



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

Evaluación de la afectación ósea en pacientes con enfermedades raras

Sabina Herrera Fernández. Doctorando

Adolfo Díez Pérez. Director y tutor de tesis

2017

TESIS DOCTORAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Evaluación de la afectación ósea en pacientes con enfermedades raras

Doctorando: Sabina Herrera Fernández

Servicio de Medicina Interna, Hospital del Mar/Parc De Salut
Mar, IMIM. Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

Director y tutor: Adolfo Díez Pérez

Servicio de Medicina Interna, Hospital del Mar/Parc De Salut
Mar, IMIM. Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).



**Universitat Autònoma
de Barcelona**



Adolfo Díez Pérez,

Profesor Titular de Medicina de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona hace constar que el proyecto de tesis "Evaluación de la afectación ósea en pacientes con enfermedades raras" elaborado por la doctoranda D^a Sabina Herrera Fernández reúne los requisitos necesarios para ser defendida ante el oportuno tribunal calificador para aspirar al Grado de Doctor.

En Barcelona a 20 de Mayo de 2017

Fdo: Prof. Adolfo Díez Pérez

A aquellos que me dieron alas

“Sapere aude”

Índice

Agradecimientos	7
Listado de publicaciones	9
Abreviaturas	10
1. Enfermedad de Gaucher	12
1.1. Introducción, historia y epidemiología.....	12
1.2. Fisiopatología.....	13
1.3. Tipos de EG y manifestaciones clínicas.....	15
1.4 Diagnóstico de la enfermedad de Gaucher.....	17
2. Afectación ósea en la enfermedad de Gaucher	18
2.1 Patogenia de la afectación ósea.....	18
2.2 Manifestaciones clínicas óseas.....	20
2.3 Métodos de evaluación de afectación ósea.....	22
2.4 Tratamiento de la enfermedad de Gaucher.....	26
3. Afectación ósea en pacientes con enfermedad renal crónica	29
3.1 Enfermedad renal crónica y trasplante renal: definición, prevalencia, mortalidad.....	29
3.2. Enfermedad mineral ósea, hiperparatiroidismo secundario y osteoporosis asociado a la enfermedad renal crónica.....	30
3.3 Diagnóstico de la enfermedad mineral ósea y osteoporosis en la enfermedad renal crónica.....	35
3.4 Tratamiento de la enfermedad mineral ósea y osteoporosis en la enfermedad renal crónica.....	36
3.5 Enfermedad mineral ósea y osteoporosis asociado al trasplante renal.....	37

4. Microindentación	41
4.1 Medir la resistencia del hueso.....	41
4.2 Técnicas de indentación por punto de referencia.....	42
4.3 Estudios realizados con indentación cíclica.....	42
4.4 Estudios realizados con microindentación por impacto.....	43
5. Proyectos que constituyen la presente tesis	44
5.1. Assessment of Bone Health in Patients with Type 1 Gaucher Disease Using Impact Microindentation.....	44
5.2. Bone density, microarchitecture and material strength in chronic kidney disease patients at the time of kidney transplantation.....	49
6. Discusión	54
6.1. Evaluación ósea en los pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 usando microindentación de impacto.....	54
6.2. Densidad ósea, microarquitectura y fuerza ósea en pacientes con enfermedad renal crónica en el momento del trasplante.....	57
7. Conclusiones	60
Referencias bibliográficas	61
Anexo: publicaciones	72

Agradecimientos

¡Gracias!

A Adolfo, por su infinita paciencia. Por haberme guiado hasta aquí. Por haber creído en mí desde el primer día, y por seguir haciéndolo, aunque me haya ido. Por ser hoy y siempre una referencia de la persona, científico y médico que un día me gustaría ser.

A mis padres, por su amor ciego, por haberme apoyado en cada salto, a menudo al vacío... Por seguir haciéndolo. A mi madre, por haberme enseñado a través de su ejemplo la importancia de ser humilde, humana e incansablemente trabajadora. A mi padre por haberme quitado el miedo a salir, a dejar atrás, a volar.

A mis abuelos, que sé que hoy desde arriba y desde abajo se sienten orgullosos.

A mis hermanos, que no han tenido las mismas oportunidades.

A Luisa, por haber sido madre y amiga, por haberme empujado a buscar algo mejor. A Roberto, por sus enseñanzas, por quererme a su lado, y pelear por ello, no siempre en su beneficio. A Hernando por haberme dado la oportunidad de publicar mi primer artículo como primera autora, por venir los domingos a enseñarme, y por buscarme una oportunidad, por defender la meritocracia frente a la inercia.

Al Dr. Nelson, porque su carta de recomendación me ha abierto muchas puertas. Al Dr. Husain, por haberme abierto la suya, por la oportunidad de aprender en un centro de excelencia.

A Marisa, un cuarto de esta tesis es suya. Por su generosa paciencia, y su perenne sonrisa, por perseguir cariñosa y telefónicamente los pacientes. Tere, no en esta tesis, pero sí en tantas otras empresas y proyectos. Gracias por haber sido dos madres adoptivas.

A MariaJosé, a Julio Pascual, al Dr. Nogués por haberme dado la oportunidad de trabajar en este proyecto, de aprender de vosotros. A Dani Prieto-Alhambra por iluminar los números, por tender siempre una mano, una sonrisa virtual.

A Dani por ser el mejor coR, por su amistad incondicional, por dejarme su furgoneta, depositarme la tesis, cuidarme al gato, custodiarme el título, y una larga lista de favores que me han hecho la vida más fácil para llegar aquí. A Erika y a Silvia Aguilar, por su acogida a mi llegada al hospital y a Erika por haber sido amiga y camarada en mi etapa de adjunta.

A Jordi Pérez por abrirnos una ventana al mundo de las enfermedades raras y a los pacientes con Enfermedad de Gaucher, a Marc Moltó por su siempre amable disponibilidad.

A Laia Vilaplana por haberme dejado su hueco y en herencia estos dos proyectos.

A Cinthya, a Alejandra, a Ana, a Elena Chico, a Carol, a Lili, a Toto, a David, Santi, Michele, Andrea, a todos los amigos, por ser lo más, lo mejor que tengo.

Al servicio de Medicina Interna y Enfermedades Infecciosas, por la oportunidad de haberme formado como internista e infectóloga, por todas las enseñanzas recibidas en mis 6 años en el Hospital del Mar.

A Jorge, por haberme empujado a volar, de su mano, y en cada cambio de viento, sostenerme.

A los pacientes, esto es por y para ellos.

Listado de publicaciones

- I. Herrera S, Pérez-López J, Moltó-Abad M, Güerri-Fernández R, Cabezudo E, Novelli S, Esteve J, Hernández A, Roig I, Solanich X, Prieto-Alhambra D, Nogués X, Díez-Pérez A. **Assessment of Bone Health in Patients with Type 1 Gaucher Disease Using Impact Microindentation.** J Bone Miner Res. 2017 Mar 6. doi: 10.1002/jbmr.3121.

- II. María José Pérez-Sáez, Sabina Herrera, Daniel Prieto-Alhambra, Laia Vilaplana, Xavier Nogués, María Vera, Dolores Redondo-Pachón, Marisa Mir, Güerri, Marta Crespo, Adolfo Díez-Pérez, and Julio Pascual. **Bone density, microarchitecture and material strength in chronic kidney disease patients at the time of kidney transplantation.** Accepted for publication in Osteoporosis International.

Abreviaturas

BMSi: Bone Material Strength index

CTX-I: Telopéptido C-terminal

DE: Desviación estándar

DXA: Dual Energy X-ray Absorptiometry/ Densitometría ósea

DM: Diabetes mellitus

EG: Enfermedad de Gaucher

EG1: Enfermedad de Gaucher tipo 1

EMO: Enfermedad mineral ósea

ERC: Enfermedad renal crónica

FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23

FG: Filtrado glomerular

FGe: FG estimado

FRAX: Fracture Risk Assessment Tool

GAB: Glucocerebrosidasa

GC: Glucocorticoides

HR: Hazard ratio

IC: Intervalo de confianza

iFMO: Índice de fuerza mineral ósea

ICGG: Grupo de colaboración de registro de Gaucher internacional

IMC: Índice de masa corporal

imTOR: Inhibidores de la vía mTOR

IPR: Indentación por punto de referencia

KDIGO: Kidney Disease Improvement Global Outcomes

M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos

MIP-1: Proteína de inflamación de macrófagos

OMS: Organización mundial de la Salud

OPG: Osteoprotegerina

OR: Odds ratio

iPTH: Parathormona intacta

P1PN: Procolágeno tipo 1 N propéptido

PTH: Parathormona

RANKL: Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand

RMN: Resonancia magnética nuclear

TBS: Trabecular Bone Score

TNF: Factor de necrosis tumoral

TSE: Terapia de sustición enzimática

TR: Trasplante renal

TRS: Terapia de reducción de sustrato

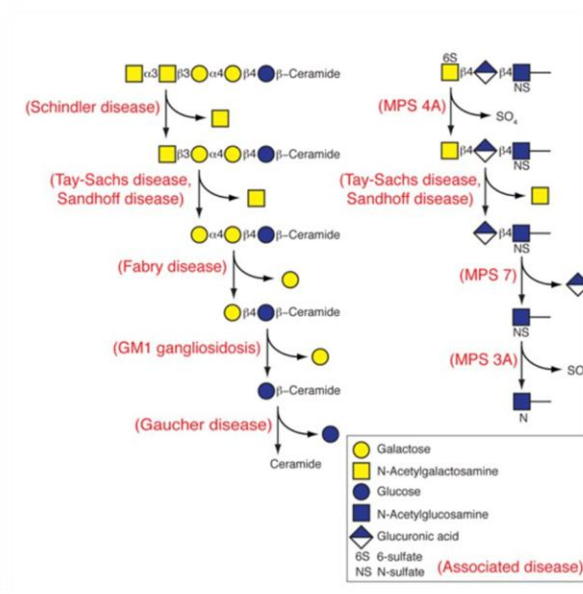
QCSI: Quantitative Chemical Shift Imaging

QT: Quitotriosidasa

1. ENFERMEDAD DE GAUCHER

1.1 Introducción, historia y epidemiología

Las enfermedades de depósito lisosomal son un grupo de enfermedades genéticas que se caracterizan por mutaciones en los genes encargados de codificar diversas enzimas lisosomales. Estas enzimas están encargadas de la degradación de diversas macromoléculas, de manera que, en ausencia de estas enzimas, los sustratos son acumulados, causando una serie de disfunciones en los órganos donde son almacenados. Uno de los grupos de enfermedades de depósito liposomal son las llamadas esfingolipidosis, donde la molécula que no es degradada, un esfingolípido, es componente de la membrana celular o regulador de vías de señalización (1). Los esfingolípidos se degradan normalmente en los lisosomas de los macrófagos del sistema retículo endotelial. Algunas de las esfingolipidosis son: la enfermedad de Tay-Sachs, la enfermedad de Sandhoff-Jatzkewitz, la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Niemann-Pick, la enfermedad de Krabbe, la fucosidosis, la enfermedad de Fabry, la leucodistrofia metacromática y la gangliosidosis generalizada.



Vía metabólica de las esfingolipidosis

La enfermedad de Gaucher (EG), es una de las enfermedades de depósito lisosomal, de esfingolipidosis, más común. Fue descrita por primera vez en 1882 por un dermatólogo francés llamado Philippe Charles Ernest Gaucher, quien describió un paciente con esplenomegalia masiva sin leucemia (2). No fue hasta 1905, cuando Nathan Brill acuñó el término de EG, sugiriendo su herencia autosómica recesiva (3). La mutación responsable de la enfermedad se encuentra en el gen *GAB1*, localizado en el cromosoma 1(1q21), que codifica para la enzima glucocerebrosidasa (GBA) (4), encargada de hidrolizar glucocerebrósido/ glucosilceramida a glucosa y ceramida. Como consecuencia, el glucocerebrósido se acumula en los macrófagos del sistema retículoendotelial.

Se estima que la EG tiene una prevalencia aproximada de 1 entre 40000-60000, si bien en la población de judíos Askenazis esta prevalencia es mucho mayor, siendo alrededor de 1 entre 800 (5). Se han descrito más de 300 mutaciones del gen *GAB1*, siendo las más frecuentes la N370S y la L444P (6). La mutación N370S se da mayormente en la raza caucásica, mientras que la mutación L444P es pan-étnica. El 90% de los alelos que provocan EG en la población de judíos Askenazis corresponden a 4 mutaciones: N370S, L444P, 84GG, y IVS2fl, mientras que en el resto de la población suponen entre un 50% y 60% de los alelos. No se han identificado correlaciones entre los genotipos y fenotipos, si bien algunas mutaciones se han relacionado con mayor riesgo de enfermedad neuropática (homocigotos L444P o D409H, o heterocigotos L444P/D409H) (7). Por otra parte, la mutación N370S se ha relacionado con formas poco sintomáticas.

1.2. Fisiopatología

Los esfingolípidos tienen unas determinadas funciones dentro de la célula, participando en mecanismos de reconocimiento celular, así como en los procesos metabólicos de señalización molecular en las vías de apoptosis o proliferación. La ceramida y la esfingosina-1-fosfato actúan como segundos mensajeros e inician mecanismos de apoptosis. Su metabolismo depende de su estructura, los glucoesfingolípidos que tienen más de 4 unidades de glucosa

en la estructura de su cadena, no necesitan más que enzimas hidrolíticas; sin embargo, aquellos que poseen menos de 4, necesitan además una segunda molécula del grupo de proteínas activadoras de esfingolípidos, que en el caso de la GBA se denomina Saposina C. La Saposina C está codificada por un gen ubicado en el cromosoma 10 (8). El déficit de Saposina C conlleva el desarrollo de una enfermedad similar a la EG tipo 3, que se detallará más adelante, con afectación visceral y neuropática.

Debido a las mutaciones en el gen GBA1, existe una actividad insuficiente de la enzima GBA, como consecuencia su sustrato, glucosilcerebrósido, se acumula en los macrófagos, dando como resultado las llamadas células de Gaucher. Estas células tienen un aspecto microscópico característico, con un núcleo excéntrico y un citoplasma heterogéneo como “arrugado”. Se acumulan en los órganos del sistema retículo endotelial, principalmente en el hígado, el bazo y la médula ósea, causando un amplio espectro de síntomas (9).

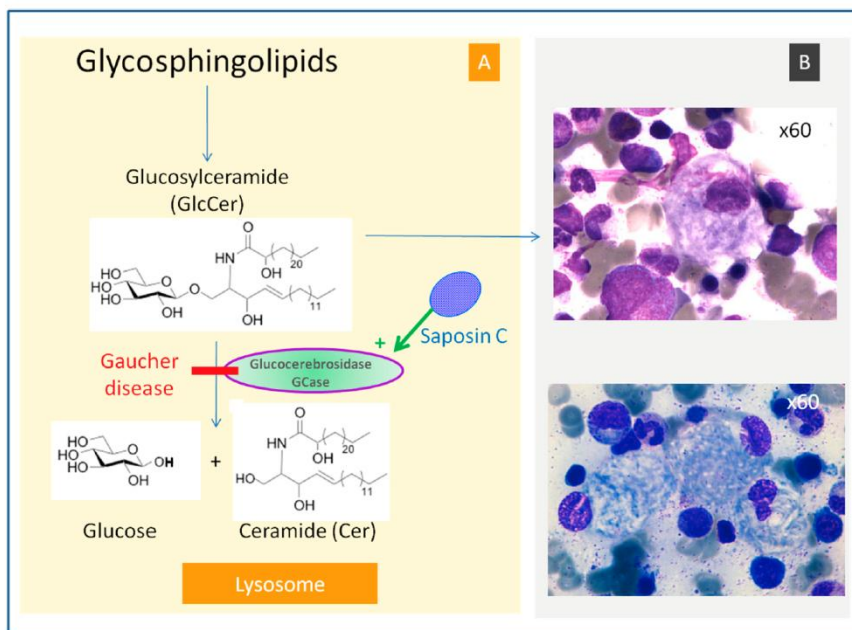


Figura 1. Metabolismo de glucosilceramida/glucosilcerebrósido(10).

Estudios recientes han identificado la formación de las células de Gaucher en un subtipo específico de macrófagos denominado M2. En la maduración del

monocito al macrófago existen dos vías, diferenciación hacia M1, que es la vía clásica, o hacia M2, siendo esta la vía alternativa. La subpoblación de macrófagos M2 es de carácter antiinflamatorio, con efecto inmunomodulador y de reparación de tejidos (11). El perfil de marcadores de inflamación que expresan estos pacientes sugiere un estado “pseudo-inflamatorio”, probablemente por la activación de macrófagos M1, de carácter inflamatorio y la disfunción de los macrófagos M2, de carácter antiinflamatorio. Estudios realizados in vivo han evidenciado un aumento de citoquinas y quimiocinas en plasma en pacientes con EG, como: IL-1 , IL-6, IL-8, TNF (Factor de necrosis tumoral), M-CSF (Factor estimulador de colonias de macrófagos), MIP-1 (Proteína de inflamación de macrófagos), IL-18, IL-10, TGF, CCL-18, quitotriosidasa, CD14s, y CD163s; y que parecen tener un papel en las complicaciones hematológicas y óseas de la EG (12) (13). Sólo algunas de estas moléculas se expresan en las células de Gaucher, en concreto, la quitotriosidasa y CCL-18, que son además marcadores de la enfermedad.

