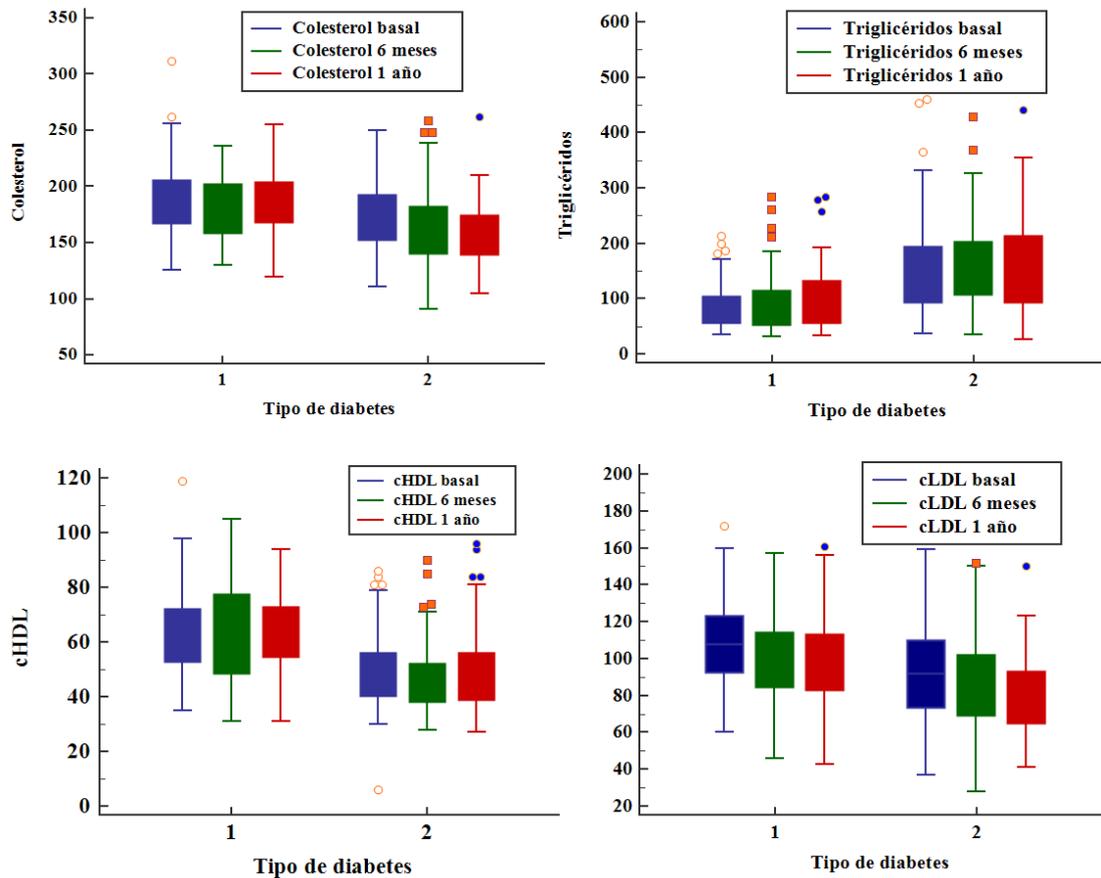


Figura 28: Representación gráfica de los diferentes valores de colesterol, triglicéridos, cHDL y cLDL en función del tipo de diabetes y del momento temporal.

4.3.2 Parámetros bioquímicos de remodelado óseo

Se estudiaron los niveles de MRO en ambos grupos de estudio, Tabla 21. No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la evolución de los marcadores en función del paso del tiempo en ninguno de los dos grupos estudiados.

En el análisis comparativo de los marcadores de remodelado óseo entre ambos grupos de DM, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de OC ($p < 0,001$) y P1NP ($p \leq 0,001$), siendo ambos menores en la DM2 (Figura 29).

No se observan diferencias estadísticamente significativas comparando los MRO en función del sexo, en ninguno de los grupos estudiados.

Tabla 21: Estudio de los parámetros bioquímicos de remodelado óseo en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos

PARÁMETRO		DM 1				DM 2				P
		Media	DS	Min	Máx.	Media	DS	Min	Máx.	
OC (ug/l)	Basal	17,65	7,29	5,82	34,14	12,73	6,23	5,19	50,74	<0,001
	6 meses	17,00	6,56	7,5	38,18	12,30	6,29	4,36	52,27	<0,001
	1 año	16,47	6,32	5,65	33,9	12,28	6,09	1,93	37,73	<0,001
β-CTX (ug/l)	Basal	0,31	0,19	0,06	0,97	0,26	0,18	0,08	1,52	n.s.
	6 meses	0,32	0,21	0,06	0,92	0,25	0,14	0,05	0,86	n.s.
	1 año	0,30	0,17	0,06	0,92	0,27	0,24	0,09	2,19	n.s.
P1NP (ug/l)	Basal	55,17	37,25	16,66	244,7	37,52	17,72	15,38	131	<0,001
	6 meses	50,21	31,19	14,26	188,8	35,28	17,69	5,14	126,5	0,001
	1 año	47,92	28,96	17,69	178	35,97	23,34	11,88	224,4	0,001

n.s.: no significativo (p>0.05).

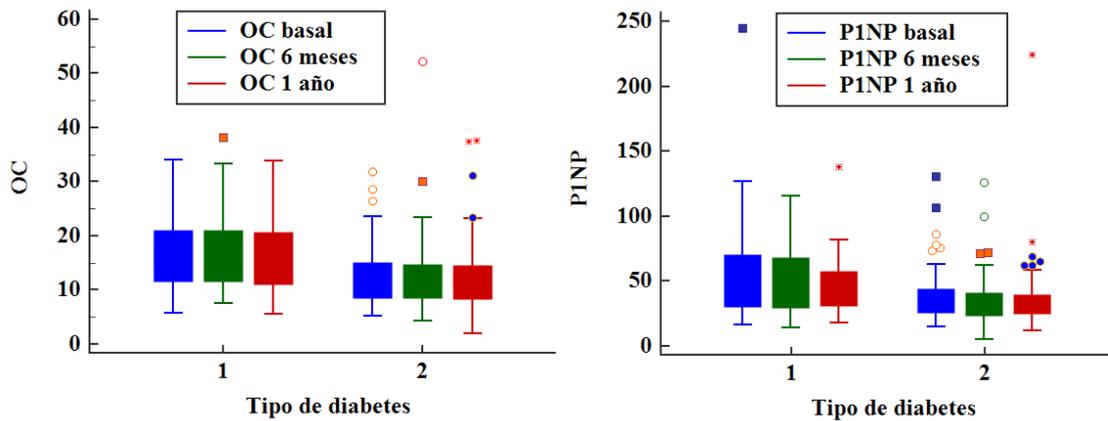


Figura 29: Representación gráfica de los diferentes valores de OC y P1NP en función del tipo de diabetes y del momento temporal.

Para estudiar la asociación de los MRO con el resto de variables continuas se realizó un estudio de correlaciones, utilizando para ello el coeficiente de correlación de Spearman, incluyendo las características clínicas, los valores de DMO y el resto de parámetros bioquímicos. Debido a lo extenso de los datos, se muestran sólo las correlaciones significativas.

Se observó correlación entre la OC y la edad (r= -0,220, p= 0,009), el tipo de DM (r=0,348, p<0,001), HTA (r= -0,317, p<0,001), dislipemia (r= -0,350, p<0,001), obesidad (r= -0,481, p<0,001), fracturas previas (r= -0,238, p=0,005), T-score cadera (r= -0,212, p=0,031), T-score lumbar (r= -0,475, p<0,001), β-CTX (r= 0,741, p<0,001), P1NP (r= 0,744, p<0,001), IL-6 (r= -0,327, p<0,001), glucosa (r= -0,286, p<0,001), triglicéridos (r= -0,341, p<0,001) y cHDL (r= -0,315, p<0,001) (Figura 30).

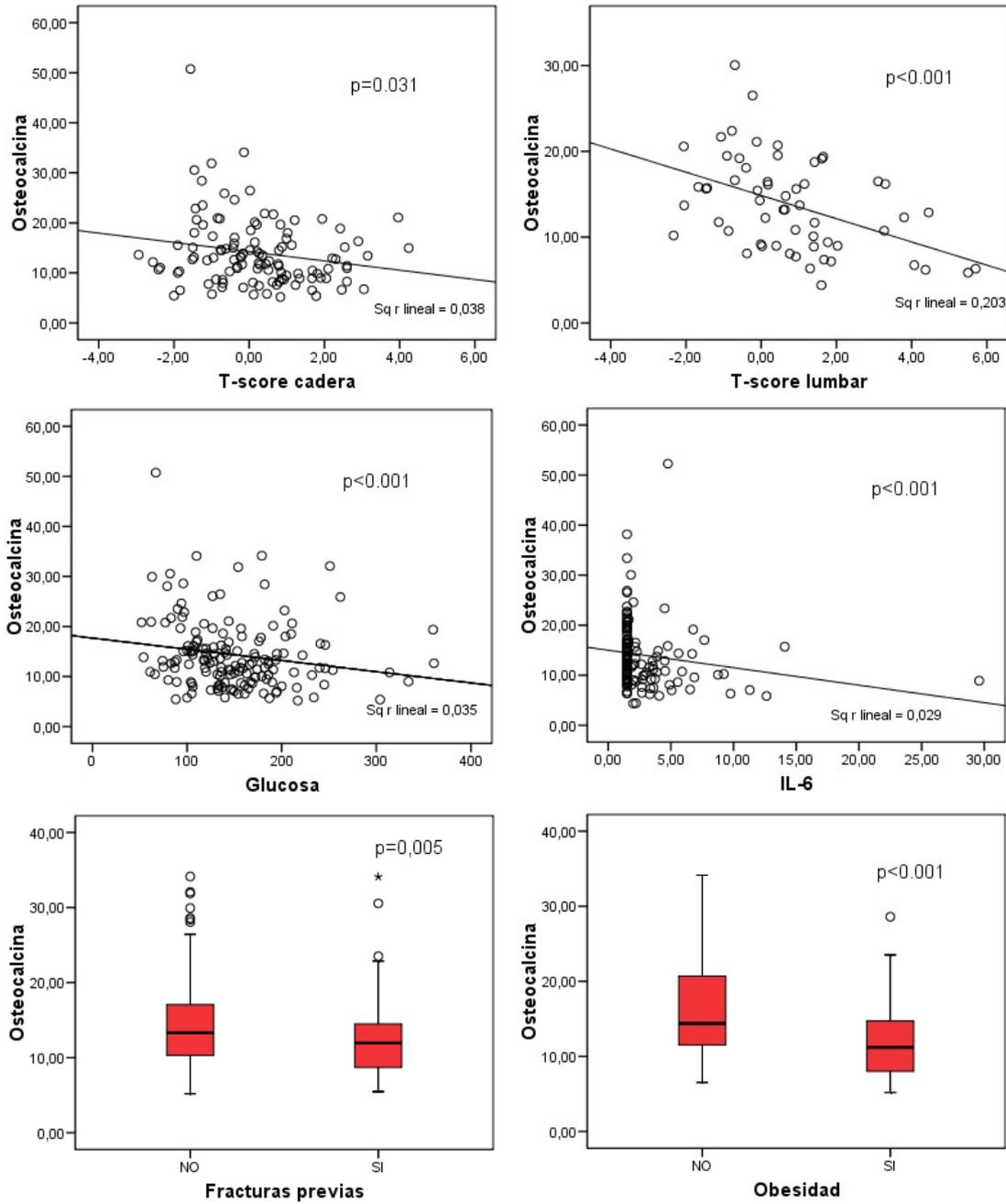


Figura 30: Correlación lineal simple entre OC con diversas covariables.

Se observó correlación entre el β -CTX y la edad ($r=-0,165$, $p= 0,040$), HTA ($r= -0,205$, $p=0,011$), obesidad ($r= -0, 162$, $p=0.044$), T-score lumbar ($r= -0,440$, $p=0,001$), creatinina ($r=0,266$, $p=0,001$), OC ($r= 0,741$, $p<0,001$) y P1NP ($r= 0,719$, $p<0,001$) (Figura 31).

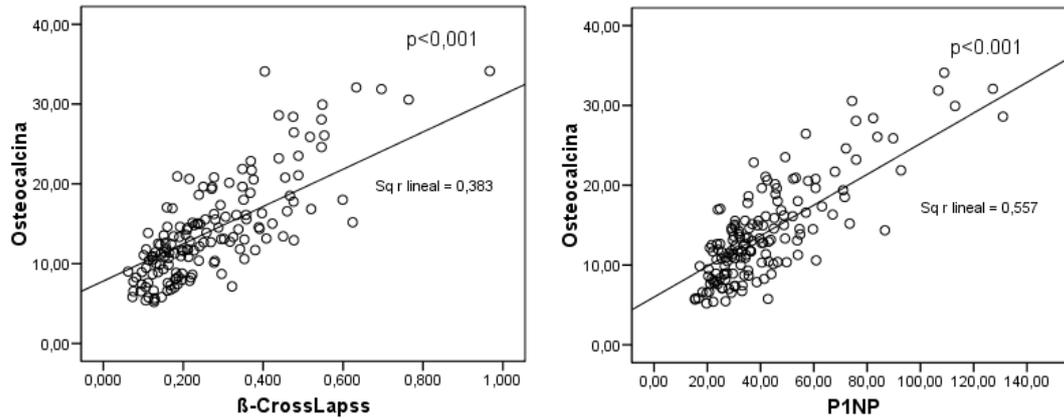


Figura 31: Correlación lineal simple entre el β -CTX con el resto de MRO.

Se observa correlación entre el **P1NP** y la edad ($r = -0,237$, $p = 0,003$), tipo de diabetes ($r = 0,282$, $p < 0,001$), HTA ($r = -0,372$, $p < 0,001$), dislipemia ($r = -0,266$, $p < 0,001$), obesidad ($r = -0,275$, $p = 0,002$), T-score lumbar ($r = -0,267$, $p = 0,009$), PTH ($r = 0,280$, $p = 0,008$), OC ($r = 0,744$, $p < 0,001$), β -CTX ($r = 0,719$, $p < 0,001$), y cHDL ($r = -0,246$, $p = 0,002$).

4.3.2.1 Capacidad de los marcadores de remodelado óseo para detectar patología ósea.

Para determinar la capacidad de los marcadores de remodelado óseo como predictores de patología ósea, ya sea osteopenia u osteoporosis, frente a la densitometría, se utilizaron curvas ROC, calculando el área bajo la curva (AUC) y estudiando la sensibilidad y especificidad diagnósticas para cada marcador de remodelado óseo analizado (Figura 32).

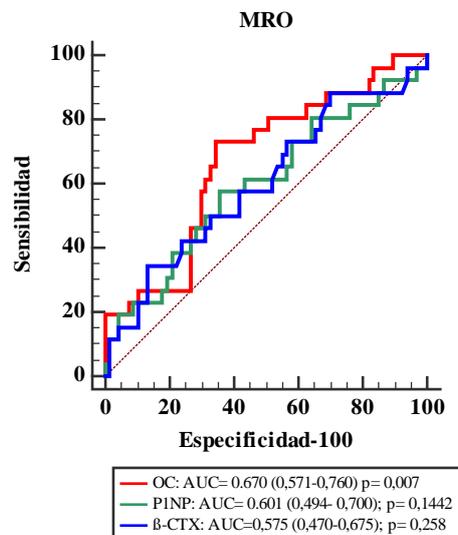


Figura 32: Curva ROC para OC, P1NP y β -CTX en el diagnóstico de patología ósea (osteopenia u osteoporosis) en toda la población al inicio del estudio.

También se estudió al capacidad de los marcadores de remodelado óseo para el diagnóstico de patología ósea en los dos grupos de estudio por separado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22: Capacidad de los marcadores de remodela óseo para el diagnóstico de patología ósea en DM1 y DM2

POBLACIÓN	MRO	AUC	IC	p
DM1	OC	0,747	0,560 - 0,885	0,028
	P1NP	0,628	0,440 - 0,791	n.s.
	β-CTX	0,565	0,376 - 0,741	n.s.
DM2	OC	0,697	0,572 - 0,803	0,007
	P1NP	0,638	0,510 - 0,754	n.s.
	β-CTX	0,648	0,521 - 0,762	n.s.
AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza; n.s.: no significativo (p>0,05)				

Así mismo, en la Tabla 23, se muestran los puntos de corte de mayor sensibilidad y especificidad para cada MRO calculado mediante el índice de Youden. También se recoge el valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) en cada punto de corte y en cada grupo de población estudiada. Se obtuvo un elevado VPN especialmente para la OC, lo que sugiere que es un marcador que puede tener un papel muy importante como prueba de cribado.

Tabla 23: Puntos de corte con mayor sensibilidad y especificidad para detectar patología ósea en la población diabética

POBLACIÓN	MRO	Punto de corte	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
TOTAL	OC	17,05	46,67	83,56	45,9	84,0
	P1NP	38,17	57,69	64,71	38,5	80,0
	β-CTX	0,139	89,29	28,99	33,8	87,0
DM1	OC	20,54	66,67	86,36	66,7	86,4
	P1NP	71,57	44,44	95,65	80,0	81,5
	β-CTX	0,204	50,00	73,91	40,0	81,0
DM2	OC	12,88	65,00	78,72	56,5	84,1
	P1NP	40,96	44,44	85,11	53,3	80,0
	β-CTX	0,341	35,00	93,48	70,0	76,8
S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo						

4.3.3 Parámetros bioquímicos de inflamación

Para el estudio de los parámetros de inflamación, se determinaron los niveles de IL-6 en ambos grupos de estudio, en los diferentes puntos temporales, Tabla 24. Tras el análisis de ANOVA para medidas repetidas en cada uno de los grupos de pacientes estudiados, se encontraron

diferencias estadísticamente significativas en la evolución de la IL-6 a lo largo del tiempo de estudio (basal, 6 meses y 1 año) en DM 1 ($p=0,030$) y en DM 2 ($p= 0,002$).

Tras comparar estos valores en función del tipo de DM, se observaron diferencias significativas en los tres puntos temporales entre los dos tipos de DM (Figura 33).

Tabla 24: Determinación de los valores de IL-6 en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos

PARÁMETRO		DM 1			DM 2			P
		Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
IL-6 (ng/l)	Basal	1,48	1,48	1,50	1,93	1,50	3,98	<0,001
	6 meses	1,49	1,49	2,47	2,43	1,50	4,28	0,007
	1 año	1,50	1,50	3,26	3,11	1,97	4,82	<0,001

Se consideran estadísticamente significativos valores de p inferiores a 0,05.

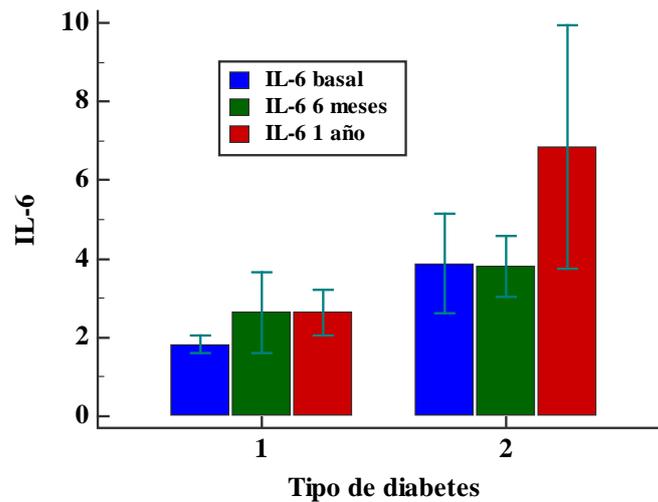


Figura 33: Representación gráfica de los diferentes valores de IL-6 en función del tipo de diabetes y del momento temporal.

Se observa correlación entre la IL-6 y la edad ($r= 0,421$, $p<0,001$), HTA ($r= 0,229$, $p=0,007$), dislipemia ($r= 0,319$, $p<0,001$), obesidad ($r= 0,393$, $p<0,001$), T-score cadera ($r= -0,246$, $p=0,016$), calcio en orina ($r= -0,379$, $p<0,001$), fósforo en orina ($r= -0,309$, $p=0,003$), creatinina en orina ($r= -0,251$, $p=0,002$), vitamina D ($r= -0,289$, $p=0,005$), OC ($r= -0,327$, $p<0,001$), triglicéridos ($r= 0,428$, $p<0,001$) y cHDL ($r= -0,311$, $p<0,001$) (Figura 34).

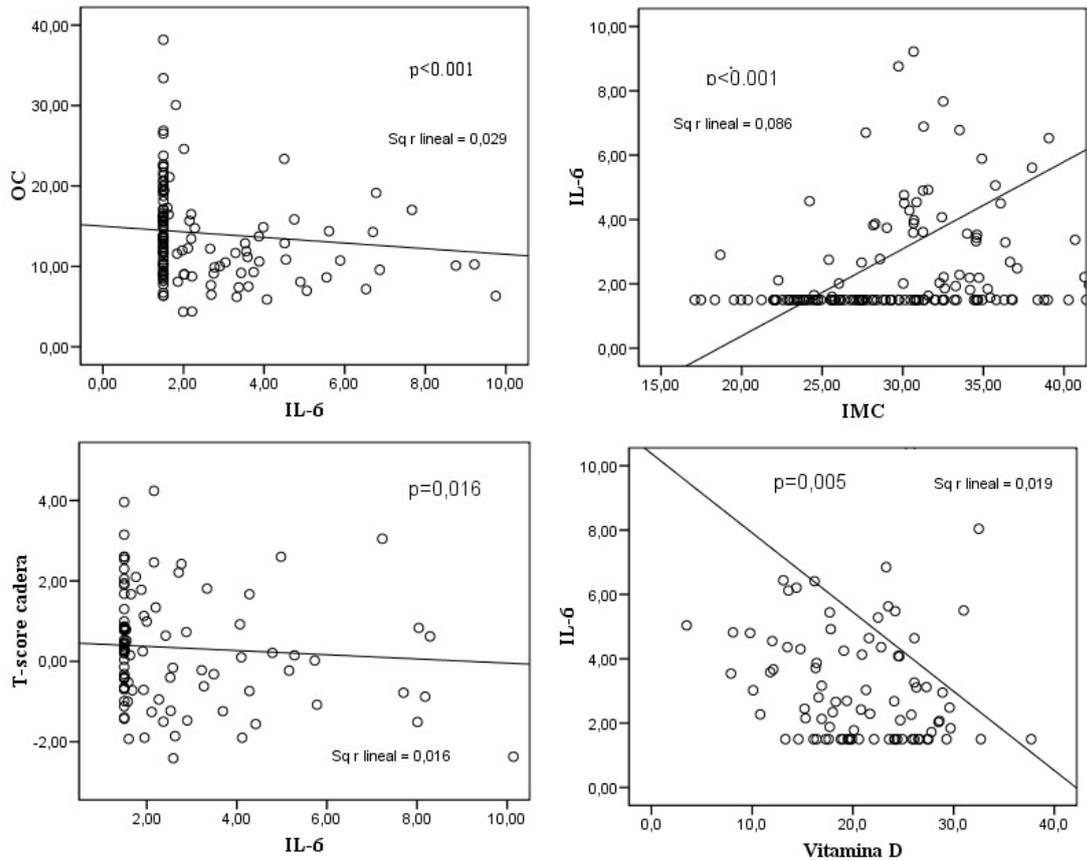


Figura 34: Correlación lineal simple entre la IL-6 con la OC, el IMC, la DMO en cadera y la vitamina D.

4.4 Objetivo 4: Determinar la frecuencia genotípica de los SNPs de los genes VDR, ESR1, OPG, RANKL e IL-6 en los diferentes grupos de diabéticos y compararla entre sí y con las descritas en la población general, así como estudiar las correlaciones existentes con las manifestaciones clínicas, bioquímicas y densitométricas en estos pacientes

4.4.1 Prevalencia de los polimorfismos en la población estudiada y comparación con la población control

Se analizó la prevalencia de los polimorfismos en todos los participantes. Las frecuencias de los alelos no se desviaron del equilibrio de Hardy-Weinberg. La distribución de las frecuencias alélicas de todos los SNPs estudiados fue similar en el grupo de DM1 y de DM2, quedando reflejadas en la Tabla 25. Sólo se observan diferencias significativas en la distribución genotípica en el SNP de la IL-6.

Tabla 25: Prevalencia de los polimorfismos en la población total y en cada uno de los grupos estudiados

POLIMORFISMO	Alelo R/A	TOTAL %	DM1 %	DM2 %	p
BsmI (rs 1544410)	A/A	19,5	16,7	21,6	n.s.
	A/G	48,3	50	47,1	
	G/G	32,2	33,3	31,4	
ApaI (rs 7975232)	A/A	26,4	21,1	30,2	n.s.
	A/C	51,6	57,9	47,2	
	C/C	22	21,1	22,6	
TaqI (rs 731236)	T/T	34,4	35,9	33,3	n.s.
	T/C	48,9	51,3	47,1	
	C/C	16,7	12,8	19,6	
FokI (rs 2228570)	C/C	51,1	47,5	54	n.s.
	C/T	41,1	42,5	40	
	T/T	7,8	10	6	
PvuII (rs 2234693)	T/T	25	22,2	26,9	n.s.
	T/C	54,5	55,6	53,8	
	C/C	20,5	22,2	19,2	
XbaI (rs 9340799)	A/A	36,3	31,4	40	n.s.
	A/G	50	57,1	44,4	
	G/G	13,8	11,4	15,6	
1181 G/C OPG (rs 2073618)	G/G	25,6	25,7	25,5	n.s.
	G/C	53,7	51,4	55,3	
	C/C	20,7	22,9	19,1	
163 A/G OPG (rs 3102735)	A/A	75,6	81,6	70,8	n.s.
	A/G	22,1	13,2	29,2	
	G/G	2,3	5,3	0,0	
245 T/G OPG (rs3134070)	T/T	91,3	96,9	87,5	n.s.
	T/G	8,8	3,1	12,5	
	G/G	0,0	0,0	0,0	
RANKL A/G (rs 2277438)	A/A	72,1	63,6	77,4	n.s.
	A/G	25,6	30,3	22,6	
	G/G	2,3	6,1	0,0	
174 G/C IL-6 (rs 1800795)	G/G	43,8	34,4	50	0.049
	G/C	47,5	50	45,8	
	C/C	8,8	15,6	4,2	

n.s.: no significativo (p>0,05). R (alelo de referencia)/ A (alelo alternativo).

Las comparaciones entre las prevalencias genotípicas y alélicas de los diferentes SNPs estudiados con la población control se muestran en la Tabla 26 y en la Tabla 27 respectivamente. Se muestran las diferencias encontradas entre la población total del estudio, y de ambos grupos, con la población control (población CEU, residentes del estado de Utah con antepasados europeos) de la base de datos del proyecto GENOMOS 1000.

Se han encontrado varios polimorfismos asociados con la DM. Uno de ellos es el polimorfismo ApaI (rs7975232) del gen del VDR, donde el genotipo AC es más frecuente en pacientes con DM1 que en la población control (p=0,042) y el genotipo AA es menos frecuente en pacientes con DM2 que en la población control (p=0,031).

El otro polimorfismo asociado con la DM es el 174 G/C del gen de la IL-6, donde el genotipo GG es más frecuente en nuestra población total y el CC menos frecuente que los hallados en la población control ($p=0,002$ y $p<0,001$ respectivamente). Comparado entre los diferentes grupos de estudios, el genotipo CC es menos frecuente en nuestra población con DM1 ($p=0,043$). En nuestra población con DM2, el genotipo GG es más frecuente y el CC menos frecuente ($p=0,001$ y $p<0,001$ respectivamente) que en la población control (Figura 35).

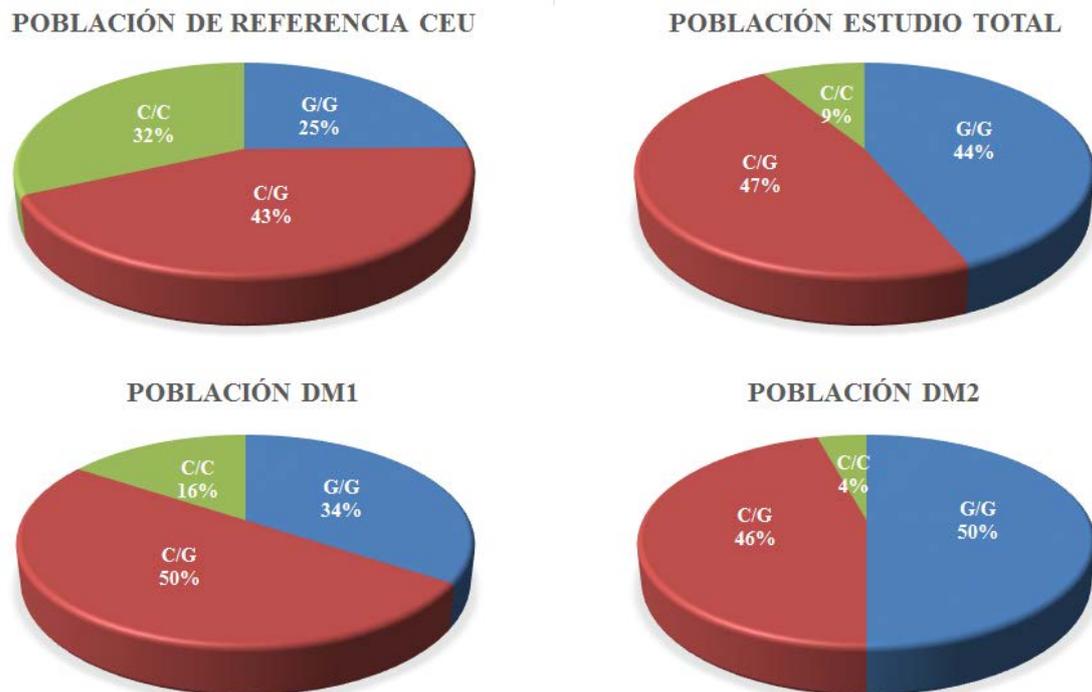


Figura 35: Representación gráfica de las diferentes frecuencias genotípicas del polimorfismo 174 G/C del gen de la IL-6 entre la población total y los diferentes grupos estudiados.