1.3 Tipos de EG y manifestaciones clínicas

Se distinguen en la actualidad tres tipos de EG. La EG tipo 1 (EG1), o no neuropática, que es la más frecuente, comprende el 90-95% de los pacientes con EG. Se distingue del tipo 2 y 3 en la ausencia de manifestaciones neurológicas, si bien estudios recientes han demostrado la asociación de EG1, con un riesgo de entre 4 y 20 veces mayor que la población sana, con la enfermedad de Parkinson (14) (15) (16). Se ha descrito también la presencia de neuropatía periférica en estos pacientes (17). El debut de la EG1 es variable, hay pacientes que permanecen asintomáticos durante toda su vida, si bien es frecuente encontrar síntomas durante la infancia. La edad media de diagnóstico según el registro de pacientes con enfermedad de Gaucher es alrededor de los 20 años (18). Entre los síntomas más frecuentes que presentan estos pacientes se encuentra la fatiga, casi en un 50%. En los niños se observa un retraso del crecimiento y retraso de la pubertad (19). Se encuentra hepatomegalia en hasta un 80% de los pacientes con EG tipo 1,

causando distensión abdominal y dolor. Además de la hepatomegalia, se observa una mayor incidencia de litiasis biliar en esta población comparado con la población sana (20), sin embargo, no se ha visto un riesgo aumentado de cirrosis o hipertensión portal. Se diagnostica esplenomegalia en hasta el 90% de los pacientes, con un tamaño del bazo incluso hasta 20 veces el tamaño normal (21). Ocasiona al igual que la hepatomegalia, distensión abdominal y dolor, y es en muchos casos es la piedra angular del diagnóstico de la EG, al sospechar enfermedades hematológicas. Los trastornos hematológicos también son algunas de las alteraciones más frecuentes en este tipo de pacientes; y a menudo son encontrados como hallazgos incidentales en analíticas rutinarias. Entre las alteraciones hematológicas podemos encontrar anemia, que causa entre otros síntomas fatiga; trombopenia, que causa sangrados frecuentes de poca gravedad y leucopenia con la consecuente tendencia a presentar infecciones de repetición. Las citopenias son resultado directo de la infiltración de la médula ósea y bazo por células de Gaucher. Los sangrados (gingivales, menorragias, hematomas, etc..) no son sólo resultado de un número reducido de plaquetas; pero también de una actividad disfuncional de las mismas (22). Se ha observado en este grupo de pacientes una actividad deficitaria de varios factores de la coagulación, consecuencia de la hepato-esplenomegalia. Se ha visto alargamiento de tiempo de protrombina y del tiempo parcial de tromboplastina activada, así como déficits en los factores de coagulación XI, XII, VII, X, V y I (23). Se postula que la causa de este déficit sea la constante activación de la cascada de la coagulación por parte del sistema mononuclear.

Se han descrito alteraciones en otros órganos como resultado de la infiltración por células de Gaucher, u otros mecanismos secundarios, por ejemplo, neumopatía intersticial que puede dar lugar a fibrosis pulmonar por infiltración de células de Gaucher, neumopatía restrictiva por deformación de la columna, o hipertensión pulmonar secundaria a síndrome hepatopulmonar (24). Hay también en la literatura casos de proteinuria y hematuria por infiltración glomerular por células de Gaucher (25).

La enfermedad de Gaucher tipo 2, supone menos de un 5% del total de pacientes diagnosticados con EG. Debuta entre los 3 y los 6 meses de edad y

se caracteriza por alteraciones neurológicas que se acompañan de hepatoesplenomegalia. Los pacientes presentan rigidez de origen piramidal y extrapiramidal, retraso psicomotor, y epilepsia de difícil control farmacológico. No hay alteraciones óseas en este tipo de EG. La mayoría de los niños no llegan al tercer año de vida (26).

La enfermedad de Gaucher tipo 3, también llamada juvenil o EG subaguda neurológica, corresponde al 5% de los casos diagnosticados como EG. Presenta alteraciones viscerales que además se acompañan de alteración neurológica oculomotora. Debutan más tarde que la EG tipo 2, aunque suele ser antes de los 20 años. El espectro clínico es muy variable, encontrando formas moderadas y otras muy graves que presentan epilepsia y demencia (27).

1.4 Diagnóstico de la enfermedad de Gaucher

El diagnóstico de la EG es a menudo un reto para los médicos; el debut con síntomas inespecíficos y el desconocimiento de la enfermedad generan retrasos en su diagnóstico.

El diagnóstico definitivo debe hacerse confirmando la actividad deficitaria de la GAB en leucocitos totales, en células mononucleares o en fibroblastos cultivados que suele ser del 10-15% de la actividad normal. En la práctica clínica habitual se usa el análisis de GBA en gota de sangre seca, pero en caso de un resultado positivo, es necesario confirmar el resultado con el primer test (28). En el caso de confirmarse el déficit, se realiza el estudio genético para determinar las mutaciones en el gen GAB1 responsables de la enfermedad. En caso de que no se confirme el déficit, pero el cuadro clínico sea compatible, es preciso descartar el déficit de Saposina C mediante secuenciación genética, sobre todo si la quitotriosidasa (QT) está elevada.

No obstante, aunque los métodos descritos son los más precisos, es común que los clínicos lleguen al diagnóstico de EG por otros métodos. A menudo los pacientes presentan trombopenia y esplenomegalia, y ante la sospecha de una enfermedad hematológica se realiza una biopsia de médula ósea, encontrando células de Gaucher, aunque a veces es difícil de diferenciar de las “pseudo-

células de Gaucher” encontradas en algunas enfermedades hematológicas o infecciosas. En otras ocasiones se realiza biopsia hepática como estudio de hepatomegalia, o elevación de transaminasas, encontrando células de Gaucher.

Otros parámetros que pueden ser de ayuda a la hora de identificar pacientes con EG son algunos marcadores como la QT, CCL18, la glicosilesfingosina y la ferritina. La QT se produce en las células de Gaucher, aunque no es específico de esta enfermedad, ya que se encuentra elevado en muchas enfermedades como algunas enfermedades depósito lisosomal, y otras enfermedades como la sarcoidosis, la talasemia, o la enfermedad de Alzheimer (29). Se ha utilizado ampliamente en la EG como marcador diagnóstico y como marcador de la enfermedad y respuesta al tratamiento (30, 31). No se debería utilizar en pacientes que presentan una mutación en el gen CHT1, que lleva a un déficit de su actividad. CCL18 es una quimiocina producida por los macrófagos, sobretodo del tipo M2 y por células dendríticas. Su función es promover el reclutamiento de linfocitos T. Se encuentra elevada en numerosas enfermedades, incluyendo cáncer, reacciones alérgicas, enfermedades inflamatorias crónicas. Es producida por las células de Gaucher y tiene una cinética similar a la QT, con niveles elevados en plasma en pacientes con EG. Altos niveles se asocian con peor pronóstico. Es un marcador de especial utilidad en pacientes con déficit de QT (32, 33). La glicosilesfingosina por otra parte, es un biomarcador nuevo con una mayor sensibilidad y especificidad que QT y CCL8, si bien su utilidad no ha sido validada con estudios a grande escala (34, 35).

2. Afectación ósea en la enfermedad de Gaucher

2.1 Patogenia de la afectación ósea

El sistema esquelético es complejo, y está en constante cambio. La médula ósea es la parte fluida del hueso, mientras que el hueso esponjoso y el cortical están encargados de las propiedades mecánicas del mismo. El periostio cubre

la parte externa del hueso y se compone de dos capas, una fibrosa externa y una interna más vascularizada que puede formar hueso nuevo. El hueso cortical de las diáfisis y metáfisis tiene un sistema de vascularización doble, mientras que las epífisis solo tienen uno; esto hace que sean más susceptibles a infartos óseos. La matriz ósea se compone de material orgánico, sobretodo colágeno tipo 1 (encargado de dar resistencia a la tracción) y material inorgánico, hidroxapatita sobretodo (da resistencia a la compresión) (36). Los elementos celulares del hueso están encargados de mantener esta matriz. Los precursores de osteoclastos derivan de precursores mieloides, que pueden derivar en macrófagos y ambos expresan receptores Fcγ. Los macrófagos también pueden diferenciarse en osteoclastos; es por ello que son considerados como una posible diana terapéutica en la EG (37). En el proceso de remodelado óseo se produce una resorción ósea por los osteoclastos y se deposita una nueva matriz por los osteoblastos. Los osteoclastos también se encargan de regular otras células como los osteoblastos, la salida de células hematopoyéticas de la médula y funcionan como células inmunes durante procesos de inflamación (38).

En el pasado se atribuía el peso de la enfermedad ósea en la EG a la infiltración ósea por las células de Gaucher, causando oclusión vascular, compresión y aumento de la presión intraósea (39). En la actualidad, es sabido que en la EG hay un estado de estimulación inmune crónica, donde la mayoría de los estudios se centran en analizar los niveles séricos de determinadas citoquinas (40). Las células de Gaucher no son un elemento inerte, sino que son responsables de la producción de proteínas. A pesar de la variación que existe entre pacientes, se han encontrado niveles séricos elevados de IL-1 , IL-1 , IL-1Ra, sIL-2R, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF- , TGF- , M-CSF, MIP-1, y CCL18 (32, 41-43). Los macrófagos, principal célula afectada en la EG, tienen diferentes funciones, pueden secretar citoquinas pro y antiinflamatorias dependiendo de la señalización. Las células de Gaucher son el resultado de la afectación de los macrófagos de la vía alternativa, M2, caracterizada por la expresión de CCL18 y QT (11). Tanto CCL18 como QT se encuentran elevadas en suero en pacientes con EG, hasta 1000 veces su valor normal en el caso de QT (30). Los niveles de QT se relacionan con el grado de hepatomegalia,

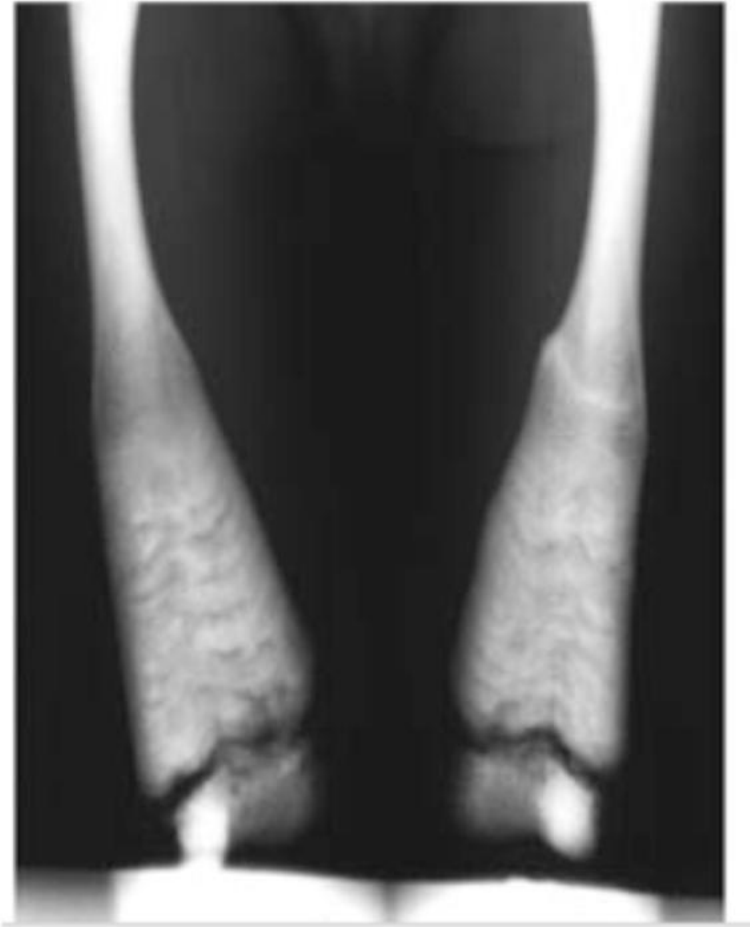
esplenomegalia, concentración de hemoglobina y plaquetas, así como manifestaciones óseas (31). Son utilizadas para seguimiento, así como para valorar la respuesta al tratamiento(44). Además de los macrófagos otras células están comprometidas en la EG, los monocitos, las células dendríticas y los linfocitos T y B también se encuentran afectados (45).

2.2 Manifestaciones clínicas óseas

Uno de los aspectos claves de la enfermedad ósea en la EG es que se desarrolla de forma silente, en la mayoría de los casos sin relación con la enfermedad visceral. De esta forma, todos los pacientes con diagnóstico de EG están en riesgo de presentar complicaciones óseas, independientemente de la enfermedad visceral o el genotipo (46). En el estudio de Charrow 82% de los pacientes presentaban alteraciones radiográficas previo al inicio del tratamiento (46). Algunos estudios han puesto en evidencia que el alelo N370S pueda tener un efecto atenuante de la enfermedad en la médula ósea (47).

La osteopenia es una de las alteraciones óseas más frecuentes, encontrándose en todos los grupos de edad y sexo. Puede ser difusa o localizada, y afectar tanto el hueso trabecular como el cortical (48), su distribución es centrífuga desde el esqueleto axial al apendicular, con mayor afectación de la columna vertebral.

La deformidad en tubo de matraz Erlenmeyer se produce por un desbalance entre formación y resorción ósea, por defecto de acción osteoclástica. Se produce un ensanchamiento metafisodiafisario femoral bilateral.



Deformidad en tubo de matraz o de Erlenmeyer (49)

Es frecuente encontrar fenómenos de osteoesclerosis, que reflejan un aumento actividad osteoclástica y osteoblástica sobre un proceso inflamatorio o una crisis ósea. Es posible apreciarlo en una radiografía simple como un aumento de densidad en la cavidad medular.

La osteonecrosis y la necrosis avascular, son el resultado de la muerte del tejido óseo secundario a un proceso isquémico. Es la complicación más incapacitante en los pacientes con EG. Puede afectar a la cabeza femoral, húmero proximal, y cuerpos vertebrales. En éstos, se produce por un aumento de la presión intramedular por infiltración, resultando en una reabsorción endóstica cortical con fenómenos oclusivos. El hueso epifisario es más propenso a infartos óseos, dado que tiene una única irrigación, mientras que la metáfisis y diáfisis disponen de una doble circulación.

Otras de las manifestaciones óseas que presentan estos pacientes son las crisis óseas, que corresponden a episodios de dolor agudo e intenso, con aumento de leucocitosis y fiebre; y que puede objetivarse como una elevación del periostio en la radiografía simple. Suele tener una duración de unos 3 días, requieren frecuentemente la inmovilización del paciente y el uso analgésicos opioides para el control del dolor. Muchas veces se siguen de necrosis, fracturas y daño irreversible. El embarazo aumenta el riesgo de crisis óseas. Es uno de los síntomas que se miden para evaluar la respuesta a la TSE, ya que tanto las crisis óseas como el dolor óseo han demostrado responder al tratamiento.

Table 2. Bone crises and bone pain reported by patients with type 1 Gaucher disease before receiving ERT

Events	Years before ERT		
	Year 3	Year 2	Year 1
Bone crisis	$n = 58$	$n = 118$	$n = 826$
% (SE)	12 (4)	17 (4)	23 (1)
Bone pain	$n = 67$	$n = 130$	$n = 932$
% (SE)	51 (6)	56 (4)	56 (2)

ERT, enzyme replacement therapy; SE, standard error.

Datos del registro ICGC sobre las crisis óseas y dolor óseo tras el inicio de TSE. (50)

2.3 Métodos de evaluación de afectación ósea

Densitometría ósea, Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA)

La densitometría ósea se ha considerado la técnica de elección para la valoración cuantitativa del hueso en adultos con EG1. Se realiza en la columna lumbar L1-L4 y en cadera (cadera total y cuello femoral). Los parámetros

obtenidos varían en función del tamaño de los huesos, madurez esquelética y pubertad. Los huesos pequeños tienden a infra estimar la DMO. Otros factores que pueden interferir en las medidas son la presencia de necrosis avascular del fémur proximal o las fracturas vertebrales. Así mismo la presencia de osteofitos, calcificaciones vasculares y cálculos pueden sobre estimar la DMO.

El parámetro de referencia de la DXA para hombres menores de 50 años, mujeres premenopáusicas y población pediátrica es el Z-score, que refleja la media de la DMO del individuo comparado con la población del mismo sexo, edad y etnia (51). Para las mujeres postmenopáusicas y hombres por encima de 50 años se prefiere el uso del T-score, que compara la DMO del individuo con la de adultos jóvenes (20 a 29 años) del mismo sexo. La interpretación se basa en la clasificación densitométrica de la Organización mundial de la Salud (OMS), donde un T-score de entre -1.0 y -2.5 indica osteopenia, y un T-score de -2.5 indica osteoporosis. Las recomendaciones actuales son que se debería realizar una DXA basal a todos los pacientes con EG1, y posteriormente repetirla cada 12-24 meses en los no tratados y en los tratados que han alcanzado la meta terapéutica, mientras que en los que no la han alcanzado se debería repetir cada 12 meses (52). Se recomienda utilizar el mismo dispositivo y el mismo operador.

Resonancia Nuclear Magnética (RMN)

La RMN es un método extremadamente sensible para evaluar la patología ósea en la EG1. La infiltración de la médula ósea por células de Gaucher desplaza la grasa de la médula ósea, de manera que se capta una señal menos intensa. Cuando la infiltración disminuye tras la TSE, la grasa de la médula ósea se recompone, de manera que la señal que es captada se normaliza. Otros cambios son irreversibles, como los infartos óseos o la fibrosis. La RMN también es capaz de captar de forma muy sensible fenómenos como la osteonecrosis, con una intensidad de señal aumentada en T1 y T2.

El grupo de colaboración de registro de Gaucher internacional (ICGG) recomienda la realización de una RMN en el momento del diagnóstico, y cada

12-24 meses en los pacientes que no reciben TSE y los que están en TSE pero no han conseguido su meta terapéutica, mientras que los que si la han conseguido se recomienda cada 24-36 meses (52). Se recomienda así mismo la realización de RMN en caso de cambio de tratamiento o aparición de nuevas complicaciones óseas. Se considera que la RMN es coste-efectiva, en relación al valor diagnóstico y el coste terapéutico.

RMN semicuantitativa- Quantitative Chemical Shift Imaging

La RMN es un método cualitativo, se han desarrollado también métodos semicuantitativos para valorar la infiltración en médula ósea por las células de Gaucher. La importancia de medir la infiltración de la médula ósea radica en que refleja el riesgo de crisis óseas y de osteonecrosis, y forma parte del índice de severidad de la enfermedad. La RMN semicuantitativa compara la intensidad de señal con una referencia interna estandarizada. Se han desarrollado hasta el momento seis métodos, que difieren según el área corporal que es evaluada.

Otro método desarrollado como RMN cuantitativa es el *Quantitative Chemical Shift Imaging* (QCSI). QCSI cuantifica el contenido de grasa utilizando las frecuencias resonantes de la grasa y del agua en la médula ósea (53). Su principal limitación es que no está disponible de forma universal, precisa de un técnico especializado y su interpretación lleva mucho tiempo. Por todo ello no se utiliza en la práctica clínica habitual.

Radiografía simple

La radiografía está disponible de forma universal y es económica, pero tiene una baja sensibilidad a la hora de detectar cambios leves en los pacientes con EG1. Su utilidad principal se basa en la detección de fracturas; aunque también es útil a la hora de detectar otras lesiones: adelgazamiento cortical, zonas de osteonecrosis y osteoesclerosis, y deformidad de Erlenmeyer, que pueden ayudar al diagnóstico de la enfermedad (54). El ICGC recomienda una valoración inicial con radiografía simple de fémur, columna y otras áreas sintomáticas.

Biomarcadores de daño óseo

El recambio óseo se puede medir a través de una serie de biomarcadores específicos para actividades enzimáticas, la liberación de varios componentes estructurales del hueso y proteínas involucradas en la formación del hueso. A lo largo de los años varios estudios han medido estos parámetros en pacientes con EG1 (33, 55-59). Los niveles de hidroxiprolina total en orina se utilizan para medir la hiperactividad osteoclástica. En el estudio de Stowens et al, se encontró que un tercio de los pacientes con EG1 presentaban niveles de hidroxiprolina disminuidos (39), sugiriendo una actividad osteoclástica disminuida. Otros estudios apuntan a una actividad osteoblástica también disminuida en pacientes con EG1 sin TSE, reflejado por un descenso de hasta tres veces en los niveles de marcadores de actividad osteoblástica: osteocalcina (55) o P1NP (56). Van Dussen evidenció una reducción significativa en los niveles de osteocalcina, sin cambios en los niveles de CTX, marcador de actividad osteoclástica (60), sugiriendo que la alteración del recambio óseo en pacientes con EG es a expensas de una formación del hueso reducida. El estudio de Mikosch apoya esta hipótesis, ya que los niveles de fosfatasa ácida resistente al tartrato (marcador de osteoclastos) era normal en su serie de pacientes con EG (61). A pesar de los datos arrojados por estos estudios, un revisión sistemática reciente comprueba que los resultados no son consistentes, y a menudo son contradictorios (59). Es por ello que no se recomienda su uso para evaluación o seguimiento de estos pacientes. Cabe destacar que los marcadores reflejan una valoración del hueso puntual, mientras que las pruebas de imagen ofrecen una imagen de los efectos acumulativos de la pérdida o ganancia de hueso a lo largo de la vida. Si se recomienda, no obstante, medir los niveles séricos de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina ósea, PTH, calcio y fósforo urinario, así como 25-hidrovitamina D.

Escala FRAX (Fracture Risk Assessment Tool)

La escala FRAX, diseñada por la OMS y de gran utilidad en muchas poblaciones, no se usa de forma habitual en pacientes con EG, por lo que se desconoce si tendría eventualmente aplicabilidad. El FRAX estima la probabilidad de fractura mayor osteoporótica (vertebral clínica, cadera,

antebrazo y húmero) a 10 años, aplicando un algoritmo basado en la edad, el sexo y factores clínicos (con o sin la DMO).

Microindentación por impacto

No existen hasta la fecha estudios en esta población utilizando esta técnica, que se detalla en el apartado 4 de este manuscrito.

2.4 Tratamiento de la enfermedad de Gaucher

Existen en la actualidad dos tipos de tratamientos específicos para la EG, la TSE y la terapia de reducción de sustrato (TRS). El objetivo es el tratamiento de los pacientes antes de que se manifiesten las complicaciones que pueden dejar secuelas o no puedan ser tratadas, como esplenomegalia masiva fibrosa, necrosis avascular, osteoartritis secundaria, compresión vertebral o fibrosis hepática.

Terapia Sustitutiva Enzimática (TSE)

El principio de la TSE es la administración de glucocerebrosidasa a las células de Gaucher. A principios de los 90 se extrajo la enzima de placenta humana, y se desarrolló la imiglucerasa y, posteriormente, la glucocerebrosidasa recombinante (Cerezyme®, Sanofi-Genzyme). Otras enzimas recombinantes que se han comercializado son Velaglucerasa (Vpriv®, Shire) y Taliglucerasa. Las dos primeras se producen en mamíferos y tienen pocas diferencias, mientras que la última se produce en células de plantas. Se administran de forma parenteral con una dosis inicial recomendada de 60U/Kg por semana (62), que posteriormente se reduce tras alcanzar las metas terapéuticas. Para valorar de forma integral un paciente con EG1 y su respuesta al tratamiento es necesario evaluar los aspectos más importantes de la enfermedad: recuento de plaquetas y eritrocitos, volumen de hígado y bazo, calidad de vida, crisis y dolor óseos, remodelado óseo, grasa en médula ósea y DMO. En la actualidad la estrategia de tratamiento utilizada es la dosis-respuesta (63), de forma que la dosis y las infusiones se ajustan de acuerdo

con la evolución clínica y de los marcadores. La trombocitopenia suele mejorar con la TSE, aunque en pacientes con esplenomegalia residual o presencia de nódulos hepáticos puede persistir (64). La mayoría de los pacientes refiere mejoría tras 24-48 meses de tratamiento (65). La infiltración de la médula ósea y la osteopenia mejoran gradualmente con la TSE (66), también los dolores óseos mejoran y se objetivan menos crisis óseas (50). Las complicaciones óseas se reducen, aunque la TSE no las previene completamente (67). El tratamiento precoz con TSE reduce el riesgo de necrosis avascular. No se ha evidenciado mejoría de las alteraciones neurológicas con la TSE. La respuesta a la TSE en la enfermedad ósea es mucho más lenta que en las alteraciones viscerales. En un estudio de pacientes que recibieron imiglucerasa 60U/Kg cada 2 semanas, 73% de los pacientes refirieron una mejoría del dolor óseo comparado con el basal a los 3 meses de tratamiento. Pero a los dos años, un 48% aún aquejaba dolor óseo (68). La mejoría en la RMN puede tardar entre 2 y 3 años. Otro estudio refleja un tiempo de 8 años para conseguir una DMO normal en pacientes en tratamiento con TSE (66).

El tratamiento con TSE, dado su elevado coste, se reserva para aquellos pacientes que presentan síntomas clínicos o alteraciones biológicas. Es un tratamiento relativamente seguro, aunque se han declarado casos de reacciones alérgicas, así como desarrollo de anticuerpos contra la enzima.

TRS

El objetivo de la TRS es reducir el exceso de glucocerebrósido disminuyendo su producción. Miglustat (Zavesca®, Actelion) es un inhibidor de la síntesis de glucocerebrósido, de manera que se reduce su producción en las células de Gaucher (69). Es efectivo para el tratamiento de la hepatomegalia y esplenomegalia así como en el descenso de los niveles de quitotriosidasa (QT), aunque puede tardar hasta 24 meses en corregir los parámetros hematológicos. Sus efectos sobre el hueso no han sido evaluados de una forma exhaustiva. Tiene la ventaja sobre el TSE de que es un tratamiento oral, aunque tiene más efectos secundarios como diarrea, neuropatía periférica o pérdida de peso (70). Se suele utilizar como tratamiento de segunda línea en

pacientes que no toleran la TSE. Al igual que la TSE no tiene efectos sobre las alteraciones neurológicas. Recientemente se ha comercializado otro inhibidor: Eliglustat (Cerdelga®, Sanofi-Genzyme) más potente que Miglustat (71) y que ha demostrado tener efecto en el hueso, donde se evidenció en un grupo de pacientes que recibió tratamiento durante 4 años un aumento significativo de la DMO (72).

Chaperonas

Las proteínas chaperonas son un conjunto de proteínas presentes en todas las células, cuya función principal es la de ayudar al plegamiento de otras proteínas recién formadas en la síntesis de proteínas. Se está estudiando el uso de chaperonas para restablecer la actividad intracelular de la GBA mutante. Estudios preliminares han arrojado resultados positivos (73).

Bifosfonatos

El efecto de la TSE en la DMO sigue sin estar bien establecido, aunque algunos estudios apuntan que los pacientes con osteopenia mejoran tras varios años de tratamiento (66). Algunos estudios defienden que el tratamiento con bifosfonatos aumenta la DMO en los pacientes que reciben simultáneamente TSE (74), sin embargo, no existe aún suficiente evidencia científica ni ensayos aleatorizados para recomendar el uso sistemático de los mismos. Tampoco existen para el uso de terapia hormonal, Teriparatide o Denosumab.

Para los pacientes con EG1 que persisten con osteoporosis a pesar de la TSE, y sobretudo en los pacientes de más edad con riesgo de caídas, parece una medida con un riesgo-beneficio positivo el uso de bifosfonatos.

Otros tratamientos

Previo a la existencia de la TSE uno de los tratamientos era la esplenectomía, que hoy en día no está recomendada. Varios estudios demostraron la asociación entre enfermedad ósea severa y esplenectomía (75, 76). Un estudio evidenció la aparición de lesiones líticas meses después de la esplenectomía, se ha descrito la esplenectomía como factor de riesgo

independiente para osteonecrosis (77) y se han observado niveles de DMO más bajos en pacientes asplénicos comparados con pacientes no esplenectomizados (78). Sin embargo, otros estudios no han encontrado estos hallazgos, e hipotetizan sobre la posibilidad de que estos pacientes esplenectomizados tuviesen un grado más severo de EG1, y por lo tanto mayor enfermedad ósea (79).

3. Afectación ósea en pacientes con enfermedad renal crónica

3.1 Enfermedad renal crónica y trasplante renal: definición, prevalencia, mortalidad

La definición de enfermedad renal crónica (ERC) es la disminución de la función renal, expresada por un filtrado glomerular (FG) inferior a 60 ml/min/1,73 m² o como la presencia de daño renal de forma persistente durante al menos 3 meses. Las principales causas de ERC con la hipertensión y la diabetes en los países desarrollados (80). Se clasifica de acuerdo a una serie de grados, y cuando su FG estimado (FGe) es inferior a 60, es decir, se encuentra en grado 3, 4 o 5 de ERC.

Pronóstico de la ERC según FGe y albuminuria: KDIGO 2012				Categorías por albuminuria, descripción e intervalo		
				A1	A2	A3
				Normal o aumento leve < 30 mg/g < 3 mg/mmol	Aumento moderado 30-299 mg/g 3-29 mg/mmol	Aumento grave ≥ 300 mg/g ≥ 30 mg/mmol
Categorías por FGe, descripción y rango (ml/min/1,73 m ²)	G1	Normal o alto	> 90			
	G2	Levemente disminuido	60-89			
	G3a	Descenso leve-moderado	45-59			
	G3b	Descenso moderado-grave	30-44			
	G4	Descenso grave	15-29			
	G5	Fallo renal	< 15			

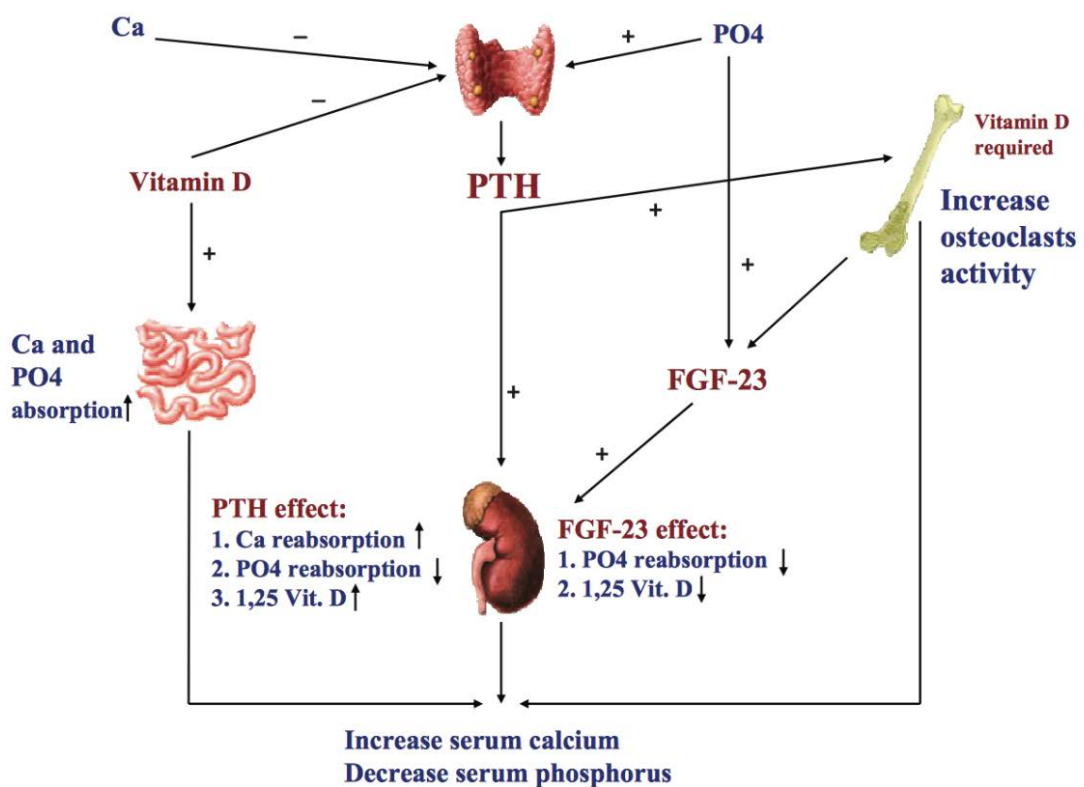
Sociedad Española de Nefrología. Documento de Consenso (81)

La ERC tiene una alta prevalencia, y afecta a un 5-10% de la población mundial (82). En España esta cifra se sitúa en el 6.8% de la población, y aquellos con ERC terminal (ERCT), que precisan terapia renal sustitutiva con diálisis o trasplante renal, la prevalencia es del 0.03% (83). El TR se ha convertido en la terapia de elección para la mayoría de las causas de ERC terminal dado que mejora la calidad de vida y la supervivencia frente a la terapia renal sustitutiva. En el año 2016 se trasplantaron en España 2994 riñones, de los cuales 341 fueron de donante vivo (84), y en el 2014 había en Cataluña 5.278 trasplantados renales (TR) con riñón funcional. Tanto los pacientes con ERC terminal como los pacientes con TR tienen un riesgo aumentado de mortalidad comparado con la población general. En España, la ERC terminal la mortalidad anual es alrededor de 15% en los pacientes que se encuentran en terapia de sustitución renal y 2.5% en los pacientes portadores de un trasplante renal (85). La principal causa de mortalidad al igual que en el resto de la población es la cardiovascular, ya que estos pacientes acumulan varios factores de riesgo. El TR mejora la supervivencia, pero la mortalidad sigue siendo superior al resto de la población (86).

3.2. Enfermedad mineral ósea, hiperparatiroidismo secundario y osteoporosis asociado a la enfermedad renal crónica

La hormona paratiroidea es el regulador del metabolismo del calcio. Se segrega por la glándula paratiroidea en respuesta a hipocalcemia e hiperfosfatemia. Estimula los osteoclastos produciendo resorción ósea y consecuentemente un aumento de los niveles séricos de calcio y fósforo. Además, estimula la actividad de la 1-hidroxilasa en el riñón, aumentando la producción de 1,25 di-hidroxitamina D. También aumenta la reabsorción del calcio y disminuye la de fósforo en el túbulo renal distal, disminuyendo el aclaramiento de calcio. Aumenta la absorción intestinal de calcio y de fósforo de forma indirecta, a través del aumento de producción de 1,25 di-hidroxitamina D. Como resultado de todo ello, los niveles elevados de PTH dan hipercalcemia, hipofosfatemia y calcio y fósforo urinarios elevados. El calcio ejerce un *feedback* negativo sobre las glándulas paratiroideas a través del receptor de calcio (87).

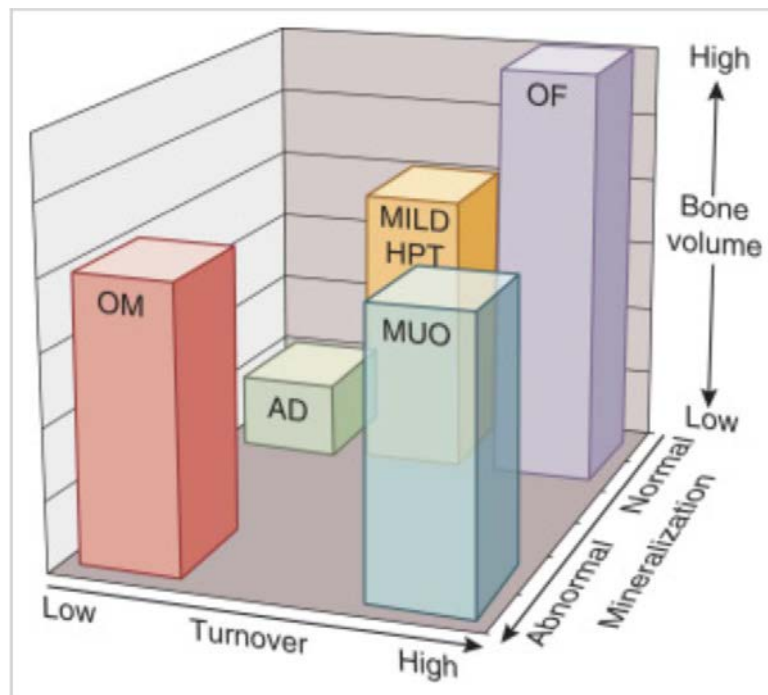
La vitamina D también forma parte de la regulación del metabolismo fosfo-cálcico, y aunque se sintetiza en la piel también se obtiene a través de la dieta. Su metabolito activo es la 1,25 di-hidroxitamina D, que se encarga principalmente de la disponibilidad de calcio y fósforo para la formación de hueso a través de la absorción intestinal y de la reabsorción a nivel del túbulo distal, así como regulando la secreción de PTH. El Factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) es secretado por los osteocitos y tiene un papel muy importante en la regulación del fósforo. Su estímulo es la hiperfosfatemia, y como consecuencia aumenta el aclaramiento renal de fósforo y estimula la 1-hidroxilasa disminuyendo los niveles de 1,25 di-hidroxitamina D (88). A través de su receptor FGFR1-Klotho, inhibe la función paratiroidea (89).