Por otro lado los análisis de frecuencias alélicas entre poblaciones mostraron que en referencia al polimorfismo XbaI (rs9340799) del gen ESR1, el alelo A es menos frecuente y el alelo G más frecuente en nuestra población total que en la población control ($p=0,047$). Además, en los pacientes con DM1, existe menor frecuencia del alelo A y una mayor frecuencia del alelo G del polimorfismo rs2277438 del gen RANKL, que en la población control ($p=0,034$).

Tabla 26: Comparación de las frecuencias genotípicas entre los diferentes grupos de estudio y la frecuencia genotípica poblacional

SNP	Alelo R/A	CEU	Población total		DM1		DM2	
		FG	FG	p	FG	p	FG	p
BsmI (rs 1544410)	A/A	23,5	19,5	n.s.	16,7	n.s.	21,6	n.s.
	A/G	41,6	48,3	n.s.	50,0	n.s.	47,1	n.s.
	G/G	34,9	32,2	n.s.	33,3	n.s.	31,4	n.s.
ApaI (rs 7975232)	A/A	37,2	26,4	n.s.	21,1	n.s.	30,2	0,031
	A/C	39,8	51,6	0,069	57,9	0,042	47,2	n.s.
	C/C	23,0	22,0	n.s.	21,1	n.s.	22,6	n.s.
TaqI (rs 731236)	T/T	34,6	34,4	n.s.	35,9	n.s.	33,3	n.s.
	T/C	43,3	48,9	n.s.	51,3	n.s.	47,1	n.s.
	C/C	22,1	16,7	n.s.	12,8	n.s.	19,6	n.s.
FokI (rs 2228570)	C/C	46,7	51,1	n.s.	47,5	n.s.	54,0	n.s.
	C/T	45,5	41,1	n.s.	42,5	n.s.	40,0	n.s.
	T/T	7,8	7,8	n.s.	10,0	n.s.	6,0	n.s.
PvuII (rs 2234693)	T/T	33,6	25,0	n.s.	22,2	n.s.	26,9	n.s.
	T/C	53,1	54,5	n.s.	55,6	n.s.	53,8	n.s.
	C/C	15,0	20,5	n.s.	22,2	n.s.	19,2	n.s.
XbaI (rs 9340799)	A/A	48,1	36,3	0,066	31,4	0,053	40,0	n.s.
	A/G	42,6	50,0	n.s.	57,1	n.s.	44,4	n.s.
	G/G	9,3	13,8	n.s.	11,4	n.s.	15,6	n.s.
1181 G/C OPG (rs 2073618)	G/G	18,4	25,6	n.s.	25,7	n.s.	25,5	n.s.
	G/C	53,3	53,7	n.s.	51,4	n.s.	55,3	n.s.
	C/C	28,3	20,7	n.s.	22,9	n.s.	19,1	n.s.
163 A/G OPG (rs 3102735)	A/A	75,0	75,6	n.s.	81,6	n.s.	70,8	n.s.
	A/G	22,3	22,1	n.s.	13,2	n.s.	29,2	n.s.
	G/G	2,7	2,3	n.s.	5,3	n.s.	0,0	n.s.
245 T/G OPG (rs3134070)	T/T	88,6	91,3	n.s.	96,9	n.s.	87,5	n.s.
	T/G	10,6	8,8	n.s.	3,1	n.s.	12,5	n.s.
	G/G	0,8	0,0	n.s.	0,0	n.s.	0,0	n.s.
RANKL A/G (rs 2277438)	A/A	¿?	72,1	-	63,6	-	77,4	-
	A/G	¿?	25,6	-	30,3	-	22,6	-
	G/G	¿?	2,3	-	6,1	-	0,0	-
174 G/C IL-6 (rs 1800795)	G/G	24,7	43,8	0,002	34,4	n.s.	50,0	0,001
	G/C	43,3	47,5	n.s.	50,0	n.s.	45,8	n.s.
	C/C	31,8	8,8	<0,001	15,6	0,043	4,2	<0,001

FG: frecuencia genotípica; n.s.: no significativo (p>0,05); R(alelo de referencia)/A(alelo alternativo).
¿?: Desconocido

Tabla 27: Comparación de las frecuencias alélicas entre los diferentes grupos de estudio y la frecuencia alélica poblacional.

POLIMORFISMO	Alelo	CEU	Población total		DM1		DM2	
		FA	FA	p	FA	p	FA	p
BsmI (rs 1544410)	A	44,2	46,5	n.s.	45,7	n.s.	47,0	n.s.
	G	55,8	53,5	n.s.	54,3	n.s.	53,0	n.s.
ApaI (rs 7975232)	A	57,1	51,4	n.s.	50,0	n.s.	52,6	n.s.
	C	42,9	48,6	n.s.	50,0	n.s.	47,5	n.s.
TaqI (rs 731236)	T	56,2	54,9	n.s.	58,3	n.s.	54,9	n.s.
	C	43,8	45,1	n.s.	41,6	n.s.	45,1	n.s.
FokI (rs 2228570)	C	69,4	65,4	n.s.	63,2	n.s.	63,2	n.s.
	T	30,6	34,7	n.s.	36,8	n.s.	36,8	n.s.
PvuII (rs 2234693)	T	59,3	51,5	n.s.	50,0	n.s.	52,5	n.s.
	C	40,7	48,5	n.s.	50,0	n.s.	47,5	n.s.
XbaI (rs 9340799)	A	69,4	57,1	0,047	55,6	n.s.	58,4	n.s.
	G	30,6	42,9	0,047	44,4	n.s.	41,6	n.s.
1181 G/C OPG (rs 2073618)	G	44,9	51,6	n.s.	50,9	n.s.	52,1	n.s.
	C	55,1	48,4	n.s.	49,1	n.s.	48,0	n.s.
163 A/G OPG (rs 3102735)	A	86,2	80,0	n.s.	83,7	n.s.	74,4	n.s.
	G	13,8	20,0	n.s.	16,3	n.s.	22,6	n.s.
245 T/G OPG (rs3134070)	T	93,8	92,0	n.s.	97,0	n.s.	88,9	n.s.
	G	6,2	8,0	n.s.	3,0	n.s.	11,1	n.s.
RANKL A/G (rs 2277438)	A	84,0	75,2	n.s.	69,2	0,034	79,7	n.s.
	G	16,0	24,8	n.s.	30,7	0,034	20,3	n.s.
174 G/C IL-6 (rs 1800795)	G	53,6	58,6	n.s.	52,6	n.s.	63,2	n.s.
	C	46,4	41,4	n.s.	47,4	n.s.	36,8	n.s.

FA: frecuencia alélica; n.s.: no significativo (p>0,05).

4.4.2 Asociación de los polimorfismos estudiados y la DMO

Se estudió en toda la población la distribución genotípica de los polimorfismos según la presencia o no, de patología ósea, atendiéndonos a la clasificación densitométrica (T-Score inferior o igual a -1,0 DE). La Tabla 28 muestra los resultados obtenidos, en los que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de comparación en toda la población de estudio.

Tabla 28: Prevalencia de polimorfismos en toda la población según fueran sanos o con patología ósea

POLIMORFISMO	Alelo R/A	NORMAL (%)	PATOLOGÍA ÓSEA (%)	p
BsmI (rs 1544410)	A/G	45,6	55,6	n.s.
	A/A	19,3	27,8	
	G/G	35,1	16,7	
ApaI (rs 7975232)	A/A	27,6	28,6	n.s.
	A/C	51,7	52,4	
	C/C	20,7	19,0	
TaqI (rs 731236)	T/T	36,8	23,8	n.s.
	T/C	47,4	52,4	
	C/C	15,8	23,8	
FokI (rs 2228570)	C/C	46,4	54,5	n.s.
	C/T	46,4	45,5	
	T/T	7,1	0,0	
PvuII (rs 2234693)	T/T	29,6	17,4	n.s.
	T/C	48,1	69,6	
	C/C	22,2	13,0	
XbaI (rs 9340799)	A/A	34,0	40,0	n.s.
	A/G	46,0	55,0	
	G/G	20,0	5,0	
1181 G/C OPG (rs2073618)	G/G	23,5	40,0	n.s.
	G/C	52,9	50,0	
	C/C	23,5	10,0	
163 A/G OPG (rs 3102735)	A/A	70,4	86,4	n.s.
	A/G	27,8	9,1	
	G/G	1,9	4,5	
245 T/G OPG (rs3134070)	T/T	90,2	88,9	n.s.
	T/G	9,8	11,1	
	G/G	0,0	0,0	
RANKL A/G (rs 2277438)	A/A	75,9	75,0	n.s.
	A/G	22,2	20,0	
	G/G	1,9	5,0	
174 G/C IL-6 (rs 1800795)	G/G	42,0	45,0	n.s.
	G/C	54,0	45,0	
	C/C	4,0	10,0	

n.s.: no significativo (p>0,05). R (alelo de referencia)/ A (alelo alternativo).

Para valorar la relación entre los diferentes polimorfismos estudiados y la DMO al comienzo del estudio, se ha realizado un análisis de la varianza mediante tres modelos de herencia: el modelo aditivo, el modelo dominante (tomando el alelo de referencia como alelo dominante) y el modelo recesivo (tomando el alelo de referencia como alelo recesivo) (Tabla 29 y Tabla 30).

Tabla 29: Polimorfismos en DMI y asociación con la DMO

SNP	Alelo R/A	T-score cadera basal			T-score lumbar basal			T-score cadera basal				T-score lumbar basal			
		Media	DE	p	Media	DE	p	Modelo dominante	P	Modelo recesivo	P	Modelo dominante	P	Modelo recesivo	P
BsmI (rs 1544410)	A/A	0,76	1,03	n.s.	0,39	1,64	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A	n.s.
	A/G	0,46	1,22		0,29	1,54				A/G+G/G				A/G+G/G	
	G/G	0,17	0,62		0,77	1,18									
ApaI (rs 7975232)	A/A	0,67	1,25	n.s.	0,19	1,90	n.s.	A/A+A/C C/C	n.s.	A/A	n.s.	A/A+A/C C/C	n.s.	A/A	n.s.
	A/C	0,40	1,11		0,71	1,27				A/C+C/C				A/C+C/C	
	C/C	0,35	0,67		0,05	1,50									
TaqI (rs 731236)	T/T	0,27	0,57	n.s.	0,48	1,25	n.s.	T/T+T/C C/C	n.s.	T/T	n.s.	T/T+T/C C/C	n.s.	T/T	n.s.
	T/C	0,54	1,22		0,31	1,49				T/C+C/C				T/C+C/C	
	C/C	0,65	1,26		0,74	1,94									
FokI (rs 2228570)	C/C	0,41	0,79	n.s.	0,05	1,11	n.s.	C/C+T/C T/T	n.s.	C/C	n.s.	C/C+T/C T/T	n.s.	C/C	n.s.
	C/T	0,52	1,21		0,50	1,63				T/C+T/T				T/C+T/T	
	T/T	0,58	1,56		2,02	0,49									
PvuII (rs 2234693)	T/T	0,57	0,90	n.s.	0,55	1,39	n.s.	T/T+T/C C/C	n.s.	T/T	n.s.	T/T+T/C C/C	n.s.	T/T	n.s.
	T/C	0,11	1,10		-0,03	1,51				T/C+C/C				T/C+C/C	
	C/C	0,86	1,15		1,36	1,55									
XbaI (rs 9340799)	A/A	0,63	1,03	n.s.	0,43	1,43	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A	n.s.
	A/G	0,45	1,18		0,33	1,64				A/G+G/G				A/G+G/G	
	G/G	0,32	0,62		0,87	0,75									
1181 G/C OPG (rs 2073618)	G/G	0,18	0,81	n.s.	0,25	0,57	n.s.	G/G+G/C C/C	n.s.	G/G	n.s.	G/G+G/C C/C	n.s.	G/G	n.s.
	G/C	0,55	1,25		1,09	1,66				G/C+C+C				C/G+C+C	
	C/C	0,99	0,64		0,35	1,37									
163 A/G OPG (rs 3102735)	A/A	0,58	1,07	n.s.	0,47	1,47	n.s.	A/G+A/A G/G	n.s.	A/A	n.s.	A/G+A/A G/G	n.s.	A/A	n.s.
	A/G	0,49	0,90		1,21	0,86				A/G+G/G				A/G+G/G	
	C/C	-0,35	1,58		-1,12	1,94									
245 T/G OPG (rs3134070)	T/T	0,54	1,05	n.s.	0,65	1,37	n.s.	T/T+T/G C/C	n.s.	T/T	n.s.	T/T+T/G C/C	n.s.	T/T	n.s.
	T/G	0,02	-		0,49	-				T/G+C/C				T/G+C/C	
	G/G	0,00	0,00		0,00	0,00									
RANKL A/G (rs 2277438)	A/A	0,32	0,99	n.s.	0,53	1,29	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A	n.s.
	A/G	0,75	1,34		0,40	1,96				A/G+G/G				A/G+G/G	
	G/G	0,98	0,88		-0,06	1,59									
174 G/C IL-6 (rs 1800795)	G/G	0,33	0,86	n.s.	0,68	1,31	n.s.	G/G+G/C C/C	0,039	G/G	n.s.	G/G+G/C C/C	n.s.	G/G	n.s.
	G/C	0,94	1,08		0,38	1,76				C/G+C/C				C/G+C/C	
	C/C	-0,29	0,83		0,19	0,91									

DE: desviación típica; n.s.: no significativo (p>0,05). R (alelo de referencia)/ A (alelo alternativo).

Tabla 30: Polimorfismos en DM2 y asociación con la DMO

SNP	Alelo R/A	T-score cadera basal			T-score lumbar basal			T-score cadera basal				T-score lumbar basal			
		Media	DE	p	Media	DE	p	Modelo dominante	p	Modelo recesivo	p	Modelo dominante	p	Modelo recesivo	p
BsmI (rs 1544410)	A/A A/G G/G	0,17 -0,23 -0,11	1,71 1,00 1,13	n.s.	0,81 0,47 1,70	1,78 1,56 1,97	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A A/G+G/G	n.s.	A/A+A/G G/G	0,048	A/A A/G+G/G	n.s.
Apal (rs 7975232)	A/A A/C C/C	0,40 -0,45 0,07	1,44 1,02 1,33	n.s.	0,84 0,42 2,41	1,62 1,41 1,77	0,009	A/A+A/C C/C	n.s.	A/A A/C+C/C	n.s.	A/A+A/C C/C	0,003	A/A A/C+C/C	n.s.
TaqI (rs 731236)	T/T T/C C/C	-0,10 -0,37 0,49	1,06 1,10 1,66	n.s.	1,77 0,38 1,05	1,65 1,68 1,79	n.s.	T/T+T/C C/C	n.s.	T/T T/C+C/C	n.s.	T/T+T/C C/C	n.s.	T/T T/C+C/C	0,031
FokI (rs 2228570)	C/C C/T T/T	-0,31 -0,07 1,37	1,20 1,29 1,32	n.s.	1,02 0,65 1,01	2,02 1,38 1,30	n.s.	C/C+C/T T/T	n.s.	C/C C/T+T/T	n.s.	C/C+C/T T/T	n.s.	C/C C/T+T/T	n.s.
PvuII (rs 2234693)	T/T T/C C/C	-0,19 -0,01 -0,23	0,84 1,34 1,80	n.s.	0,71 1,20 0,08	1,50 1,97 1,69	n.s.	T/T+T/C C/C	n.s.	T/T T/C+C/C	n.s.	T/T+T/C C/C	n.s.	T/T T/C+C/C	n.s.
XbaI (rs 9340799)	A/A A/G G/G	-0,09 -0,13 -0,08	1,01 1,32 1,74	n.s.	0,94 1,20 0,09	1,70 2,02 1,54	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A A/G+G/G	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A A/G+G/G	n.s.
1181 G/C OPG (rs 2073618)	G/G G/C C/C	-0,50 0,27 -0,49	1,29 1,36 0,82	n.s.	1,22 0,70 0,34	2,65 1,32 1,05	n.s.	G/G+G/C C/C	n.s.	G/G G/C+C+C	n.s.	G/G+G/C C/C	n.s.	G/G G/C+C+C	n.s.
163 A/G OPG (rs 3102735)	A/A A/G G/G	-0,07 -0,32 0,00	1,28 1,44 0,00	n.s.	0,92 0,74 0,00	1,79 1,82 0,00	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A A/G+G/G	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A A/G+G/G	n.s.
245 T/G OPG (rs3134070)	T/T T/G G/G	0,07 -0,82 0,00	1,29 1,47 0,00	n.s.	0,93 0,72 0,00	1,68 2,32 0,00	n.s.	T/T+T/G C/C	n.s.	T/T T/G+C/C	n.s.	T/T+T/G C/C	n.s.	T/T T/G+C/C	n.s.
RANKL A/G (rs 2277438)	A/A A/G G/G	-0,17 0,19 0,15	1,13 1,68 .	n.s.	0,81 1,04 2,37	1,58 2,54 .	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A A/G+G/G	n.s.	A/A+A/G G/G	n.s.	A/A A/G+G/G	n.s.
174 G/C IL-6 (rs 1800795)	G/G G/C C/C	-0,04 -0,07 -0,70	1,33 1,28 0,84	n.s.	0,56 1,49 0,07	1,54 1,91 2,00	n.s.	G/G+G/C C/C	n.s.	G/G G/C+C/C	n.s.	G/G+G/C C/C	n.s.	G/G G/C+C/C	n.s.

DE: desviación típica; n.s.: no significativo (p>0,05). R (alelo de referencia)/ A (alelo alternativo).

En la DM1 se ha encontrado un polimorfismo relacionado con la DMO (Tabla 29). Este polimorfismo es el 174 G/ delC gen de la IL-6. El modelo dominante (G/G+C/G) se ha relacionado el alelo G con una mayor DMO a nivel de cadera al inicio del estudio ($p=0,039$) (Figura 36).

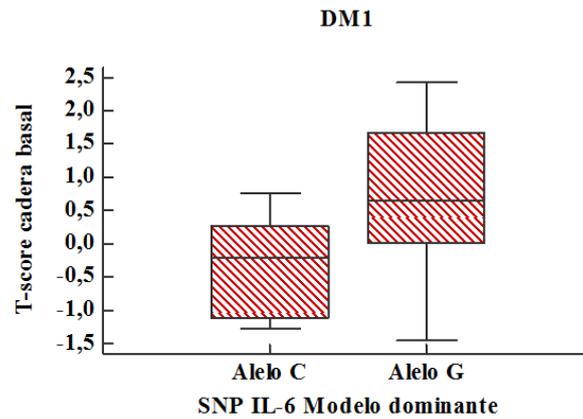


Figura 36: DMO en cadera en función de la distribución alélica del SNP 174 G/C de la IL-6 (rs1800795) en la DM1.

En la DM2 se han encontrado varios polimorfismos relacionados con la DMO (Tabla 30). Estos polimorfismos son el BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232) y el TaqI (rs731236) del gen del VDR. En el modelo dominante, se relacionado el alelo A del BsmI y el alelo A del ApaI con una menor DMO a nivel lumbar al inicio del estudio ($p=0,048$ y $p=0,003$ respectivamente). En el modelo recesivo se ha relacionado el alelo C del TaqI con una menor DMO a nivel de lumbar al inicio del estudio ($p=0,031$) (Figura 37, Figura 38 y Figura 39).

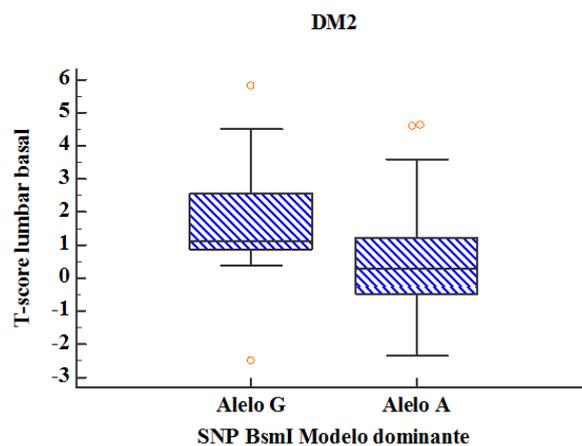


Figura 37: DMO lumbar en función de la distribución alélica del SNP BsmI (rs1544410) del gen del VDR en la DM2.

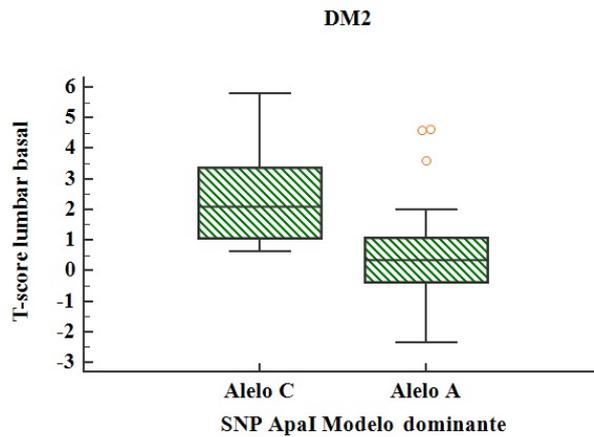


Figura 38: DMO lumbar en función de la distribución alélica del SNP ApaI (rs7975232) del gen del VDR en la DM2.

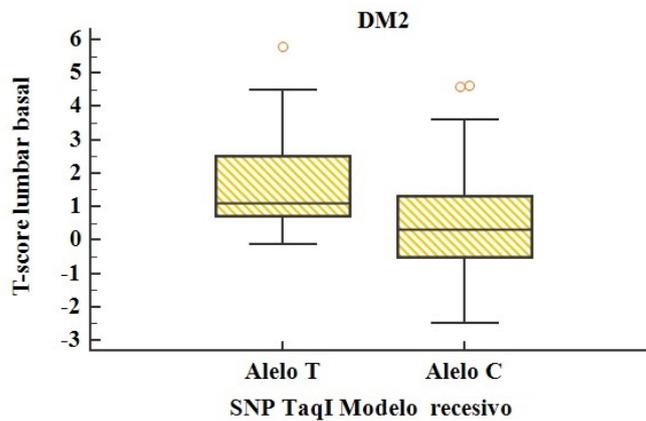


Figura 39: DMO lumbar en función de la distribución alélica del SNP TaqI (rs731236) del gen del VDR en la DM2.

4.4.3 Asociación entre los polimorfismos genéticos y las distintas características clínicas y los diferentes parámetros bioquímicos de la población

Se estudió la existencia de asociaciones entre los polimorfismos genéticos y las diferentes características clínicas de la población, así como la asociación de dichos polimorfismos con los parámetros bioquímicos. Debido a la gran cantidad de datos obtenidos, se mostrarán sólo los resultados referentes a MRO e inflamación, así como PTH y Vitamina D.

4.4.3.1 Polimorfismos en el gen del VDR

• **Polimorfismo BsmI (rs1544410) del gen VDR.**

En este polimorfismo no se encuentra ninguna asociación significativa con las características clínicas, ni en la población total ni en cada grupo de DM por separado.

Los resultados de la asociación con los parámetros bioquímicos se muestran en la Tabla 31.

- **Asociación en pacientes con DM1:** Este polimorfismo muestra asociación con los valores OC, siendo mayores en aquellos pacientes con genotipo AG. Se observa asociación entre el polimorfismo y los valores de β -CTX, mostrando valores más elevados en los pacientes con presencia del alelo G. También observamos una asociación entre la presencia del alelo A y mayores valores de Vitamina D y menores de PTH.
- **Asociación en pacientes con DM2:** Se observa asociación entre la presencia del alelo G y valores más elevados de β -CTX, P1NP y PTH.

Tabla 31: Comparación entre los distintos genotipos del BsmI del VDR y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de DM.

BsmI (rs 1544410)									
Parámetro	R/A	DM1				DM2			
		Media \pm DE	p	MD	MR	Media \pm DE	p	MD	MR
OC (ug/l)	A/A	12,32 \pm 3,26	0,050	n.s.	n.s.	10,83 \pm 4,97	n.s.	n.s.	n.s.
	A/G	18,88 \pm 6,79				11,87 \pm 6,72			
	G/G	14,9 \pm 6,95				13,59 \pm 5,66			
β -CTX (ug/l)	A/A	0,19 \pm 0,11	n.s.	n.s.	0,044	0,19 \pm 0,07	0,034	n.s.	0,031
	A/G	0,39 \pm 0,22				0,29 \pm 0,29			
	G/G	0,3 \pm 0,21				0,26 \pm 0,15			
P1NP (ug/l)	A/A	31,73 \pm 11,07	n.s.	n.s.	n.s.	29,36 \pm 9,32	n.s.	n.s.	0,049
	A/G	59,46 \pm 41,72				33,33 \pm 11,33			
	G/G	43,61 \pm 20,29				38,61 \pm 18,68			
IL-6 (ng/l)	A/A	1,66 \pm 0,44	n.s.	n.s.	n.s.	2,32 \pm 1,48	n.s.	n.s.	n.s.
	A/G	1,72 \pm 0,62				4,66 \pm 5,73			
	G/G	1,93 \pm 1,03				3,93 \pm 3,00			
Vitamina D (ng/ml)	A/A	24,13 \pm 4,74	0,003	0,001	n.s.	16,77 \pm 4,21	n.s.	n.s.	n.s.
	A/G	23,86 \pm 5,22				17,5 \pm 4,88			
	G/G	16,39 \pm 7,41				17,92 \pm 6,03			
PTH (pg/ml)	A/A	21,43 \pm 3,95	0,019	0,006	n.s.	26,69 \pm 13,37	0,033	0,009	n.s.
	A/G	23,2 \pm 6,66				39,48 \pm 30,69			
	G/G	29,33 \pm 5,15				32,88 \pm 13,94			

MD: Modelo dominante; MR: Modelo recesivo, DE: desviación estándar; R (alelo de referencia)/ A (alelo alternativo).n.s.: no significativo (p>0,05).

• **Polimorfismo ApaI (rs7975232) del gen VDR.**

En este polimorfismo se encuentra una asociación significativa entre la DM1 y la presencia de fracturas previas ($p=0,001$), así como entre la DM1 y la presencia del alelo C y la presencia de nefropatía ($p=0,019$).

Los resultados de la asociación con los parámetros bioquímicos se muestran en la Tabla 32.

- **Asociación en pacientes con DM1:** Este polimorfismo muestra asociación entre el alelo C y mayores valores de OC y PTH. Se observan menores valores de IL-6 en pacientes con presencia del alelo A.
- **Asociación en pacientes con DM2:** Se observa asociación entre la presencia del alelo C y valores más elevados de OC. Los pacientes con genotipo CA presentan valores más elevados de PTH.

Tabla 32: Comparación entre los distintos genotipos del ApaI del VDR y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de DM.

ApaI (rs7975232)									
Parámetro	R/A	DM1				DM2			
		Media ±DE	p	MD	MR	Media ±DE	p	MD	MR
OC (ug/l)	A/A	10,87 ± 4,39	0,009	n.s.	0,008	9,75 ± 3,75	n.s.	n.s.	0,033
	A/C	16,16 ± 8,99				14,63 ± 9,34			
	C/C	13,09 ± 5,63				11,55 ± 5,3			
β-CTX (ug/l)	A/A	0,25 ± 0,16	n.s.	n.s.	n.s.	0,19 ± 0,09	n.s.	n.s.	n.s.
	A/C	0,32 ± 0,25				0,31 ± 0,29			
	C/C	0,25 ± 0,16				0,25 ± 0,16			
P1NP (ug/l)	A/A	39 ± 20,96	n.s.	n.s.	n.s.	30,53 ± 8,95	n.s.	n.s.	n.s.
	A/C	47,84 ± 36,82				36,98 ± 16,55			
	C/C	37,59 ± 16,77				36,65 ± 16,76			
IL-6 (ng/l)	A/A	2,74 ± 1,64	n.s.	0,030	n.s.	3,18 ± 1,84	n.s.	0,052	n.s.
	A/C	2,89 ± 4,46				3,99 ± 5,86			
	C/C	3,76 ± 2,79				4,84 ± 3,05			
Vitamina D (ng/ml)	A/A	18,06 ± 4,96	n.s.	n.s.	n.s.	16,74 ± 4,51	n.s.	n.s.	n.s.
	A/C	19,52 ± 6,39				17 ± 4,86			
	C/C	19,34 ± 7,51				19,27 ± 6,5			
PTH (pg/ml)	A/A	23,24 ± 8,24	0,040	n.s.	0,013	22,93 ± 9,04	0,021	n.s.	0,005
	A/C	34,05 ± 24,57				41,7 ± 30,37			
	C/C	33,18 ± 12,88				36,55 ± 14,64			

MD: Modelo dominante; MR: Modelo recesivo; DE: desviación estándar; R (alelo de referencia)/ A (alelo alternativo).n.s.: no significativo ($p>0,05$).

• **Polimorfismo TaqI (rs731236) del gen VDR.**

En este polimorfismo no se encuentra ninguna asociación significativa con las características clínicas, ni en la población total ni en cada grupo de DM por separado.

Los resultados de la asociación con los parámetros bioquímicos se muestran en la Tabla 33.

- **Asociación en pacientes con DM1:** Este polimorfismo muestra asociación entre el alelo C y mayores valores de Vitamina D y menores de PTH.
- **Asociación en pacientes con DM2:** No se observa ninguna asociación significativa.