Homeostasis normal de calcio, fósforo, PTH y FGF23 (90).

En la ERC, a medida que el filtrado glomerular desciende lo hace simultáneamente el aclaramiento de fósforo, con la consiguiente hiperfosfatemia y estimulación de secreción de PTH. Este es el mecanismo principal por el que se produce el hiperparatiroidismo secundario. Este proceso se perpetúa y agrava a medida que el FG desciende. En pacientes con en ERC grado 5 se observan los niveles más elevados de PTH en humanos, con unas graves consecuencias como: hipercalcemia, calcificaciones de tejidos blandos, aumento del remodelado óseo con niveles de fosfatasa alcalina ósea elevados, osteítis fibrosa quística severa, pérdida de DMO y fracturas de fragilidad. El tratamiento que se utiliza para reducir los niveles de fósforo y PTH, el hiperparatiroidismo secundario en los pacientes con ERC, se basa en captadores del fósforo, esteroides o análogos de vitamina D y calcimiméticos. Los pacientes con ERC grado 5 en quienes no se puede controlar el hiperparatiroidismo deben ser evaluados para plantear paratiroidectomía (91).

El término clásico osteodistrofia renal se ha sustituido hoy en día por el término enfermedad mineral ósea (EMO), y afecta al 100% de los pacientes con ERC en alguna de sus formas (91). Existen tres aspectos clave en la EMO; el remodelado óseo (que puede ser alto, normal o bajo), la mineralización ósea (que puede ser normal o anormal) y el volumen óseo. En función de estos aspectos se distinguen varios tipos de patologías en la ERC-EMO.



Cada eje representa uno de los componentes descritos.

OM: osteomalacia, AD: enfermedad ósea adinámica, OF: osteítis fibrosa, HPT: hiperparatiroidismo, MUO (osteodistrofia urémica mixta) (91)

Enfermedad ósea adinámica (Bajo remodelado óseo)

Se caracteriza por un bajo recambio óseo, sin acumulación de osteoide y una disminución de osteoblastos y osteoclastos. Tanto la síntesis de colágeno como la mineralización son discretamente anormales. Este hecho diferencia esta entidad de la osteomalacia, donde el defecto de mineralización supera el defecto en la formación ósea resultando en un exceso de osteoide (92). Se ha identificado en pacientes con ERC en tratamiento conservador, así como en pacientes en terapia de sustitución renal. Aunque en un porcentaje de casos no se conoce la etiología, en muchos se asocia con el tratamiento (vitamina D, cinacalcet, o paratiroidectomía) para controlar los niveles elevados de PTH, produciéndose en ocasiones una sobre-supresión. Se caracteriza por una DMO disminuida y se asocia a fracturas de fragilidad, aunque no hay un perfil bioquímico que la identifique. Es importante realizar un estudio histomorfométrico para su diagnóstico, ya que el tratamiento con bisfosfonatos,

que reducen el remodelado óseo, en pacientes donde ya está disminuido, puede ser de efectos negativos (93).

Osteítis fibrosa (Alto remodelado óseo)

La osteítis fibrosa es el resultado de la estimulación osteoclástica y resorción ósea secundarias a niveles elevados de PTH. Puede dar lugar a episodios de dolor óseo y fracturas. Si se perpetúa en el tiempo, las zonas de mayor resorción ósea pueden ser remplazadas por tejido fibroso formando un tumor pardo. Son fácilmente identificables en las radiografías simples como lesiones líticas que a menudo se confunden con lesiones metastásicas.

Osteomalacia (Bajo remodelado óseo)

La osteomalacia se desarrolla cuando los niveles séricos de calcio, fósforo o vitamina D están disminuidos o cuando los osteoblastos no producen suficiente fosfatasa alcalina y se produce la acumulación excesiva de osteoide no mineralizado en la superficie ósea. Era también muy frecuente en pacientes tratados con hemodiálisis; a medida que el aluminio se acumulaba en la superficie ósea, interfería con la formación de hueso, dando lugar a osteomalacia. Desde que se identificó su patogenia y siendo una causa reversible su frecuencia ha disminuido notablemente. Los pacientes con osteomalacia pueden presentar fracturas por fragilidad. Los bisfosfonatos lógicamente están contraindicados en este grupo de pacientes y es por ello que es de vital importancia realizar un diagnóstico acertado (94). El tratamiento es relativamente sencillo, bien mediante el uso de quelantes de aluminio o suplementación de vitamina D, según la etiología.

Osteodistrofia Urémica Mixta (Alto remodelado óseo y mineralización anormal)

Se define como la combinación de la enfermedad de alto remodelado con una variedad de bajo remodelado, la osteomalacia. Se caracteriza por la coexistencia de osteítis fibrosa y un incremento del grosor de osteoide típico de osteomalacia. La tasa de mineralización puede ser variable, aunque siempre es insuficiente para mineralizar el osteoide depositado.

3.3 Diagnóstico de la enfermedad mineral ósea y osteoporosis en la enfermedad renal crónica

La biopsia ósea de cresta ilíaca con doble marcaje con tetraciclinas y el estudio histomorfométrico, están consideradas como las mejores técnicas de diagnóstico de estas entidades que forman parte de la EMO en el paciente con ERC (85).

La ERC-EMO hace que la relación entre la DMO y las fracturas sea mucho más compleja que en la población general. En la población de pacientes con ERC etiologías completamente opuestas pueden dar lugar a una DMO disminuida (95). Como ejemplo, una DMO baja puede ser resultado de una enfermedad con remodelado óseo aumentado o disminuido, puede ser por osteoporosis secundaria, asociada a la edad o con el sexo; y ser completamente indistinguibles a nivel de DXA. Es por ello que en 2009, el grupo Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) desaconsejaba la determinación de DMO en pacientes con ERC grado 3-5, ya que no era capaz de predecir el riesgo de fractura de la misma forma que lo hace en la población general y tampoco era capaz de dilucidar el tipo de EMO presente (96). Estudios recientes, sin embargo, han avalado la capacidad de la DXA para predecir el riesgo de fractura en pacientes con ERC grados 3-5 sin terapia de sustitución renal (97, 98).

La radiografía ósea por otra parte tiene valor diagnóstico para identificar lesiones características de la osteodistrofia renal, pero los cambios son tardíos, de manera que su principal utilidad es la de detectar fracturas vertebrales asintomáticas.

La tomografía computarizada cuantitativa periférica de alta resolución ha sido utilizada tanto en pacientes con ERC como en TR y permite junto con la resonancia magnética de alta resolución analizar la microarquitectura ósea. No se utilizan en la práctica clínica habitual por su elevado coste (99).

La microindentación ósea no se ha evaluado previamente en pacientes con ERC, aunque si se ha evaluado en TR a largo plazo (100).

El FRAX no se usa de forma habitual en pacientes con ERC, por lo que se desconoce si tendría eventualmente aplicabilidad. El FRAX estima la

probabilidad de fractura mayor osteoporótica (vertebral clínica, cadera, antebrazo y húmero) a 10 años, aplicando un algoritmo basado en la edad, el sexo y factores clínicos (con o sin la DMO). Un estudio reciente en TR donde se aplicó el score FRAX encontró concordancia entre la estimación de riesgo y la tasa de fractura observada(101).

3.4 Tratamiento de la enfermedad mineral ósea y osteoporosis en la enfermedad renal crónica

La DMO disminuida en esta población se atribuía esencialmente a la EMO por ERC, y el tratamiento preferido era el control de la hiperfosfatemia y la disminución de niveles de PTH, sin uso de otros tratamiento anti-resortivos. Estudios recientes han avalado la habilidad de la DXA para predecir el riesgo de fractura en pacientes con ERC grados 3-5 sin terapia de sustitución renal (97, 98). Otro de los aspectos que ha cambiado con respecto a las guías del 2009, es la recomendación sobre el uso de bifosfonatos en esta población. Hasta entonces solo se recomendaba su uso en pacientes con ERC grado 1-2, y en grado 3 siempre y cuando los niveles séricos de PTH fueran normales y hubiese osteoporosis o un riesgo elevado de fractura (96). En el resto de grados se desaconsejaba su uso en pacientes sin biopsia ósea por su asociación con daño renal, proteinuria y el riesgo de suprimir remodelado óseo en pacientes con enfermedad ósea adinámica no diagnosticada (102). Sin embargo aún no hay disponibles ensayos clínicos que evalúen la eficacia de los bifosfonatos en esta población, si bien si se han publicado varios estudios en pacientes con ERC grados 3-4 sin alteraciones metabólicas con resultados favorables(103, 104).

Aunque se han descrito efectos adversos renales con Denosumab, el hecho de que no tenga aclaramiento renal hace que sea un buen candidato de tratamiento en estos pacientes, y así lo han avalado varios estudios realizados

en pacientes con ERC(105). Se debe tener precaución en pacientes con elevado recambio óseo por el riesgo de producir hipocalcemia severa(106).

No hay estudios realizados en pacientes con ERC y tratamiento con Teriparatide.

Las mujeres con ERC presentan menopausia precoz en comparación con las mujeres de la población general. El tratamiento con moduladores de los receptores estrogénicos, y en concreto raloxifeno, ha demostrado aumentar la DMO en mujeres postmenopáusicas y en mujeres con ERC además de disminuir el riesgo cardiovascular (107).

3.5 Enfermedad mineral ósea y osteoporosis asociado al trasplante renal

Los trasplantes de órgano sólido se han convertido en un tratamiento efectivo para las enfermedades terminales de varios órganos y también en la enfermedad renal crónica terminal. Los avances en los últimos años han permitido mejoras importantes en la técnica quirúrgica y en la medicación inmunosupresora. Sin embargo, la mejoría en la supervivencia se ha visto acompañada de algunas complicaciones, y entre las más importantes se encuentran la osteoporosis y las fracturas osteoporóticas.

Es en los primeros 6 meses tras el trasplante en los que los pacientes presentan el mayor riesgo de fractura. La DMO desciende una media de entre un 5.5% y 19.5% (108) en estos primeros seis meses y entre un 2.6% y un 8.2% en los siguientes 6 meses hasta el año, y desciende hasta 0.4%-4.5% después de un año, manteniéndose estable posteriormente (109). La prevalencia de osteopenia tras el trasplante renal se encuentra en torno al 25-35%, mientras que la de osteoporosis es de 8-28% (110, 111). El mecanismo fisiopatológico de este fenómeno se basa en una formación y mineralización ósea disminuidas acompañado de una resorción ósea persistente. En el pre-trasplante, se debe principalmente a una pérdida de hueso cortical por el hiperparatiroidismo secundario. Tras la recuperación de la función renal en el TR, se restituye la capacidad de sintetizar 1,25 VD y de responder a la hiperfosfatemia con la excreción urinaria de fósforo, solucionándose por tanto el desbalance que dio lugar inicialmente al hiperparatiroidismo secundario en la

ERC. Sin embargo, estas correcciones metabólicas no siempre resultan en una normalización de la PTH, y el hiperparatiroidismo persistente postrasplante es un fenómeno frecuente, que se produce hasta en un tercio de pacientes con TR a los 12 meses pos-trasplante y en un 20% cinco años tras el mismo, incluso en los que alcanzan buena función renal (112). A pesar de este fenómeno, en el post-trasplante la pérdida de hueso es principalmente trabecular, y se atribuye sobre todo al tratamiento inmunosupresor, en especial con glucocorticoides (113).

Tratamiento Inmunosupresor

Glucocorticoides (GC): Su uso está asociado a pérdida de hueso, principalmente trabecular y riesgo de fractura. Los pacientes trasplantados reciben dosis altas de corticoides en el periodo inicial post-trasplante, que posteriormente se van reduciendo gradualmente, y la pérdida inicial de DMO se atribuye fundamentalmente a este tratamiento (114). Los mecanismos por los que los GC tienen un efecto deletéreo en el hueso son tanto directos como indirectos. Por un parte los GC tienen un efecto sobre los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos (115). Varios estudios han encontrado en las células estromales y de los osteoblastos un cambio en la ratio del ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B, más conocido como RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand) y la osteoprotegerina (OPG), que induce la osteoclastogénesis y resulta en una resorción ósea aumentada (116). Otros estudios sugieren que los GC potencian CSF-1, una citoquina encargada de la supervivencia de los osteoclastos, de forma que potenciaría consecuentemente la resorción ósea. Por otra parte, se han identificado varios mecanismos encargados de la supresión de la diferenciación de los osteoblastos y su apoptosis, como la supresión por parte de los GC de la vía señalización de Wnt/ β -catenina y la proteína ósea morfogenética (BMP-2) (117). El efecto indirecto que tienen los GC sobre el hueso incluye la reducción de la absorción intestinal de calcio, la reducción de la excreción de hormona del crecimiento y de los estrógenos y andrógenos (118).

Inhibidores de Calcineurina; Ciclosporina y Tacrolimus. Este grupo de inmunosupresores limitan la función de los linfocitos T a través de la supresión de genes reguladores que codifican proteínas como: IL-2, receptor de IL, y protooncogenes como H-ras y c-myc (119). Varios estudios han confirmado la pérdida de DMO tras el uso de Ciclosporina (mayor que con Tacrolimus), si bien el mecanismo por el que se produce no está bien esclarecido. Tacrolimus también es responsable de la pérdida de DMO, se cree que es debido a un desequilibrio en el sistema RANK/RANKL/OPG resultando en un predominio de resorción ósea sobre la formación ósea (120).

Inhibidores de la vía mTOR (imTOR): Sirolimus y Everolimus. Ambos tienen una función antiproliferativa y antiangiogénica, y por ellos interfieren el metabolismo óseo. Sin embargo, varios estudios sugieren que este grupo de inmunosupresores tiene un efecto sobre el hueso menos dañino que el ejercido por los inhibidores de calcineurina, e incluso que Everolimus puede tener un papel protector al reducir la resorción ósea (120).

Otros inmunosupresores: MMF y Azatioprina: No hay muchos estudios que hayan analizados el efecto de estos inmunosupresores sobre el hueso; en modelos animales no se objetivaron efectos adversos sobre el tejido óseo.

La tasa de fractura de los pacientes con TR es de alrededor de un 11%, pero aumenta en la población de trasplantados diabéticos, siendo además las fracturas principalmente apendiculares (cadera, pie, tobillo). Esto supone un riesgo aumentado de más de 3 veces con respecto al resto de la población (121). Este riesgo se mantiene hasta 10 años tras el trasplante, sugiriendo una fragilidad ósea a pesar de la mejoría de los parámetros metabólicos (122). Entre los factores de riesgo de fractura se encuentra la edad, raza blanca, diálisis previa y fractura previa al trasplante (123). Otro estudio longitudinal encontró que el hiperparatiroidismo persistente era un factor de riesgo independiente (124). Los trasplantados renales que presentan una fractura tienen una evolución desfavorable con un riesgo de mortalidad 60% mayor que la población general (125).

Es por ello que es de gran importancia realizar una correcta evaluación pre y post trasplante. Se recomienda en el pre-trasplante la realización de DXA de forma rutinaria, en cadera y columna lumbar, así como radiografía de columna para detectar las fracturas prevalentes. Solo existe hasta la fecha un estudio que valora la microarquitectura ósea en estos pacientes mediante microindentación por impacto (100). Las alteraciones metabólicas como el déficit de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario o hipogonadismo deben ser corregidas siempre y cuando sea posible. Los pacientes deben recibir suplementación de calcio y vitamina D. Se debe además alentar a estos pacientes al abandono del hábito tabáquico, enólico o una vida sedentaria.

En el caso del post-trasplante, y en la medida de lo posible, es aconsejable prescribir los GC el menor tiempo posible y a la dosis más baja, ya que son el principal motivo de las alteraciones óseas descritas. Se recomienda continuar la suplementación con vitamina D, ya que varios estudios han demostrado la propensión de esta población a presentar déficit o insuficiencia de vitamina D (126). Otros tratamientos que se valoran en el periodo de post-trasplante son los bisfosfonatos (que encuentran su principal limitación en el grupo de pre-trasplante por su toxicidad renal). El pamidronato, el ibandronato o el risedronato oral previenen la pérdida de DMO y están especialmente recomendados en pacientes con diabetes tipo I, varones por encima de 65 y mujeres por encima de 45 años, ante fracturas óseas de estrés preexistentes y si se realiza inmunosupresión con esteroides a altas dosis (127, 128). Apenas existen estudios para el uso de Calcitonina o Teriparatide en estos pacientes, mientras que estudios recientes avalan el uso de Denosumab en esta población, ya que aumenta la DMO aunque aumenta también la tasa de infecciones urinarias (129).

4. Microindentación

4.1 Medir la resistencia del hueso

Desde un punto de vista clínico, la resistencia del hueso podría ser definida como la habilidad del hueso para resistir traumatismos sin romperse. En la definición actual de osteoporosis la resistencia del hueso integra la cantidad y la calidad de hueso (130). La cantidad de hueso puede ser medida por diferentes técnicas. La densitometría ósea (DXA) es la más utilizada para el diagnóstico y seguimiento de la osteoporosis. Es un buen predictor de riesgo de fractura, y es capaz de reflejar la influencia de los tratamientos (131, 132).

No obstante, existen otros dos aspectos que contribuyen a la resistencia mecánica del hueso. El primero es la distribución espacial del tejido óseo, bien a nivel macroscópico (geométrico) o a nivel microscópico (microarquitectura); el segundo es la composición del tejido óseo. La distribución espacial del tejido óseo puede ser evaluada por diferentes técnicas, desde una radiografía simple, una tomografía axial computarizada o una resonancia magnética (133, 134). Las estructuras microscópicas se evalúan mejor cuanto mayor es la definición de las imágenes. Los componentes del tejido óseo también son importantes para la resistencia ósea e incluyen una larga lista, como las características del colágeno, la cristalinidad, el grado de mineralización o la homogeneidad del mismo y las proteínas no colágenas (135, 136).

La función ósea mecánica es el resultado final de la integración de la densidad ósea, la micro y macro arquitectura del tejido, así como su composición. En la práctica habitual la única prueba disponible para medir este aspecto es el TBS (Trabecular Bone Score) (137).

Para medir las propiedades mecánicas del hueso de forma directa es necesario aplicar técnicas cruentas en las que una determinada fuerza es aplicada a una muestra de hueso hasta que éste se rompe. Estas técnicas están disponibles solo en unos pocos laboratorios, y es necesario obtener muestras óseas

mediante una intervención quirúrgica, por lo que no es factible en la práctica clínica habitual.

Por esto motivo se desarrolló la denominada indentación por punto de referencia (IPR).

4.2 Técnicas de indentación por punto de referencia

Se han desarrollado dos técnicas hasta la actualidad. Ambas están basadas en el principio que cuánto más penetre la sonda en la superficie de la cortical del hueso, menos resistencia ofrece el hueso a presiones mecánicas. La primera de las técnicas para IPR fue basada en la indentación cíclica, si bien recientemente se ha desarrollado la microindentación por impacto para su uso clínico. Los detalles técnicos de ambas técnicas han sido descritos en varias publicaciones (138).

Los parámetros que se miden en la microindentación cíclica se expresan en términos de distancia de indentación, si bien se pueden calcular otros parámetros (139). Los parámetros de la microindentación por impacto se expresan como unidades de Bone Material Strength index (BMSi) o índice de Fuerza Mineral Ósea (iFMO), en unidades absolutas, y representan el ratio entre la penetración de la sonda en el hueso y su penetración en una placa de metil metacrilato de referencia (140). Los detalles técnicos han sido publicados recientemente (141).

4.2 Estudios realizados con indentación cíclica (142)

A continuación, se muestran los estudios realizados indentación cíclica.

Study authors and year	Study design	Study population	Outcomes
Díez-Pérez A, et al. <i>J Bone Miner Res</i> 2010;25:1877–85.	Series of cases and controls.	27 women with osteoporosis-related fractures and 8 controls of comparable ages	Measured Total Indentation Distance and Indentation Distance Increase were significantly greater in fracture patients than in controls. Areas under the receiver operating characteristic curve for the two measurements were above 90%.
Güerri-Fernandez R, et al. <i>J Bone Miner Res</i> 2013;28:162–8.	Series of cases and controls.	Four groups of patients ($n = 70$): 6 atypical femoral fractures, 38 typical osteoporotic fractures, 6 taking long-term bisphosphonates, and 20 controls without fracture	After adjusting by age, significant differences were observed between controls and typical and atypical fractures for Total Indentation Distance and for Indentation Distance Increase.

4.2 Estudios realizados con microindentación por impacto (142)

En la tabla se muestran los estudios realizados con microindentación por impacto.

Study authors and year	Microindentator used	Study design	Study population	Outcomes
Farr JN et al. <i>J Bone Miner Res</i> . 2014 Apr;29(4):787–95		Series of cases and controls.	60 postmenopausal women including 30 patients diagnosed with T2D for > 10 years and 30 age-matched, nondiabetic controls	T2D patients had significantly lower BMS, adjusted $p = 0.022$. In patients with T2D, the average glycated hemoglobin level over the previous 10 years was negatively correlated with BMS ($r = -0.41$; $p = 0.026$)
Duarte Sosa D, et al. <i>J Bone Miner Res</i> 2014;30:1784–9	Impact microindentation	Series of cases and controls??	42 Norwegian and 46 Spanish women with normal BMD values, without vertebral fractures or secondary osteoporosis. 88	BMSi value of Norwegian women was significantly inferior when compared to Spanish women $p < 0.001$
Malgo F, et al. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> 2015;100:2039–45	Impact microindentation	Cross-sectional study	90 patients with low bone mass with or without a fragility fracture. Sixty-three patients had sustained one or more fragility fractures.	BMS values were lower in patients with a fragility fracture compared with nonfracture patients ($p = 0.032$) despite similar BMD. In patients with osteopenia, BMS was significantly lower in fracture patients than in nonfracture $p = 0.015$
Mellibovsky L, et al. <i>J Bone Miner Res</i> 2015;30:1651–6.	Impact microindentation	Series of cases	52 consecutive cases were included in the study within 4 weeks of initiating glucocorticoid treatment. 19 patients received treatment with calcium plus 25 (OH) vitamin D; 14 risedronate; 14 denosumab; and 5 received teriparatide.	Changes in cortical bone indentation properties, at the tissue level, can be tracked longitudinally using the Reference Point Indentation technique in patients exposed to systemic glucocorticoid treatment. These changes occur very early (within the first few weeks) after starting glucocorticoids, well before BMD imaging by DXA can detect any alteration.
Güerri-Fernandez R, et al. <i>J AIDS</i> . 2016 Jul 1;72(3):314–8	Impact microindentation	Series of cases and controls.	50 infected with HIV and 35 controls. 85	HIV infection is associated with bone damage, independently of BMD. $p < 0.001$
Sundh D, et al. <i>J Bone Miner Res</i> 2016;31:749–57	Impact microindentation	Series of cases	202 women, bone parameters and subcutaneous fat were measured at the tibia	BMSi was inversely correlated to body mass index (BMI) ($r = -0.17$, $p = 0.01$), whole body fat mass ($r = -0.16$, $p = 0.02$), and, in particular, to tibia s.c. fat ($r = -0.33$, $p < 0.001$).
Aasarød KM et al. <i>Scand J Gastroenterol</i> 2016 Feb 8	Impact microindentation	Cross-sectional study	17 chronic atrophic gastritis 41 sex- and age-matched controls. 58	Lower lumbar BMD, increased frequency of osteopenia and osteoporosis in male, but not female patients with CAG. BMS did not differ between the groups.
Pérez-Sáez MJ et al. <i>Transplantation</i> 2016. Pub ahead of print	Impact microindentation	Series of cases and controls.	40 long-term after kidney transplant and 94 sex-age matched controls. 134	BMD was lower at lumbar spine ($p = 0.025$), total hip ($p < 0.001$) and femoral neck ($p < 0.001$) in KTR than in controls. BMSi was also lower in KTR ($p = 0.012$) although this difference disappeared after adjusted model by age, gender and body mass index ($p = 0.145$).
Duarte Sosa D, et al. <i>Acta Orthop</i> . 2016 Jun 20:1–6.	Impact microindentation	Series of cases and controls.	30 women with previous stress fractures and in 30 normal controls. 60?	BMSi was inferior in patients with previous stress fracture, but was unrelated to BMD and bone turnover. $p = 0.02$
Rudäng R et al. <i>Osteoporosis int</i> 2016 APR; 27(4): 1585–92	Impact microindentation	Cohort	211 older women	BMSi was positively associated with aBMD of the total hip ($\beta = 0.14$, $p = 0.04$), non-dominant radius ($\beta = 0.17$, $p = 0.02$), and lumbar spine (L1–L4) ($\beta = 0.14$, $p < 0.05$). No association in crude or adjusted BMSi with prevalent fractures.
Malgo F et al. abstract al ENDO2016, Boston, Massachusetts	Impact microindentation	Cross-sectional study	32 well-controlled acromegalic patients and 32 age-matched controls. 64	Adjusted for BMI, LS BMD was not significantly different between acromegaly patients and controls, but BMSi was lower than in controls $p = 0.004$
Furst JR et al. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> 2016 JUN;101(6):2502–10.	Impact microindentation	Cross-sectional study	16 postmenopausal women with T2D and 19 matched controls. 35	BMSi was reduced by 9.2% in T2D ($p = 0.02$) and was inversely associated with the duration of T2D ($r = -0.68$, $P = 0.004$). Increased SAF was associated with reduced BMSi ($r = -0.65$, $p = 0.006$) and lower bone formation marker procollagen type 1 amino-terminal propeptide ($r = -0.63$, $p = 0.01$) in T2D, whereas no associations were seen in controls

5. Proyectos que constituyen la presente tesis

5.1. Assessment of Bone Health in Patients with Type 1 Gaucher Disease Using Impact Microindentation

Hipótesis de trabajo

El análisis de la literatura de estudio de la EG y su afectación ósea nos permitió concluir que la enfermedad ósea es uno de los principales problemas de morbilidad en estos pacientes. La terapia de sustitución enzimática es capaz de mejorar estas alteraciones muy lentamente, tardando años, si bien algunas lesiones son irreversibles. El quantitative chemical shift es la mejor técnica para medir el grado de infiltración que presentan estos pacientes, sin embargo, tan solo está disponible en unos pocos centros dado su elevado coste y complejidad. Se utiliza de forma rutinaria la DXA, que solo ofrece una evaluación parcial de la enfermedad ósea.

Nuestra hipótesis de trabajo se fundamentó en la evaluación integral no invasiva de la enfermedad ósea de pacientes con EG, atendiendo a todos los aspectos que conforman la resistencia ósea y evaluando las características mecánicas mediante microindentación de impacto.

Objetivos

1) Establecer el estado de la enfermedad mineral ósea en los pacientes con EG tipo 1 de una forma integral, atendiendo a:

- a. la cantidad ósea medida por DMO mediante DXA.
- b. la microarquitectura ósea medida por el score trabecular óseo.

- c. los marcadores de recambio óseo
- d. las propiedades mecánicas del hueso mediante la indentación ósea.

2) Testar la microindentación ósea como técnica diagnóstica en estos pacientes.

Material y métodos

Estudio transversal de pacientes con EF tipo 1 que fueron apareados con controles sanos por edad y sexo.

Participantes

Los candidatos fueron elegidos de centros médicos de la comunidad autónoma de Cataluña que atienden pacientes con EG. Los pacientes fueron reclutados entre julio de 2015 y enero de 2016, fueron contactados a través de su médico responsable e invitados a participar. Los criterios de inclusión comprendían: diagnóstico de EG tipo 1, edad mayor o igual a 18 años y firma del consentimiento informado. El comité ético de nuestro centro aprobó el protocolo de estudio. Se excluyeron todos aquellos pacientes que presentaran: cáncer activo, enfermedad crónica avanzada, u otra enfermedad que pudiera afectar la salud ósea (enfermedad hepática o renal crónica, enfermedad tiroidea o paratiroidea, tratamiento con glucocorticoides, artritis reumatoide, malabsorción crónica o inmovilización). Los pacientes que presentaban lesiones focales en la tibia (ej: infartos óseos o necrosis avascular) en las pruebas de imagen también fueron excluidos.

Grupo Control

Se reclutaron voluntarios sanos como controles (sin historia de fracturas, uso de fármacos con acción sobre el hueso o algún tipo de enfermedad ósea) de nuestra base de datos de referencia para microindentación. Se realizó a todos los controles microindentación de impacto y una densitometría como se

describe en los siguientes apartados; además de recoger información demográfica (edad, sexo, altura y peso).

VARIABLES DE ESTUDIO

Se recogieron los siguientes parámetros de los pacientes con EG tipo 1: edad, sexo, peso, altura, concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas, niveles séricos de QT, edad en el momento de diagnóstico, años desde el diagnóstico, índice de severidad en el momento de la inclusión (usando el índice de severidad de Zimran, SSI(79)). El tipo y la duración del tratamiento recibido, esplenectomía previa, necrosis avascular, presencia de lesiones focales óseas o nódulos esplénicos en resonancias magnéticas también se recogieron como variables.

Se midieron los marcadores de recambio óseo tras 8 horas de ayuno por el laboratorio Nordic Bioscience. Se realizaron los siguientes marcadores en plasma mediante inmunoensayo por electroluminiscencia (Elecsys 2010®, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany): procolágeno tipo 1 N propeptide (P1PN) y telopeptido C-terminal (CTX-I).

DENSIDAD MINERAL ÓSEA

Se midió la densidad mineral ósea en cadera y columna lumbar en todos los pacientes y controles mediante densitometría (Hologic QDR 4500 SR, Hologic, Inc., Bedford, MA, USA).

MICROINDENTACIÓN DE IMPACTO

Se siguió el recientemente publicado protocolo de microindentación (141), mediante el uso del microindentador Osteoprobe® (Active Life Scientific, Santa Barbara, CA) para producir una indentación microscópica en la cara anterior de la tibia. En resumen, tras desinfectar la piel y administrar anestesia local, se penetra la piel con una sonda con un extremo cónico de 10 µm hasta alcanzar la superficie ósea. El operador está encargado de accionar la parte móvil del dispositivo, manteniendo el mismo perpendicular a la superficie hasta que se alcanza la superficie ósea. Esto genera una fuerza previa de 10N hasta

que un sistema gatillo se desencadena a alta velocidad generando una fuerza de 30N que realiza una indentación microscópica en el córtex de la tibia. La distancia de indentación se recoge en un sistema computarizado. En cada individuo se realizan 8 indentaciones separadas por 2mm en dos líneas paralelas al eje de la tibia, de modo que en cada línea se realizan 4 indentaciones. Los valores extremos son identificados por el software y se excluyen del análisis tras haber completado al menos 3-4 indentaciones.

Aunque es infrecuente, cuando el operador percibe una textura anormal en el hueso indentado (eg. tipo corcho o material porexpan) se excluye la medición. Tras realizar 8 mediciones válidas, el operador realiza 5 más en un bloque de polimetilmetacrilato BMSi-100 que se utiliza como material calibrador. Las unidades de indentación son expresadas como Índice de Fuerza Ósea (iFMO o BMSi por sus siglas en inglés), y se define como 100 veces la ratio de la distancia de indentación del impacto al material de calibración, dividido por la distancia de indentación del impacto al hueso. El procedimiento es indoloro, lleva aproximadamente 3 minutos y no contempla complicaciones. Las únicas contraindicaciones que existen son problemas locales como infección de la piel o tejido celular subcutáneo; o la presencia de edema o gran panículo adiposo pretibial que impidan alcanzar la superficie ósea.

Análisis estadístico

Las variables continuas fueron representadas como media y desviación estándar (DE). Se calculó la Hazard ratio (HR) para valorar las diferencias en las variables sociodemográficas entre los casos y los controles. El análisis de covarianza le utilizó para comparar las medias ajustadas por edad, sexo, peso y altura. Un valor de p menor de 0.05 se consideró para indicar resultados significativos. Todos los valores de p son bilaterales. El análisis se realizó utilizando SPSS para Windows, versión 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Resultados

Todos los pacientes de la comunidad autónoma de Cataluña diagnosticados con EG tipo 1 (40) fueron invitados a participar en el estudio, de los cuales 17 (42,5%) firmaron el consentimiento informado. Se excluyó un paciente por presentar lesiones focales en la tibia, según las imágenes de la resonancia magnética. Las características de los 16 pacientes incluidos se muestran en la Tabla 1.

Entre los sujetos estudiados había 7 hombres (43.7%) y 9 (56.3%) mujeres, con una edad media de 51.31 (DE14.4) años (rango 21-69), peso 71 Kg (DE 12.0) y altura 165.9 cm (DE 9.1). Todos los pacientes a excepción de 4 estaban en tratamiento con terapia de sustitución enzimática durante el periodo de estudio, con una media de 10.5 (rango 0.25-19) años de tratamiento y 21 (DE 16.4) años desde el diagnóstico. Dos pacientes no habían recibido tratamiento en ninguna ocasión. La concentración media de hemoglobina era de 14.1g/dL (rango 10.1-16.4), recuento de plaquetas 148,692 (rango 63.000-260.000), y SSI Zimran 6.46 (rango 1-16). Los niveles medios plasmáticos de QT 1,775.7 (rango 35-3770). Tres pacientes (18.8%) estaban esplenectomizados, 3 (18.8%) presentaban nódulos viscerales, y 2 (12.6%) presentaban necrosis avascular.

El iFMO fue 72.74 (DE 9.98), 74.8 (DE 9.33) para hombres y 71.1 (DE 10.7) para mujeres. La DMO lumbar media fue 0.896 g/cm² (0.997 g/cm² para hombres y 0.808 g/cm² para mujeres) y DMO media en cadera de 0.717 g/cm² (0.812 g/cm² y 0.655 g/cm², respectivamente). De acuerdo con el T score lumbar, 10 pacientes (62.5%) tenían osteopenia, 1 (6.25%) tenía osteoporosis (6.25%), y 4 (25%) tenían una DMO normal. No había historia de fracturas en este grupo.