Tabla 33: Comparación entre los distintos genotipos del TaqI del VDR y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de DM

TaqI (rs731236)									
Parámetro	R/A	DM1				DM2			
		Media ±DE	p	MD	MR	Media ±DE	p	MD	MR
OC (ug/l)	T/T	15,87 ± 7,56	n.s.	n.s.	n.s.	15,33 ± 10,19	n.s.	n.s.	n.s.
	T/C	19,19 ± 7,34				11,65 ± 3,72			
	C/C	16,74 ± 10,88				10,16 ± 4,72			
β-CTX (ug/l)	T/T	0,28 ± 0,19	n.s.	n.s.	n.s.	0,28 ± 0,16	n.s.	n.s.	n.s.
	T/C	0,38 ± 0,22				0,27 ± 0,29			
	C/C	0,22 ± 0,13				0,19 ± 0,08			
P1NP (ug/l)	T/T	49,83 ± 28,63	n.s.	n.s.	n.s.	38,4 ± 19,74	n.s.	n.s.	n.s.
	T/C	61,96 ± 49,93				34,36 ± 11,61			
	C/C	49,66 ± 34,62				30,55 ± 9,57			
IL-6 (ng/l)	T/T	1,87 ± 0,96	n.s.	n.s.	n.s.	3,98 ± 2,92	n.s.	n.s.	n.s.
	T/C	1,71 ± 0,6				4,58 ± 5,78			
	C/C	1,75 ± 0,56				2,33 ± 1,18			
Vitamina D (ng/ml)	T/T	14,17 ± 7,36	0,008	n.s.	0,002	17,35 ± 5,75	n.s.	n.s.	n.s.
	T/C	21,21 ± 4,84				19,38 ± 7,29			
	C/C	22,33 ± 2,82				14,98 ± 3,96			
PTH (pg/ml)	T/T	27,82 ± 5,78	n.s.	n.s.	0,034	39,94 ± 32,11	n.s.	n.s.	n.s.
	T/C	23,38 ± 6,47				34,5 ± 18,92			
	C/C	20,5 ± 4,51				24,91 ± 9,68			

MD: Modelo dominante; MR: Modelo recesivo, DE: desviación estándar; R (alelo de referencia)/ A (alelo alternativo).n.s.: no significativo (p>0,05).

• **Polimorfismo FokI (rs2228570) del gen VDR.**

En este polimorfismo se encuentra una asociación significativa entre la DM1 y la presencia de padres con fractura ($p=0,002$).

Los resultados de la asociación con los parámetros bioquímicos se muestran en la Tabla 34.

- **Asociación en pacientes con DM1:** Este polimorfismo muestra asociación entre el alelo T y menores valores de OC y β -CTX. Se asocia el genotipo CT con mayores valores de IL-6.
- **Asociación en pacientes con DM2:** Se observa asociación entre la presencia del alelo T y menores valores de β -CTX, P1NP e IL-6.

Tabla 34 Comparación entre los distintos genotipos del FokI del VDR y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de diabetes

FokI (rs2228570)									
Parámetro	R/A	DM1				DM2			
		Media \pm DE	p	MD	MR	Media \pm DE	p	MD	MR
OC (ug/l)	C/C	20,08 \pm 8,12	0,043	n.s.	0,020	14,16 \pm 9,48	n.s.	n.s.	n.s.
	C/T	15,15 \pm 5,84				10,07 \pm 3,64			
	T/T	11,49 \pm 2,26				12,85 \pm 0,85			
β -CTX (ug/l)	C/C	0,45 \pm 0,29	0,030	n.s.	0,008	0,26 \pm 0,13	n.s.	n.s.	0,041
	C/T	0,22 \pm 0,11				0,2 \pm 0,08			
	T/T	0,17 \pm 0,05				0,16 \pm 0,05			
P1NP (ug/l)	C/C	62,1 \pm 43,79	n.s.	n.s.	n.s.	37,52 \pm 13,76	n.s.	n.s.	0,014
	C/T	44,27 \pm 23,51				28,26 \pm 8,91			
	T/T	36,56 \pm 12,75				32,42 \pm 4,99			
IL-6 (ng/l)	C/C	1,5 \pm 0	0,034	n.s.	0,037	9,7 \pm 19,58	0,043	n.s.	0,016
	C/T	2,11 \pm 1,01				4,25 \pm 5,28			
	T/T	1,5 \pm 0				2,75 \pm 1,43			
Vitamina D (ng/ml)	C/C	20,67 \pm 6,32	n.s.	n.s.	n.s.	17,55 \pm 4,91	n.s.	n.s.	n.s.
	C/T	22,61 \pm 6,19				18,12 \pm 5,65			
	T/T	20,2 \pm 12,16				19,77 \pm 2,18			
PTH (pg/ml)	C/C	24,11 \pm 10,2	n.s.	n.s.	n.s.	35,15 \pm 21,79	n.s.	n.s.	n.s.
	C/T	25,69 \pm 7,5				26,53 \pm 15,66			
	T/T	27,75 \pm 5,25				25 \pm 15,62			

MD: Modelo dominante; MR: Modelo recesivo, DE: desviación estándar; R (alelo de referencia)/ A (alelo alternativo).n.s.: no significativo ($p>0,05$).

4.4.3.2 Polimorfismos en el gen del ESR1

• Polimorfismo PvuII (rs2234693) del gen del ESR1

En este polimorfismo se encuentra una asociación significativa entre la DM1 y el IMC (p=0,038).

Los resultados de la asociación con los parámetros bioquímicos se muestran en la Tabla 35.

- **Asociación en pacientes con DM1:** Este polimorfismo muestra asociación entre el genotipo TC y mayores valores de OC. Se asocia el alelo T con menores valores de IL-6.
- **Asociación en pacientes con DM2:** Se observa asociación entre la presencia del alelo T con menores valores de β-CTX. Se asocia el alelo C con mayores valores de IL-6 y con menores valores de Vitamina D.

Tabla 35: Comparación entre los distintos genotipos del PvuII del ESR1 y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de diabetes

PvuII (rs2234693)									
Parámetro	R/A	DM1				DM2			
		Media±DE	p	MD	MR	Media ± DE	p	MD	MR
OC (ug/l)	T/T	14,21 ± 7,03	0,036	n.s.	n.s.	11,21 ± 2,96	n.s.	n.s.	n.s.
	T/C	20,67 ± 7,91				13,89 ± 9,52			
	C/C	13,68 ± 4,21				11,14 ± 3,65			
β-CTX (ug/l)	T/T	0,27 ± 0,16	n.s.	n.s.	n.s.	0,23 ± 0,08	n.s.	0,032	n.s.
	T/C	0,3 ± 0,22				0,22 ± 0,1			
	C/C	0,28 ± 0,13				0,44 ± 0,63			
P1NP (ug/l)	T/T	47,83 ± 29,6	n.s.	n.s.	n.s.	30,01 ± 10,88	n.s.	n.s.	n.s.
	T/C	66 ± 49				37,8 ± 17,71			
	C/C	37,95 ± 10,41				31,27 ± 12,48			
IL-6 (ng/l)	T/T	2,09 ± 1,57	n.s.	0,044	n.s.	2,52 ± 0,96	0,012	n.s.	0,004
	T/C	2,61 ± 2,16				10,35 ± 19,73			
	C/C	3,82 ± 1,76				5,76 ± 6,08			
Vitamina D (ng/ml)	T/T	22,4 ± 7,82	n.s.	n.s.	n.s.	20,65 ± 4,6	0,003	n.s.	0,010
	T/C	21,46 ± 7,81				15,34 ± 4,34			
	C/C	19,89 ± 5,23				19,21 ± 5,45			
PTH (pg/ml)	T/T	21,13 ± 7,12	n.s.	n.s.	n.s.	23,31 ± 7,83	n.s.	n.s.	n.s.
	T/C	28,05 ± 8,87				33,15 ± 23,01			
	C/C	23,25 ± 8,7				32,4 ± 13,96			

MD: Modelo dominante; MR: Modelo recesivo, DE: desviación estándar; R (alelo de referencia)/ A (alelo alternativo).n.s.: no significativo (p>0,05).

• **Polimorfismo XbaI (rs9340799) del gen del ESR1**

En este polimorfismo se encuentra una asociación significativa entre la DM (población total) con la presencia de dislipemia (p=0,043), siendo el alelo A el que muestra un perfil lipídico más desfavorable.

Los resultados de la asociación con los parámetros bioquímicos se muestran en la Tabla 36.

- **Asociación en pacientes con DM1:** Este polimorfismo muestra asociación entre el genotipo AG y mayores valores de IL-6. Se asocia el alelo A con mayores valores de TSH.
- **Asociación en pacientes con DM2:** Se observa asociación entre la presencia del alelo A con menores valores de β-CTX.

Tabla 36: Comparación entre los distintos genotipos del XbaII del ESR1 y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de diabetes

XbaI (rs 9340799)									
Parámetro	R/A	DM1				DM2			
		Media ±DE	p	MD	MR	Media ±DE	p	MD	MR
OC (ug/l)	A/A	16,03 ± 7,44	n.s.	n.s.	n.s.	14,01 ± 9,23	n.s.	n.s.	n.s.
	A/G	18,98 ± 7,9				11,9 ± 5,78			
	G/G	15,9 ± 9,19				10,76 ± 3,83			
β-CTX (ug/l)	A/A	0,29 ± 0,14	n.s.	n.s.	n.s.	0,22 ± 0,09	n.s.	0,037	n.s.
	A/G	0,27 ± 0,21				0,24 ± 0,11			
	G/G	0,37 ± 0,18				0,45 ± 0,67			
P1NP (ug/l)	A/A	48,84 ± 26,72	n.s.	n.s.	n.s.	35,43 ± 15,78	n.s.	n.s.	n.s.
	A/G	59,45 ± 48,29				36,44 ± 15,87			
	G/G	57,74 ± 39,86				30,6 ± 13,29			
IL-6 (ng/l)	A/A	1,68 ± 0,61	0,011	n.s.	n.s.	3,63 ± 2,6	n.s.	n.s.	n.s.
	A/G	1,89 ± 0,87				3,36 ± 2,57			
	G/G	1,53 ± 0,07				5,56 ± 9,17			
Vitamina D (ng/ml)	A/A	21,98 ± 6,44	n.s.	n.s.	n.s.	18,86 ± 5,26	n.s.	n.s.	n.s.
	A/G	21,21 ± 7,39				15,78 ± 5,09			
	G/G	21,02 ± 6,52				18,55 ± 4,23			
PTH (pg/ml)	A/A	23,25 ± 7,06	n.s.	n.s.	n.s.	33,33 ± 20,92	n.s.	n.s.	n.s.
	A/G	26,18 ± 9,31				29,82 ± 19,08			
	G/G	25 ± 10,2				30,11 ± 14,6			

MD: Modelo dominante; MR: Modelo recesivo, DE: desviación estándar; R (alelo de referencia)/ A (alelo alternativo).n.s.: no significativo (p>0,05).

4.4.3.3 Polimorfismos en el gen de la OPG

• **Polimorfismo 1181 G/C (rs2073618) del gen de la OPG**

En este polimorfismo se encuentra relacionado con la presencia de retinopatía, tanto la población total estudiada ($p=0,025$), como en la DM2 en particular ($p=0,043$). En cuanto a la asociación estudiada por frecuencia alélica, se observa asociación entre el alelo C de dicho polimorfismo y la retinopatía, en la población total ($p=0,005$) y en la DM1 en particular ($p=0,044$).

Los resultados de la asociación con los parámetros bioquímicos se muestran en la Tabla 37.

- **Asociación en pacientes con DM1:** En este polimorfismo se asocia el alelo C con mayores valores de IL-6 y el genotipo CC con mayores valores de P1NP.
- **Asociación en pacientes con DM2:** No se observa ninguna asociación significativa.

Tabla 37: Comparación entre los distintos genotipos del rs2073618 de la OPG y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de diabetes

1181 G/C OPG (rs 2073618)									
Parámetro	R/A	DM1				DM2			
		Media ±DE	p	MD	MR	Media ±DE	p	MD	MR
OC (ug/l)	G/G	18,32 ± 5,76	n.s.	n.s.	n.s.	10,67 ± 4,75	n.s.	n.s.	n.s.
	G/C	16,2 ± 8,45				13,44 ± 9,06			
	C/C	17,71 ± 7,87				13,42 ± 6,06			
β-CTX (ug/l)	G/G	0,36 ± 0,13	n.s.	n.s.	n.s.	0,36 ± 0,42	n.s.	n.s.	n.s.
	G/C	0,26 ± 0,17				0,25 ± 0,13			
	C/C	0,36 ± 0,27				0,24 ± 0,12			
P1NP (ug/l)	G/G	54,56 ± 14,86	0,036	n.s.	n.s.	31,91 ± 10,56	n.s.	n.s.	n.s.
	G/C	34,98 ± 16,32				34,65 ± 15,64			
	C/C	66,32 ± 58,11				38,31 ± 13,46			
IL-6 (ng/l)	G/G	1,5 ± 0	0,010	0,006	0,039	13,44 ± 29,07	n.s.	n.s.	n.s.
	G/C	2,43 ± 1,74				6,19 ± 6,05			
	C/C	4,11 ± 2,52				4,87 ± 5,99			
Vitamina D (ng/ml)	G/G	21,32 ± 5,5	n.s.	n.s.	n.s.	17,24 ± 4,88	n.s.	n.s.	n.s.
	G/C	21,47 ± 8,64				17,75 ± 4,59			
	C/C	21,86 ± 4,19				16,21 ± 5,44			
PTH (pg/ml)	G/G	23,22 ± 8,94	n.s.	0,071	n.s.	25,42 ± 10,87	n.s.	n.s.	n.s.
	G/C	24,41 ± 7,86				34,81 ± 21,58			
	C/C	30,38 ± 9,59				25,38 ± 21,57			

MD: Modelo dominante; MR: Modelo recesivo, DE: desviación estándar; R (alelo de referencia)/ A (alelo alternativo).n.s.: no significativo ($p>0,05$).

- **Polimorfismo 163 A/G (rs3102735) del gen de la OPG**

Este polimorfismo se encuentra relacionado con la presencia de fracturas previas, así como con los antecedentes de padres con fractura. En cuanto a la asociación de este polimorfismo con la presencia de fracturas previas, se observa una relación significativa en el caso de la población total ($p=0,021$) y en el caso de la DM1 ($p=0,005$), siendo en este caso la presencia del alelo A el que se asocia con una mayor prevalencia de fracturas previas ($p=0,032$). En cuanto a la asociación de este polimorfismo con los antecedentes de padres con fractura, se observa una relación significativa en el caso de la población total ($p=0,038$), siendo en este caso la presencia del alelo G el que se asocia con una mayor prevalencia de antecedentes de padres con fractura ($p=0,026$) así como en la DM1 en particular ($p<0,001$), siendo en este caso el alelo A el relacionado ($p=0,003$).

No se observa ninguna asociación significativa entre este polimorfismo y los marcadores estudiados en ambos tipos de DM.

- **Polimorfismo 245 T/G (rs3134070) del gen de la OPG**

En este polimorfismo se encuentra relacionado con la presencia de fracturas previas ($p=0,046$) y con y la presencia de microangiopatía ($p=0,037$) en la población total estudiada.

En el caso del grupo de pacientes DM1 en particular encontramos asociación entre dicho polimorfismo con la obesidad ($p=0,001$) y la presencia de microangiopatía ($p<0,001$).

No se observa ninguna asociación significativa entre este polimorfismo y los marcadores estudiados en ambos tipos de DM.

4.4.3.4 Polimorfismos en el gen del RANKL

EL polimorfismo rs2277438 (A/G) del gen RANKL se asocia con la presencia de ACV, tanto en la población total de estudio ($p<0,001$) como en el caso de la DM2 en particular ($p=0,018$) siendo la presencia del alelo A la que se asocia a una mayor prevalencia de ACV.

Sin embargo, no se observa ninguna asociación significativa entre este polimorfismo y los marcadores estudiados en ambos tipos de DM.

4.4.3.5 Polimorfismos en el gen de la IL-6

Este polimorfismo 174 G/C (rs1800795) se relaciona con la presencia de antecedentes de padres con fractura en el caso de la DM1 (p=0,046), siendo en particular la presencia del alelo C el que hace posible esta asociación. También se encuentra una asociación en dicho grupo de pacientes de este polimorfismo con el IMC (p=0,020). En el caso de pacientes con DM2, hemos encontrado asociación de este polimorfismo con la presencia de ACV (p=0,001).

Los resultados de la asociación con los parámetros bioquímicos se muestran en la Tabla 38.

- **Asociación en pacientes con DM1:** En este polimorfismo se asocia el alelo C con menores valores de IL-6.
- **Asociación en pacientes con DM2:** Se encuentra asociación entre el alelo G y menores valores de Vitamina D. El alelo C se asocia a menores valores de PTH.

Tabla 38: Comparación entre los distintos genotipos del rs1800795 del gen de la IL-6 y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de diabetes

174 G/C IL-6 (rs1800795)									
Parámetro	R/A	DM1				DM2			
		Media ± DE	p	MD	MR	Media ±DE	p	MD	MR
OC (ug/l)	G/G	16,43 ± 8,1				13,69 ± 8,77			
	G/C	17,97 ± 7,78	n.s.	n.s.	n.s.	12,32 ± 6,03	n.s.	n.s.	n.s.
	C/C	18,93 ± 8,38				10,97 ± 4,26			
β-CTX (ug/l)	G/G	0,34 ± 0,25				0,29 ± 0,29			
	G/C	0,32 ± 0,18	n.s.	n.s.	n.s.	0,26 ± 0,14	n.s.	n.s.	n.s.
	C/C	0,32 ± 0,2				0,21 ± 0,11			
P1NP (ug/l)	G/G	60,23 ± 58,28				34,78 ± 14,85			
	G/C	51,28 ± 25,4	n.s.	n.s.	n.s.	37,36 ± 16,03	n.s.	n.s.	n.s.
	C/C	58,56 ± 37,75				28,94 ± 15,5			
IL-6 (ng/l)	G/G	4,66 ± 6,4				4,3 ± 4,04			
	G/C	1,86 ± 0,74	n.s.	n.s.	0,040	3,96 ± 4,09	n.s.	n.s.	n.s.
	C/C	1,77 ± 0,55				3,24 ± 1,79			
Vitamina D (ng/ml)	G/G	17,1 ± 6,83				16,99 ± 6,19			
	G/C	20,34 ± 5,11	n.s.	n.s.	n.s.	17,27 ± 4,53	0,011	0,003	n.s.
	C/C	17,93 ± 9,03				26,98 ± 11,3			
PTH (pg/ml)	G/G	27,22 ± 4,76				42,38 ± 29,34			
	G/C	22,73 ± 7,11	n.s.	n.s.	n.s.	30,5 ± 16,96	n.s.	n.s.	0,020
	C/C	25,14 ± 6,09				20 ± 10,49			

MD: Modelo dominante; MR: Modelo recesivo, DE: desviación estándar; R (alelo de referencia)/ A (alelo alternativo).n.s.: no significativo (p>0,05).

4.5 Objetivo 5: Estudiar la combinación más adecuada de los marcadores de remodelado óseo, de inflamación y de los SNPs con las variables clínicas para el diagnóstico y seguimiento de la patología ósea en el paciente diabético

Para elaborar un modelo que predijese la probabilidad o riesgo de que un paciente presente patología ósea, se realizó un análisis de regresión logística binaria, tomando como referencia la Odds Ratio ajustada, con un intervalo de confianza del 95%.

El análisis de regresión logística se llevó a cabo para el diagnóstico de patología ósea como variable dependiente, eligiendo varios factores clínicos como covariables así como marcadores bioquímicos y polimorfismos, elaborando cuatro modelos posibles.

Para cada modelo, con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística, se calculó la ecuación de regresión logística que define la probabilidad de clasificación en paciente con patología ósea:

$$\text{Logit}(p) = \alpha + \beta_1 * (\text{variable}_1) + \beta_2 * (\text{variable}_2) + \dots + \beta_n * (\text{variable}_n)$$

Siendo $\text{Logit}(p) = \ln [p/(1-p)]$, y donde p es la probabilidad de que un individuo presente la característica evaluada, es decir, la probabilidad de que un paciente se clasifique en el grupo de paciente con patología ósea.

La fórmula puede expresarse también de la siguiente manera, definiendo la probabilidad de que un paciente se clasifique en el grupo de patología ósea:

$$\text{Probabilidad} = \frac{1}{[1 - e^{-\text{Logit}(p)}]}$$

Posteriormente, se evaluaron y compararon los cuatro modelos mediante el IDI, mediante el modelo que describió Pencina y cols. (130).

4.5.1 Modelo con variables clínicas

Se realizó un análisis univariado de las variables clínicas, incluyendo la edad, el tipo de diabetes, el sexo, los años de evolución, el IMC, la presencia de HTA, dislipemia, microangiopatía, nefropatía, retinopatía, ACV, neuropatía, cardiopatía, EAP, obesidad, fracturas previas y antecedentes de padres con fractura.

Se eliminaron del modelo diez variables clínicas (sexo, microangiopatía, nefropatía, retinopatía, ACV, neuropatía, EAP, obesidad y padres con fractura), puesto que se comprobó que no mejoraban el rendimiento diagnóstico. Seguidamente, se realizó un análisis multivariado de regresión logística, donde se incluyeron las variables con una $p < 0,15$ en el análisis univariado: la edad, el tipo de diabetes, los años de evolución, la HTA, la dislipemia, la presencia de cardiopatía y de fracturas previas. En el análisis multivariado, se confirmó que fueron factores predictores de patología ósea, de forma independiente ($p < 0,05$), la edad y la presencia de fracturas previas. Los detalles del análisis se señalan en la Tabla 39.

Tabla 39: Modelo de regresión logística univariado y multivariado para el diagnóstico de osteopenia con variables clínicas

Variable	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Edad	1,10(1,04-1,17)	0,000	1,10(1,02-1,19)	0,014
Tipo de diabetes	3,82(1,07-13,60)	0,039	0,66(0,07-5,64)	0,706
Sexo	1,56(0,65-3,77)	0,314		
Años de evolución	1,03(0,99-1,08)	0,096	1,02(0,96-1,08)	0,447
HTA	3,21(1,27-8,09)	0,013	1,57(0,48-5,0)	0,447
Dislipemia	2,630(0,97-7,09)	0,056	0,95(0,24-3,64)	0,940
Microangiopatía	1,66(0,19-14,16)	0,642		
Nefropatía	0,77(0,29-2,06)	0,610		
Retinopatía	0,56(0,19-1,64)	0,297		
ACV	0,00	1,000		
Neuropatía	1,09(0,33-3,61)	0,881		
Cardiopatía isquémica	4,25(1,18-15,28)	0,027	2,32(0,51-10,56)	0,274
EAP	1,45(0,145-14,63)	0,748		
Obesidad	0,67(0,28-1,62)	0,383		
Fracturas previas	2,66(1,08-6,56)	0,033	3,05(1,05-8,84)	0,04
Padres con fractura	0,82(0,21-3,14)	0,780		

OR: Odds Ratio; p significativa para univariado ($p < 0,150$); p significativa para multivariado ($p < 0,05$)

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se definió la siguiente ecuación:

$$\text{Logit}(p) = -7.476 + 0.098 * \text{Edad} - 0.413 * \text{Tipo de diabetes} + 0.024 * \text{Años de evolución} + 0.455 * \text{HTA} - 0.052 * \text{Dislipemia} + 0.845 * \text{Cardiopatía} + 1.116 * \text{Fracturas previas}$$

Las unidades de las variables incluidas en la fórmula son las siguientes: edad en años, tipo de diabetes uno para DM1 y dos para DM2, años de evolución en años, y en el caso de HTA, dislipemia, cardiopatía y fracturas previas, el valor será de cero si está ausente y uno en caso de presencia.

Se establece para dicho modelo un punto de corte de 0.278, con una sensibilidad de 76%, una especificidad de 81.19%, un VPP de 50% y un VPN de 91.3%.

4.5.2 Modelo con OC

Para la realización del modelo de regresión logística, se han incluido las variables clínicas incluidas en el modelo de variables clínicas y la OC ya que mostró una p significativa en el análisis univariado de regresión logística de cada uno de los modelos por separado (Tabla 40).

Se eliminaron del modelo como variables los valores de β -CTX y P1NP puesto que se comprobó que no mejoraban el rendimiento diagnóstico.

En el análisis multivariado, se confirmó que fueron factores predictores de patología ósea, de forma independiente ($p < 0,05$), la edad y la presencia fracturas previas y la OC.

Tabla 40: Modelo de regresión logística univariado y multivariado para el diagnóstico de osteopenia con variables clínicas y MRO

Variable	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Edad	1,10 (1,045-1,172)	0,000	1,090(1,00-1,17)	0,030
Tipo de diabetes	3,82 (1073-13,609)	0,039	0,93(0,09-9,61)	0,956
Años de evolución	1,038 (0993-1,085)	0,096	0,98(0,92-1,05)	0,732
HTA	3,212 (1274-8,096)	0,013	2,19(0,54-8,83)	0,270
Dislipemia	2,630 (0974-7,099)	0,056	1,40(0,33-5,94)	0,644
Cardiopatía isquémica	4,250 (1182-15,285)	0,027	2,91(0,47-18,0)	0,250
Fracturas previas	2,663 (1080-6,566)	0,033	3,80(1,20-12,0)	0,023
OC	1,08 (1,01-1,15)	0,012	1,16(1,05-1,28)	0,003
β-CTX	2,55 (0,29-22,39)	0,396		
P1NP1	1,00 (0,98-1,02)	0,772		

OR: Odds Ratio; p significativa para univariado ($p < 0,150$); p significativa para multivariado ($p < 0,05$)

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se definió la siguiente ecuación:

$$\text{Logit}(p) = -9.602 + 0.087 * \text{Edad} - 0.066 * \text{Tipo de diabetes} - 0.012 * \text{Años de evolución} + 0.785 * \text{HTA} + 0.340 * \text{Dislipemia} + 1.070 * \text{Cardiopatía} + 1.336 * \text{Fracturas previas} + 0.152 * \text{OC}$$

Las unidades de las variables incluidas en la fórmula son las siguientes: edad en años, tipo de diabetes uno para DM1 y dos para DM2, años de evolución en años, en el caso de HTA, dislipemia, cardiopatía y fracturas previas, el valor será de cero si está ausente y uno en caso de presencia y la OC en ug/l.

Se establece para dicho modelo un punto de corte de 0.178, con una sensibilidad de 83.3%, una especificidad de 71.9%, un VPP de 42.6% y un VPN de 94.5%.

4.5.3 Modelo con IL-6

Para la realización del modelo de regresión logística, se han incluido las variables clínicas, la OC y la IL-6 ya que mostró una p significativa en el análisis univariado de regresión logística de cada uno de los modelos por separado (Tabla 41).

En el análisis multivariado, se confirmó que fueron factores predictores de patología ósea, de forma independiente ($p < 0,05$), la edad, la presencia de fracturas previas y la OC.

Tabla 41: Modelo de regresión logística univariado y multivariado para el diagnóstico de osteopenia con variables clínicas, OC e IL-6.

Variable	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Edad	1,10 (1,045-1,172)	0,000	1,09 (1,01-1,18)	0,026
Tipo de diabetes	3,82 (1,073-13,609)	0,039	0,94 (0,09-9,62)	0,962
Años de evolución	1,038 (0,993-1,085)	0,096	0,97 (0,91-1,05)	0,563
HTA	3,212 (1,274-8,096)	0,013	2,32 (0,55-9,67)	0,247
Dislipemia	2,630 (0,974-7,099)	0,056	1,44 (0,33-6,24)	0,618
Cardiopatía isquémica	4,250 (1,182-15,285)	0,027	3,11 (0,45-21,2)	0,245
Fracturas previas	2,663 (1,080-6,566)	0,033	3,94 (1,22-12,7)	0,021
OC	1,08 (1,01-1,15)	0,012	1,17 (1,05-1,30)	0,003
IL-6	0,94 (0,77-1,14)	0,150	0,83 (0,58-1,18)	0,304

OR: Odds Ratio; p significativa para univariado ($p < 0,150$); p significativa para multivariado ($p < 0,05$)

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se definió la siguiente ecuación:

$$\text{Logit}(p) = -9.350 + 0.090 * \text{Edad} - 0.056 * \text{Tipo de diabetes} - 0.021 * \text{Años de evolución} + 0.843 * \text{HTA} + 0.371 * \text{Dislipemia} + 1.137 * \text{Cardiopatía} + 1.373 * \text{Fracturas previas} + 0.158 * \text{OC} - 0.183 * \text{IL-6}$$

Las unidades de las variables incluidas en la fórmula son las siguientes: edad en años, tipo de diabetes uno para DM1 y dos para DM2, años de evolución en años, en el caso de HTA, dislipemia, cardiopatía y fracturas previas, el valor será de cero si está ausente y uno en caso de presencia, OC en ug/l y la IL-6 en ng/l.

Se establece para dicho modelo un punto de corte de 0.191, con una sensibilidad de 83.3%, una especificidad de 72.9%, un VPP de 43.5% y un VPN de 94.6%.

4.5.4 Modelo con polimorfismos genéticos

Para la realización del modelo de regresión logística, se han incluido las variables clínicas, la OC y la IL-6 ya que mostraron una p significativa en el análisis univariado de regresión logística de cada uno de los modelos por separado (Tabla 42), así como la presencia del alelo Alelo C del polimorfismo PvuII del gen ESR1 y del alelo C del polimorfismo 1181G/C del gen de la OPG.

Se eliminaron del modelo como variables, el resto de alelos de los diferentes polimorfismos estudiados puesto que se comprobó que no mejoraban el rendimiento diagnóstico.

En el análisis multivariado, se confirmó que fueron factores predictores de patología ósea, de forma independiente ($p < 0,05$), la OC y la presencia del alelo C del polimorfismo rs2073618 1181G/C del gen de la OPG.

Tabla 42: Modelo de regresión logística univariado y multivariado para el diagnóstico de osteopenia con variables clínicas, OC, IL-6 y SNPs.