Se compararon los 16 pacientes con EG tipo 1 con 29 controles apareados por edad y sexo; de los cuales (17.2%) eran hombres y 24 (82.8%) mujeres; edad media de 48 (DE 12.1) años (rango 20-69). Los resultados del análisis univariado están resumidos en la Tabla 2a, mostrando valores de iFMO significativamente menores en pacientes con EG1 que en los controles. Las diferencias se mantuvieron tras ajustar por edad, sexo, peso y altura (Table

2b): los pacientes con EG tipo 1 tenían un iFMO significativamente menor comparado con los controles (beta ajustado -9.30 [95%CI -15.18 to -3.42]; $p = 0.004$). De la misma forma que el análisis multivariado no atenuó la disminución en la DMO observada en pacientes con EG tipo 1 en ambos lugares donde fue medida: lumbar (beta ajustada -0.14 [95%CI -0.22 to -0.06]; $p = 0.002$) y cadera (beta ajustada -0.09 [95%CI -0.15 to -0.03]; $p = 0.006$) (Figura 2a and 2b).

Se encontró una correlación linear negativa con los niveles de QT en pacientes con EG tipo 1 e iFMO (R^2 51.6%): edad-, sexo-, peso-, y altura-beta ajustados -0.004 [95%CI -0.007 to -0.002]; $p = 0.005$ (Figura 1). Esta diferencia se mantuvo tras ajustar por DMO ($p = 0.01$). De la misma forma, los pacientes con EG tipo 1 y niveles elevados de QT tenían DMO en cadera significativamente menor (beta ajustada 0.00005 [-0.00010 to -0.00008], $p = 0.027$), aunque no para DMO lumbar (beta ajustada -0.00001 [-0.00003 to 0.00001], $p = 0.27$). No se encontraron diferencias entre pacientes y controles en los niveles de P1NP ($p = 0.471$) ni CTX-I ($p = 0.286$).

No se encontraron diferencias en el iFMO, DMO lumbar o DMO de cadera en pacientes que habían recibido tratamiento comparado con los que no habían recibido, aunque si encontró una asociación entre TSE con un iFMO más elevado (74.45 vs 60.75, respectivamente; $p = 0.67$); el pequeño tamaño muestral limita el poder estadístico de este análisis. La severidad de la enfermedad o el número de años desde el diagnóstico no se asociaron a diferencias significativas en iFMO, DMO lumbar o DMO de cadera.

5.2. Bone density, microarchitecture and material strength in chronic kidney disease patients at the time of kidney transplantation

Hipótesis de trabajo

En el periodo post-trasplante, la enfermedad mineral ósea sufre grandes

cambios, con un reajuste de los parámetros del hiperparatiroidismo secundario y un descenso inicial en la DMO, hasta en un 20% en los primeros 6 meses, con una posterior estabilización (108, 143). De esta forma, los pacientes con trasplante renal presentan un riesgo elevado de fractura en los primeros años tras el trasplante, sobre todo cuando se administran la mayor dosis de corticosteroides (125).

Para poder prevenir estas fracturas, predecir qué población está en riesgo es uno de los puntos clave. La valoración ósea en los candidatos a trasplante se realiza habitualmente con DXA (144, 145). Para mejorar esta valoración otras técnicas han sido desarrolladas: TBS, que ya ha sido aplicado a pacientes en hemodiálisis (146-148).

Nuestra hipótesis de trabajo se fundamentó en la evaluación integral no invasiva de la enfermedad ósea de pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) en el momento del trasplante renal, atendiendo a todos los aspectos que conforman la resistencia ósea y evaluando las características mecánicas mediante microindentación de impacto.

Objetivos

1) Establecer el estado de la enfermedad mineral ósea en los pacientes con enfermedad renal crónica en el momento del trasplante renal de una forma integral, atendiendo a:

- a. la cantidad ósea medida por DMO mediante DXA.
- b. la microarquitectura ósea medida por el score trabecular óseo.
- c. las propiedades mecánicas del hueso mediante la indentación ósea.

2) Testar la microindentación ósea como técnica diagnóstica en estos pacientes.

Material y métodos

Estudio transversal en pacientes con enfermedad renal crónica reclutados entre julio de 2012 y febrero de 2014 tras su ingreso para ser intervenidos de trasplante renal. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes y el Comité de Ética de nuestro centro aprobó el protocolo del estudio.

Se realizó una historia clínica completa, exploración física y examen sanguíneo; incluyendo niveles de (PTH) intacta (*electrochemiluminescence, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany*) y 25-OH vitamina D (25[OH]D) (*ELISA, IDS, Boldon, UK*), que fueron realizados en las horas previas al trasplante renal. Los resultados de iPTH y 25[OH]D están expresados como medianas y rango intercuartil [IQR].

La evaluación de la salud ósea incluyó radiografía (anteroposterior y lateral), DXA y microindentación ósea, y se realizaron en la primera semana post-trasplante. Las radiografías de columna fueron informadas por dos observadores independientes utilizando el método semicuantitativo de Genant (149), siendo aceptado el grado I o mayor (pérdida de más del 20% de la altura vertebral) para fractura. Las discordancias se resolvieron por consenso. La DMO se midió en la columna lumbar y cadera (Hologic QDR 4500 SL[®] (*Hologic Inc. Bedford, MA, USA*)).

El TBS basado en DXA se realizó usando las mismas mediciones de DMO lumbar con iNsight[®] v 2.1 (*Med.Imaps, Merignac, France*). La microindentación ósea se realizó en la cara anterior de la tibia con un dispositivo manual de indentación, el Osteoprobe[®] (*Active Life Scientific, Santa Barbara, CA, USA*) según las instrucciones del reciente protocolo (141). Tras la administración de la anestesia local, una precarga de 10 N seguida de una indentación de 30N de fuerza es aplicada con un dispositivo con una cabeza cónica. La media de los 8 valores obtenidos se calcula a través de un algoritmo computerizado. Se realizan 5 indentaciones de calibración en un bloque de metacrilato (BMSi-100 Reference Material). La ratio entre los valores encontrados en la tibia y el material de referencia es el resultado del índice fuerza mineral ósea (iFMO) (139).

Los resultados se compararon con un grupo de controles sanos seleccionados de nuestra base de referencia para microindentación. Los controles carecían de enfermedades ósea, artritis reumatoide, enfermedades metabólicas o endocrinas, tratamiento actual o previo con bifosfonatos, corticoides orales u otra medicación activa contra el hueso.

El análisis estadístico se realizó con SPSS v 22.0 (IBM®) usando el test de T de Student para variables paramétricas y el test U Mann-Whitney para variables no paramétricas. Se realizaron modelos de regresión lineal multivariable para valorar la asociación entre ERC y DMO, TBS e iFMO tras ajuste por edad, sexo e IMC. También se analizó la asociación entre fractura en el momento del trasplante y DMO, TBS e iFMO.

Resultados

Pacientes

Se incluyeron 53 pacientes en el estudio. Edad media 55.8 ± 12.1 años, con 77.8% de pacientes de raza caucásica, y 53.7% mujeres. IMC medio de 27.5 ± 5.7 kg/m² con 25.9% de diabéticos. Se trataba del primer trasplante para el 90.74% con un tiempo medio en diálisis de 21 meses [IQR 11-36].

Se compararon los pacientes con 94 controles sanos, con una edad media de 50.2 ± 16 años, 78.7% de mujeres e IMC 24.8 ± 4 kg/m². (Tabla suplementaria S1).

Análisis de laboratorio

Previo al trasplante los pacientes presentaban unos niveles de calcio sérico de media 9.6 ± 0.7 mg/dl (corregidos por albúmina sérica), fósforo 4.4 ± 1.2 mg/dl, 25[OH]D $7.9 [3.1-16.7]$ ng/ml y iPTH $214 [102-390]$ pg/ml. Para alcanzar este control del hiperparatiroidismo estaban en tratamiento con ligando de fósforo, 28% vitamina D nativa, 17% vitamina D activa, 22% análogos de vitamina D y 32% calcimiméticos.

Análisis óseo

Los estudios óseos se realizaron de media 8 días [IQR 6-16] tras el trasplante. Catorce pacientes (26.4%) presentaban fracturas prevalentes asintomáticas en la radiografía de columna en el momento del trasplante. Los niveles medios basales de DMO eran de $0.966 \text{ g/cm}^2 \pm 0.15$ (lumbar), $0.852 \text{ g/cm}^2 \pm 0.15$ (cadera) y $0.733 \text{ g/cm}^2 \pm 0.15$ (cuello femoral). La media del TBS fue de 1.20 [IQR 1.11-1.3]. La microindentación se realizó en 35 de los 53 candidatos, con un valor medio de iFMO de [IQR 71.8-84.2].

Los resultados de pacientes y controles están reflejados en la Tabla 1. DXA se realizó en 77 controles. Los controles presentaban mejor DMO en columna lumbar, cadera y cuello femoral tras ajuste por edad, IMC y sexo, así como un mejor score Z tras ajuste por IMC. Se encontraron también valores más elevados de iFMO y TBS en el análisis univariado que se mantuvieron tras ajustar.

Dado el riesgo aumentado de fractura y el valor absoluto claramente menor de DMO en mujeres y hombres, se hizo un análisis separado según el sexo. Encontramos valores similares de DMO en cadera y de iFMO en pacientes con ERC independientemente del sexo (Tablas suplementarias S2 y S3).

Comparamos los parámetros óseos entre pacientes que presentaban fracturas asintomáticas pre-existentes en el momento del trasplante con los pacientes sin fracturas. La DMO, TBS e iFMO fue similar en ambos subgrupos (Tabla suplementaria S4). Estos resultados se mantuvieron tras excluir los pacientes diabéticos (Tabla suplementaria S5). Por otra parte, los pacientes que habían estado en diálisis durante mayor tiempo presentaban niveles más elevados de PTH con un impacto negativo en la DMO sin alterar el TBS ni el iFMO (Tabla suplementaria S6 y S7). Por último, no encontramos diferencias tras el ajuste por edad, sexo e IMC según el tratamiento previo que habían recibido los pacientes con vitamin D, paricalcitol o cinacalcet.

6. Discusión

En la presente tesis se estudian dos enfermedades poco frecuentes, con una alta prevalencia de enfermedad ósea y un alto impacto en la morbilidad de los pacientes; realizando un estudio exhaustivo de la salud ósea, con técnicas diagnósticas que van más allá de las clásicamente aplicadas, ya que éstas pueden no determinar correctamente la resistencia ósea de los pacientes con trasplante renal o con enfermedad de Gaucher y el consecuente riesgo de fractura.

6.1. Evaluación ósea en los pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 usando microindentación de impacto

En el primer estudio, abordamos el tema del estudio de calidad ósea en pacientes con EG tipo 1. La literatura carece de ninguna descripción in vivo de las propiedades biomecánicas del tejido óseo en este grupo de pacientes. Encontramos que los pacientes con EG1 presentaban un iFMO significativamente menor comparado con controles apareados. Estos resultados son especialmente importantes ya que estos pacientes tienen una alta prevalencia de enfermedad ósea, siendo una de las principales causas de morbilidad (48), a pesar de que a menudo son asintomáticas (150). Tras ajustar por edad, sexo, peso, altura y DMO lumbar persistía un deterioro significativo de las características mecánicas del hueso comparado con los controles apareados.

Nuestros pacientes demostraron ser en general demográficamente parecidos a la cohorte española publicada (151), siendo nuestra serie de edad algo mayor (51.31 ± 14.4 años comparada con 44.8 ± 16.6) con un 43% de hombres en nuestro grupo, comparado con un 53% en la cohorte española y TSE prescrita para el 75% en nuestra serie, comparado con 72% de la suya. En la cohorte española, el 36% de los pacientes presentaban osteopenia u osteoporosis, mientras que en nuestro grupo un 62% presentaba osteopenia y un 6% osteoporosis. Esta diferencia podría explicarse ya que la cohorte española no contaba con datos de DMO de un 31% de sus pacientes, y

también porque nuestra cohorte contaba con más mujeres, y era en general más añosa. Nuestro porcentaje de osteopenia está en concordancia con los datos publicados por otros grupos: Stirnemann et al reportaron un 57% de osteopenia (58), Drugan et al un 46% con osteopenia u osteoporosis (55) y Fiore et al un 83% de osteopenia u osteoporosis en sus series (152).

Se puede detectar en fases tempranas de la enfermedad una densidad mineral ósea disminuida, y aunque estos cambios se desarrollan durante la adolescencia, también ha sido evidenciados en la infancia (67). Aquellos pacientes que no alcanzan el pico de masa ósea o presentan una DMO disminuida tienen un mayor riesgo de fracturas (153). La TSE ha demostrado mejorar las alteraciones viscerales y de una forma más lenta también las óseas, contribuyendo al aumento de la DMO, reducción del número de crisis óseas y dolor óseo (154). La mitad de los pacientes de nuestra serie presentaban osteopenia independientemente del tratamiento recibido. Nuestros pacientes con EG1 tenían un iFMO significativamente menor que los controles. Es pronto para determinar si este hallazgo se traduce en un riesgo aumentado de fractura, ya que no se han publicado aun valores de referencia internacionales. No obstante, el valor medio de iFMO de nuestros pacientes es menor que aquellos con fracturas de fragilidad (155) o fracturas de estrés (156) de otros estudios realizados con la misma técnica. En la práctica clínica habitual no se utilizan marcadores de recambio óseo, ya que los estudios realizados hasta la fecha han obtenido resultados inconsistentes (55) (59). En nuestra serie, los marcadores de recambio óseo estaban en el rango de la normalidad, sin diferencias con los controles. La DXA está recomendada para la evaluación ósea de pacientes con EG1, así como la RMN y el quantitative chemical shift imaging, sin embargo todas estas técnicas tienen limitaciones (157). La DXA refleja solo la cantidad de material y puede estar alterada por lesiones degenerativas de la columna o por prótesis de cadera, mientras que la RMN y el quantitative chemical shift imaging no están disponibles de forma generalizada.

La fuerza ósea tiene 3 componentes: DMO, geometría/microarquitectura y propiedades tisulares. La microindentación por impacto es una nueva herramienta que mide aspectos claves de las propiedades tisulares. Se

encuentra disponible para uso clínico, permitiendo mediciones in vivo de las propiedades mecánicas del hueso. Las condiciones únicas de la microindentación por impacto hacen difícil determinar cuáles de las propiedades biomecánicas clásicas se miden con esta técnica. Hay numerosos factores que influyen en la resistencia del hueso a la penetración por la sonda, entre ellas, la orientación del colágeno y los enlaces cruzados, la ratio mineral-matriz, los interfaces interlamelares o el rendimiento posterior, entre otros (141). Varios estudios han explorado el uso de microindentación por impacto en humanos en situaciones donde el iFMO explica el riesgo aumentado de fractura (ej. Fragilidad ósea) de forma más precisa que la DXA. Los estudios donde la DXA fracasa mientras que el iFMO parece explicar, al menos en parte, el riesgo aumentado de fractura: incluyen pacientes con fracturas por fragilidad (139), fracturas femorales atípicas en pacientes en tratamiento con bifosfonatos de larga evolución (158), mujeres con diabetes mellitus tipo 2 (159), pacientes ancianos (160) o en tratamiento con glucocorticoides (161).

Los niveles de QT se correlacionaron inversamente con el iFMO, hallazgo similar al encontrado en pacientes con DM tipo 2, donde los valores de microindentación por impacto estaban inversamente relacionados con los niveles de hemoglobina glicosilada (159) y los productos de glicación avanzada (162). En ambos escenarios las propiedades mecánicas se relacionan con los marcadores fisiopatológicos de la enfermedad. Este hallazgo sugiere fuertemente un deterioro de las propiedades mecánicas del tejido óseo a medida que la enfermedad empeora metabólicamente. Musumeci et al describieron niveles elevados de QT en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis severa, observando una correlación inversa entre la DMO y la QT (163).

La fortaleza de nuestro estudio reside en el hecho de que se ha usado una nueva técnica que ha demostrado ser de utilidad en condiciones donde la DXA ha fracasado a la hora de explicar la fragilidad ósea. Otro punto fuerte ha sido la posibilidad de estudiar 16 individuos con una enfermedad de una prevalencia muy baja, más del 40% de todos los pacientes con EG de nuestra región. Fuimos además muy escrupulosos a la hora de identificar lesiones focales en el hueso y las evitamos a la hora de realizar la técnica de indentación.

No obstante, nuestro estudio cuenta también con algunas limitaciones. Dada la baja prevalencia de la enfermedad nuestra muestra comprende pocos casos, de características heterogéneas y con un amplio rango de edad, por todo ello los resultados pierden fuerza, un hecho muy común en estudios de enfermedades raras. Por otra parte, utilizamos el índice de severidad de Zimran SSI como baremo para la severidad de la enfermedad, cuando habitualmente se utiliza como valoración previa al tratamiento. Por último, con nuestra técnica podemos valorar solamente el compartimiento cortical del hueso, en la tibia, lo que no es necesariamente extrapolable al resto del esqueleto.

6.2. Densidad ósea, microarquitectura y fuerza ósea en pacientes con enfermedad renal crónica en el momento del trasplante

En el segundo estudio nos planteamos analizar el estatus de la salud ósea de una cohorte de pacientes con ERC en el momento del trasplante renal, atendiendo a diferentes características del hueso que contribuyen a la fuerza ósea. Valoramos el estado mineral y óseo utilizando tres técnicas diferentes que miden densidad ósea, microarquitectura trabecular y calidad a nivel tisular. Describimos un importante deterioro en todos estos marcadores de fuerza ósea proporcionando una imagen exhaustiva del impacto de la ERC en el hueso. A pesar de ello el metabolismo calcio/fósforo y los niveles de iPTH estaban relativamente controlados, recalcando la importancia de realizar evaluación ósea pre-operatoria (DXA o si miliar) para identificar los pacientes que están en riesgo de presentar fracturas en el periodo de post-trasplante.

La enfermedad mineral y ósea relacionada con la ERC representa una constelación de alteraciones que puede afectar el sistema vascular y esquelético de los pacientes renales. Los valores analíticos que recomiendan las guías clínicas (96, 143) no son fáciles de alcanzar en esta población. Comparando con otros estudios (144, 148) nuestra cohorte de pacientes con ERC presenta mejores niveles de fósforo y PTH según las recomendaciones de las guías, pero con un déficit significativo de 25[OH]D.