Variable	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Edad	1,10(1045-1,172)	0,000	1,14(0,99-1,31)	0,066
Tipo de diabetes	3,82(1073-13,609)	0,039	0,31(0,00-10,5)	0,522
Años de evolución	1,038(0993-1,085)	0,096	0,95(0,83-1,07)	0,433
HTA	3,212(1274-8,096)	0,013	9,46(0,50-178,)	0,133
Dislipemia	2,630(0974-7,099)	0,056	6,36(0,34-115,)	0,211
Cardiopatía isquémica	4,250(1182-15,285)	0,027	1,03(0,02-50,4)	0,985
Fracturas previas	2,663(1080-6,566)	0,033	0,46(0,04-4,80)	0,524
OC	1,08(1,01-1,15)	0,012	1,34(1,05-1,71)	0,016
IL-6	0,94(0,77-1,14)	0,150	0,69(0,29-1,64)	0,411
Alelo C - PvuII	5,61(0,68-46,0)	0,108	2,74(0,17-42,1)	0,469
Alelo C - 1181 OPG	0,31(0,08-1,11)	0,074	0,02(0,00-0,75)	0,035

OR: Odds Ratio; p significativa para univariado (p<0,150); p significativa para multivariado (p<0,05)

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se definió la siguiente ecuación:

$$\text{Logit}(p) = -10.848 + 0.134 * \text{Edad} - 1.141 * \text{Tipo de diabetes} - 0.051 * \text{Años de evolución} + 2.248 * \text{HTA} + 1.851 * \text{Dislipemia} + 0.038 * \text{Cardiopatía} - 0.758 * \text{Fracturas previas} + 0.296 * \text{OC} - 0.360 * \text{IL-6} + 1.009 * \text{Alelo C (PvuII)} - 3.910 * \text{Alelo C (1181 G/C OPG)}$$

Las unidades de las variables incluidas en la fórmula son las siguientes: edad en años, tipo de diabetes, uno para DM1 y dos para DM2, años de evolución en años, en el caso de HTA, dislipemia, cardiopatía, fracturas previas Alelo C (PvuII) y Alelo C (1181 G/C OPG), el valor será de cero si está ausente y uno en caso de presencia, OC en ug/l y la IL-6 en ng/l.

Se establece para dicho modelo un punto de corte de 0.382, con una sensibilidad se 81.82%, una especificidad de 95.92%, un VPP de 81.8% y un VPN de 95.9%.

4.5.5 Evaluación de los modelos

Una vez elaborados los cuatro modelos, para evaluar su validez se estudió cómo se ajustaban a los datos. Para ello se evaluó el grado de calibración y de discriminación de cada uno de los modelos (Tabla 43).

Para saber cómo se ajustan los modelos a los datos, realizamos el test de bondad de ajuste, o test de Hosmer-Lemeshow, según los resultados obtenidos los cuatro modelos tienen una buena calibración.

Se evaluó la capacidad de discriminación de los modelos predictivos mediante el cálculo del AUC, obteniendo el estadístico c. Según los resultados obtenidos, los cuatro modelos tienen una capacidad de discriminación adecuada (Figura 40).

Además, se comparó la utilidad de los cuatro modelos mediante la diferencia de áreas y el cálculo del IDI para eventos de tipo binario. De acuerdo a los resultados obtenidos existen diferencias significativas entre el modelo con variables clínicas y OC frente al modelo con sólo variables clínicas, así como diferencias significativas entre el modelo de variables clínicas, OC, IL6 y SNPs, frente al modelo con variables clínicas, OC e IL6.

Tabla 43: Test de Hosmer-Lemeshow, estadístico c, diferencias de áreas e IDI de cada modelo propuesto

Modelo	H-L	Estadístico c		Diferencias de áreas		IDI	
		AUC (IC95%)	P	Valor (IC95%)	P	Valor (IC95%)	P
Modelo con variables clínicas	0,093	0,744 (0,615-0,848)	0,012	-	-	-	-
Modelo con variables clínicas y OC	0,810	0,794 (0,670-0,888)	0,002	0,0501 (-0,044-0,145)	0,299	0,079 (-0,00-0,159)	0,050
Modelo con variables clínicas, OC e IL6	0,981	0,799 (0,676-0,892)	0,002	0,005 (-0,035-0,047)	0,729	0,011 (-0,014-0,037)	0,288
Modelo con variables clínicas, OC, IL6 y SNPs	0,850	0,937 (0,843-0,983)	0,000	0,137 (0,175-0,257)	0,024	0,184 (0,005-0,363)	0,044

H-L: Hosmer-Lemeshow; AUC: área bajo la curva, IC: intervalo de confianza

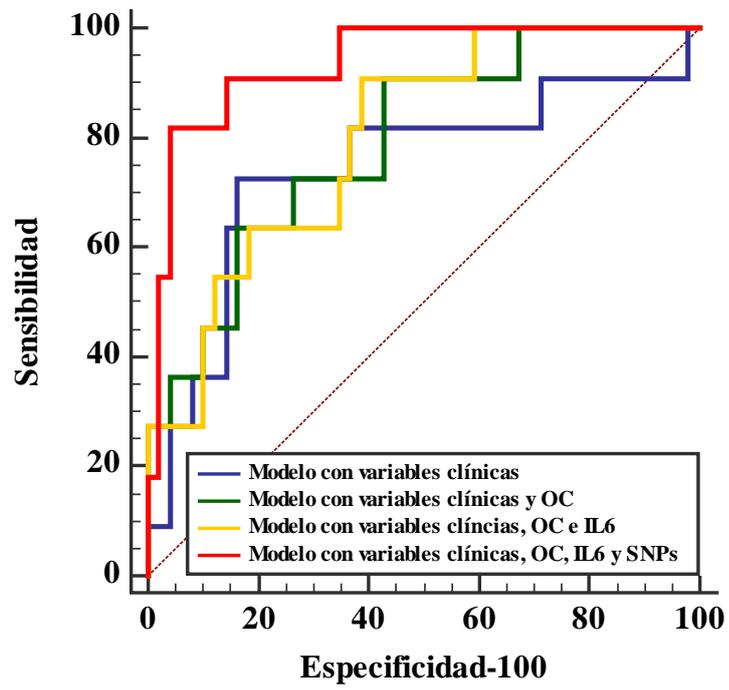


Figura 40: Curva ROC de los cuatro modelos de regresión logística.

V DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

La osteoporosis y la DM son dos enfermedades de alta prevalencia que se asocian a un aumento del riesgo de fracturas por fragilidad, y con un sustancial impacto sobre la morbilidad y mortalidad de la población general. La hiperglucemia ejerce tanto efectos directos sobre las células óseas, especialmente sobre el osteoblasto, como efectos indirectos a través de la formación de productos derivados de la glicación.

El desarrollo de este proyecto de investigación ha abordado una serie de bloques temáticos de gran interés en la osteoporosis, concretamente centrados en la evaluación de los MRO y de los SNPs, que han sido la diana fundamental del estudio.

A continuación se discutirá cada uno de los objetivos de forma independiente, resaltando en cada uno de ellos, los resultados más relevantes.

5.1 **Objetivo 1: Análisis descriptivo de las características clínicas de los pacientes en el momento del reclutamiento**

5.1.1 **Características generales de los pacientes**

La cohorte de estudio incluida en esta tesis doctoral se reclutó de las consultas externas del Servicio de Endocrinología de nuestra área de salud, donde estos pacientes acuden de manera rutinaria para el seguimiento de su patología.

La edad media de los pacientes con DM1 fue de 41 años, correspondiendo el 52,8% de ellos al sexo masculino, frente a los 60 años de media de los pacientes con DM2, siendo el 64,2% de ellos varones. Al comparar los dos grupos de pacientes, encontramos diferencias significativas con respecto a la edad. Debido a esta diferencia significativa entre ambos grupos, nos encontramos con la problemática de la conocida influencia de la edad en el desarrollo de patología ósea. Otro de los factores de riesgo en el desarrollo de patología ósea es el sexo, sin embargo la distribución de sexo en nuestro estudio es similar entre ambos grupos, sin encontrarse diferencias significativas entre ellos. Esto se corresponde con lo observado en estudios nacionales que demuestran que ésta es una patología que afecta por igual a ambos sexos, sin diferencias de género en las tasas de prevalencia (131).

Con respecto a los años de evolución, los DM1 tienen una media de 16 años de evolución, frente a los 12 de los DM2 (Tabla 11). Esta diferencia también es significativa ($p < 0,001$) siendo mayor en DM1 debido a un inicio más temprano que la DM2, generalmente antes de los 30 años. La población de nuestro estudio es representativa de los pacientes diabéticos de nuestro país.

Nuestros datos se asemejan a diversos estudios sobre DM2 en España, donde se describe una edad media de la población española con DM2 de 67,42 años y una media de evolución de la enfermedad de 10,07 años (132)(8). Uno de los principales estudios de DM2 en nuestro país, el estudio Di@bet.es, muestra que la prevalencia de DM aumentaba con la edad, con la presencia de historia familiar de diabetes, con la obesidad (sobre todo la abdominal) y con la zona geográfica correspondiente al este de la Península (Murcia y Comunidad Valenciana), donde se localiza nuestra población de estudio (8).

5.1.2 Características clínicas de la población estudiada

En cuanto a la distribución de los pacientes en función de su IMC, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de nuestro estudio, siendo la prevalencia de obesidad en la DM2 muy superior la encontrada los pacientes con DM1.

La distribución en la DM1 del IMC muestra una distribución similar a los datos publicados en la última Encuesta Nacional de Salud (2016) (133). Según el Ministerio de Sanidad, la prevalencia de obesidad en nuestro país es del 16,9%, sin embargo en nuestro estudio, la prevalencia de obesidad en DM2 es del 75,9% muy superior a la prevalencia de la población española así como superior a lo publicado en dicha encuesta en relación con la DM2 donde refieren un 41,2 % de sobrepeso y un 35,5% de obesidad, no obstante en estudios similares al nuestro, como el publicado por Zubizarreta y cols. (134) muestran mayor concordancia con nuestra distribución de sobrepeso y obesidad (67,5%) en la DM2, al igual que el estudio de Caballero Corredor (135) llevado a cabo en Cieza el cual demuestra un 62% de obesidad entre este colectivo.

La presencia de HTA en pacientes con DM1 de nuestro estudio fue del 9,4% frente al 59,8% en los pacientes con DM2, datos inferiores a los publicados en el estudio Di@bet.es que muestran que el 42,6% de la población adulta española mayor de 18 años es hipertensa, siendo superior entre los prediabéticos (67,9%) y diabéticos (79,4%). Estas diferencias encontradas pueden ser debidas al tamaño muestral, sin embargo, otros estudios realizados en países occidentales

muestran que aproximadamente el 50% de los pacientes con DM2 tienen HTA, datos semejantes a los de nuestro estudio. Estos estudios demuestran que aquellos pacientes con hipertensión o DM2 tuvieron un riesgo de 1,5 a 2,0 veces mayor de tener ambas patologías. Debido a esto la intervención temprana basada en la evidencia más reciente para prevenir complicaciones severas, es un reto importante en este tipo de enfermedades (136).

La dislipemia es muy frecuente también entre los pacientes con DM2 de nuestro estudio. Un 75% de ellos tienen algún trastorno relacionado con el nivel de lípidos en suero. Estos datos son similares a los hallados por Caballero Corredor en un análisis de la situación de los diabéticos tipo 2 en Cieza (135). En cuanto a la DM1 esta prevalencia es mucho menor y también concuerda con estudios de prevalencia como el llevado a cabo por J.Chillarón y cols. (137) donde demuestran una prevalencia en DM1 del 17,2%.

A pesar de que los programas de educación sanitaria en DM incluyen el dejar de fumar, la proporción de fumadores que se estima en nuestro estudio, 30,2% en DM1 y 25% en DM2, es similar a la de la población no diabética con similar edad y sexo en nuestro país que se computa en el 27,8% (133).

Aproximadamente el 12% de la población diabética española presenta cardiopatía isquémica, cifra que aumenta hasta casi el 40% en la población anciana, con una incidencia anual del 3,3% en este subgrupo de pacientes. Entre los pacientes con cardiopatía isquémica, la prevalencia de individuos con diabetes es 2 veces superior a la de la población general (138). Estos datos concuerdan con los calculados en nuestro estudio donde el 11,6% de los diabéticos tipo 2 presentan cardiopatía.

Desde hace algunos años se ha venido hablando de que un 15% de pacientes con DM1 y entre un 20-40% de pacientes con DM2 presentarán afectación renal a lo largo de la evolución de la enfermedad diabética, dependiendo de los numerosos factores implicados: genéticos, grado de control de la glucemia, manejo adecuado o no de la presión arterial, dislipemia, tabaquismo, aparición de microalbuminuria o progresión hacia proteinuria abierta, lo que marcará la evolución hacia nefropatía establecida (139). Es bien conocido que la insuficiencia renal crónica está asociada con alteraciones en el metabolismo óseo-mineral representando una importante causa de morbilidad, sobre todo en su estadio final. El origen de estas alteraciones es complejo y multifactorial, siendo una de las causas la activación de los mecanismos homeostáticos que mantienen las concentraciones plasmáticas de calcio y fosfato dentro de su rango fisiológico, produciéndose hipercalcemia, hiperfosfatemia, deficiencia de vitamina D e hiperparatiroidismo

secundario. La importancia de estos trastornos reside en que pueden ser causa de defectos en la mineralización ósea, con la consecuente pérdida de masa ósea. En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en la presencia de nefropatía entre ambos grupos de estudio (26,4% vs. 24,1%) (Tabla 12), de esta manera disminuimos un factor de confusión en la asociación entre ambas patologías.

Hasta un 20% de los diabéticos tipo 2 presentan retinopatía diabética en el momento del diagnóstico. En el estudio del grupo GEDAPS del año 2000, la prevalencia de retinopatía fue del 31% y la amaurosis del 3%. Tras 20 años de evolución, el 60% de los pacientes con DM2 presentarán retinopatía diabética. En España, la prevalencia de retinopatía diabética en los pacientes DM2 es del 25%, mientras que la prevalencia en los pacientes con DM1 es del 50% (140). La prevalencia de retinopatía en nuestro estudio es del 30,2% en DM1 y del 26,8% en DM2. Son prevalencias ligeramente inferiores a las encontradas en otros estudios nacionales, probablemente debido a la presencia de menos años de evolución en nuestro estudio y a que las diferentes metodologías empleadas para el diagnóstico hacen difícil establecer comparaciones. En las últimas dos décadas parece apreciarse una ligera disminución de la prevalencia general de esta patología.

La prevalencia de neuropatía en nuestro estudio fue del 18,9% en DM1 y del 14,3% en DM2, sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos. Los datos reportados en otros estudios a nivel nacional son algo superiores especialmente en DM2. La presentan el 12,9% de los diabéticos tipo 1 y el 24,1% de los tipo 2. La prevalencia de polineuropatía diabética en España en DM2 es del 24,1%, incrementándose con la edad, siendo menor del 5% entre los 15 y 19 años y alcanzando el 29,8% entre los 70 a 74 años (141).

Finalmente se definieron como sedentarios el 36,7% de las personas encuestadas por el Ministerio sobre la población española, frente al 13,2% de los pacientes con DM1 y el 28,6% de los pacientes con DM2, encuestados en nuestro estudio. Es posible que, el hecho de que el ejercicio físico practicado de manera regular sea uno de los pilares fundamentales en el plan de tratamiento de la diabetes, haya influido en que los participantes de nuestro estudio estén más sensibilizados en evitar un estilo de vida sedentario.

5.2 Objetivo 2: Determinar los valores de DMO mediante DEXA en el momento basal y a los 12 meses y calcular el riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX® en la población diabética

Existen estudios que han demostrado que el cambio en el metabolismo causado por la DM puede influir en el metabolismo óseo de manera que la calidad y la fuerza del hueso se reduce.

Son pocos los estudios que comparan el estatus óseo en los dos tipos principales de DM, la mayoría de trabajos analizan el efecto de dicho trastorno en un solo grupo de DM, y ponen de manifiesto que esta patología conlleva un efecto adverso importante relacionado con la densidad y calidad ósea.

5.2.1 Pruebas densitométricas para evaluar la DMO de los pacientes

Diversos estudios han demostrado que los sujetos con DM1, probablemente como resultado del déficit de insulina, tienen una disminución de la DMO en comparación con los sujetos sin DM (14). Con respecto a la asociación entre DMO y DM2, existen contradicciones entre estudios, sin embargo la mayoría de ellos observan un aumento de la DMO en pacientes con DM2 y paradójicamente un incremento del riesgo de fractura en los mismos (123).

Tras analizar los resultados obtenidos en nuestro estudio hemos comprobado que, los pacientes con DM1 tienen unos valores medios de T-score en cadera superiores a los encontrados en DM2, con diferencias significativas, sin embargo en cuanto a la DMO lumbar, los valores medios de T-score en DM1 son menores a los de DM2 (Tabla 13). Cuando se aplicaron los criterios de la OMS para el diagnóstico de osteopenia y osteoporosis basados en el T-score, el 22,5% de los pacientes con DM1 y el 23,7% de los pacientes con DM2 tenían osteopenia en el momento del reclutamiento (sin observarse diferencias significativas). Como ya se ha comentado anteriormente existen diferencias estadísticamente significativas en relación a la edad entre ambas poblaciones de estudio, y a pesar de esto, y conociendo que la edad es un factor de riesgo para el desarrollo de patología ósea, la DMO en columna lumbar en nuestros pacientes con DM2 es mayor que en DM1, pese a su mayor longevidad. Esto nos hace sospechar que existe algún factor característico de la DM2 que influye positivamente en la masa ósea, ratificando esta hipótesis al comprobar que la prevalencia de osteopenia entre ambos grupos no muestra diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Muchos pacientes con DM1 no han alcanzado su pico de masa ósea cuando desarrollan su enfermedad y una deficiencia mantenida de insulina puede comprometer su masa ósea. La población de los estudios existentes se divide generalmente en tres tipos de pacientes, por un lado, la mayoría de estudios evalúan la DMO en niños o adolescentes en crecimiento con un inicio reciente de DM1, otro grupo son adultos jóvenes que han alcanzado de forma reciente el pico de masa ósea y el tercer grupo son pacientes de mediana edad, con diabetes de larga duración y en su mayoría asociados con complicaciones diabéticas (106).

Estudios en pacientes con DM1 de mediana edad, con una evolución larga de la enfermedad y asociados a complicaciones diabéticas, publicados hasta la fecha, como es nuestro caso, muestran resultados heterogéneos, pero la mayoría de estudios sugieren un efecto negativo de la DM1 sobre la DMO (142)(143).

El trabajo de López-Ibarra y cols. (144) llevado a cabo en una población española de 32 pacientes con DM1, revela valores disminuidos de DMO en la columna lumbar y el cuello femoral, resultando que el 44% de ellos presentaba osteopenia, resultados superiores a los hallados en nuestro estudio (22,5%). Por otro lado, en el trabajo de Mosso C. y col. (145) se obtienen resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio, con una DMO en el rango normal para el 80% de los sujetos, sin diferencias significativas por género.

Un estudio realizado en Estados Unidos que evaluó el metabolismo óseo por DEXA en 67 mujeres posmenopáusicas con DM1 demuestra que la DMO de este grupo, comparado con grupo control de mujeres sanas de edades similares, fue de 3-8% menor en las mujeres con DM1(146). Para comparar nuestros datos con la población sana de edades similares, lo llevamos a cabo con el estudio llevado a cabo por Díaz-Curiel y cols. (43) que realizaron un estudio densitométrico a 1305 mujeres españolas con edades comprendidas entre 20 y 80 años. Para el mismo grupo de edad se obtuvo una prevalencia de osteopenia del 13%. La población de DM1 de nuestro estudio presenta una prevalencia de osteopenia del 22,5%, es decir peor de lo que cabría esperar para su rango de edad comparada con los datos de personas sanas, probablemente debido, como se ha comentado anteriormente, a que la DM1 se desarrolla años antes de alcanzar el pico de masa ósea y por lo tanto el cambio de metabolismo sufrido por la presencia de la enfermedad, afecta al desarrollo óseo.

Si comparamos nuestra población de pacientes con DM2, con el que cabría esperar para su rango de edad de los datos del estudio de Díaz-Curiel y cols. (43), en el que se observa una prevalencia de osteopenia de entre el 42-50%, observamos que la presencia de osteopenia en

nuestro grupo de DM2 es significativamente menor, con una prevalencia del 23,7%, corroborando de esta manera la existencia de algún factor característico de la DM2 que afecta a la masa ósea. Existen ciertos factores, como la edad, el sexo, el IMC, etc. que influyen en la masa ósea de un individuo. En nuestro estudio no hay variación significativa en cuanto al sexo entre los dos grupos de diabetes, por lo que las diferencias encontradas no podrían explicarse por este motivo, sin embargo, sí existen diferencias en el caso de la edad y del IMC, siendo ambos factores más elevados en el caso de la DM2. Muchos autores asocian la obesidad, característica de la DM2, con una mayor DMO, probablemente debido a la carga mecánica y a factores hormonales (147). Cuando comparamos nuestros dos grupos de estudio, y pese a la diferencia en la edad, no existe diferencia en la presencia de osteopenia entre ellos (22,5% vs. 23,7%), además de presentar los pacientes con DM2, valores mayores de DMO en columna lumbar. Esto probablemente sea debido a la diferencia significativa en la presencia de obesidad entre ambos grupos (15,1% vs. 75,9%).

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio Rotterdam, llevado a cabo por Liefde y col. (123). Dicho estudio es el más amplio sobre la DMO en DM2 realizado hasta la fecha. Este estudio incluía datos de DMO y de fracturas de 792 ancianos con DM2 (edad media de 74 años) y de 5.863 controles no diabéticos. Los sujetos con DM2 presentaron una mayor DMO en la columna y el cuello femoral que los participantes no diabéticos. Los individuos con un control inadecuado de la diabetes tuvieron los córtex óseos más gruesos que los sujetos sin DM2. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en nuestro estudio, en el que encontramos una correlación positiva del T-score lumbar con la obesidad (Figura 26).

Así mismo, nuestros resultados son bastante coincidentes con los de Leidig-Bruckner y cols. (148). En este trabajo estudiaron la prevalencia de osteoporosis en 382 pacientes diabéticos, 139 con DM1 y 243 con DM2. Para ambos sexos, la DMO no fue diferente entre los grupos de estudio, pero fue mayor en DM2 en comparación con los controles. La prevalencia de osteoporosis fue equivalente en los grupos de DM1 y DM2, pero menor en los pacientes tipo 2 en comparación con los controles, igual que demostramos en nuestro estudio. La DMO se correlacionó positivamente con el IMC y se correlacionó negativamente con la edad, pero no se correlacionó con los parámetros específicos de la diabetes en todos los subgrupos, concluyendo que de los valores obtenidos de este estudio se deduce una gran similitud a los obtenidos en nuestra población.

El estudio Rotterdam y al igual que otros muchos, demuestran que a pesar de una mayor DMO, los pacientes con DM2 tenían un 47% más de riesgo de fractura que los pacientes sin diabetes,

por lo que la presencia de una DMO más alta con un mayor riesgo de fractura presenta un gran desafío en la predicción de fractura en el paciente con DM2 y obesidad mediante el empleo del DEXA. En el caso del paciente con DM2 se ha demostrado que esta técnica no es útil, ya que el incremento del riesgo de fractura es independiente de la DMO (149). En este sentido se ha postulado usar el Trabecular Bone Score (TBS) como una herramienta útil para osteoporosis secundarias. TBS es un parámetro de textura extraído de estudios DEXA de columna lumbar. Aporta información sobre microarquitectura ósea y establece diferencias entre estudios DEXA con resultados similares de densidad ósea. El estudio llevado a cabo por Dhaliwal y cols. (150) realizado en 100 mujeres, demuestra que aquellas mujeres con DM2 presentaron una mayor DMO y menor TBS que la población sana, o el estudio retrospectivo realizado en una cohorte canadiense de 29.407 mujeres (2.356 con DM2), donde el TBS fue predictivo de fractura (151).

El estudio de Pérez-López y cols. (47) realizado recientemente en nuestro país con 56 mujeres postmenopáusicas compara el riesgo de fractura establecido por FRAX® y tras incorporar el parámetro TBS, aumenta la probabilidad de fractura, siendo éstas diferencias estadísticamente significativas. La evaluación del TBS en esta población requiere nuevos estudios para evaluar longitudinalmente su relación con la aparición de fractura.

En cuanto a la pérdida de masa ósea, en nuestro estudio, las medias de la DMO medida en el momento basal y al año, muestran una tendencia a la disminución de la masa ósea tanto a nivel de cadera, como en columna lumbar en ambos tipos de DM, sin embargo, no se encuentran diferencias significativas (Tabla 13). Esto puede ser debido al escaso tiempo transcurrido entre ambas determinaciones. La mayoría de las guías y en concreto la Guía de práctica Clínica sobre osteoporosis y prevención de fracturas por fragilidad del Sistema Nacional de Salud recomienda un intervalo mínimo de 2 años, para el control evolutivo de la DMO en pacientes sin tratamiento (como es nuestro caso) y un intervalo de entre 1 y 2 años para monitorizar la DMO en pacientes tratados por osteoporosis después de iniciado el tratamiento (36).

No existen muchos estudios que comparen esta evolución, ya que la gran mayoría, realizan una medida puntual, es decir son estudios transversales. Hamilton y col. (152) indican en su estudio, que después de cinco años de seguimiento, la DMO disminuyó en los 17 pacientes con DM1 en el cuello femoral sin cambio en la columna lumbar o antebrazo. En las 11 mujeres con DM2, la DMO disminuyó en todas las localizaciones, excepto en la columna vertebral. Estos datos muestran que la tasa de desmineralización en el cuello femoral en hombres con DM1 es similar al de las mujeres posmenopáusicas de DM2 mayores.

Los resultados de estas publicaciones justifican realizar estudios en un futuro, donde en una cohorte mayor y estableciendo un intervalo mínimo de dos años, pudiésemos evaluar la influencia real de la DM sobre el valor de la DMO, evaluando la microarquitectura ósea a través del TBS.

5.2.2 Estudio del riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX®

Las escalas de riesgo de fractura son herramientas cada vez más empleadas, a la vez que accesibles y económicas. El máximo exponente es el FRAX®. El riesgo de fractura en 10 años según esta herramienta, se definió: bajo (<5%), moderado (5-10%) y alto (>10%).

La estimación del riesgo de fractura osteopórotica obtenida mediante el FRAX® en nuestra población fue en la DM1 de 0,20% para fractura de cadera y de 3,5% para cualquier localización, es decir de bajo riesgo. Para la DM2, el riesgo fue del 0,50% para fractura de cadera y de 5,30% para cualquier localización, es decir, bajo riesgo para fractura de cadera e intermedio para otras localizaciones según la clasificación de la NOGG (Tabla 15). Esta entidad recomienda dar consejo a los de bajo riesgo, tratar a los del alto riesgo y reevaluar mediante densitometría a los de riesgo intermedio (153). Por lo tanto, en nuestro grupo de estudio, los pacientes con DM2 presentan mayor riesgo de fractura (Tabla 15). Esto puede ser debido a los factores de riesgo que tiene en cuenta dicha herramienta como son edad (mayor en DM2), sexo (sin diferencias), IMC (mayor en DM2), fracturas previas (sin diferencias significativas pero con mayor prevalencia en DM2), padres con fractura de cadera (sin diferencias), fumador actual (sin diferencias), glucocorticoides (sin diferencias), artritis reumatoide (sin diferencias), osteoporosis secundaria (positiva para DM1 pero no para DM2) y DMO del cuello del fémur (menor en DM2) (Tabla 12).

El estudio Rotterdam confirmó que la DM2 suponía un aumento en el riesgo de fractura no vertebral, pese a la mayor DMO femoral y de columna lumbar. Otros estudios también reflejan, al igual que el nuestro, que los pacientes con DM2 tienen mayor riesgo de fractura que los pacientes con DM1 pese a una mayor DMO (123).

En nuestra población, la estimación del riesgo de fractura osteopórotica mediante el FRAX® se asocia positivamente con la edad, con los años de evolución de la DM, con la presencia de dislipemia y con los valores de IL-6. Paradójicamente, el aumento del riesgo de fractura osteopórotica en DM, especialmente en DM2, es independiente de la DMO. Así evidenciamos

que aquellos pacientes de mayor edad, más años de evolución de la DM, con presencia de dislipemia y/o elevados valores de IL-6 tienen más riesgo de fractura osteopórotica a los 10 años en cadera y otras localizaciones. Al igual que el nuestro, existen estudios que sugieren una relación entre el aumento de las concentraciones de citoquinas proinflamatorias y una disminución de la DMO, así como un mayor riesgo de fractura (154).

El FRAX® tiene como principal inconveniente no valorar como ítem la propia DM2. Diferentes estudios han valorado la utilidad de esta herramienta en la DM, concluyendo que no es una herramienta válida ya que infraestima el riesgo de fractura en esta población (155). Un deterioro de la microarquitectura ósea y una distribución ineficiente de la masa ósea con insuficiencia de mecanismos de reparación y adaptación parecen ser factores de relevancia (156). La revisión llevada a cabo por Botella y cols. (157) ponen de manifiesto que las herramientas habituales para la prevención de la fractura por fragilidad, como el FRAX® y la densitometría ósea, no han demostrado la suficiente eficacia en esta patología, ya que infraestiman el riesgo y por lo tanto proponen nuevas técnicas de evaluación ósea, como el TBS o los MRO como alternativa de mayor utilidad. Debido a esto, se empieza a postular que la utilización del FRAX® ajustado por TBS, ofrece una estimación mejorada del riesgo de fractura en estos pacientes (158). En el futuro se necesitan criterios específicos de estratificación del riesgo. El desarrollo de métodos mejorados para evaluar las propiedades materiales del hueso para caracterizar mejor el riesgo de fractura es también una prioridad (159).

5.3 Objetivo 3: Medir las concentraciones de parámetros bioquímicos para evaluar el metabolismo fosfocálcico, la función renal y el metabolismo lipídico e hidrocarbonado, así como los MRO y de inflamación en el momento basal, a los 6 y a los 12 meses del inicio del estudio

5.3.1 Parámetros bioquímicos del metabolismo fosfocálcico, función renal, metabolismo glucídico, hormonas y metabolismo lipídico

En cuanto a los parámetros bioquímicos determinados (metabolismo fosfocálcico, función renal, metabolismo glucídico, hormonas y metabolismo lipídico) no se observan diferencias a lo largo del estudio en ninguno de los dos tipos de DM. Al comparar estos parámetros entre los dos grupos estudiados, sí encontramos diversas diferencias significativas.

Al estudiar el metabolismo fosfocálcico, a pesar de que en todos los puntos estudiados, los niveles de calcio y fósforo, tanto en suero como en orina, se encuentran dentro de los intervalos

de normalidad (Tabla 16), encontramos diferencias significativas en los valores de fósforo en orina entre ambos tipos de DM en todos los puntos temporales estudiados, siendo estos valores superiores en el caso de los pacientes con DM1.