Es frecuente observar una DMO disminuida en pacientes con ERC en pre diálisis (164) y con ERC terminal (144, 148). Las mediciones de la DMO

mediante DXA son entendidas como la evaluación ósea mínima. Sin embargo, en la práctica clínica habitual su realización no es tan frecuente en el manejo de pacientes con ERC, ya que su capacidad para predecir fracturas en esta población no está bien establecida (96). Existen estudios que sugieren un riesgo aumentado de fracturas en los pacientes con ERC que presentan niveles más bajos de DMO (164), si bien tal vez otros factores como la calidad ósea (145) puedan contribuir al aumento de riesgo de fractura (hasta 4,4 veces con respecto a población general) que presentan los pacientes con ERC terminal (165). Hay que añadir las limitaciones que presenta la DXA en ERC, ya que sus medidas pueden estar afectadas por calcificaciones extra-esqueléticas (comunes en esta población), osteomalacia y osteoesclerosis (145). Nuestros pacientes presentaron valores disminuidos de DMO en columna lumbar, cadera y cuello femoral con una alta prevalencia de fracturas asintomáticas, confirmando así el frágil estatus óseo que puede empeorar el periodo de post-trasplante inmediato. Estudios previos describen niveles disminuidos de DMO en cadera y cuello femoral, pero no en el esqueleto axial. Nuestra hipótesis es que algunas características peculiares no identificadas de nuestra serie explicarían este hallazgo.

Más allá, estudios previos habían reportado niveles de TBS por debajo de la normalidad en pacientes en diálisis (148). Nuestro grupo presentó resultados similares de TBS en una cohorte de trasplantados de largo tiempo y controles, demostrando una recuperación completa de sus valores 10 años tras el trasplante (100). No obstante, nuestros pacientes presentaron niveles más bajos de TBS comparado con los controles, indicando daño en la microarquitectura ósea y un potencial elevado riesgo de fracturas tras el trasplante, sobre todo tras la exposición a terapia con corticoides.

El desarrollo de técnicas mínimamente invasivas que mejore la estimación de la fuerza ósea en poblaciones con riesgo aumento de fracturas se ha logrado con la IPR, una técnica novedosa que mide directamente las propiedades mecánicas a un nivel tisular (139, 158). En estudios previos, la IPR ha demostrado su potencial relevancia al estimar la fuerza ósea en varios escenarios clínicos donde la DMO no explica completamente el riesgo aumentado de fractura (139, 155, 159, 161). En pacientes con TR, el IPR ha sido probado en un estudio piloto (100), valorando la aplicabilidad de la técnica.

En nuestra cohorte, los valores de iFMO eran inferiores a los controles, confirmando unas propiedades mecánicas del hueso deterioradas en los pacientes con ERC terminal en el momento del TR. Este estado de hueso dañado se mantuvo a pesar de realizar un análisis de sensibilidad para discriminar otros factores de riesgo de fractura (pacientes con fracturas, mujeres y diabéticos). Los pacientes con mayor tiempo en diálisis y niveles elevados de PTH también se asociaron con una peor DMO.

Nuestro estudio cuenta con varias limitaciones. No se realizaron otros marcadores de recambio ósea aparte de la PTH. El número limitado de sujetos incluidos impidió realizar análisis por subgrupos, que tal vez nos habría ayudado a comprender mejor los mecanismos del deterioro óseo. En cualquier caso, las fracturas suponen una importante morbi-mortalidad. Por lo tanto, una evaluación exhaustiva de la resistencia del hueso a la fractura en la población con ERC, incluyendo microarquitectura y fuerza mecánica tisular con una técnica viable es posible, especialmente en los pacientes que van a ser sometidos a un TR. Obviamente, más estudios longitudinales son necesarios para corroborar la utilidad de estas técnicas en pacientes con ERC.

7. Conclusiones

1. La enfermedad ósea es una de las principales causas de morbilidad en pacientes con EG1 y merece una evaluación y tratamiento adecuados.
2. Un diagnóstico temprano y una valoración completa de la salud ósea son de importancia trascendental, sobre todo por la disponibilidad de la terapia de sustitución enzimática.
3. Las técnicas recomendadas en la actualidad para esta valoración no están disponibles de forma generalizada, o fracasan a la hora de detectar alteraciones tempranas. El uso de microindentación por impacto es viable en este grupo de pacientes.
4. Más allá de la pérdida de DMO, el iFMO está deteriorado en este grupo de pacientes, y se asocia de forma significativa con los niveles de QT, marcador de actividad de la enfermedad.
5. Consideramos que un estudio exhaustivo de la salud ósea puede contribuir a una mejor valoración de la enfermedad y los efectos del tratamiento, y que estos elementos merecen más estudios.
6. Los pacientes con ERC terminal que son sometidos a TR presentan alteración de las propiedades óseas (densidad ósea, microarquitectura trabecular y fuerza tisular) a pesar de controlar su hiperparatiroidismo analítico.
7. Se deberían realizar estudios de la salud ósea para identificar aquellos pacientes que presentan un riesgo elevado de fractura independientemente de sus valores analíticos o densitométricos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ginzburg L, Kacher Y, Futerman AH. The pathogenesis of glycosphingolipid storage disorders. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15(4):417-31.
2. Gaucher PCE. De l'épithélioma primitif de la rate. 1882;Faculté de Médecine de Paris.
3. Brill NF MM, Libman E. Primary splenomegaly-Gaucher type. Report on one of four cases occurring in a single generation in one family. . *Am J Med Sci* . 1905;129:491–504.
4. Filocamo M, Mazzotti R, Stroppiano M, Seri M, Giona F, Parenti G, et al. Analysis of the glucocerebrosidase gene and mutation profile in 144 Italian gaucher patients. *Hum Mutat.* 2002;20(3):234-5.
5. Grabowski GA. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet.* 2008;372(9645):1263-71.
6. Grabowski GA. Gaucher disease: gene frequencies and genotype/phenotype correlations. *Genet Test.* 1997;1(1):5-12.
7. Grabowski GA PG, Kolodny EH. Gaucher disease. In: The online metabolic&molecular bases of inherited disease (OMMBID). McGraw-Hill global education holdings, LLC Inc, New York. 2013; – Part 16: Lysosomal disorders – Chapter 146. .
8. Ozkara HA. Recent advances in the biochemistry and genetics of sphingolipidoses. *Brain Dev.* 2004;26(8):497-505.
9. Lee RE. The fine structure of the cerebroside occurring in Gaucher's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968;61(2):484-9.
10. Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, et al. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2).
11. Boven LA, van Meurs M, Boot RG, Mehta A, Boon L, Aerts JM, et al. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol.* 2004;122(3):359-69.
12. Mucci JM, Cuello MF, Kisinovsky I, Larroude M, Delpino MV, Rozenfeld PA. Proinflammatory and proosteoclastogenic potential of peripheral blood mononuclear cells from Gaucher patients: Implication for bone pathology. *Blood Cells Mol Dis.* 2015;55(2):134-43.
13. Aflaki E, Moaven N, Borger DK, Lopez G, Westbroek W, Chae JJ, et al. Lysosomal storage and impaired autophagy lead to inflammasome activation in Gaucher macrophages. *Aging Cell.* 2016;15(1):77-88.
14. Bultron G, Kacena K, Pearson D, Boxer M, Yang R, Sathe S, et al. The risk of Parkinson's disease in type 1 Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(2):167-73.
15. Clark LN, Ross BM, Wang Y, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology.* 2007;69(12):1270-7.

16. Sato C, Morgan A, Lang AE, Salehi-Rad S, Kawarai T, Meng Y, et al. Analysis of the glucocerebrosidase gene in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2005;20(3):367-70.
17. Biegstraaten M, Mengel E, Marodi L, Petakov M, Niederau C, Giraldo P, et al. Peripheral neuropathy in adult type 1 Gaucher disease: a 2-year prospective observational study. *Brain.* 2010;133(10):2909-19.
18. Grabowski GA, Zimran A, Ida H. Gaucher disease types 1 and 3: Phenotypic characterization of large populations from the ICGG Gaucher Registry. *Am J Hematol.* 2015;90 Suppl 1:S12-8.
19. Kaplan P, Andersson HC, Kacena KA, Yee JD. The clinical and demographic characteristics of nonneuronopathic Gaucher disease in 887 children at diagnosis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2006;160(6):603-8.
20. Taddei TH, Dziura J, Chen S, Yang R, Hyogo H, Sullards C, et al. High incidence of cholesterol gallstone disease in type 1 Gaucher disease: characterizing the biliary phenotype of type 1 Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(3):291-300.
21. Hill SC, Reinig JW, Barranger JA, Fink J, Shawker TH. Gaucher disease: sonographic appearance of the spleen. *Radiology.* 1986;160(3):631-4.
22. Gillis S, Hyam E, Abrahamov A, Elstein D, Zimran A. Platelet function abnormalities in Gaucher disease patients. *Am J Hematol.* 1999;61(2):103-6.
23. Hollak CE, Levi M, Berends F, Aerts JM, van Oers MH. Coagulation abnormalities in type 1 Gaucher disease are due to low-grade activation and can be partly restored by enzyme supplementation therapy. *Br J Haematol.* 1997;96(3):470-6.
24. Miller A, Brown LK, Pastores GM, Desnick RJ. Pulmonary involvement in type 1 Gaucher disease: functional and exercise findings in patients with and without clinical interstitial lung disease. *Clin Genet.* 2003;63(5):368-76.
25. Santoro D, Rosenbloom BE, Cohen AH. Gaucher disease with nephrotic syndrome: response to enzyme replacement therapy. *Am J Kidney Dis.* 2002;40(1):E4.
26. Mignot C, Doummar D, Maire I, De Villemeur TB, French Type 2 Gaucher Disease Study G. Type 2 Gaucher disease: 15 new cases and review of the literature. *Brain Dev.* 2006;28(1):39-48.
27. Tytki-Szymanska A, Vellodi A, El-Beshlawy A, Cole JA, Kolodny E. Neuronopathic Gaucher disease: demographic and clinical features of 131 patients enrolled in the International Collaborative Gaucher Group Neurological Outcomes Subregistry. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(4):339-46.
28. Berger J, Stirnemann J, Bourgne C, Pereira B, Pigeon P, Heraoui D, et al. The uptake of recombinant glucocerebrosidases by blood monocytes from type 1 Gaucher disease patients is variable. *Br J Haematol.* 2012;157(2):274-7.
29. Aguilera B, Ghauharali-van der Vlugt K, Helmond MT, Out JM, Donker-Koopman WE, Groener JE, et al. Transglycosidase activity of chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase. *J Biol Chem.* 2003;278(42):40911-6.
30. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994;93(3):1288-92.
31. van Dussen L, Hendriks EJ, Groener JE, Boot RG, Hollak CE, Aerts JM. Value of plasma chitotriosidase to assess non-neuronopathic Gaucher disease severity and progression in the era of enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis.* 2014;37(6):991-1001.

32. Boot RG, Verhoek M, de Fost M, Hollak CE, Maas M, Bleijlevens B, et al. Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood*. 2004;103(1):33-9.
33. Deegan PB, Moran MT, McFarlane I, Schofield JP, Boot RG, Aerts JM, et al. Clinical evaluation of chemokine and enzymatic biomarkers of Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35(2):259-67.
34. Mirzaian M, Wisse P, Ferraz MJ, Gold H, Donker-Koopman WE, Verhoek M, et al. Mass spectrometric quantification of glucosylsphingosine in plasma and urine of type 1 Gaucher patients using an isotope standard. *Blood Cells Mol Dis*. 2015;54(4):307-14.
35. Murugesan V, Chuang WL, Liu J, Lischuk A, Kacena K, Lin H, et al. Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease. *Am J Hematol*. 2016;91(11):1082-9.
36. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3:S131-9.
37. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(18):7260-4.
38. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009;19(3):171-80.
39. Stowens DW, Teitelbaum SL, Kahn AJ, Barranger JA. Skeletal complications of Gaucher disease. *Medicine (Baltimore)*. 1985;64(5):310-22.
40. Barak V, Acker M, Nisman B, Kalickman I, Abrahamov A, Zimran A, et al. Cytokines in Gaucher's disease. *Eur Cytokine Netw*. 1999;10(2):205-10.
41. Hollak CE, Evers L, Aerts JM, van Oers MH. Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*. 1997;23(2):201-12.
42. Michelakakis H, Spanou C, Kondyli A, Dimitriou E, Van Weely S, Hollak CE, et al. Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1317(3):219-22.
43. van Breemen MJ, de Fost M, Voerman JS, Laman JD, Boot RG, Maas M, et al. Increased plasma macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β levels in type 1 Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(7):788-96.
44. Smid BE, Ferraz MJ, Verhoek M, Mirzaian M, Wisse P, Overkleeft HS, et al. Biochemical response to substrate reduction therapy versus enzyme replacement therapy in Gaucher disease type 1 patients. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11:28.
45. Lacerda L, Arosa FA, Lacerda R, Cabeda J, Porto G, Amaral O, et al. T cell numbers relate to bone involvement in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*. 1999;25(2):130-8.
46. Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, et al. The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Arch Intern Med*. 2000;160(18):2835-43.
47. DeMayo RF, Haims AH, McRae MC, Yang R, Mistry PK. Correlation of MRI-Based bone marrow burden score with genotype and spleen status in Gaucher's disease. *AJR Am J Roentgenol*. 2008;191(1):115-23.
48. Wenstrup RJ, Roca-Espiau M, Weinreb NJ, Bembi B. Skeletal aspects of Gaucher disease: a review. *Br J Radiol*. 2002;75 Suppl 1:A2-12.

49. Faden MA, Krakow D, Ezgu F, Rimoin DL, Lachman RS. The Erlenmeyer flask bone deformity in the skeletal dysplasias. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(6):1334-45.
50. Charrow J, Dulisse B, Grabowski GA, Weinreb NJ. The effect of enzyme replacement therapy on bone crisis and bone pain in patients with type 1 Gaucher disease. *Clin Genet*. 2007;71(3):205-11.
51. Schousboe JT, Shepherd JA, Bilezikian JP, Baim S. Executive summary of the 2013 International Society for Clinical Densitometry Position Development Conference on bone densitometry. *J Clin Densitom*. 2013;16(4):455-66.
52. Weinreb NJ, Aggio MC, Andersson HC, Andria G, Charrow J, Clarke JT, et al. Gaucher disease type 1: revised recommendations on evaluations and monitoring for adult patients. *Semin Hematol*. 2004;41(4 Suppl 5):15-22.
53. Maas M, Hollak CE, Akkerman EM, Aerts JM, Stoker J, Den Heeten GJ. Quantification of skeletal involvement in adults with type I Gaucher's disease: fat fraction measured by Dixon quantitative chemical shift imaging as a valid parameter. *AJR Am J Roentgenol*. 2002;179(4):961-5.
54. Vom Dahl S, Poll L, Di Rocco M, Ciana G, Denes C, Mariani G, et al. Evidence-based recommendations for monitoring bone disease and the response to enzyme replacement therapy in Gaucher patients. *Curr Med Res Opin*. 2006;22(6):1045-64.
55. Drugan C, Jebeleanu G, Grigorescu-Sido P, Caillaud C, Craciun AM. Biochemical markers of bone turnover as tools in the evaluation of skeletal involvement in patients with type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;28(1):13-20.
56. Ciana G, Addobbati R, Tamaro G, Leopaldi A, Nevyjel M, Ronfani L, et al. Gaucher disease and bone: laboratory and skeletal mineral density variations during a long period of enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(5):723-32.
57. Vellodi A, Foo Y, Cole TJ. Evaluation of three biochemical markers in the monitoring of Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(4):585-92.
58. Stirnemann J, Belmatoug N, Vincent C, Fain O, Fantin B, Mentre F. Bone events and evolution of biologic markers in Gaucher disease before and during treatment. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R156.
59. Giuffrida G, Cingari MR, Parrinello N, Romano A, Triolo A, Franceschino M, et al. Bone turnover markers in patients with type 1 Gaucher disease. *Hematol Rep*. 2012;4(4):e21.
60. van Dussen L, Lips P, Everts VE, Bravenboer N, Jansen ID, Groener JE, et al. Markers of bone turnover in Gaucher disease: modeling the evolution of bone disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):2194-205.
61. Mikosch P, Reed M, Baker R, Holloway B, Berger L, Mehta AB, et al. Changes of bone metabolism in seven patients with Gaucher disease treated consecutively with imiglucerase and miglustat. *Calcif Tissue Int*. 2008;83(1):43-54.
62. Andersson HC, Charrow J, Kaplan P, Mistry P, Pastores GM, Prakash-Cheng A, et al. Individualization of long-term enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Genet Med*. 2005;7(2):105-10.
63. Grabowski GA, Kacena K, Cole JA, Hollak CE, Zhang L, Yee J, et al. Dose-response relationships for enzyme replacement therapy with imiglucerase/algucerase in patients with Gaucher disease type 1. *Genet Med*. 2009;11(2):92-100.
64. Stein P, Malhotra A, Haims A, Pastores GM, Mistry PK. Focal splenic lesions in type I Gaucher disease are associated with poor platelet and splenic response to