La NOF aconseja a todas las personas a tener una ingesta adecuada de calcio en la dieta (al menos 1,200 mg al día), incluyendo suplementos si es necesario. La ingesta adecuada de calcio durante toda la vida es necesaria para la adquisición del pico de masa ósea y el subsiguiente mantenimiento de la salud ósea (94).

Es ampliamente conocida la necesidad de vitamina D para la formación de los huesos, así como para la función y fuerza muscular. Diversos estudios asocian la deficiencia de vitamina D con osteopenia y riesgo de caídas (15). La NOF recomienda una ingesta de 800 a 1.000 UI de vitamina D por día para adultos mayores de 50 años. Esta ingesta ayudará a alcanzar el nivel deseado de vitamina D en suero de 30 ng/ml o superior.

La PTH y la vitamina D son los principales reguladores de la homeostasis del calcio. En nuestro estudio, los pacientes con DM2 tienen valores de PTH más elevados que en la DM1, existiendo un 6% de hiperparatiroidismo. Se observa deficiencia de vitamina D en ambos tipos de DM, encontrándose valores discretamente inferiores en la DM2. Se observa una correlación negativa de esta vitamina con la presencia de obesidad, es decir, pacientes obesos, presentan valores más bajos de vitamina D.

Estos resultados concuerdan con la bibliografía actual, como el trabajo de Olmos y cols. (160) que ponen de manifiesto en un estudio español con 1.811 personas sanas, la correlación negativa entre los valores de vitamina D y el IMC. También hay estudios que revelan el déficit de vitamina D en la DM1 (145) y otros que estudian la relación entre niveles de vitamina D y DM2 demostrando que existe una estrecha relación entre hipovitaminosis D y la obesidad característica de esta enfermedad (161).

En animales de experimentación la deficiencia de vitamina D inhibe la secreción de insulina pancreática, por lo que parece que es esencial en la función endocrina pancreática. Los pacientes con hipovitaminosis D tienen una disfunción de las células β pancreáticas con alteración en la secreción de insulina y aumento de la resistencia a esta. El papel que desempeña la vitamina D en la secreción de insulina parece deberse a un efecto directo de esta hormona sobre el receptor VDR en las células pancreáticas, o indirecto a través de las proteínas fijadoras de calcio. Además se ha demostrado que existe una estrecha relación entre hipovitaminosis D y obesidad,

como también se pone de manifiesto nuestro estudio. Una disminución de las concentraciones plasmáticas de la vitamina D, tanto calcidiol como calcitriol, estimula la adipogénesis, y, por ello, el aumento de la obesidad. Por lo tanto, no está claro si la hipovitaminosis D es origen o consecuencia del sobrepeso (162).

En la enfermedad renal, las alteraciones óseo-metabólicas son secundarias a la pérdida progresiva de masa renal y función renal, que conlleva una retención de fósforo y descenso de los niveles de calcitriol, responsables de la resistencia esquelética a la acción de la PTH. En nuestro estudio, observamos que los pacientes con DM2 tienen la función renal significativamente más deteriorada con diferencias entre ambos grupos en los tres puntos temporales en prácticamente todos los parámetros estudiados, salvo en la comparación de los valores de urea en la determinación anual (Tabla 17). Esto puede ser debido probablemente a la coexistencia de otros factores de riesgo como la obesidad e HTA en este grupo de pacientes. Se observan valores superiores a los rangos de normalidad en la DM2 en la creatinina y en ambos grupos en la microalbuminuria.

El control glucídico es peor en DM1 debido probablemente a que este tipo de DM es, en general, más difícil de controlar. Este mal control produce estados de hiperglucemia que afectan al hueso a través de diferentes mediadores, activando la proliferación y diferenciación osteoclástica (107), así como la supresión de la función y proliferación de los osteoblastos (14).

El estudio epidemiológico transversal multicéntrico realizado en consultas de atención primaria en España en 5.591 pacientes (edad media 66,7 años; 8,8 años de evolución), llevado a cabo por A. Pérez y cols. (163) muestra valores medios de HbA1c de 7,1 %, concluyendo que la proporción de DM2 con deficiente control en España es elevada. Datos que se corresponden con lo encontrado en nuestro estudio, donde obtuvimos unos valores medios de HbA1c de 7,5% en este grupo de estudio.

En cuanto a la función tiroidea, se compararon los valores de estos marcadores en función del tipo de DM, sin observarse diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes en los tres puntos temporales, encontrándose todas las determinaciones dentro del rango de normalidad.

Al comparar los parámetros del metabolismo lipídico, los pacientes con DM1 tienen mayores valores de colesterol total, cHDL y cLDL. Los valores de triglicéridos son mayores en los pacientes con DM2 (Figura 26).

La presencia de dislipemia, característica de esta patología, también va a contribuir a una disminución en la formación de hueso (110). En nuestro estudio, encontramos una asociación positiva entre los niveles de cLDL y la DMO en cadera. Al revisar lo descrito en la literatura no existe un consenso absoluto, y en muchos casos los resultados de las publicaciones muestran ciertas discrepancias.

El estudio llevado a cabo por Poli y cols. (164) que incluyó a 1.303 mujeres postmenopáusicas observaron que aquellas con niveles plasmáticos de cLDL superiores a 160 mg/dl tenían más del doble de probabilidad de presentar osteopenia lumbar que las mujeres con niveles de cLDL más bajos. Estos resultados difieren de nuestros hallazgos ya que en nuestra población, mayores concentraciones de cLDL se asocian a valores más elevados de DMO.

En otro estudio similar, de 52 mujeres postmenopáusicas con sobrepeso, Orozco y cols. (165) observaron que las pacientes con un perfil lipídico alterado, presentaron una DMO más baja en la columna lumbar y en el cuello femoral, así como un mayor riesgo de osteopenia, en comparación con las pacientes con un perfil lipídico normal, sugiriendo una posible asociación de la hiperlipidemia con la osteoporosis.

Estas diferencias observadas entre diferentes estudios, pueden deberse a las características de la población, ya que nos encontramos con la problemática de que la mayor parte de los trabajos han estudiado esta asociación en mujeres postmenopáusicas, por lo que contamos con ciertos factores de confusión como puede ser el estado estrogénico de las mujeres.

Sin embargo, Solomon y cols. (166), en un trabajo que incluyó a 13.592 participantes en el estudio NHANES III (1988-1994), y excluyendo a los sujetos con terapia hipolipemiente, no objetivaron ninguna relación significativa entre los parámetros del metabolismo lipídico y la DMO de cadera medida con DEXA.

En un trabajo que analizó a 289 varones españoles incluidos en la cohorte de Camargo (167), se observa una asociación directa entre los niveles séricos de colesterol total, cLDL y la DMO en columna lumbar y cadera. Se puso de manifiesto que los varones con hipercolesterolemia tenían una mayor DMO, en las mediciones de cadera, respecto a los varones con normocolesterolemia, resultados que coinciden con los hallados en nuestro estudio.

Otro de los resultados obtenidos en nuestro estudio es la asociación entre los niveles elevados de triglicéridos y la presencia de fracturas. La relación hallada en los escasos trabajos publicados al respecto, entre las alteraciones del metabolismo lipídico y las fracturas es poco concluyente.

El estudio de Yamaguchi y cols. (168), realizado 214 mujeres postmenopáusicas observa una relación directa entre el cHDL y la DMO en la columna lumbar y el antebrazo, y una asociación positiva entre los valores de triglicéridos y la fractura vertebral prevalente.

Sin embargo, en el estudio de la cohorte de Camargo no se observa ninguna asociación entre los lípidos séricos y las fracturas vertebrales prevalentes. No obstante los niveles séricos de colesterol total y de cLDL fueron más bajos en varones con fracturas no vertebrales prevalentes (167).

5.3.2 Parámetros bioquímicos de remodelado óseo

Actualmente la osteoporosis se diagnostica en base a la DMO, pero el uso de la densitometría como herramienta diagnóstica no está libre de limitaciones ya que presenta un elevado coste, no está accesible en todos los centros y ofrece únicamente información cuantitativa pero no cualitativa, siendo la osteoporosis no sólo un problema de densidad, sino también de calidad. Es por esto que se ha sugerido que los MRO podrían ser una herramienta útil de cribado inicial económico y accesible sin necesidad de recurrir a la densitometría. Los MRO son sustancias que reflejan la actividad metabólica del tejido óseo en un momento puntual y, por tanto, pueden ser útiles en la evaluación de los trastornos metabólicos del hueso.

Para la elaboración de esta tesis doctoral se han determinado los niveles de OC y P1NP como marcadores de formación y de β -CTX como marcador de resorción, ya que estos marcadores han sido sugeridos por la Fundación Internacional de Osteoporosis (IOF) y por la IFCC como los marcadores óseos apropiados para examinar el remodelado óseo en la práctica clínica y en centros de investigación (99).

Con respecto a los resultados de los MRO encontrados en nuestro estudio, se han detectado diferencias significativas entre los dos tipos de DM en los valores OC y P1NP en todos los puntos temporales. Observamos en la DM2 valores significativamente inferiores en los marcadores de formación ósea (OC y P1NP), hallando valores patológicamente disminuidos en

el caso de la OC, y con tendencia a la significación en el marcador de resorción ósea (β -CTX), frente a la DM1 (Tabla 21).

Llama la atención que tanto los marcadores de formación, como el marcador de resorción en la DM2 presenten valores inferiores a los encontrados en DM1. Estos resultados no reflejan un proceso claro de formación o destrucción de hueso, ya que los dos tipos de marcadores presentan la misma cinética, pero sí ponen de manifiesto una disminución objetiva del metabolismo óseo, durante el cual disminuyen los niveles de los dos tipos de marcadores.

Los pacientes con DM1 tienen valores mayores de β -CTX, siendo además valores ligeramente patológicos en todos los puntos temporales, lo cual justifica una mayor resorción ósea que los pacientes con DM2 y por lo tanto una menor DMO. Valores disminuidos en los marcadores de formación, asociados a una discreta elevación en el de resorción, sugiere que en la DM1, existe una formación ósea ineficaz asociada con una resorción ósea acelerada.

Nuestros resultados son muy concordantes con los reflejados en la mayoría de los estudios de MRO en DM, los cuales ponen de manifiesto que la OC se encuentra reducida en este tipo de patología. Sin embargo, en cuanto al resto de MRO estudiados, los resultados son más contradictorios.

Starup-Linde y cols. (125) ponen de manifiesto en un reciente estudio, que los valores de P1NP y OC fueron menores en pacientes con DM2 en comparación con DM1, mientras que los valores de β -CTX fueron similares entre los dos grupos de pacientes, demostrando que en pacientes con DM, el aumento de la glucosa plasmática se asocia con niveles disminuidos de β -CTX, P1NP y OC.

Hussein y cols. (169) reflejan en su trabajo realizado en una población de 20 pacientes con DM2 y publicado en 2017, unos resultados concordantes con los nuestros. Estos autores encuentran valores de OC significativamente más bajos que los controles.

Por otro lado, Abd El Dayem y cols. (170) reflejan valores de OC hasta cuatro veces menor en jóvenes con DM1 que la población control (12,2 vs. 49,4 ng/ml) en una población de 47 pacientes con DM1 y 30 controles.

En el estudio de Iglesias y cols.(102) realizado en una población de 74 pacientes obesos clasificados según su tolerancia a la glucosa, los pacientes con DM2 mostraron niveles séricos

de OC significativamente más bajos que los encontrados en sujetos con tolerancia normal a la glucosa. Sin embargo, no encontraron diferencias significativas en los niveles de P1NP y β -CTX entre los grupos de estudio.

Hamilton y cols. (152) realizaron un estudio prospectivo de 5 años de evolución, y observaron que existe una tendencia a mayores concentraciones séricas de β -CTX en los pacientes con DM1 que en DM2, resultados que concuerdan con los encontrados en nuestro estudio.

Un reciente estudio transversal llevado a cabo por Laurent y cols. (171) llevado a cabo en más de 3.000 hombres encontró que en hombres con síndrome metabólico, la formación ósea y la resorción, según lo estimado por β -CTX, P1NP y OC, fueron menores que en hombres sin síndrome metabólico. La asociación entre el síndrome metabólico y los MRO estuvo particularmente correlacionada con la sensibilidad a la insulina, lo que indica que los individuos insulinoresistentes pueden tener un remodelado óseo menor que los controles sanos.

Una disminución del recambio óseo puede aumentar la fragilidad ósea en pacientes con DM. La literatura reciente sugiere que la DM reduce la calidad del hueso resultando el hueso diabético más frágil debido a la glicación del colágeno, lo que disminuye la resistencia de los enlaces cruzados (172).

Respecto al estudio de las correlaciones, en nuestro estudio hemos encontrado varias asociaciones estadísticamente significativas de los MRO. Las concentraciones de OC se asocian de forma inversa, en todos los puntos temporales, con la obesidad, la dislipemia, la DMO lumbar, la PTH, la IL-6, la glucosa y los triglicéridos y positivamente con el cHDL. Estos datos reflejan, una menor concentración de OC en la DM2, que a su vez son pacientes (al contrario que en la DM1) obesos y con dislipemia. En la DM2 hay valores más elevados de IL-6, que tiene efectos positivos sobre las osteoclastogénesis, disminuyendo así la síntesis de OC. La correlación inversa entre OC y DMO reflejan en el caso de la DM2, que a pesar de tener disminuida la formación de hueso, tienen mayores valores de DMO lumbar, igual que reflejan estudios anteriores, probablemente debido a la mayor carga mecánica (123).

Al igual que en nuestro estudio, estudios recientes también han demostrado que la OC está inversamente relacionada con los niveles de glucosa en sangre y la presencia de dislipemias. En el trabajo de Pittas y cols. (173) se muestran unos resultados bastante coincidentes con los nuestros. Estos autores han demostrado que la concentración sérica de OC está inversamente

asociada con la glucosa en ayunas, la insulina en ayunas, a la PCR ultrasensible, la IL-6, el IMC y la grasa corporal.

Así mismo, en el trabajo de Kindblom y cols. (174) llevado a cabo en 857 pacientes diabéticos comparado con 1010 controles sanos, la OC estuvo inversamente relacionada con el IMC, la masa grasa y la glucosa plasmática.

Teniendo en cuenta nuestros resultados obtenidos y los diversos estudios publicados, se deduce de manera global que los niveles de OC no solo están relacionados con el metabolismo del hueso, sino también con el metabolismo energético de la glucosa y las grasas. Posterior a la síntesis de OC, la fracción descarboxilada con menos de 3 residuos carboxilados, tiene una menor afinidad por el hueso, por lo que esta fracción se encuentra en la circulación pudiendo ejercer su función endocrina sobre las células β -pancreáticas y el adipocito.

La OC estimula la proliferación de las células β -pancreáticas y aumenta la producción de adiponectina dando como resultado un aumento de la sensibilidad a la insulina. En conjunto, estas acciones revelan un mecanismo de retroalimentación positiva entre las células β -pancreáticas, el tejido adiposo y el hueso. La insulina mejora de la producción de OC, que a su vez aumenta la producción de insulina y la sensibilidad a la misma (174)(175)(176)(177).

Lee y cols. (178) demostraron que la OC afecta a la adiposidad y a la homeostasis de la glucosa en ratones. Los ratones con deficiencia en OC mostraron obesidad, hiperglicemia, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Cuando se administró OC a estos ratones, disminuyó la glucosa y aumentó el nivel de insulina en sangre.

Al evaluar las concentraciones del otro marcador de formación, encontramos que el PINP correlaciona de forma inversa, en todos los puntos temporales, con la obesidad, la dislipemia, los datos de DMO lumbar y glucosa y positivamente con el cHDL y la PTH. Estos datos muestran que pacientes obesos y con la presencia de dislipemia, tienen una disminución del metabolismo óseo con tendencia hacia la no formación de hueso. Existen muy pocos estudios que evalúen el PINP en población diabética y que justifiquen su relación con el metabolismo lipídico y glucídico. Esto puede ser debido a que es un marcador relativamente nuevo lo cual hace necesario más estudios para demostrarlo.

Con el propósito de evaluar la utilidad clínica de los MRO en el diagnóstico de patología ósea en nuestra población realizamos un estudio de curvas ROC. Para ello tomamos como variables

de estado la presencia de patología ósea, es decir valores de DMO inferiores a -1 DE expresados como T-score.

La evaluación del grado de la presencia de patología ósea (osteopenia u osteoporosis) en los pacientes con DM es determinante a la hora de efectuar un pronóstico y tomar decisiones terapéuticas. Concretamente, la identificación de patología ósea en estos pacientes reviste mucha importancia desde el punto de vista clínico, ya que previniéndola se reducirá la morbilidad asociada a esta patología.

Al evaluar los MRO para la identificación de patología ósea encontramos que sólo la OC aportó un AUC significativa en ambos grupos de estudio (Tabla 22). Sin embargo, el valor del AUC no es demasiado elevado, sin alcanzar el valor de 0,8, punto que muchas publicaciones científicas refieren como el valor mínimo desde el punto de vista clínico.

Por otro lado, se estableció como punto de corte óptimo para cada una de las variables aquel que aportase la mejor relación entre sensibilidad y especificidad. Al igual que ocurrió al valorar las AUCs, los resultados de sensibilidad y especificidad asociados a los puntos de corte tampoco resultaron muy satisfactorios. Esto quedó patente al evaluar el índice de Youden de cada una de las variables. Este índice, cuyos valores oscilan entre (-1) y (1), evalúa de sensibilidad y especificidad de manera dual, y se considera mejor cuanto más se acerque su valor a uno, y en este caso la OC, aun aportando el mejor resultado, no alcanza el 0,5 (Tabla 23).

Por tanto, estos resultados indican que, aunque la OC ha aportado valores de AUC significativos en la identificación de un estado de patología ósea, desde el punto de vista clínico, y valorando los resultados de sensibilidad y especificidad asociados al punto de corte escogido, ninguno MRO se considera suficientemente confiable como para ser usado de forma aislada.

5.3.3 Parámetros bioquímicos de inflamación

La IL-6 es una citoquina multifuncional que media en la respuesta inflamatoria y de estrés. Se calcula que la tercera parte de la concentración circulante de IL-6 proviene del tejido adiposo. La IL-6 contribuye a la patología y a la fisiología de la DM a través de sus interacciones con las vías de señalización de la insulina y las células β -pancreáticas, además de regular el metabolismo óseo a través de la vía endocrina contribuyendo al reclutamiento y diferenciación de pre-osteoclastos, favoreciendo así la progresión de la pérdida ósea. Igualmente la IL-6 puede

regular el metabolismo óseo indirectamente regulando la adiponectina y la leptina liberada de los adipocitos.

Con respecto a los resultados encontrados en nuestra población de estudio, los valores de IL-6 aumentan a lo largo del estudio, haciéndose este cambio significativo en ambos tipos de DM. Además se observa, con una fuerte significación estadística, que los pacientes con DM2 presentan valores más elevados que los pacientes con DM1 (Tabla 24). Debido a estos resultados, podemos sugerir que la inflamación juega un papel importante en la patogénesis de la diabetes.

Los valores de IL-6 en nuestro estudio se asocian de forma positiva con la edad, la HTA, la dislipemia, la obesidad y de forma negativa con la OC, calcio en orina, fósforo en orina, creatinina en orina, vitamina D y cHDL (Figura 34).

Estos resultados son muy concordantes con los reflejados en la mayoría de los estudios que incluyen poblaciones de pacientes con DM, en donde suele encontrarse que concentraciones elevadas de IL-6 se asocian con IMC elevados, con la presencia de dislipemia, con la DM2 y con la HTA.

Malenica y cols. (179) en un reciente estudio que incluyó a 97 mujeres con DM2 y 107 mujeres no diabéticas, muestran un aumento significativo de la IL-6 en la población femenina diabética en comparación con los sujetos control, encontrando una correlación significativa con la glucosa y con el IMC.

En el trabajo de Mohieldein y cols. (180) llevado a cabo en 60 pacientes diabéticos tipo 2 como grupo de estudio y 60 sujetos sanos como grupo control, también muestra una correlación entre los valores de IL-6 y el IMC.

La correlación negativa entre la IL-6 y la vitamina D se puede explicar debido la acción inmunomoduladora de la vitamina D, ya que inhibe la síntesis y las acciones de las PGs proinflamatorias inhibiendo la expresión de la COX-2 y por lo tanto, su deficiencia es común en pacientes con valores elevados de citoquinas proinflamatorias. En concordancia con nuestro estudio, Tiwari y col. (181) ponen de manifiesto en un estudio llevado a cabo con pacientes diabéticos la asociación entre la deficiencia de vitamina D y las elevadas concentraciones de citoquinas inflamatorias, así como el estudio de de Amal y cols. (182) donde también se

demonstró una correlación significativa y negativa entre los niveles plasmáticos de vitamina D y de IL-6 en pacientes con DM2.

La asociación encontrada en nuestro trabajo entre la IL-6, la dislipemia, la obesidad y la OC probablemente se deba a la relación de la obesidad con un estado proinflamatorio de bajo grado mantenido, en el que el tejido adiposo parece estar implicado y que constituye un potencial mecanismo de pérdida ósea y un aumento del riesgo de fracturas, ya que esta citoquina estimula la osteoclastogénesis y la resorción ósea (107)(117). Los hallazgos del presente estudio ponen de manifiesto el papel de la inflamación, mediada por la IL-6, en el desarrollo de patología ósea, justificada por estudios previos que asocian la presencia de esta citoquina con la presencia de obesidad y con la OC (173)(174).

5.4 Objetivo 4: Determinar la frecuencia genotípica de los SNPs de los genes VDR, ESR1, OPG, RANKL e IL-6 en los diferentes grupos de diabéticos y compararla entre sí y con las descritas en la población general, así como estudiar las correlaciones existentes con las manifestaciones clínicas, bioquímicas y densitométricas en estos pacientes.

La osteoporosis es una enfermedad compleja, multifactorial y multigénica. Son muchos los factores de riesgo que intervienen en el desarrollo de la enfermedad y es la combinación de ellos lo que determinará la severidad de la misma y la respuesta al tratamiento. Dentro de estos factores de riesgo, se incluyen variantes génicas cuya expresión fenotípica dependerá de la interacción con otros genes, de factores ambientales y como no, de la presencia de enfermedades concomitantes.

Para estudiar la posible influencia genética en este binomio DM-hueso, se han seleccionado diferentes polimorfismos en genes candidatos que participan de algún modo en el metabolismo óseo-mineral. Los genes escogidos, en función de la revisión bibliográfica previa, han sido: el gen del VDR, el gen del ESR1, el gen de la OPG, el gen del RANKL y el gen de la IL-6.

5.4.1 Prevalencia de los polimorfismos en la población estudiada y comparación con la población control

En nuestro estudio, no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de DM en la prevalencia de los diferentes genotipos estudiados, salvo en el polimorfismo 174 G/C de la IL-6

(rs1800795) en el que sí se observan diferencias significativas entre los dos grupos de DM (Tabla 25).

Para realizar la comparación de los diferentes alelos y genotipos de los polimorfismos estudiados, se ha utilizado, como población sana de referencia, la población CEU del proyecto GENOMOS 1000. Este proyecto se llevó a cabo entre los años 2008-2015 y tenía como objetivo encontrar la mayoría de variantes genéticas de poblaciones estudiadas que tuvieran una frecuencia mínima del 1%. De este modo se creó el mayor catálogo público a nivel mundial de genotipos humanos de libre acceso (128).

- **Polimorfismos en el gen del VDR:**

La vitamina D puede modular la secreción de insulina y también posee efectos pleiotrópicos sobre la patogénesis de la DM. En los últimos años, existen diversos estudios que pretenden aclarar la asociación de los polimorfismos en este gen con la DM en diferentes regiones y grupos étnicos. A través de la revisión de la literatura, encontramos que los resultados al describir el genotipo de VDR fueron discrepantes.

En nuestro estudio, no encontramos diferencias de prevalencias en los polimorfismos de este gen entre ambos grupos de estudio, ni comparados con la población control, salvo en el caso del polimorfismo ApaI (rs7975232) donde observamos una mayor asociación del genotipo CA en DM1 y del genotipo AA en DM2 (Tabla 26).

El análisis de frecuencias genotípicas del BsmI obtenidas en nuestro estudio (Tabla 26) son muy similares a las obtenidas por Ji y cols. (183) en población caucásica. Del mismo modo, otros estudios llevados a cabo en este tipo de población muestran que no hay asociación significativa entre el genotipo de los cuatro polimorfismos del gen del VDR estudiados con la DM (184)(185)(186).

Al igual que en nuestro trabajo, en el estudio de casos y controles de Martí y cols. (187) en 2 poblaciones españolas geográficamente cercanas (Barcelona y Navarra), ponen de manifiesto que las frecuencias de los genotipos de BsmI y FokI no muestran ninguna diferencia significativa entre el grupo control y los pacientes con DM1. En el caso de FokI existe una tendencia hacia la significación en la población de Navarra, siendo el genotipo GG menos frecuente en el grupo de pacientes con DM1. Estos últimos datos difieren con los hallados en nuestro estudio donde el genotipo menos frecuente en nuestra población con DM1 es el AA.

Estudios llevados a cabo en otras etnias demuestran asociación entre los polimorfismos del VDR y la DM, como es el caso del estudio de Wang y cols. (188) en el que asocian el alelo A del BsmI con un mayor riesgo de DM1 y el alelo C del FokI con un aumento del riesgo de DM2.

En cuanto al polimorfismo ApaI del gen VDR, en el que sí hemos encontrado diferencias con la población control, la distribución genotípica del mismo varía significativamente en distintas poblaciones poniendo de manifiesto la importancia de la influencia de la etnia/raza en este tipo de estudios. Las frecuencias del genotipo AA en población de origen Chino fue de 7,8%, del 15,1% en Japonesas, 25% en Turcas y 50% en Hispanas. En nuestro estudio hemos observado una frecuencia del genotipo AA del 26,4% similar a la observada por Bustamante y cols. (189) del 22,1%.

- **Polimorfismos en el gen ESR1:**

En cuanto a la comparación de la frecuencia alélica y genotípica entre los diferentes grupos de estudio y la población control en los polimorfismos del gen ESR1, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que tanto en la población general como en los pacientes con DM1 existe una tendencia a la significación de que el genotipo AA no es el de mayor prevalencia para el polimorfismo XbaI (rs9340799), como sí ocurre en la población control. (Tabla 26). El hecho de que exista esta tendencia a la significación es muy trascendente, ya que implicaría que la presencia de polimorfismos en el enzima de restricción pueden estar implicados en la patogénesis de la DM. Sin embargo, si lo que comparamos son frecuencias alélicas, sí observamos diferencias significativas entre nuestra población total de estudio y la población control (Tabla 27). Estos resultados sugieren una asociación del polimorfismo de este gen con la población diabética.

Estos resultados coinciden con los hallados en el trabajo de Martínez Villanueva (190) en población murciana en el que se encuentra una asociación significativa del polimorfismo XbaI con la presencia de DM en su grupo de estudio.

Mohammadi y cols. (191) demostraron que las frecuencias alélicas de los polimorfismos PvuII y XbaI fueron significativamente diferentes entre los pacientes con DM2 y los sujetos control. Demostraron que el genotipo mayoritario de PvuII es TC y de XbaI es AG, mostrando una reducción de la frecuencia del genotipo AA de XbaI, resultados que concuerdan con los hallados en nuestro estudio.

Por otro lado, existen estudios en los que no se encontró asociación significativa entre la DM2 y los polimorfismos PvuII y XbaI (192)(193). Las diferencias son atribuibles a las características intrínsecas de la población, especialmente a lo que a etnia y raza se refiere y que obviamente influirá en gran medida en los resultados referidos. Por otra parte, hay que tener en cuenta la variabilidad de los estudios en cuanto al tamaño muestral y al diseño del estudio.

- **Polimorfismos en el gen de la OPG:**

En nuestro estudio analizamos la posible asociación de polimorfismos en la región 1181 G/C, 163 A/G, 245 T/G de la OPG con la DM. No encontramos diferencias en la distribución genotípica ni alélica entre los diferentes grupos de paciente con DM y la población control, lo que interpretamos en el sentido de que ninguno de los polimorfismos estudiados sería un factor de predisposición genética para la DM.

La frecuencia de los distintos genotipos de los SNPs 1181 G/C, 163 A/G y 245 T/G del gen OPG coincide con la hallada en un estudio español llevado a cabo por La Piedra (194) en pacientes hiperparatiroideos de una región de Cantabria.

En contrapartida a los resultados encontrados en nuestro estudio, Tu y cols. (31) demostraron que el genotipo GG del polimorfismo 1181 G/C OPG se asoció con un mayor riesgo de DM2 en mujeres chinas. No hemos encontrados estudios que analicen la prevalencia de los polimorfismos 163 A/G y 245 T/G en la DM.

- **Polimorfismos en el gen RANKL:**

En nuestro estudio encontramos diferencias de prevalencia entre la población control y el grupo de pacientes con DM1, donde la proporción de los homocigotos GG es mayor en detrimento del número de homocigotos AA (Tabla 27), siendo la prevalencia del alelo mayoritario, el alelo A, del 69,2%, significativamente inferior al encontrado en la población control. Esto datos coinciden con otros estudios llevados a cabo en población oriental, (195)(196), en el que de la misma manera, la proporción de homocigotos GG es mayor con el consecuente descenso en la prevalencia de genotipo AA.

La frecuencia de los distintos genotipos del polimorfismo rs2277438 del gen RANKL en nuestro grupo de DM2 fue similar a la descrita en el estudio español de La Piedra (194) donde, del mismo modo que en nuestro estudio, se pone de manifiesto que el genotipo GG es el

minoritario (0,0 % vs. 1,6%). La prevalencia genotípica del SNP del gen RANKL de nuestro estudio también es similar a la de Dong y cols. (72) en población caucásica.

- **Polimorfismos en el gen de la IL-6:**

Existen tres genotipos para este polimorfismo: GG, GC y CC, que parecen afectar a la transcripción de la citoquina. El genotipo GC presenta la prevalencia más elevada en la mayoría de estudios poblacionales realizados hasta el momento en población europea. El genotipo CC, normalmente el de menor incidencia, ha sido relacionado con una menor expresión del gen y con niveles menores de IL-6 circulante. Otros estudios, han relacionado al alelo G con una mayor transcripción del gen y con una mayor producción de IL-6 (80).

En nuestro estudio encontramos diferencias de prevalencia entre ambos grupos de DM, además encontramos diferencias significativas ente la prevalencia de cada grupo comparada con la población control. En la población CEU el genotipo más frecuente corresponde a la combinación heterocigota GC. La mayoría de los estudios poblacionales realizados en Europa muestran a este genotipo como el más prevalente y al genotipo CC como el de menor frecuencia. En nuestro caso, existe concordancia para la baja frecuencia del genotipo CC en ambos tipos de DM, pero sin embargo, el genotipo mayoritario difiere entre ambos grupos, siendo igual que en la población control en la DM1, mientras que el mayoritario en la DM2 es el GG (Tabla 26). Se observan diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica de este polimorfismo entre ambos grupos de DM, donde llama la atención la distribución del genotipo CC que aun siendo el genotipo minoritario en ambos grupos, la prevalencia de éste en la DM2 es más de tres veces inferior a la encontrada en la DM1 (4,2% vs. 15,6%) y esta diferencia se hace mucho más pronunciada si la comparamos con la población control (4,2% vs. 31,8%).

Los estudios en los cuales se evaluaron la frecuencia genotípica de este polimorfismo en DM aportan resultados variables. En el estudio de Vozarova y cols. (77), entre los 329 sujetos caucásicos españoles estudiados, hubo una diferencia significativa en la distribución genotípica entre sujetos diabéticos y no diabéticos siendo el genotipo GG fue más frecuente en pacientes con DM2 que en sujetos sin DM. Además relacionaron el alelo G con una mayor resistencia a la insulina y con un mayor riesgo de desarrollar DM2. Datos que que concuerdan con los hallados en nuestro trabajo y que podemos comparar con nuestro estudio, ya que éste es llevado a cabo en población de la misma raza.

Del mismo modo que en nuestro estudio, el genotipo GG en americanos nativos y caucásicos, ha sido asociado a DM2, mientras un estudio sueco y otro de población franco-canadiense han relacionado al alelo C con índices de obesidad. En la población española, se ha asociado al alelo G con hiperglucemia, con una disminución en la sensibilidad a la insulina y con alteraciones lipídicas (80).

Estas diferencias, al igual que ya hemos comentado en el resto de polimorfismos, pueden justificarse por el origen étnico y la distribución geográfica, así como por la diferencia en los tamaños de muestras utilizados. La ventaja principal de nuestro estudio es la homogeneidad etnia/raza de los participantes en el mismo.

5.4.2 Asociación de los polimorfismos estudiados y la DMO

Nuestro estudio analizó si la DMO de una selección de sujetos de una población con DM estaba genéticamente relacionada con una selección de genes candidatos conocidos por estar asociados con la DMO y por estar implicados en el metabolismo óseo.

Los diferentes estudios de asociación genética y osteoporosis/DMO realizados hasta la fecha han mostrado resultados diversos. En nuestro trabajo hemos encontrado una asociación directa entre la DMO determinada en cadera y el modelo dominante del polimorfismo de la IL-6 en nuestra población con DM1 (Tabla 29). En cuanto a la población con DM2 y la relación entre la DMO y los polimorfismos estudiados, encontramos asociación en 3 de los 4 polimorfismos del gen del VDR (BsmI, ApaI y TaqI).

- **Polimorfismos en el gen del VDR:**

En nuestro estudio, en los pacientes con DM2 encontramos una asociación entre el modelo dominante (AA+AG), del polimorfismo BsmI, presentando estos individuos menores valores de DMO en columna lumbar (Tabla 37), concordando con diversos estudios que relacionan el alelo A del BsmI con una menor DMO (197). También se ha encontrado una asociación entre el genotipo CC del polimorfismo ApaI con una mayor DMO en columna lumbar. En cuanto al polimorfismo TaqI, hemos encontrado en este grupo de pacientes una asociación significativa entre el modelo recesivo (CC+TC) y una menor DMO en columna lumbar.

El polimorfismo BsmI del gen del VDR fue el primero en relacionarse con la adquisición y/o mantenimiento de la masa ósea, aunque posteriormente no todos los estudios han confirmado

esta asociación. El primer estudio que demostró esta asociación fue el de Morrison y cols. (56) que demostraron que las mujeres con genotipo AA del BsmI presentaban una menor DMO. También el análisis de Thakkinistian y cols. (197) indicó una débil pero estadísticamente significativa relación entre el alelo A de dicho polimorfismo y una DMO menor en la columna lumbar. Estos resultados concuerdan con los hallados en nuestros pacientes con DM2 donde la presencia del alelo A se asocia a una menor DMO en columna lumbar.

Nuestros resultados también son coincidentes con un estudio llevado a cabo por Martínez Villanueva (190) en población murciana. Este trabajo estudió la asociación de diferentes polimorfismos relacionados con la enfermedad ósea en pacientes con trasplante renal. Se demostró que los pacientes con genotipo AA del BsmI mostraban significativamente una menor DMO en columna lumbar en el momento pretrasplante. En cuanto al polimorfismo FokI, no demostraron asociación con la DMO, igual que ocurre en nuestro estudio.

En contraposición a nuestros resultados está el estudio llevado a cabo por Botella Martínez (198) en una cohorte de mujeres de la Comunidad Foral de Navarra, en el que no se observaron diferencias significativas en la DMO en función del genotipo de los polimorfismos BsmI y FokI.

Los resultados encontrados en la bibliografía en cuanto al polimorfismo ApaI son contradictorios. Nuestros resultados se asemejan al estudio de Álvarez y cols. (57) donde se encuentra asociación entre el alelo A y el aumento de riesgo de fracturas y del genotipo CC asociado a una mayor DMO (Figura 38), mientras que discrepan con otros que no señalan ninguna evidencia de asociación (58).

Así mismo, para el polimorfismo TaqI, nuestros resultados son concordantes con los reflejados en el trabajo de Seyed y cols. (199) donde se asocia el alelo C del polimorfismo TaqI, con una menor DMO (Figura 39).

- **Polimorfismos en el gen ESR1:**

En nuestro trabajo no hemos encontrado una asociación directa entre la DMO y los genotipos frecuentes del gen ESR1 (PvuII y XbaI). Nuestros resultados son concordantes con el metaanálisis de Ioannidis y cols. (66) llevado a cabo en aproximadamente 20.000 individuos procedentes de 8 centros europeos (proyecto GENOMOS). Este estudio llega a la conclusión de

que ninguno de los 2 polimorfismos o haplotipos tuvo ningún efecto estadísticamente significativo sobre la DMO.

Del mismo modo, en el estudio de Martínez Villanueva (190) en pacientes con trasplante renal de la Región de Murcia, no se encuentra asociación entre la DMO al inicio del estudio con los genotipos de los polimorfismos PvuII y XbaI, sin embargo, se demuestra que la presencia del genotipo AA del polimorfismo XbaI está netamente asociado a una mayor pérdida de masa ósea en cabeza femoral en el postransplante

Nuestros resultados también concuerdan con el estudio de Botella Martínez (198) en mujeres navarras, en el que no se observaron diferencias significativas en la DMO en función del genotipo de los polimorfismos PvuII y XbaI.

- **Polimorfismos en el gen de la OPG:**

En nuestro estudio no encontramos ninguna diferencia entre genotipos en el polimorfismo 1181 G/C, 163 A/G ni en el 245 T/G del gen OPG en cuanto a la DMO en los sujetos con DM. Al igual que ha ocurrido con otros polimorfismos de este estudio, no encontramos estudios que asocien estos polimorfismos con la DMO en la DM, por lo que la comparación la realizamos con otro tipo de pacientes.

En contrapartida con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en un estudio español llevado a cabo por La Piedra y cols. (70) los sujetos con hiperparatiroidismo primario y genotipo GG de los SNPs 163 A/G y 245 T/G del gen OPG tuvieron una menor DMO en radio distal. También encontraron para el polimorfismo 1181 G/C de la OPG en sujetos control, una mayor DMO lumbar en el genotipo CC respecto del GG.

En el estudio de García-Unzueta y cols. (200), en un grupo de mujeres españolas con diferentes status hormonal, no encontraron diferencias significativas en la DMO según el genotipo 163 A/G y 245 T/G, sin embargo, encontraron mayores valores de DMO de columna lumbar mujeres con genotipo CC frente a aquellos con genotipo GC o GG. en el polimorfismo 1181 G/C de la OPG.

- **Polimorfismos en el gen RANKL:**

De acuerdo con otros trabajos previos en población no diabética (196)(195) en nuestro estudio no hemos encontrado ninguna asociación significativa con la DMO entre los diferentes genotipos del polimorfismo rs2277438 del gen RANKL en ninguno de los dos grupos estudiados.

Sin embargo, en el estudio realizado por Dong y cols. (72) en una población estadounidense, encuentran relación entre el haplotipo GG del SNP rs2277438 del gen RANKL y un mayor índice de resistencia a la compresión en cuello femoral calculado a partir de la DMO por DEXA.

- **Polimorfismos en el gen de la IL-6:**

En cuanto a la relación entre la DMO y el polimorfismo 174 C/G de la IL-6 en nuestro estudio encontramos una asociación significativa en los pacientes con DM1, en el que el modelo dominante (G/G+G/C) se asocia con una mayor DMO en cadera (Figura 36).

Muchos estudios han examinado la asociación entre los polimorfismos del gen de la IL-6 y la DMO, sin embargo, los resultados siguen siendo controvertidos.

Kusek y cols. (201) en un estudio llevado a cabo con 267 mujeres posmenopáusicas de la región de Wielkopolska demuestran que el polimorfismo 174 G/C de la IL-6 no tiene influencia sobre el valor de la DMO en la población investigada. Sin embargo, Ni y cols. (75) encontraron que los individuos con el genotipo GG tenían un valor de DMO significativamente menor que aquellos con genotipo CC en el cuello femoral y radio distal. A pesar de estos hallazgos, no encontraron una diferencia estadísticamente significativa de la DMO en la columna vertebral.

Del mismo modo, y en contrapartida a nuestros resultados en DM1, en un estudio llevado a cabo en población turca, Deveci y cols. (202) demostraron que los valores de DMO de la columna lumbar y la cadera fueron más bajos en las mujeres con el genotipo GG, intermedio en los heterocigotos y más alto en mujeres con el genotipo CC.

Estas diferencias pueden deberse a diferencias en las etnias estudiadas y como inconveniente tenemos que no hemos encontrado ningún estudio que evalúe la asociación entre la DMO y los polimorfismos del gen de la IL-6 en población diabética, así como la posibilidad de la

heredabilidad de estas mutaciones asociadas a ciertos patrones genéticos característicos de la DM que no podemos evaluar y que para ello sería necesario realizar estudios poblacionales con mayor número de sujetos.

5.4.3 Asociación entre los polimorfismos genéticos y las distintas características clínicas y los diferentes parámetros bioquímicos de la población

5.4.3.1 Polimorfismos en el gen del VDR

En nuestro estudio encontramos diversas asociaciones entre los marcadores bioquímicos relacionados con el status óseo del paciente diabético en todos los polimorfismos del gen de la vitamina D estudiados. Sin embargo, la bibliografía publicada hasta la fecha muestra discrepancias, probablemente debido al tipo de población en la cual se lleva a cabo el estudio. Encontramos escasos trabajos que estudien esta asociación en pacientes con DM, y ninguno que comparen ambos grupos de DM (1 y 2).

En cuanto a los polimorfismos del gen de la vitamina D relacionados con valores de OC, encontramos en nuestro estudio que las concentraciones plasmáticas de este marcador son menores en el genotipo AA del BsmI en la DM1, en alelo A del ApaI en ambos grupos, en el que además la presencia de este alelo en DM2 está asociado a una menor DMO, y en el alelo T del FokI en DM1. El único polimorfismo del gen VDR con el que no encontramos asociación con la OC es el polimorfismo TaqI.

Estas asociaciones encontradas entre los niveles de OC y los polimorfismos del VDR, en 3 de los 4 polimorfismos estudiados se pueden explicar debido a que el complejo calcitriol-VDR participa en la regulación de la transcripción del gen de la OC, una de las principales proteínas involucradas en la formación ósea en los osteoblastos. Los primeros estudios del posible efecto de los polimorfismos del VDR sobre el metabolismo del hueso se hicieron sobre los niveles séricos de OC, encontrándose una gran asociación entre los alelos de los polimorfismos del BsmI, ApaI y TaqI y los niveles plasmáticos de OC, en una cohorte de 91 controles sanos (203).

En contraposición a nuestros hallazgos, Feuz y cols. (204) determinaron los niveles séricos de OC y el genotipo del polimorfismo BsmI en 97 mujeres embarazadas sanas. El genotipo AA se asoció significativamente con un nivel más alto de OC que el resto de genotipos. Sin embargo no podemos comparar este tipo de estudios con el nuestro debido a que hay que contemplar la

relación de este marcador con el metabolismo hidrocarbonado que hace que sus concentraciones se vean significativamente disminuidas en la DM.

En nuestro estudio, las concentraciones β -CTX, se relacionan con el alelo G del polimorfismo BsmI con valores más elevados de dicho marcador en ambos tipos de DM sin alcanzar este marcador, valores patológicos por lo que estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que el metabolismo óseo está disminuido en esta patología siendo por lo tanto el alelo A, con menores valores de β -CTX, el alelo que más disminuido tiene el remodelado óseo, con tendencia hacia la no formación ni destrucción de hueso. Otro polimorfismo que se asocia con los valores de β -CTX tanto en DM1 como DM2 es el alelo C del FokI que se asocia con valores más elevados de este marcador, alcanzando en el caso de la DM1, valores patológicos. La bibliografía asocia este alelo a una peor pronóstico óseo.

En cuanto a las hormonas calciotropas, en nuestro estudio, los pacientes con DM1 y alelo A del polimorfismo BsmI, tienen mayores valores de vitamina D y PTH. Estos resultados concuerdan con el estudio de Laaksonen y cols. (205) en mujeres finlandesas, lo que podría explicar las diferencias en la absorción de calcio entre los diferentes genotipos. Estos resultados coinciden con nuestros hallazgos en pacientes con DM1, pero no en DM2, lo cual pone de manifiesto que los procesos moleculares que afectan a la patología ósea difieren entre DM1 y DM2.

Hasta la fecha, existen algunos datos publicados sobre la posible interacción entre el polimorfismo del gen VDR con los mediadores inmunes/inflamatorios en la DM, especialmente en la DM2. Algunas de las acciones inmunes no clásicas de la vitamina D pueden indicar su papel en la patogénesis de la DM2 a través de la regulación de las citoquinas (IL-6). Aunque hay evidencias para apoyar una relación entre el estado de vitamina D, inflamación crónica y resistencia a la insulina, el mecanismo subyacente requiere más estudios que lo demuestren. En este sentido, en nuestro estudio, en pacientes con DM1 encontramos que los valores plasmáticos de la IL-6 se encuentran disminuidos en presencia del alelo A del ApaI, mientras que en el genotipo TC del FokI se encuentran valores elevados de esta citoquina. En el caso de la DM2 es el alelo C del FokI el que presenta valores más elevados de IL-6. Además de estos hallazgos de asociación entre los polimorfismos del VDR y la IL-6, la asociación encontrada entre las concentraciones plasmáticas de ambos parámetros (vitamina D e IL-6) apoyan esta hipótesis.

5.4.3.2 Polimorfismos en el gen del ESR1

En nuestro estudio encontramos una asociación significativa entre la DM1 y el IMC en el polimorfismo PvuII. Estudios recientes de asociación entre el polimorfismo PvuII del gen ESR1 y el IMC han dado resultados contradictorios. Nuestros resultados son inconsistentes con los hallazgos previos en poblaciones chinas en el que no se encuentra asociación de este polimorfismo con el IMC (206). Sin embargo coinciden con otros que indican asociaciones significativas entre el polimorfismo PvuII del gen ESR1 y el IMC en mujeres posmenopáusicas de raza caucásica (207), mujeres japonesas de mediana edad (208), mujeres blancas posmenopáusicas (209), familias afroamericanas (210) y población brasileña (211).

En el caso del XbaI, en nuestro estudio encontramos una asociación significativa entre el modelo dominante (AA+AG) en ambos grupos de DM y la presencia de dislipemia. Son numerosas las referencias bibliográficas que relacionan los receptores de estrógenos con el metabolismo lipídico. Nuestros hallazgos concuerdan con los resultados del estudio de Rauschemberger y cols. (212) en el que muestran que el genotipo AG se asocia a la presencia un peor perfil lipídico.

En nuestro estudio, en la DM1, el genotipo TC del PvuII se asocia con mayores valores de OC y el alelo T con menores valores de IL-6. En el caso del polimorfismo XbaI, encontramos mayores valores de IL-6 en el genotipo GA. En pacientes con DM2 se observa asociación entre la presencia del alelo T del PvuII con menores valores de β -CTX, de IL-6 y de vitamina D. En el caso del polimorfismo XbaI, se observan menores valores de β -CTX en la presencia del alelo A.

En este punto la bibliografía muestra resultados dispares, pero en general, la gran mayoría de artículos no detectan diferencias para los marcadores óseos entre los diferentes polimorfismos PvuII y XbaI (213)

5.4.3.3 Polimorfismos en el gen de la OPG

En nuestro estudio encontramos que el polimorfismo 1181G/C de la OPG se encuentra relacionado con la presencia de retinopatía, tanto la población total estudiada, como en la DM2 en particular, siendo mayoritaria la prevalencia en el caso de la presencia del alelo C.

Estos resultados concuerdan con el estudio de Mankoč y cols. (214) llevado a cabo en pacientes caucásicos con DM2. Fue el primer estudio que demostró que los portadores del genotipo CC y, por tanto, el alelo C, tenían una mayor prevalencia de retinopatía diabética que aquellos con el genotipo CG o el genotipo GG. Esto puede explicarse debido a la influencia que ejerce la OPG en el tejido vascular, ya que la disminución de la expresión de OPG además de asociarse a severos cuadros de osteoporosis, y aumento de la actividad osteoclástica, se asocia también a calcificación arterial severa, lo que revela el papel protector de la OPG en el sistema vascular. Asimismo, existen estudios que asocian la variante polimórfica CC con otras complicaciones vasculares como es el caso del estudio de Biscetti y cols. (215) que informó de una asociación entre el genotipo CC y ACV en pacientes diabéticos italianos. En otro estudio sobre pacientes con DM2, se observó una fuerte asociación entre el alelo C y el pie diabético (216).

En nuestro estudio, el polimorfismo 163 A/G OPG se encuentra relacionado con la presencia de fracturas previas, siendo en este caso la presencia del alelo A el que se asocia con una mayor prevalencia de fracturas tanto en la población total como en la DM1. También encontramos relación entre el polimorfismo 245 T/G OPG y la presencia de fracturas previas. Del mismo modo que en nuestro trabajo, en el estudio de Boroňová y cols. (217) se detectó que el polimorfismo 245T/G OPG se asoció a fracturas previas, por lo que podría usarse junto con otros marcadores genéticos para identificar individuos con alto riesgo de fracturas osteoporóticas. También en un metaanálisis llevado a cabo por Sheng y cols. (218) se demuestra que este polimorfismo se asocia con la presencia de fracturas. Sin embargo existen otros artículos que no revelan ninguna asociación entre los SNPs de la OPG y la presencia de fracturas (219).

En nuestro estudio no observamos asociación entre genotipo de los SNPs de la OPG y marcadores bioquímicos, salvo en el caso del 1181 G/C OPG en el que se asocia el alelo C con mayores valores de IL-6 y el genotipo CC con mayores valores de P1NP en la DM1. En contraposición a los resultados de nuestro estudio, el trabajo de La Piedra y cols. (194) en pacientes españoles con hiperparatiroidismo primario se observan diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de OC en el caso del genotipo GG del 163A/G OPG. Para el polimorfismo 245T/G OPG también encuentran diferencias significativas, presentando concentraciones plasmáticas más elevadas de OC y β -CTX en presencia del genotipo GG.

5.4.3.4 Polimorfismos en el gen del RANKL

En nuestro estudio, en este polimorfismo rs2277438 (A/G) del gen RANKL no se observa ninguna asociación significativa con los marcadores bioquímicos estudiados en ambos tipos de DM. Al revisar la literatura, apenas existen trabajos que relacionen el genotipo de este polimorfismo con los MRO, pero hallamos concordancia con un estudio español realizado por La Piedra y cols. (194) en pacientes con hiperparatiroidismo primario, en el que no se observan diferencias significativas en función del genotipo en ningún parámetro estudiado, ni en marcadores de formación ni de resorción, ni en el caso de hormonas calciotropas.

5.4.3.5 Polimorfismos en el gen de la IL-6

Este polimorfismo en nuestro estudio se relaciona con la presencia de antecedentes de padres con fractura en el caso de la DM1, siendo en particular la presencia del alelo C el que hace posible esta asociación. También se encuentra una asociación en dicho grupo de pacientes de este polimorfismo con el IMC.

En el caso de pacientes con DM2, hemos encontrado asociación de este polimorfismo con la presencia de ACV. Nuestros resultados se correlacionan con los múltiples estudios que demuestran la asociación entre el ACV y dicho polimorfismo (220)(221) en los que se demuestra la asociación del genotipo GG del 174G/C IL-6 con ACVs menos graves, mejor pronóstico a corto y largo plazo y supervivencia. Debido a estos hallazgos podemos determinar que el genotipo GG parece ser protector contra la gravedad del ACV, el resultado y la mortalidad.

Del mismo modo que en el estudio de Garnero y cols. (222), en nuestro estudio no encontramos asociación significativa entre los genotipos y los MRO, sin embargo, Ferrari y cols. (83) determinaron que los niveles de β -CTX difirieron significativamente entre los genotipos de IL-6 observándose valores más bajos en el caso del el genotipo CC, asociándose a una menor resorción ósea. En contraste, los niveles de OC no variaron según el genotipo.

En cuanto a la asociación con el resto de parámetros bioquímicos sólo encontramos asociación en pacientes con DM1 del alelo C con menores valores de IL-6. Esto se puede explicar ya que existen evidencias bibliográficas de que este polimorfismo produce una variante funcional, en el

sentido de que el alelo C produce una actividad promotora de la IL-6 estimulada más baja y concentraciones de IL-6 circulantes inferiores en comparación con el alelo G (223).

5.5 Objetivo 5: Estudiar la combinación más adecuada de los marcadores de remodelado óseo y de inflamación con las variables clínicas para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad ósea en el paciente diabético.

El diagnóstico y seguimiento de la osteoporosis es conceptualmente complejo y ha dependido durante mucho tiempo de la densitometría, pero en la actualidad cada vez es más patente que dicha patología no es solo un problema de cantidad, sino también de calidad, especialmente en la DM, por lo que el valor de esta técnica para evaluar el estado óseo en el paciente diabético es muy limitado.

Aunque la densitometría continúa siendo el estándar de oro para la gradación de la osteoporosis, ya se ha explicado que este procedimiento tiene varias limitaciones en el caso de pacientes con DM donde a pesar de una DMO más elevada, en el caso de la DM2, nos encontramos con un mayor riesgo de fractura.

En la actualidad, la determinación de marcadores bioquímicos y polimorfismos de remodelado óseo supone una propuesta novedosa en la evaluación clínica de los pacientes con patología ósea al tratarse de mediciones no invasivas y relativamente económicas. La determinación de marcadores bioquímicos es una técnica mucho más accesible y económica que el DEXA y en lo referente a los SNPs, pese a su mayor coste, es una técnica que sólo realizaremos una vez en la vida del individuo. Por todo esto, un modelo que combinase los biomarcadores y los polimorfismos tendría la clara ventaja de una mayor disponibilidad.

Por tanto, elaboramos cuatro modelos diagnósticos que predijesen la probabilidad o riesgo de que un paciente con DM tuviese osteoporosis u osteopenia. Para ello realizamos regresión logística binaria y evaluamos la utilidad que aportarían en la evaluación del grado de patología ósea en nuestra cohorte de pacientes. El primer modelo comprendió variables clínicas, parámetros relacionados con la patología diabética. El segundo modelo resultó de la inclusión en el modelo anterior de los MRO. En el tercer modelo tuvimos en cuenta el marcador de inflamación estudiado. El cuarto y último modelo supuso la adición de los polimorfismos asociados a patología ósea al tercer modelo.

Se realizó un análisis de regresión logística tomando como variable la presencia de patología ósea (T-score inferior a -1,0 DE). Los cuatro modelos presentaron un nivel de calibración adecuado de acuerdo al resultado del test de Hosmer-Lemeshow. La calibración es una medida que expresa la concordancia entre los resultados observados y las predicciones del modelo. En otras palabras, es la capacidad del modelo de producir estimaciones no sesgadas de la probabilidad del evento o variable de valoración, en nuestro caso la identificación de patología ósea.

Al comparar la utilidad de los cuatro modelos mediante la diferencia de áreas y el IDI, no se observaron diferencias significativas al comparar los modelos con marcador de inflamación con aquellos que solo incluían OC y variables clínicas (3 vs. 2), pero por el contrario, el modelo con los polimorfismos óseos aportó resultados significativamente superiores a los que incluían únicamente marcadores bioquímicos (3 vs. 4).

Para estudiar la influencia que ejercen el resto de variables continuas, tanto clínicas como de laboratorio, realizamos un análisis de regresión lineal múltiple. En el análisis multivariado, se confirmó que fueron factores predictores de patología ósea, de forma independiente la edad, la presencia de fracturas previas y la OC en los modelos 1, 2 y 3. Sin embargo en el modelo 4 (incluye SNPs) el único factor predictor independiente es el alelo C del polimorfismo 1181 G/C de la OPG.

Es evidente, según los resultados aportados, que para la detección de patología ósea en la DM la utilización de un modelo que combina marcadores bioquímicos y polimorfismos aporta mejores resultados que el uso de los marcadores individuales. Las AUCs de los cuatro modelos son superiores a cualquiera de las aportadas por los biomarcadores de manera aislada.

Teniendo en cuenta lo anterior, de manera global el modelo más conveniente es el cuarto, que incluye OC e IL-6 y el alelo C (PvuII) y el alelo C (1181 G/C OPG). Así mismo, los altos valores de sensibilidad (81,82%), especificidad (95,92%), VPP (81,8%) y VPN (95,9%) avalan la utilización de este modelo para la identificación de patología ósea.

A pesar de que no hemos encontrado en nuestra revisión bibliográfica, estudios que evalúen este tipo de modelos, en este sentido podemos afirmar que la OC, como ya hemos comentado anteriormente, está estrechamente relacionada con el metabolismo hidrocarbonado y con el metabolismo óseo en el paciente diabético y los resultados de estos modelos refuerzan la utilidad de este marcador en el diagnóstico de la patología ósea en DM, ya que analizado por sí

solo y a pesar de tener un buen AUC, no es del todo apto para usar de forma aislada, pero combinado con diversas variables clínicas mejora significativamente.

El análisis multivariado también reveló que el alelo C del polimorfismo 1181G/C de la OPG es un factor independiente de patología ósea, lo cual va en consonancia con diversos estudios, en concreto el estudio español llevado a cabo por García-Unzueta y cols. (200) en el que pone de manifiesto que este polimorfismo está fuertemente relacionado con la DMO de la columna, y explicó 11,5% de la varianza siendo alelo C el asociado a una DMO más alta.

En la actualidad no se recomienda la detección de la patología ósea o el tratamiento profiláctico en los pacientes con DM, tanto tipo 1 como 2, sin embargo en base a los resultados obtenidos en este estudio se debe dar a esta población de pacientes orientación general sobre la ingesta de calcio y vitamina D, el ejercicio y la prevención de posibles factores de riesgo de osteoporosis, así como un seguimiento que permita una detección temprana de la patología ósea. A pesar de los buenos resultados obtenidos con este modelo (variables clínicas, OC, IL-6 y SNPs), la implantación en la práctica clínica diaria debería evaluarse con estudios adicionales que validasen su utilidad. Además, sería interesante establecer su utilidad en la evaluación del pronóstico de la patología ósea, que en última instancia, es el punto final más relevante clínicamente.

5.6 Limitaciones del estudio

La principal limitación del presente estudio reside en el insuficiente seguimiento longitudinal de los pacientes, el cual probablemente proporcionaría información adicional para corroborar el valor pronóstico de los biomarcadores estudiados para predecir la progresión de la patología. Por este motivo, permanece abierto el estudio para posteriores evaluaciones.

Por problemas logísticos, sólo se han genotipado 95 de los 165 pacientes incluidos en el estudio (47 DM1 y 48 DM2). Para valorar el alcance de dicha pérdida, se ha realizado una prueba de Levenne de calidad de varianzas que no muestra diferencias significativas entre la población de la que se disponen datos de SNPs y la población perdida.

VI CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. Las características de nuestra población de estudio son comparables a las recogidas en la bibliografía y extrapolables a la población diabética de nuestro medio. Al comparar los dos grupos de pacientes diabéticos encontramos diferencias significativas con respecto a la edad, pero no con el sexo, manifestando como otros autores que la diabetes es una patología que afecta por igual a ambos sexos. Encontramos que los pacientes con DM1 son más jóvenes pero con mayor número de años de evolución de la enfermedad. En el grupo de pacientes con DM2 encontramos una mayor proporción de obesidad, HTA, dislipemia y cardiopatía isquémica.
2. La media del T-score en cadera fue superior en el grupo de DM1, mientras que en el grupo con DM2 encontramos una mayor DMO en columna lumbar, probablemente consecuencia de una mayor carga mecánica. No obstante, la prevalencia de osteopenia fue superior al 20% en ambos grupos, encontrando incluso un 5% de pacientes osteoporóticos en el grupo de DM2. En ninguno de los dos grupos se encontró variación de la DMO en el intervalo de tiempo estudiado, por tanto estudios posteriores deberían programarse en un plazo más largo. En ambos grupos se observó una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el IMC y la DMO. El riesgo de fractura a 10 años calculado por el algoritmo FRAX® fue diferente para los dos tipos de diabetes, siendo mayor la probabilidad de fractura en el grupo de DM2, con un valor correspondiente a riesgo intermedio, pese a tener mayores valores de DMO, lo que pone de manifiesto la escasa utilidad del DEXA en esta patología.
3. Existe deficiencia de vitamina D en ambos grupos siendo más acentuada en el caso de la DM2. Los pacientes con DM2 tienen la función renal significativamente más deteriorada y el control glucídico es peor en el caso de la DM1. La presencia de dislipemias se asocia negativamente a la calidad ósea reflejada en la relación entre los niveles de cLDL y la DMO en cadera y de los triglicéridos con el riesgo de fracturas. Los MRO manifiestan una disminución objetiva del remodelado óseo en la DM2 y una disminuida formación ósea asociada con una resorción ósea acelerada en la DM1. La OC demostró ser el MRO más eficaz para el diagnóstico de patología ósea. Los valores de IL-6 aumentaron a lo largo del estudio, y fueron más altos en pacientes con DM2, lo que reflejó un estado proinflamatorio de bajo grado mantenido en estos pacientes que constituye un potencial mecanismo de pérdida ósea y un aumento del riesgo de fractura.

4. La prevalencia de los genotipos de los polimorfismos estudiados no difiere entre ambos tipos de diabetes salvo en el caso del polimorfismo 174 G/C de la IL-6, donde la frecuencia del alelo C es mayor en la DM1 comparado con la DM2, mientras que el alelo G es el más prevalente en la DM2. Se encontraron diferencias de distribución genotípica al compararlas con la población control en el polimorfismo ApaI, XbaI y 174 G/C de la IL-6 en ambos grupos de diabetes y del polimorfismo RANKL entre la DM1 y la población control. En pacientes con DM1, los valores de DMO en cadera fueron mayores en aquellos pacientes con presencia del alelo G del polimorfismo 174 G/C de la IL-6. Los pacientes afectados de DM2 mostraron una menor DMO asociada al alelo A del BsmI, al alelo A del ApaI y al alelo C del TaqI. Las concentraciones plasmáticas de OC fueron menores en presencia del alelo A del ApaI en ambos grupos de DM y en el genotipo AA del BsmI y en el alelo T del FokI en la DM1. Valores más elevados de β -CTX, se encontraron asociados al alelo G del BsmI y al alelo C del FokI en ambos tipos de DM. Se relacionaron mayores concentraciones plasmáticas de IL-6 con el alelo C del ApaI en la DM1 y al alelo C del FokI en ambos grupos.

5. La combinación del modelo con variables clínicas, OC, IL-6 y Alelo C del PvuII y Alelo C del 1181 G/C OPG, supone una opción válida y más eficaz que cualquiera de las variables estudiadas de manera individual proporcionando un test adecuado para el diagnóstico y prevención de patología ósea en el paciente diabético en la práctica clínica.

VII BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37:S81-90.
2. Association AD. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2017;40:S11–24.
3. David M Maahs, Nancy A West, Jean M. Lawrence, And Mayer-Davis EJ. Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39:481–97.
4. Gastaldelli A. Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011;93.
5. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la diabetes. WHO [Internet]. 2016;4. Available from: <http://www.who.int/diabetes/global-report/es/>
6. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. *International Journal of Medical Sciences*. 2014;11(11):1185–200.
7. Ogurtsova K, Linnenkamp U, Guariguata L Whiting D, Shaw J da RFJ, Al. E. IDF Diabetes Atlas: Estimates for 2015 and 2040. [Internet]. 7th ed. 2015. Available from: www.diabetesatlas.org
8. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012 Jan 11;55(1):88–93.
9. International Expert Committee. International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2009 Jul 1;32(7):1327–34.
10. Cowie CC, Rust KF, Byrd-Holt DD, Gregg EW, Ford ES, Geiss LS, et al. Prevalence of Diabetes and High Risk for Diabetes Using A1C Criteria in the U.S. Population in 1988–2006. *Diabetes Care*. 2010 Mar 1;33(3):562–8.
11. Aathira R, Jain V. Advances in management of type 1 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 2014 Oct 15;5(5):689.
12. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment. *Diabetes Care*. 2016;40(Supplement 1).
13. Dennis L K, Eugene B, Anthony S F, Stephen L H, Dan L L, J LJ et al. Diabetes mellitus. In: Mc Graw Hill, editor. *Harrison: Medicina Interna*. 18th ed. 2012.
14. Hamann C, Kirschner S, Günther K-P, Hofbauer LC. Bone, sweet bone-osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. 2012 Jan 17;8(5):297–305.

15. Dennis L K, Eugene B, Anthony S F, Stephen L H, Dan L L, J LJ et al. Metabolismo óseo y mineral en las personas sanas y enfermas. In: Mc Graw Hill, editor. Harrison: Medicina Interna. 18th ed. 2012.
16. C CB. Anatomía y ultraestructura ósea. In: Panamericana, editor. Osteoporosis y menopausia. 2009.
17. Kraft-Terry SD, Gendelman HE. Proteomic biosignatures for monocyte-macrophage differentiation. *Cellular immunology*. 2011;271(2):239–55.
18. Wheeler G, Elshahaly M, Tuck SP, Datta HK, van Laar JM. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *Journal of translational medicine*. 2013 Aug 29;11:201.
19. Pogoda P, Priemel M, Rueger JM, Amling M. Bone remodeling: new aspects of a key process that controls skeletal maintenance and repair. *Osteoporosis International*. 2005 Mar 16;16(S02):S18–24.
20. Grant SFA RS. Genes and osteoporosis. *Endocrinology* [Internet]. 1997;8(6):232–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276097000581>
21. Williams FMK, Spector TD. The genetics of osteoporosis. *Acta reumatologica portuguesa*. 32(3):231–40.
22. Han Y, Cowin SC, Schaffler MB, Weinbaum S. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Nov 23;101(47):16689–94.
23. Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, et al. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *AJP: Cell Physiology*. 2003 Apr 1;284(4):C934–43.
24. Neyro Bilbao J, Cano Sánchez a, Palacios Gil-Antuñano S. Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2011;3(2):105–12.
25. Pacifici R. T cells, osteoblasts, and osteocytes: interacting lineages key for the bone anabolic and catabolic activities of parathyroid hormone. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016 Jan;1364(1):11–24.
26. Zaidi M, Moonga BS, Abe E. Calcitonin and bone formation: a knockout full of surprises. *The Journal of clinical investigation*. 2002 Dec;110(12):1769–71.
27. Frenkel B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C, Khalid O, et al. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *Journal of Cellular Physiology*. 2010 Aug;224(2):305–10.
28. Whittier X, Saag KG. Glucocorticoid-induced Osteoporosis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* [Internet]. 2016 Feb;42(1):177–89. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26611558>
29. Cornish J, Callon KE, Bava U, Lin C, Naot D, Hill BL, et al. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *The Journal of endocrinology* [Internet]. 2002 Nov [cited 2017 Feb 19];175(2):405–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429038>
 30. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, et al. Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism. *Cell*. 2010 Jul 23;142(2):296–308.
 31. Tu P, Duan P, Zhang R-S, Xu D-B, Wang Y, Wu H-P, et al. Polymorphisms in genes in the RANKL/RANK/OPG pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in post-menopausal women. *Osteoporosis International*. 2015 Jan 20;26(1):179–85.
 32. McGrath EE. OPG/RANKL/RANK pathway as a therapeutic target in cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2011 Sep;6(9):1468–73.
 33. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337–42.
 34. Gordon MD, Nusse R. Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Aug 11;281(32):22429–33.
 35. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and T. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*. 2001 Feb 14;285(6):785–95.
 36. Guía de Práctica Clínica sobre Osteoporosis y Prevención de Fracturas por Fragilidad. In: *GGuías de práctica clínica en el SNS 2010*. 2010.
 37. Organization WH. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO technical report series ; 843. 1994;(Geneva : World Health Organization):1–129.
 38. Hans DB, Shepherd JA, Schwartz EN, Reid DM, Blake GM, Fordham JN, et al. Peripheral Dual-Energy X-ray Absorptiometry in the Management of Osteoporosis: The 2007 ISCD Official Positions. *Journal of Clinical Densitometry*. 2008 Jan;11(1):188–206.
 39. Muñoz-Torres M, Higuera López-Frías M de la, Fernández García D. Avances en el conocimiento de la biología del osteoclasto: el sistema osteoprotegerina-ligando del RANK. *Medicina Clínica*. 2004 Jan;122(2):75–7.
 40. Rochira V, Kara E, Carani C. The Endocrine Role of Estrogens on Human Male Skeleton. *International Journal of Endocrinology*. 2015;2015:1–15.

41. Boroňová I, Bernasovská J, Mačeková S, Petrejčíková E, Tomková Z et al. Bone Health and Osteoporosis. Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Office of the Surgeon General (US); 2004.
42. Wright NC, Looker AC, Saag KG, Curtis JR, Delzell ES, Randall S, et al. The Recent Prevalence of Osteoporosis and Low Bone Mass in the United States Based on Bone Mineral Density at the Femoral Neck or Lumbar Spine. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2014 Nov;29(11):2520–6.
43. Díaz Curiel M, García JJ, Carrasco JL, Honorato J, Pérez Cano R, Rapado A, et al. Prevalence of osteoporosis assessed by densitometry in the Spanish female population. *Medicina Clínica*. 2001;116(3):86–8.
44. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: Medical management, epidemiology and economic burden: A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Archives of Osteoporosis*. 2013;8(1–2).
45. Herrera A, Martínez AA, Ferrandez L, Gil E, Moreno A. Epidemiology of osteoporotic hip fractures in Spain. *International orthopaedics*. 2006 Feb;30(1):11–4.
46. Serra JA, Garrido G, Vidán M, Maraňón E, Brañas F, Ortiz J. Epidemiología de la fractura de cadera en ancianos en España. *Anales de Medicina Interna*. 2002;19(8):9–19.
47. Pérez-López B, Carranco-Medina T, Martín-Gómez E, Ruano-Pérez R, Usategui-Martín R, Quesada-Moreno A, Pérez-Garrido L, Sánchez-González MD, Montilla-Morales C, Pino-Montes J, Carranco-Medina T, Martín-Gómez E, Ruano-Pérez R, Usategui-Martín R, Quesada-Mor P-MJ del. Evaluación del riesgo de fractura en pacientes postmenopáusicas. ¿Qué nos aporta el trabecular bone score (TBS)? *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2016;8(3):42–51.
48. European Prospective Osteoporosis Study (EPOS) Group, Felsenberg D, Silman AJ, Lunt M, Armbrrecht G, Ismail AA, et al. Incidence of Vertebral Fracture in Europe: Results From the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002 Apr 1;17(4):716–24.
49. Honkanen RJ, Honkanen K, Kröger H, Alhava E, Tuppurainen M, Saarikoski S. Risk Factors for Perimenopausal Distal Forearm Fracture. *Osteoporosis International*. 2000 Mar 1;11(3):265–70.
50. Pérez Edo L, Alonso Ruiz A, Roig Vilaseca D, García Vadillo A, Guañabens Gay N, Peris P et al. Actualización 2011 del consenso Sociedad Española de Reumatología de osteoporosis. *Reumatol Clin*. 2011;7:357–79.
51. Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delma PD, Reginster JY, Borgstrom F et al. European

- guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2008;19:399–428.
52. González J, Guañabens N, Gómez C, Del Río L, Muñoz M, Delgado M et al. Guías de práctica clínica en la osteoporosis posmenopáusica, glucocorticoidea y del varón. Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral. *Rev Clin Esp*. 2008;208(1):1–24.
 53. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL, Lips P, et al. Large-Scale Evidence for the Effect of the COL1A1 Sp1 Polymorphism on Osteoporosis Outcomes: The GENOMOS Study. Lewis C, editor. *PLoS Medicine*. 2006 Feb 21;3(4):e90.
 54. Smith DM, Nance WE, Kang KW, Christian JC, Johnston CC. Genetic Factors in Determining Bone Mass. *Journal of Clinical Investigation*. 1973 Nov 1;52(11):2800–8.
 55. Tolosa de Talamoni N. Osteoporosis y polimorfismos del gen del receptor de vitamina D. *Endocrinol Nutr*. 2007;54(2):96–101.
 56. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen T V., et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994 Jan 20;367(6460):284–7.
 57. Álvarez-Hernández D, Naves Díaz M, Gómez Alonso C, Cannata Andía JB. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms modulate the response of tissue-specific vitamin D. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*. 2007 Jan;16(1):20–7.
 58. Yoldemir T, Yavuz DG, Anik G, Verimli N, Erenus M. Vitamin D receptor gene polymorphisms in a group of postmenopausal Turkish women: association with bone mineral density. *Climacteric*. 2011 Jun 17;14(3):384–91.
 59. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clinica Chimica Acta*. 2006 Sep;371(1–2):1–12.
 60. Lisker R, López MA, Jasqui S, Ponce De León Rosales S, Correa-Rotter R, Sánchez S, et al. Association of vitamin D receptor polymorphisms with osteoporosis in mexican postmenopausal women. *Human biology*. 2003 Jun;75(3):399–403.
 61. Styrkarsdottir U, Halldorsson B V., Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. Multiple Genetic Loci for Bone Mineral Density and Fractures. *New England Journal of Medicine*. 2008 May 29;358(22):2355–65.
 62. Boroumand M, Ghaedi M, Mohammadtaghvaei N, Pourgholi L, Anvari MS, Davoodi G, et al. Association of estrogen receptor α gene polymorphism with the presence of coronary artery disease documented by coronary angiography. *Clinical Biochemistry*. 2009 Jun;42(9):835–9.
 63. Salmén T, Heikkinen A-M, Mahonen A, Kröger H, Komulainen M, Saarikoski S, et al. Early Postmenopausal Bone Loss Is Associated with PvuII Estrogen Receptor Gene

- Polymorphism in Finnish Women: Effect of Hormone Replacement Therapy. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010 Feb 18;15(2):315–21.
64. GENOMOS Website - History of GENOMOS [Internet]. Available from: <http://www.genomos.eu/?page=history>
 65. Khosla S, Riggs BL, Atkinson EJ, Oberg AL, Mavilia C, Del Monte F, et al. Relationship of Estrogen Receptor Genotypes to Bone Mineral Density and to Rates of Bone Loss in Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004 Apr;89(4):1808–16.
 66. Ioannidis JPA, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, et al. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA*. 2004 Nov 3;292(17):2105.
 67. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002 Apr 1;22(4):549–53.
 68. Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, Tanaka N, Kato R, Nakamura H, et al. Association between osteoprotegerin gene polymorphism and coronary artery disease in Japanese men. *Atherosclerosis*. 2006 Jul;187(1):215–7.
 69. Luo Y, Hu Z, Hao J, Jiang W, Shen J, Zhao J. Significant Associations Between the A163G and G1181C Polymorphisms of the Osteoprotegerin Gene and Risk of Osteoporosis, Especially in Postmenopausal Women: A Meta-Analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2014 Mar;18(3):211–9.
 70. Piedra M, García-Unzueta MT, Berja A, Paule B, Lavín BA, Valero C, et al. Single nucleotide polymorphisms of the OPG/RANKL system genes in primary hyperparathyroidism and their relationship with bone mineral density.
 71. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the Osteoprotegerin Gene Are Associated With Osteoporotic Fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002 Jul 1;17(7):1245–55.
 72. Dong S-S, Liu X-G, Chen Y, Guo Y, Wang L, Zhao J, et al. Association Analyses of RANKL/RANK/OPG Gene Polymorphisms with Femoral Neck Compression Strength Index Variation in Caucasians. *Calcified Tissue International*. 2009 Aug 21;85(2):104–12.
 73. Wang Z, Yang Y, He M, Wang R, Ma J, Zhang Y, et al. Association between interleukin-6 gene polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2013 Dec;17(12):898–909.
 74. Qi L, Zhang C, van Dam RM, Hu FB. Interleukin-6 Genetic Variability and Adiposity: Associations in Two Prospective Cohorts and Systematic Review in 26,944 Individuals.

- The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2007 Sep;92(9):3618–25.
75. Ni Y, Li H, Zhang Y, Zhang H, Pan Y, Ma J, et al. Association of IL-6 G-174C polymorphism with bone mineral density. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2014 Mar 13;32(2):167–73.
 76. Inanir A, Özorán K, Tutkak H, Mermerci B. The Effects of Calcitriol Therapy on Serum Interleukin-1, Interleukin-6 and Tumour Necrosis Factor- α Concentrations in Postmenopausal Patients with Osteoporosis. *Journal of International Medical Research*. 2004 Nov;32(6):570–82.
 77. Vozarova B, Fernández-Real J-M, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, et al. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Human genetics*. 2003 Apr;112(4):409–13.
 78. Berthier M-T, Paradis A-M, Tchernof A, Bergeron J, Prud'homme D, Després J-P, et al. The interleukin 6 -174G/C Polymorphism is associated with indices of obesity in men. *Journal of Human Genetics*. 2003 Jan 1;48(1):14–9.
 79. Poitou C, Lacorte J-M, Coupaye M, Bertrais S, Bedel J-F, Lafon N, et al. Relationship between Single Nucleotide Polymorphisms in Leptin, IL6 and Adiponectin Genes and their Circulating Product in Morbidly Obese Subjects before and after Gastric Banding Surgery. *Obesity Surgery*. 2005 Jan 1;15(1):11–23.
 80. E. Goyenechea, M. D. Parra JAMH. Role of IL-6 and its -174G>C polymorphism in weight management and in the metabolic comorbidities associated with obesity. *An Sist Sanit Navar*. 2005;28(3):357–66.
 81. Fernández-Real J-M, Broch M, Vendrell Cristóbal Richart J, Ricart W, Ricart W. Interleukin-6 Gene Polymorphism and Lipid Abnormalities in Healthy Subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000 Mar;85(3):1334–9.
 82. Jahromi MM, Millward BA, Demaine AG. A Polymorphism in the Promoter Region of the Gene for Interleukin-6 Is Associated with Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2000 Oct;20(10):885–8.
 83. Ferrari SL, Garnerio P, Emond S, Montgomery H, Humphries SE, Greenspan SL. A functional polymorphic variant in the interleukin-6 gene promoter associated with low bone resorption in postmenopausal women. *Arthritis & Rheumatism*. 2001 Jan;44(1):196–201.
 84. Kubaszek A, Pihlajamäki J, Komarovski V, Lindi V, Lindström J, Eriksson J, et al. Promoter polymorphisms of the TNF-alpha (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes*. 2003 Jul;52(7):1872–6.

85. McKenzie JA, Weiss EP, Ghiu IA, Kulaputana O, Phares DA, Ferrell RE, et al. Influence of the interleukin-6 -174 G/C gene polymorphism on exercise training-induced changes in glucose tolerance indexes. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2004 Oct 1;97(4):1338–42.
86. Wernstedt I, Eriksson A-L, Berndtsson A, Hoffstedt J, Skrtic S, Hedner T, et al. A common polymorphism in the interleukin-6 gene promoter is associated with overweight. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2004 Oct 10;28(10):1272–9.
87. Möhlig M, Boeing H, Spranger J, Osterhoff M, Kroke A, Fisher E, et al. Body Mass Index and C-174G Interleukin-6 Promoter Polymorphism Interact in Predicting Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004 Apr;89(4):1885–90.
88. Gillespie KM, Nolsøe R, Betin VM, Kristiansen OP, Bingley PJ, Mandrup-Poulsen T, et al. Is puberty an accelerator of type 1 diabetes in IL6-174CC females? *Diabetes*. 2005 Apr 1;54(4):1245–8.
89. Hamid YH, Rose CS, Urhammer SA, Glümer C, Nolsøe R, Kristiansen OP, et al. Variations of the interleukin-6 promoter are associated with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. *Diabetologia*. 2005 Feb 11;48(2):251–60.
90. Illig T, Bongardt F, Schöpfer-Wendels A, Huth C, Heid I, Rathmann W, et al. Genetics of Type 2 Diabetes: Impact of Interleukin-6 Gene Variants. *Das Gesundheitswesen*. 2005 Aug 22;67(S 01):122–6.
91. Johnell D, MBSPD-MLSH. An Assessment Tool for Predicting Fracture Risk in Postmenopausal Women. *Osteoporosis International*. 2001;12(7):519–28.
92. Naranjo A, Ojeda-Bruno S, Francisco-Hernández F, Erausquin C, Rúa-Figueroa I, Rodríguez-Lozano C. Aplicación de las guías de prevención secundaria de fractura osteoporótica y del índice FRAX en una cohorte de pacientes con fractura por fragilidad. *Medicina Clínica*. 2011 Mar 19;136(7):290–2.
93. Schwartz A V., Vittinghoff E, Bauer DC, Hillier TA, Strotmeyer ES, Ensrud KE, et al. Association of BMD and FRAX Score With Risk of Fracture in Older Adults With Type 2 Diabetes. *JAMA*. 2011 Jun 1;305(21):2184.
94. NOF. *Clinian's guide to prevention and treatment of osteoporosis*. Washington; 2014.
95. Hippisley-Cox J, Coupland C. Predicting risk of osteoporotic fracture in men and women in England and Wales: prospective derivation and validation of QFractureScores. *BMJ* (Clinical research ed). 2009 Nov 19;339:b4229.
96. Rozas P, Reyes R, García-Martín A, Muñoz M. Utilidad de las escalas de evaluación del riesgo de fractura en el paciente con diabetes tipo 2. *Avances en Diabetología*.

- 2011;27(3):95–9.
97. Dennis L K, Eugene B, Anthony S F, Stephen L H, Dan L L, J LJ et al. Osteoporosis. In: Hill MG, editor. Harrison: Medicina Interna. 18th ed. 2012.
 98. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia*. 2005;48(7):1292–9.
 99. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporosis International*. 2011 Feb 24;22(2):391–420.
 100. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *The Clinical biochemist Reviews*. 2005 Nov;26(4):97–122.
 101. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, Griesmacher A, Morris HA, Trenti T, et al. International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Position on bone marker standards in osteoporosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2011 Jan 1;49(8):1271–4.
 102. Iglesias P, Arrieta F, Piñera M, Botella-Carretero JJ, Balsa JA, Zamarrón I, et al. Serum concentrations of osteocalcin, procollagen type 1 N-terminal propeptide and beta-CrossLaps in obese subjects with varying degrees of glucose tolerance. *Clinical Endocrinology*. 2011;75(2):184–8.
 103. Dorta Ramos, T; Navarro García, R; Ruiz Caballero, JA; Jiménez Díaz, JF; Brito Ojeda E. Marcadores bioquímicos del Remodelado Oseo. Aplicación clínica. In: XXIII JORNADAS CANARIAS DE TRAUMATOLOGÍA Y CIRUGÍA ORTOPÉDICA. 2009. p. 122–6.
 104. Okabe R, Inaba M, Nakatsuka K, Miki T, Naka H, Moriguchi A, et al. Significance of serum CrossLaps as a predictor of changes in bone mineral density during estrogen replacement therapy; comparison with serum carboxyterminal telopeptide of type I collagen and urinary deoxypyridinoline. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2004 Mar 1;22(2):127–31.
 105. Ivaska KK, Gerdhem P, Åkesson K, Garnero P, Obrant KJ. Effect of Fracture on Bone Turnover Markers: A Longitudinal Study Comparing Marker Levels Before and After Injury in 113 Elderly Women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007 May 7;22(8):1155–64.
 106. Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, Dobnig H. Osteoporosis in Patients With Diabetes Mellitus. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007 May 14;22(9):1317–28.
 107. Roy B. Biomolecular basis of the role of diabetes mellitus in osteoporosis and bone

- fractures. *World Journal of Diabetes*. 2013 Aug 15;4(4):101.
108. Wongdee K, Charoenphandhu N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. *World journal of diabetes*. 2011;2(3):41–8.
109. Roy B, Curtis ME, Fears LS, Nahashon SN, Fentress HM. Molecular Mechanisms of Obesity-Induced Osteoporosis and Muscle Atrophy. *Frontiers in Physiology*. 2016 Sep 29;7:439.
110. Wang W, Zhang X, Zheng J, Yang J. High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2010 May 1;338(1–2):115–22.
111. Jang WG, Kim EJ, Bae I-H, Lee K-N, Kim YD, Kim D-K, et al. Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2. *Bone*. 2011 Apr 1;48(4):885–93.
112. Kawai M, Rosen CJ. PPAR γ : a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. *Nature reviews Endocrinology*. 2010 Nov;6(11):629–36.
113. Debiais F. Thiazolidinediones: Antidiabetic agents with effects on bone. *Joint Bone Spine*. 2009 May;76(3):221–3.
114. Sishi B, Loos B, Ellis B, Smith W, du Toit EF, Engelbrecht A-M. Diet-induced obesity alters signalling pathways and induces atrophy and apoptosis in skeletal muscle in a prediabetic rat model. *Experimental Physiology*. 2011 Feb 1;96(2):179–93.
115. Elliott B, Renshaw D, Getting S, Mackenzie R. The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis. *Acta Physiologica*. 2012 Jul;205(3):324–40.
116. Sindhu S, Thomas R, Shihab P, Sriraman D, Behbehani K, Ahmad R. Obesity Is a Positive Modulator of IL-6R and IL-6 Expression in the Subcutaneous Adipose Tissue: Significance for Metabolic Inflammation. Stover CM, editor. *PLOS ONE*. 2015 Jul 22;10(7):e0133494.
117. Wisse BE. The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004 Nov 1;15(11):2792–800.
118. Mastrandrea LD, Wactawski-Wende J, Donahue RP, Hovey KM, Clark A, Quattrin T. Young women with type 1 diabetes have lower bone mineral density that persists over time. *Diabetes care*. 2008 Sep;31(9):1729–35.
119. Pérez-Castrillón J-L, De Luis D, Martín-Escudero JC, Asensio T, del Amo R, Izaola O. Non-insulin-dependent diabetes, bone mineral density, and cardiovascular risk factors. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2004 Nov;18(6):317–21.
120. Sosa M, Saavedra P, Jódar E, Lozano-Tonkin C, Quesada JM, Torrijos A, et al. Bone

- mineral density and risk of fractures in aging, obese post-menopausal women with type 2 diabetes. The GIUMO Study. *Aging clinical and experimental research*. 2009 Feb;21(1):27–32.
121. Räkel A, Sheehy O, Rahme E, LeLorier J. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism*. 2008 Jun;34(3):193–205.
 122. Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic Review of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Fracture. *American Journal of Epidemiology*. 2007 Jun 21;166(5):495–505.
 123. De Liefde II, Van Der Klift AM, De Laet ACEDH, Van Daele PLA, Hofman AA, Pols AHAP. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study.
 124. Starup-Linde J, Eriksen SA, Lykkeboe S, Handberg A, Vestergaard P. Biochemical markers of bone turnover in diabetes patients—a meta-analysis, and a methodological study on the effects of glucose on bone markers. *Osteoporosis International*. 2014 Jun 28;25(6):1697–708.
 125. Starup-Linde J, Lykkeboe S, Gregersen S, Hauge EM, Langdahl BL, Handberg A, et al. Differences in biochemical bone markers by diabetes type and the impact of glucose. *Bone*. 2016 Feb;83:149–55.
 126. Hygum K, Starup-Linde J, Harsløf T, Vestergaard P, Langdahl BL. Mechanisms in endocrinology: Diabetes mellitus, a state of low bone turnover – a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Endocrinology*. 2017 Mar 3;176(3):R137–57.
 127. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and T of HBC in A (Adult TPI. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002 Dec 17;106(25):3143–421.
 128. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015 Sep 30;526(7571):68–74.
 129. Kant Anil, Mishra G. P. SB and S. High throughput detection of PCR products and SNP for molecular breeding. In: *Molecular Plant breeding; Principles and Applications*. LLC S press, editor. 2008. 1-77 p.
 130. Pencina MJ, D’Agostino RB, D’Agostino RB, Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: From area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Statistics in Medicine*. 2008 Jan 30;27(2):157–72.
 131. Coduras A, Del Llano J, Caicoya M. La diabetes tipo 2 en España. *Estudio Crítico De Situación*. Fundación Gaspar Casal, editor. 2012 p. 98.

132. Sociedad Española de Salud Pública y Administración Sanitaria. M, Antoñanzas F, Tafalla M, Sanz P. Gaceta sanitaria. Vol. 16, Gaceta Sanitaria. Ediciones Doyma; 2002. 511-520 p.
133. Cifras España D. La salud y el sistema sanitario en 100 tablas. 2016; Available from: https://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/SaludSistemaSanitario_100_Tablas1.pdf
134. Zubizarreta Peinado K, Rodríguez González N, Castilla Ramírez AB, Hevia Costa M, Becerra Zayas N. Relation between anthropometric characteristics and its repercussion in Diabetes Type-2. *Rev Ciencias Médicas*. 2012;16(2):3–19.
135. Caballero Corredor J. Análisis de la situación de los diabéticos tipo 2 en Cieza. Estudio DIABET CIEZA 2010. *SEMERGEN - Medicina de Familia*. 2012 Jan;38(1):9–15.
136. Tatsumi Y, Ohkubo T. Hypertension with diabetes mellitus: significance from an epidemiological perspective for Japanese. *Hypertension Research*. 2017 Jul 13;
137. Chillarón JJ, Sales MP, Flores Le-Roux JA, Castells I, Benaiges D, Sagarra E, et al. Dislipidemia aterogénica en pacientes con diabetes mellitus tipo 1. *Medicina Clínica*. 2013 Dec;141(11):465–70.
138. Bertoni AG, Hundley WG, Massing MW, Bonds DE, Burke GL, Goff DC. Heart failure prevalence, incidence, and mortality in the elderly with diabetes. *Diabetes care*. 2004 Mar;27(3):699–703.
139. Friedman E, Friedman A, Eggers P. End-stage renal disease in diabetic persons: Is the pandemic subsiding? *Kidney International*. 2006;70:51–4.
140. Vila L, Viguera J, Alemán R. Retinopatía diabética y ceguera en España. *Epidemiología y prevención*. *Endocrinología y Nutrición*. 2008 Dec;55(10):459–75.
141. Cabezas-Cerrato J. The prevalence of clinical diabetic polyneuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. *Neuropathy Spanish Study Group of the Spanish Diabetes Society (SDS)*. *Diabetologia*. 1998 Nov;41(11):1263–9.
142. Joshi A, Varthakavi P, Chadha M, Bhagwat N. A Study of Bone Mineral Density and Its Determinants in Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal of Osteoporosis*. 2013;2013:1–8.
143. Eller-Vainicher C, Zhukouskaya V V., Tolkachev Y V., Koritko SS, Cairoli E, Grossi E, et al. Low Bone Mineral Density and Its Predictors in Type 1 Diabetic Patients Evaluated by the Classic Statistics and Artificial Neural Network Analysis. *Diabetes Care*. 2011 Oct 1;34(10):2186–91.
144. López-Ibarra P-J, Pastor MMC, Escobar-Jiménez F, Pardo MDS, González AG, Luna JDD, et al. Bone mineral density at time of clinical diagnosis of adult-onset type 1 Diabetes mellitus. *Endocrine Practice*. 2001 Oct;7(5):346–51.
145. Mosso C, Hodgson MI, Ortiz T, Reyes ML. Bone mineral density in young Chilean

- patients with type 1 diabetes mellitus. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2016 Jan 1;29(6):731–6.
146. Strotmeyer E, Cauley J, Orchard T, Steenkiste A, Dorman J. Middle-Aged Premenopausal Women With Type 1 Diabetes Have Lower Bone Mineral Density and Calcaneal Quantitative Ultrasound Than Nondiabetic Women. *Diabetes Care*. 2006;29:306–11.
 147. Abdulameer SA, Syed Sulaiman SA, Hassali MAA, Subramaniam K, Sahib MN. Osteoporosis and type 2 diabetes mellitus: What do we know, and what we can do? Patient Preference and Adherence. 2012;6:435–48.
 148. Leidig-Bruckner G, Grobholz S, Bruckner T, Scheidt-Nave C, Nawroth P, Schneider JG. Prevalence and determinants of osteoporosis in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *BMC endocrine disorders*. 2014 Apr 11;14:33.
 149. Ma L, Oei L, Jiang L, Estrada K, Chen H, Wang Z, et al. Association between bone mineral density and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *European Journal of Epidemiology*. 2012 May 27;27(5):319–32.
 150. Dhaliwal R, Cibula D, Ghosh C, Weinstock RS, Moses AM. Bone quality assessment in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporosis International*. 2014 Jul 10;25(7):1969–73.
 151. Leslie WD, Aubry-Rozier B, Lamy O, Hans D, Manitoba Bone Density Program. TBS (Trabecular Bone Score) and Diabetes-Related Fracture Risk. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013 Feb;98(2):602–9.
 152. Hamilton EJ, Rakic V, Davis WA, Paul Chubb SA, Kamber N, Prince RL, et al. A five-year prospective study of bone mineral density in men and women with diabetes: The Fremantle Diabetes Study. *Acta Diabetologica*. 2012 Apr 5;49(2):153–8.
 153. Compston J, Bowring C, Cooper A, Cooper C, Davies C, Francis R, et al. Diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women and older men in the UK: National Osteoporosis Guideline Group (NOGG) update 2013. *Maturitas*. 2013 Aug;75(4):392–6.
 154. Dischereit G, Lange U. Osteoporose – inflammatorische Effekte auf den Knochenstoffwechsel und das Frakturrisiko. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2014 Apr 23;152(2):170–6.
 155. Tell-Lebanon O, Rotman-Pikielny P. Osteoporosis and diabetes - In which way are they related? *Harefuah*. 2016 Nov;155(11):697–701.
 156. Oei L, Rivadeneira F, Zillikens MC, Oei EHG. Diabetes, Diabetic Complications, and Fracture Risk. *Current Osteoporosis Reports*. 2015 Apr 4;13(2):106–15.
 157. Botella Martínez S, Varo Cenarruzabeitia N, Escalada San Martín J, Calleja Canelas A. La paradoja diabética: densidad mineral ósea y fractura en la diabetes tipo 2.

- Endocrinología y Nutrición. 2016 Nov;63(9):495–501.
158. Bonaccorsi G, Fila E, Messina C, Maietti E, Ulivieri FM, Caudarella R, et al. Comparison of trabecular bone score and hip structural analysis with FRAX® in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Aging Clinical and Experimental Research*. 2016 Oct 8;
 159. Poiana C, Capatina C. Fracture Risk Assessment in Patients With Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Densitometry*. 2017 Jul 14;
 160. Olmos JM, Hernández JL, García-Velasco P, Martínez J, Llorca J, González-Macías J. Serum 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, calcium intake, and bone mineral density in Spanish adults. *Osteoporosis International*. 2016 Jan 2;27(1):105–13.
 161. González-Parra E, Egido J. Vitamina D, síndrome metabólico y diabetes mellitus. *Medicina Clínica*. 2014 Jun;142(11):493–6.
 162. Mattila C, Knekt P, Männistö S, Rissanen H, Laaksonen MA, Montonen J, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and subsequent risk of type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2007 Oct 1;30(10):2569–70.
 163. Pérez A, Mediavilla JJ, Miñambres I, González-Segura D. Glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus in Spain. *Rev Clin Esp*. 2014 Nov;214(8):429–36.
 164. Poli A, Bruschi F, Cesana B, Rossi M, Paoletti R, Crosignani PG. Plasma low-density lipoprotein cholesterol and bone mass densitometry in postmenopausal women. *Obstet Gynecol*. 2003 Nov;102(5 Pt 1):922–6.
 165. Orozco P. Atherogenic lipid profile and elevated lipoprotein (a) are associated with lower bone mineral density in early postmenopausal overweight women. *European journal of epidemiology*. 2004;19(12):1105–12.
 166. Solomon DH, Avorn J, Canning CF, Wang PS. Lipid levels and bone mineral density. *The American Journal of Medicine*. 2005 Dec;118(12):1414.e1-1414.e5.
 167. Hernández JL, Olmos JM, Ramos C, Martínez J, de Juan J, Valero C, et al. Serum lipids and bone metabolism in Spanish men: the Camargo cohort study. *Endocrine journal*. 2010;57(1):51–60.
 168. Yamaguchi T, Sugimoto T, Yano S, Yamauchi M, Sowa H, Chen Q, et al. Plasma lipids and osteoporosis in postmenopausal women. *Endocrine journal*. 2002 Apr;49(2):211–7.
 169. Hussein RM. Biochemical relationships between bone turnover markers and blood glucose in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2017 Mar 6;
 170. Abd El Dayem SM, El-Shehaby AM, Abd El Gafar A, Fawzy A, Salama H. Bone density, body composition, and markers of bone remodeling in type 1 diabetic patients. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2011 Sep 8;71(5):387–

- 93.
171. Laurent MR, Cook MJ, Gielen E, Ward KA, Antonio L, Adams JE, et al. Lower bone turnover and relative bone deficits in men with metabolic syndrome: a matter of insulin sensitivity? The European Male Ageing Study. *Osteoporosis International*. 2016 Nov 7;27(11):3227–37.
172. Saito M, Kida Y, Kato S, Marumo K. Diabetes, Collagen, and Bone Quality. *Current Osteoporosis Reports*. 2014 Jun 13;12(2):181–8.
173. Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between Serum Osteocalcin and Markers of Metabolic Phenotype. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009 Mar;94(3):827–32.
174. Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren Ö, Karlsson MK, Tivesten Å, Smith U, et al. Plasma Osteocalcin Is Inversely Related to Fat Mass and Plasma Glucose in Elderly Swedish Men. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2009 May;24(5):785–91.
175. Fernández-Real JM, Izquierdo M, Ortega F, Gorostiaga E, Gómez-Ambrosi J, Moreno-Navarrete JM, et al. The Relationship of Serum Osteocalcin Concentration to Insulin Secretion, Sensitivity, and Disposal with Hypocaloric Diet and Resistance Training. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009 Jan;94(1):237–45.
176. Pooruk P, Kittimanon N, Janthorn P, Bunyaratavej N. The impacts of type 2 diabetes mellitus on bone markers in the elderly Thai women. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2009 Sep;92 Suppl5:S45-8.
177. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Kurioka S, Yano S, et al. Serum Osteocalcin Level Is Associated with Glucose Metabolism and Atherosclerosis Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009 Jan;94(1):45–9.
178. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 2007 Aug 10;130(3):456–69.
179. Malenica M, Šilar M, Dujčić T, Bego T, Semiz S, Škrbo S, et al. Importance of inflammatory markers and IL-6 for diagnosis and follow up of patients with type 2 diabetes mellitus. *Medicinski glasnik : official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina*. 2017 Aug 1;14(2):169–75.
180. Mohieldein A, Alzohairy M, Hasan M, Khan AA. Inflammatory Markers and Haptoglobin Polymorphism in Saudi with Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Global Journal of Health Science*. 2012 Nov 11;5(1):135–42.
181. Tiwari S, Pratyush DD, Gupta SK, Singh SK. Vitamin D deficiency is associated with inflammatory cytokine concentrations in patients with diabetic foot infection. *British Journal of Nutrition*. 2014 Dec 21;112(12):1938–43.

182. Mackawy AMH, Badawi MEH. Association of vitamin D and vitamin D receptor gene polymorphisms with chronic inflammation, insulin resistance and metabolic syndrome components in type 2 diabetic Egyptian patients. *Meta Gene*. 2014 Dec;2:540–56.
183. Ji G-R, Yao M, Sun C-Y, Li Z-H, Han Z. BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and risk of fracture in Caucasians: A meta-analysis. *Bone*. 2010 Sep;47(3):681–6.
184. Zhu B, Zhao H-L, Ou C, Huang L-S, Li P-Z, Lao M. Association of vitamin D receptor BsmI gene polymorphism with the risk of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2014 Dec 19;34(6):458–62.
185. Qin W-H, Wang H-X, Qiu J-L, Huang X-B, Huang Y, Wu N-R, et al. A meta-analysis of association of vitamin D receptor BsmI gene polymorphism with the risk of type 1 diabetes mellitus. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2014 Oct 25;34(5):372–7.
186. Malecki M, Frey J, Moczulski D, Klupa T, Kozek E, Sieradzki J. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Association with Type 2 Diabetes Mellitus in a Polish Population. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2004 Jan 9;111(8):505–9.
187. Martí G, Audí L, Esteban C, Oyarzábal M, Chueca M, Gussinyé M, et al. [Association of vitamin D receptor gene polymorphism with type 1 diabetes mellitus in two Spanish populations]. *Medicina clinica*. 2004 Sep 11;123(8):286–90.
188. Wang Q, Xi B, Reilly KH, Liu M, Fu M. Quantitative assessment of the associations between four polymorphisms (FokI, ApaI, BsmI, TaqI) of vitamin D receptor gene and risk of diabetes mellitus. *Molecular Biology Reports*. 2012 Oct 20;39(10):9405–14.
189. Bustamante M, Nogués X, Enjuanes A, Elosua R, García-Giralt N, Pérez-Edo L, et al. COL1A1, ESR1, VDR and TGFB1 polymorphisms and haplotypes in relation to BMD in Spanish postmenopausal women. *Osteoporosis International*. 2007 Jan 10;18(2):235–43.
190. Martínez Villanueva M. Enfermedad ósea en el trasplante renal: marcadores bioquímicos de remodelado óseo y genotipado de polimorfismos [Internet]. Universidad de Murcia; 2012. Available from: <https://digitum.um.es/xmlui/handle/10201/27995>
191. Mohammadi F, Pourahmadi M, Mosalanejad M, Jamali H, Ghobadifar MA, Erfanian S. Association of Estrogen Receptor α Genes PvuII and XbaI Polymorphisms with Type 2 Diabetes Mellitus in the Inpatient Population of a Hospital in Southern Iran. *Diabetes & Metabolism Journal*. 2013 Aug;37(4):270.
192. Dahlman I, Vaxillaire M, Nilsson M, Lecoœur C, Gu HF, Cavalcanti-Proença C, et al. Estrogen receptor alpha gene variants associate with type 2 diabetes and fasting plasma

- glucose. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2008 Nov;18(11):967–75.
193. Shekufeh Golkhu, Mahboobe Ghaed, Narges Mohammad Taghvaie, Mohammad Ali Boroumand, Gholamreza Davoodi, Alireza Aminzadegan, Leila Poorgoli, Mahmood Sheikh Fathollahiollahi MS. Genetic Polymorphisms of Estrogen Receptors in Iranian Women with Diabetes and Coronary Artery Disease. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2015 May 18;34(3):208–12.
194. Piedra León M, María. Estudio de la distribución de determinados polimorfismos de un solo nucleótido de los genes OPG, RANK, RANKL, GNAS1 y CLDN14 y su relación con la densidad mineral ósea y diversos marcadores de remodelación ósea en el hiperparatiroidismo primario [Internet]. Tesis Doctorales en Red (TDR). Universidad de Cantabria; 2012. Available from: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/1334?show=full>
195. Kim JG, Kim JH, Kim JY, Ku SY, Jee BC, Suh CS, et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause*. 2007 Sep;14(5):913–8.
196. Hsu Y-H, Niu T, Terwedow HA, Xu X, Feng Y, Li Z, et al. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Human Genetics*. 2006 Jan 26;118(5):568–77.
197. Thakkinstian A, D'Este C, Attia J. Haplotype analysis of VDR gene polymorphisms: a meta-analysis. *Osteoporosis International*. 2004 Sep 1;15(9):729–34.
198. Botella Martínez S. Utilidad de los marcadores de remodelado óseo en el diagnóstico y seguimiento de la osteoporosis. Universidad de Navarra; 2014.
199. Dastgheib SA, Gartland A, Tabei SMB, Omrani GR, Teare MD. A Candidate Gene Association Study of Bone Mineral Density in an Iranian Population. *Frontiers in Endocrinology*. 2016 Oct 27;7:141.
200. García-Unzueta M, Riancho J, Zarrabeitia M, Sañudo C, Berja A, Valero C, et al. Association of the 163A/G and 1181G/C Osteoprotegerin Polymorphism with Bone Mineral Density. *Hormone and Metabolic Research*. 2008 Mar;40(3):219–24.
201. Kusek J, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Mikołajczak P, Czerny B, Maciejewska M, et al. The influence of interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms on bone mineral density in postmenopausal women. *Ginekologia polska*. 2008 Jun;79(6):426–31.
202. Deveci D, Ozkan ZS, Yuce H. Is there any relation between IL-6 gene -174 G>C polymorphism and postmenopausal osteoporosis? *European Journal of Obstetrics &*

- Gynecology and Reproductive Biology. 2012 Sep;164(1):98–101.
203. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992 Aug 1;89(15):6665–9.
204. Feuz J, Wisser J, Heufelder A, Joba W, Zimmermann R, von Mandach U. Vitamin D receptor genotype BB is associated with higher serum osteocalcin in first pregnancy. *Journal of Perinatal Medicine*. 2009 Jan 1;37(5):491–5.
205. Laaksonen M, Kärkkäinen M, Outila T, Vanninen T, Ray C, Lamberg-Allardt C. Vitamin D receptor gene Bsm I-polymorphism in Finnish premenopausal and postmenopausal women: its association with bone mineral density, markers of bone turnover, and intestinal calcium absorption, with adjustment for lifestyle factors. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2002 Nov 1;20(6):383–90.
206. Xu H, Xiao W, Luo D, Liu Y, Zou L, Kuang H. Association analysis of genetic polymorphisms and potential interaction of the osteocalcin (BGP) and ER- α genes with body mass index (BMI) in premenopausal Chinese women. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2010 Apr 22;31(4):455–60.
207. Deng H-W, Li J, Li J-L, Dowd R, Davies KM, Johnson M, et al. Association of Estrogen Receptor- α Genotypes with Body Mass Index in Normal Healthy Postmenopausal Caucasian Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000 Aug;85(8):2748–51.
208. Okura T, Koda M, Ando F, Niino N, Ohta S, Shimokata H. Association of polymorphisms in the estrogen receptor α gene with body fat distribution. *International Journal of Obesity*. 2003 Sep;27(9):1020–7.
209. Goulart AC, Zee RYL, Rexrode KM. Estrogen receptor 1 gene polymorphisms and decreased risk of obesity in women. *Metabolism: clinical and experimental*. 2009 Jun;58(6):759–64.
210. Gallagher CJ, Langefeld CD, Gordon CJ, Campbell JK, Mychalecky JC, Bryer-Ash M, et al. Association of the Estrogen Receptor- α Gene With the Metabolic Syndrome and Its Component Traits in African-American Families. *Diabetes*. 2007 Aug;56(8):2135–41.
211. Mansur A de P, Nogueira CCM, Strunz CMC, Aldrighi JM, Ramires JAF. Genetic Polymorphisms of Estrogen Receptors in Patients with Premature Coronary Artery Disease. *Archives of Medical Research*. 2005 Sep;36(5):511–7.
212. Rauschemberger M, Polini N, Sola M, Bonacorsi S, Massheimer V. Estrogen Receptor: Polymorphisms of ESR1 and Biochemical Markers of Cardiovascular Risk. *Rev argent endocrinol metab*. 2012;49(2).

213. Välimäki V-V, Piippo K, Välimäki S, Löyttyniemi E, Kontula K, Välimäki MJ. The relation of the XbaI and PvuII polymorphisms of the estrogen receptor gene and the CAG repeat polymorphism of the androgen receptor gene to peak bone mass and bone turnover rate among young healthy men. *Osteoporosis International*. 2005 Dec 13;16(12):1633–40.
214. Mankoč Ramuš S, Kumše T, Globočnik Petrovič M, Petrovič D, Cilenšek I. SNP rs2073618 of the Osteoprotegerin Gene Is Associated with Diabetic Retinopathy in Slovenian Patients with Type 2 Diabetes. *BioMed Research International*. 2013;2013:1–6.
215. Biscetti F, Straface G, Giovannini S, Santoliquido A, Angelini F, Santoro L, et al. Association between TNFRSF11B gene polymorphisms and history of ischemic stroke in Italian diabetic patients. *Human Genetics*. 2013 Jan 11;132(1):49–55.
216. Nehring P, Mrozikiewicz-Rakowska B, Sobczyk-Kopciol A, Makowski A, Krasnodębski P, Płoski R, et al. Osteoprotegerin gene rs2073617 and rs3134069 polymorphisms in type 2 diabetes patients and sex-specific rs2073618 polymorphism as a risk factor for diabetic foot. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2013;123(4):176–82.
217. Boroňová I, Bernasovská J, Mačeková S, Petrejčíková E, Tomková Z, Klóc J, et al. TNFRSF11B gene polymorphisms, bone mineral density, and fractures in Slovak postmenopausal women. *Journal of Applied Genetics*. 2015 Feb 17;56(1):57–63.
218. Sheng X, Cai G, Gong X, Yao Z, Zhu Y. Common Variants in OPG Confer Risk to Bone Mineral Density Variation and Osteoporosis Fractures. *Scientific Reports*. 2017 Dec 11;7(1):1739.
219. Bonfá AC, Seguro LPC, Caparbo V, Bonfá E, Pereira RMR. RANKL and OPG gene polymorphisms: associations with vertebral fractures and bone mineral density in premenopausal systemic lupus erythematosus. *Osteoporosis International*. 2015 May 22;26(5):1563–71.
220. Yan J, JM G, PA M. Interleukin 6 promoter 174 G/C polymorphisms in acute ischemic stroke: G allele is protective but not associated with IL-6 levels or stroke outcome. *Journal of Neuroimmunology*. 2016 Apr 15;293:22–7.
221. Chakraborty B, Chowdhury D, Vishnoi G, Goswami B, Kishore J, Agarwal S. Interleukin-6 Gene -174 G/C Promoter Polymorphism Predicts Severity and Outcome in Acute Ischemic Stroke Patients from North India. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2013 Jul;22(5):683–9.
222. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Duboeuf F, Jeffery R, Woo P, et al. Association between a functional interleukin-6 gene polymorphism and peak bone mineral density and postmenopausal bone loss in women: the OFELY study. *Bone*. 2002 Jul;31(1):43–

- 50.
223. Ferrari SL, Ahn-Luong L, Garnero P, Humphries SE, Greenspan SL. Two Promoter Polymorphisms Regulating Interleukin-6 Gene Expression Are Associated with Circulating Levels of C-Reactive Protein and Markers of Bone Resorption in Postmenopausal Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003 Jan 1;88(1):255–9.

ANEXOS

Anexo I: Resolución del Comité Ético



Arrixaca
Hospital Universitario
"Virgen de la Arrixaca"
Ctra. Madrid - Cartagena • Tel. 968 36 95 00
30120 El Palmar (Murcia)

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 24/07/2017, acta 07/2017 ha evaluado la propuesta del investigador **Dr. José Antonio Noguera Velasco** referida al estudio:

Título: Diabetes Mellitus, osteoporosis y riesgo de fractura. Aportaciones de los polimorfismos y los biomarcadores de remodelado óseo y de inflamación

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

Lo que firmo en Murcia, a 24 de julio de 2017

Fdo:

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

Anexo II: Consentimiento informado

SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS CONSENTIMIENTO INFORMADO



Código del Estudio: " Estudio de polimorfismos y biomarcadores de remodelado óseo y de inflamación en la Diabetes Mellitus"

Yo (nombre y apellidos) _____

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

_____ (Nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

- Accedo a que las muestras de sangre o tejidos obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad o fármacos del estudio no previstos en el protocolo actual.

SI

NO

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Número Estimado de personas con diabetes en el mundo y por región en 2015 y 2040 (20-79 años) (7).	5
Figura 2: Vías que regulan el desarrollo de los (A) osteoblastos y (B) osteoclastos (15)	11
Figura 3: Ciclo de resorción y de formación de hueso (15)	12
Figura 4: Regulación del metabolismo fosfocálcico por la PTH y la vitamina D (24)	14
Figura 5: Sistema regulador OPG-RANKL-RANK. Factores pro-resortivos (a), factores anti-resortivos (b) (33).	18
Figura 6: Hueso normal (izquierda), hueso con osteoporosis (derecha).	20
Figura 7: Sitios polimórficos del gen VDR. Los rectángulos amarillos son los exones y los espacios entre ellos los intrones (55).	29
Figura 8: Localización de los polimorfismos PvuII y XbaI en el intrón 1 del gen ESR1.(64)	31
Figura 9: Polimorfismos en la región proximal del gen OPG. Los SNP 245 T/G (rs3134070) y 163 A/G (rs3102735) parecen estar en el mismo bloque haplotípico (promotor) pero en uno diferente del que contiene al SNP 1181 G/C (exón 1) (70).	32
Figura 10: FRAX®. Herramienta de Evaluación de Riesgo de Fractura	37
Figura 11: Determinación de la DMO a través de DEXA.	39
Figura 12: Efectos de la DM sobre el osteoblasto (107).	44
Figura 13: Esquema representativo de los mecanismos subyacentes a la DM y a la hiperglucemia que afectan al metabolismo y a la calidad ósea.(107).	46
Figura 14: Deterioro de la osteogénesis en la DM (14).	48
Figura 15: Efectos óseos de los tratamientos farmacológicos de la DM(14).	48
Figura 16: Diseño del estudio en pacientes con DM1 y DM2.	60
Figura 17: Extracción y purificación de ADN genómico.	77
Figura 18: Fundamento de la qPCR (129).	79
Figura 19: Curva de fluorescencia de la qPCR. La flecha indica el Cp, ciclo umbral a partir del cual la qPCR pasa a fase exponencial y comienza a aumentar de forma significativa la fluorescencia (129).	79
Figura 20: Termociclador LightCycler 2.0® (A), capilares de reacción (B).	81
Figura 21: Composición de la mezcla de reacción utilizada.	81
Figura 22: Programa utilizado con LightCycler 2.0®.	82
Figura 23: Interpretación de resultados de curvas melting.	83
Figura 24: Distribución de edad y años de evolución en DM1 y DM2.	90
Figura 25: Distribución en % de las variables clínicas con diferencias estadísticamente significativas p<0.05	92

Figura 26: Distribución de la DMO lumbar en función del tipo de obesidad en cada tipo de DM.	95
Figura 27: Representación gráfica de los diferentes valores de creatinina y urea en función del tipo de diabetes y del momento temporal.	99
Figura 28: Representación gráfica de los diferentes valores de colesterol, triglicéridos, cHDL y cLDL en función del tipo de diabetes y del momento temporal.	102
Figura 29: Representación gráfica de los diferentes valores de OC y P1NP en función del tipo de diabetes y del momento temporal.	103
Figura 30: Correlación lineal simple entre OC con diversas covariables.	104
Figura 31: Correlación lineal simple entre el β -CTX con el resto de MRO.	105
Figura 32: Curva ROC para OC, P1NP y β -CTX en el diagnóstico de patología ósea (osteopenia u osteoporosis) en toda la población al inicio del estudio.	105
Figura 33: Representación gráfica de los diferentes valores de IL-6 en función del tipo de diabetes y del momento temporal.	107
Figura 34: Correlación lineal simple entre la IL-6 con la OC, el IMC, la DMO en cadera y la vitamina D.	108
Figura 35: Representación gráfica de las diferentes frecuencias genotípicas del polimorfismo 174 G/C del gen de la IL-6 entre la población total y los diferentes grupos estudiados.	110
Figura 36: DMO en cadera en función de la distribución alélica del SNP 174 G/C de la IL-6 (rs1800795) en la DM1.	116
Figura 37: DMO lumbar en función de la distribución alélica del SNP BsmI (rs1544410) del gen del VDR en la DM2.	116
Figura 38: DMO lumbar en función de la distribución alélica del SNP ApaI (rs7975232) del gen del VDR en la DM2.	117
Figura 39: DMO lumbar en función de la distribución alélica del SNP TaqI (rs731236) del gen del VDR en la DM2.	117
Figura 40: Curva ROC de los cuatro modelos de regresión logística.	134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diversas prevalencias de personas afectadas mayores de 18 años en población española (8)	6
Tabla 2: Criterios para el diagnóstico de diabetes (2)	7
Tabla 3: Principales factores locales reguladores del remodelado óseo (23)	16
Tabla 4: Diagnóstico de osteoporosis según la OMS basado en la DMO y T-Score	21
Tabla 5: Causas de osteoporosis secundaria (41)	23
Tabla 6: Prevalencia de osteopenia y osteoporosis en columna lumbar y cuello femoral en la población femenina española por grupos de edad (43).	24
Tabla 7: Genes implicados en la osteoporosis (21)	28
Tabla 8: Principales efectos metabólicos atribuidos a los alelos del polimorfismo 174G/C del gen de la IL-6 (80).	34
Tabla 9: Marcadores bioquímicos del remodelado óseo (99)	41
Tabla 10: Temperatura melting de los diferentes alelos de los polimorfismos estudiados	83
Tabla 11: Edad y años de evolución de los pacientes	89
Tabla 12: Características clínicas de los dos grupos de población a estudio. Los datos se expresan como porcentaje.	91
Tabla 13: Valores de DMO por DEXA en los dos grupos de población a estudio expresados como T-score.	93
Tabla 14: Características de la población diabética dividida en dos grupos según el criterio densitométrico de osteopenia	94
Tabla 15: Valores de riesgo de fractura evaluados con el algoritmo FRAX® en los dos grupos de población a estudio expresados como %.	96
Tabla 16: Estudio del metabolismo fosfocálcico en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos	97
Tabla 17: Estudio de los parámetros de la función renal en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos.	98
Tabla 18: Estudio de los parámetros del metabolismo glucídico en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos	100
Tabla 19: Estudio de los parámetros hormonales en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos	100
Tabla 20: Estudio de los parámetros de metabolismo lipídico en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos.	101

Tabla 21: Estudio de los parámetros bioquímicos de remodelado óseo en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos	103
Tabla 22: Capacidad de los marcadores de remodela óseo para el diagnóstico de patología ósea en DM1 y DM2	106
Tabla 23: Puntos de corte con mayor sensibilidad y especificidad para detectar patología ósea en la población diabética	106
Tabla 24: Determinación de los valores de IL-6 en el momento basal, a los 6 meses y al año de comenzar el estudio, en ambos tipos de diabetes y comparación entre dichos grupos	107
Tabla 25: Prevalencia de los polimorfismos en la población total y en cada uno de los grupos estudiados	109
Tabla 26: Comparación de las frecuencias genóticas entre los diferentes grupos de estudio y la frecuencia genótica poblacional	111
Tabla 27: Comparación de las frecuencias alélicas entre los diferentes grupos de estudio y la frecuencia alélica poblacional.	112
Tabla 28: Prevalencia de polimorfismos en toda la población según fueran sanos o con patología ósea	113
Tabla 29: Polimorfismos en DM1 y asociación con la DMO	114
Tabla 30: Polimorfismos en DM2 y asociación con la DMO	115
Tabla 31: Comparación entre los distintos genotipos del BsmI del VDR y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de DM.	118
Tabla 32: Comparación entre los distintos genotipos del ApaI del VDR y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de DM.	119
Tabla 33: Comparación entre los distintos genotipos del TaqI del VDR y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de DM	120
Tabla 34 Comparación entre los distintos genotipos del FokI del VDR y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de diabetes	121
Tabla 35: Comparación entre los distintos genotipos del PvuII del ESR1 y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de diabetes	122
Tabla 36: Comparación entre los distintos genotipos del XbaII del ESR1 y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de diabetes	123
Tabla 37: Comparación entre los distintos genotipos del rs2073618 de la OPG y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de diabetes	124
Tabla 38: Comparación entre los distintos genotipos del rs1800795 del gen de la IL-6 y los diferentes marcadores bioquímicos en ambos tipos de diabetes	126
Tabla 39: Modelo de regresión logística univariado y multivariado para el diagnóstico de osteopenia con variables clínicas	128

Tabla 40: Modelo de regresión logística univariado y multivariado para el diagnóstico de osteopenia con variables clínicas y MRO	129
Tabla 41: Modelo de regresión logística univariado y multivariado para el diagnóstico de osteopenia con variables clínicas, OC e IL-6.	130
Tabla 42: Modelo de regresión logística univariado y multivariado para el diagnóstico de osteopenia con variables clínicas, OC, IL-6 y SNPs.	132
Tabla 43: Test de Hosmer-Lemeshow, estadístico c, diferencias de áreas e IDI de cada modelo propuesto	133