- macrophage-targeted enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(6):769-74.
65. Damiano AM, Pastores GM, Ware JE, Jr. The health-related quality of life of adults with Gaucher's disease receiving enzyme replacement therapy: results from a retrospective study. *Qual Life Res.* 1998;7(5):373-86.
 66. Wenstrup RJ, Kacena KA, Kaplan P, Pastores GM, Prakash-Cheng A, Zimran A, et al. Effect of enzyme replacement therapy with imiglucerase on BMD in type 1 Gaucher disease. *J Bone Miner Res.* 2007;22(1):119-26.
 67. Mistry PK, Weinreb NJ, Kaplan P, Cole JA, Gwosdow AR, Hangartner T. Osteopenia in Gaucher disease develops early in life: response to imiglucerase enzyme therapy in children, adolescents and adults. *Blood Cells Mol Dis.* 2011;46(1):66-72.
 68. Sims KB, Pastores GM, Weinreb NJ, Barranger J, Rosenbloom BE, Packman S, et al. Improvement of bone disease by imiglucerase (Cerezyme) therapy in patients with skeletal manifestations of type 1 Gaucher disease: results of a 48-month longitudinal cohort study. *Clin Genet.* 2008;73(5):430-40.
 69. Aerts JM, Hollak CE, Boot RG, Groener JE, Maas M. Substrate reduction therapy of glycosphingolipid storage disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29(2-3):449-56.
 70. Belmatoug N, Burlina A, Giraldo P, Hendriksz CJ, Kuter DJ, Mengel E, et al. Gastrointestinal disturbances and their management in miglustat-treated patients. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(5):991-1001.
 71. Mistry PK, Lukina E, Ben Turkia H, Amato D, Baris H, Dasouki M, et al. Effect of oral eliglustat on splenomegaly in patients with Gaucher disease type 1: the ENGAGE randomized clinical trial. *JAMA.* 2015;313(7):695-706.
 72. Kamath RS, Lukina E, Watman N, Dragosky M, Pastores GM, Arreguin EA, et al. Skeletal improvement in patients with Gaucher disease type 1: a phase 2 trial of oral eliglustat. *Skeletal Radiol.* 2014;43(10):1353-60.
 73. McNeill A, Magalhaes J, Shen C, Chau KY, Hughes D, Mehta A, et al. Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. *Brain.* 2014;137(Pt 5):1481-95.
 74. Wenstrup RJ, Bailey L, Grabowski GA, Moskovitz J, Oestreich AE, Wu W, et al. Gaucher disease: alendronate disodium improves bone mineral density in adults receiving enzyme therapy. *Blood.* 2004;104(5):1253-7.
 75. Fleshner PR, Aufses AH, Jr., Grabowski GA, Elias R. A 27-year experience with splenectomy for Gaucher's disease. *Am J Surg.* 1991;161(1):69-75.
 76. Ida H, Rennert OM, Kato S, Ueda T, Oishi K, Maekawa K, et al. Severe skeletal complications in Japanese patients with type 1 Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis.* 1999;22(1):63-73.
 77. Rodrigue SW, Rosenthal DI, Barton NW, Zurakowski D, Mankin HJ. Risk factors for osteonecrosis in patients with type 1 Gaucher's disease. *Clin Orthop Relat Res.* 1999(362):201-7.
 78. Pastores GM, Wallenstein S, Desnick RJ, Luckey MM. Bone density in Type 1 Gaucher disease. *J Bone Miner Res.* 1996;11(11):1801-7.
 79. Zimran A, Kay A, Gelbart T, Garver P, Thurston D, Saven A, et al. Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients. *Medicine (Baltimore).* 1992;71(6):337-53.

80. Alcazar R, Egocheaga MI, Orte L, Lobos JM, Gonzalez Parra E, Alvarez Guisasola F, et al. [SEN-SEMFYC consensus document on chronic kidney disease]. *Nefrologia*. 2008;28(3):273-82.
81. Martinez-Castelao A, Gorritz JL, Segura-de la Morena J, Cebollada J, Escalada J, Esmatjes E, et al. Consensus document for the detection and management of chronic kidney disease. *Nefrologia*. 2014;34(2):243-62.
82. Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R, Eckardt KU, Levin A, Levin N, et al. The burden of kidney disease: improving global outcomes. *Kidney Int*. 2004;66(4):1310-4.
83. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, Garcia F, Group ES. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrologia*. 2010;30(1):78-86.
84. en D. <http://www.ont.es/Documents/PresentaciónDatos2016-17.pdf>.
85. Disponible en:
http://www.senefro.org/contents/webstructure/REER_Cong_SEN_2015.pdf.
86. Jardine AG, Gaston RS, Fellstrom BC, Holdaas H. Prevention of cardiovascular disease in adult recipients of kidney transplants. *Lancet*. 2011;378(9800):1419-27.
87. Komaba H, Goto S, Fukagawa M. Critical issues of PTH assays in CKD. *Bone*. 2009;44(4):666-70.
88. Gonciulea AR, Jan De Beur SM. Fibroblast Growth Factor 23-Mediated Bone Disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017;46(1):19-39.
89. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest*. 2007;117(12):4003-8.
90. Saliba W, El-Haddad B. Secondary hyperparathyroidism: pathophysiology and treatment. *J Am Board Fam Med*. 2009;22(5):574-81.
91. Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2006;69(11):1945-53.
92. Spasovski GB. Bone biopsy as a diagnostic tool in the assessment of renal osteodystrophy. *Int J Artif Organs*. 2004;27(11):918-23.
93. Odvina CV, Zerwekh JE, Rao DS, Maalouf N, Gottschalk FA, Pak CY. Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(3):1294-301.
94. Liu WC, Yen JF, Lang CL, Yan MT, Lu KC. Bisphosphonates in CKD patients with low bone mineral density. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:837573.
95. Torres PU, Bover J, Mazzaferro S, de Vernejoul MC, Cohen-Solal M. When, how, and why a bone biopsy should be performed in patients with chronic kidney disease. *Semin Nephrol*. 2014;34(6):612-25.
96. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD-MBDWG. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl*. 2009(113):S1-130.
97. West SL, Lok CE, Langsetmo L, Cheung AM, Szabo E, Pearce D, et al. Bone mineral density predicts fractures in chronic kidney disease. *J Bone Miner Res*. 2015;30(5):913-9.
98. Iimori S, Mori Y, Akita W, Kuyama T, Takada S, Asai T, et al. Diagnostic usefulness of bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in

predicting fracture in CKD stage 5D patients--a single-center cohort study. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(1):345-51.

99. Nickolas TL, Stein E, Cohen A, Thomas V, Staron RB, McMahon DJ, et al. Bone mass and microarchitecture in CKD patients with fracture. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(8):1371-80.
100. Perez-Saez MJ, Herrera S, Prieto-Alhambra D, Nogues X, Vera M, Redondo-Pachon D, et al. Bone density, microarchitecture and tissue quality long-term after kidney transplant. *Transplantation*. 2016.
101. Naylor KL, Leslie WD, Hodsmen AB, Rush DN, Garg AX. FRAX predicts fracture risk in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2014;97(9):940-5.
102. Amerling R, Harbord NB, Pullman J, Feinfeld DA. Bisphosphonate use in chronic kidney disease: association with adynamic bone disease in a bone histology series. *Blood Purif*. 2010;29(3):293-9.
103. Miller PD, Roux C, Boonen S, Barton IP, Dunlap LE, Burgio DE. Safety and efficacy of risedronate in patients with age-related reduced renal function as estimated by the Cockcroft and Gault method: a pooled analysis of nine clinical trials. *J Bone Miner Res*. 2005;20(12):2105-15.
104. Jamal SA, Bauer DC, Ensrud KE, Cauley JA, Hochberg M, Ishani A, et al. Alendronate treatment in women with normal to severely impaired renal function: an analysis of the fracture intervention trial. *J Bone Miner Res*. 2007;22(4):503-8.
105. Jamal SA, Ljunggren O, Stehman-Breen C, Cummings SR, McClung MR, Goemaere S, et al. Effects of denosumab on fracture and bone mineral density by level of kidney function. *J Bone Miner Res*. 2011;26(8):1829-35.
106. Farinola N, Kanjanapan Y. Denosumab-induced hypocalcaemia in high bone turnover states of malignancy and secondary hyperparathyroidism from renal failure. *Intern Med J*. 2013;43(11):1243-6.
107. Haghverdi F, Farbodara T, Mortaji S, Soltani P, Saidi N. Effect of raloxifene on parathyroid hormone in osteopenic and osteoporotic postmenopausal women with chronic kidney disease stage 5. *Iran J Kidney Dis*. 2014;8(6):461-6.
108. Mikuls TR, Julian BA, Bartolucci A, Saag KG. Bone mineral density changes within six months of renal transplantation. *Transplantation*. 2003;75(1):49-54.
109. Brandenburg VM, Politt D, Ketteler M, Fassbender WJ, Heussen N, Westenfeld R, et al. Early rapid loss followed by long-term consolidation characterizes the development of lumbar bone mineral density after kidney transplantation. *Transplantation*. 2004;77(10):1566-71.
110. Falkiewicz K, Boratynska M, Zmonarski SC, Milewicz A, Patrzalek D, Biecek P, et al. Evolution of bone disease at 2 years after transplantation: a single-center study. *Transplant Proc*. 2009;41(8):3063-6.
111. Pereira S, Pedroso S, Martins L, Santos P, Almeida M, Freitas C, et al. Bone mineral density after simultaneous kidney-pancreas transplantation: four years follow-up of 57 recipients. *Transplant Proc*. 2010;42(2):555-7.
112. Messa P, Sindici C, Cannella G, Miotti V, Risaliti A, Gropuzzo M, et al. Persistent secondary hyperparathyroidism after renal transplantation. *Kidney Int*. 1998;54(5):1704-13.
113. Monier-Faugere MC, Mawad H, Qi Q, Friedler RM, Malluche HH. High prevalence of low bone turnover and occurrence of osteomalacia after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(6):1093-9.

114. Ebeling PR. Approach to the patient with transplantation-related bone loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(5):1483-90.
115. Hofbauer LC, Rauner M. Minireview: live and let die: molecular effects of glucocorticoids on bone cells. *Mol Endocrinol.* 2009;23(10):1525-31.
116. Humphrey EL, Williams JH, Davie MW, Marshall MJ. Effects of dissociated glucocorticoids on OPG and RANKL in osteoblastic cells. *Bone.* 2006;38(5):652-61.
117. Moutsatsou P, Kassi E, Papavassiliou AG. Glucocorticoid receptor signaling in bone cells. *Trends Mol Med.* 2012;18(6):348-59.
118. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int.* 2007;18(10):1319-28.
119. Epstein S. Post-transplantation bone disease: the role of immunosuppressive agents and the skeleton. *J Bone Miner Res.* 1996;11(1):1-7.
120. Westenfeld R, Schlieper G, Woltje M, Gawlik A, Brandenburg V, Rutkowski P, et al. Impact of sirolimus, tacrolimus and mycophenolate mofetil on osteoclastogenesis--implications for post-transplantation bone disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(12):4115-23.
121. Ball AM, Gillen DL, Sherrard D, Weiss NS, Emerson SS, Seliger SL, et al. Risk of hip fracture among dialysis and renal transplant recipients. *JAMA.* 2002;288(23):3014-8.
122. Sukumaran Nair S, Lenihan CR, Montez-Rath ME, Lowenberg DW, Chertow GM, Winkelmayer WC. Temporal trends in the incidence, treatment and outcomes of hip fracture after first kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant.* 2014;14(4):943-51.
123. Nikkel LE, Iyer SP, Mohan S, Zhang A, McMahon DJ, Tanriover B, et al. Pancreas-kidney transplantation is associated with reduced fracture risk compared with kidney-alone transplantation in men with type 1 diabetes. *Kidney Int.* 2013;83(3):471-8.
124. Perrin P, Caillard S, Javier RM, Braun L, Heibel F, Borni-Duval C, et al. Persistent hyperparathyroidism is a major risk factor for fractures in the five years after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13(10):2653-63.
125. Naylor KL, Li AH, Lam NN, Hodzman AB, Jamal SA, Garg AX. Fracture risk in kidney transplant recipients: a systematic review. *Transplantation.* 2013;95(12):1461-70.
126. Ewers B, Gasbjerg A, Moelgaard C, Frederiksen AM, Marckmann P. Vitamin D status in kidney transplant patients: need for intensified routine supplementation. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(2):431-7.
127. Torregrosa JV, Fuster D, Monegal A, Gentil MA, Bravo J, Guirado L, et al. Efficacy of low doses of pamidronate in osteopenic patients administered in the early post-renal transplant. *Osteoporos Int.* 2011;22(1):281-7.
128. Torregrosa JV, Fuster D, Gentil MA, Marcen R, Guirado L, Zarraga S, et al. Open-label trial: effect of weekly risedronate immediately after transplantation in kidney recipients. *Transplantation.* 2010;89(12):1476-81.
129. Bonani M, Meyer U, Frey D, Graf N, Bischoff-Ferrari HA, Wuthrich RP. Effect of Denosumab on Peripheral Compartmental Bone Density, Microarchitecture and Estimated Bone Strength in De Novo Kidney Transplant Recipients. *Kidney Blood Press Res.* 2016;41(5):614-22.
130. Nih Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention D, Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA.* 2001;285(6):785-95.

131. Kopperdahl DL, Aspelund T, Hoffmann PF, Sigurdsson S, Siggeirsdottir K, Harris TB, et al. Assessment of incident spine and hip fractures in women and men using finite element analysis of CT scans. *J Bone Miner Res.* 2014;29(3):570-80.
132. Leslie WD, Majumdar SR, Morin SN, Lix LM. Change in Bone Mineral Density Is an Indicator of Treatment-Related Antifracture Effect in Routine Clinical Practice: A Registry-Based Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2016;165(7):465-72.
133. Graeff C, Marin F, Petto H, Kayser O, Reisinger A, Pena J, et al. High resolution quantitative computed tomography-based assessment of trabecular microstructure and strength estimates by finite-element analysis of the spine, but not DXA, reflects vertebral fracture status in men with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone.* 2013;52(2):568-77.
134. Nyman JS, Granke M, Singleton RC, Pharr GM. Tissue-Level Mechanical Properties of Bone Contributing to Fracture Risk. *Curr Osteoporos Rep.* 2016;14(4):138-50.
135. Roschger P, Paschalis EP, Fratzl P, Klaushofer K. Bone mineralization density distribution in health and disease. *Bone.* 2008;42(3):456-66.
136. Bala Y, Seeman E. Bone's Material Constituents and their Contribution to Bone Strength in Health, Disease, and Treatment. *Calcif Tissue Int.* 2015;97(3):308-26.
137. Hans D, Goertzen AL, Krieg MA, Leslie WD. Bone microarchitecture assessed by TBS predicts osteoporotic fractures independent of bone density: the Manitoba study. *J Bone Miner Res.* 2011;26(11):2762-9.
138. Allen MR, McNerny EM, Organ JM, Wallace JM. True Gold or Pyrite: A Review of Reference Point Indentation for Assessing Bone Mechanical Properties In Vivo. *J Bone Miner Res.* 2015;30(9):1539-50.
139. Diez-Perez A, Guerri R, Nogues X, Caceres E, Pena MJ, Mellibovsky L, et al. Microindentation for in vivo measurement of bone tissue mechanical properties in humans. *J Bone Miner Res.* 2010;25(8):1877-85.
140. Bridges D, Randall C, Hansma PK. A new device for performing reference point indentation without a reference probe. *Rev Sci Instrum.* 2012;83(4):044301.
141. Diez-Perez A, Bouxsein ML, Eriksen EF, Khosla S, Nyman JS, Papapoulos S, et al. Technical note: Recommendations for a standard procedure to assess cortical bone at the tissue-level in vivo using impact microindentation. *Bone Rep.* 2016;5:181-5.
142. Herrera S, Diez-Perez A. Clinical experience with microindentation in vivo in humans. *Bone.* 2017;95:175-82.
143. Copley JB, Wuthrich RP. Therapeutic management of post-kidney transplant hyperparathyroidism. *Clin Transplant.* 2011;25(1):24-39.
144. Malluche HH, Davenport DL, Cantor T, Monier-Faugere MC. Bone mineral density and serum biochemical predictors of bone loss in patients with CKD on dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(7):1254-62.
145. Ott SM. Bone strength: more than just bone density. *Kidney Int.* 2016;89(1):16-9.
146. McCloskey EV, Oden A, Harvey NC, Leslie WD, Hans D, Johansson H, et al. A Meta-Analysis of Trabecular Bone Score in Fracture Risk Prediction and Its Relationship to FRAX. *J Bone Miner Res.* 2016;31(5):940-8.
147. Silva BC, Leslie WD, Resch H, Lamy O, Lesnyak O, Binkley N, et al. Trabecular bone score: a noninvasive analytical method based upon the DXA image. *J Bone Miner Res.* 2014;29(3):518-30.

148. Brunerova L, Ronova P, Veresova J, Beranova P, Potoekova J, Kasalicky P, et al. Osteoporosis and Impaired Trabecular Bone Score in Hemodialysis Patients. *Kidney Blood Press Res.* 2016;41(3):345-54.
149. Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res.* 1993;8(9):1137-48.
150. Balwani M, Fuerstman L, Kornreich R, Edelmann L, Desnick RJ. Type 1 Gaucher disease: significant disease manifestations in "asymptomatic" homozygotes. *Arch Intern Med.* 2010;170(16):1463-9.
151. Giraldo P, Perez-Lopez J, Nunez R, de la Puebla RF, Luno E, Saura-Grau S, et al. Patients with type 1 Gaucher disease in Spain: A cross-sectional evaluation of health status. *Blood Cells Mol Dis.* 2016;56(1):23-30.
152. Fiore CE, Barone R, Pennisi P, Pavone V, Riccobene S. Bone ultrasonometry, bone density, and turnover markers in type 1 Gaucher disease. *J Bone Miner Metab.* 2002;20(1):34-8.
153. Khan A, Hangartner T, Weinreb NJ, Taylor JS, Mistry PK. Risk factors for fractures and avascular osteonecrosis in type 1 Gaucher disease: a study from the International Collaborative Gaucher Group (ICGG) Gaucher Registry. *J Bone Miner Res.* 2012;27(8):1839-48.
154. Weinreb NJ, Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, et al. Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. *Am J Med.* 2002;113(2):112-9.
155. Malgo F, Hamdy NA, Papapoulos SE, Appelman-Dijkstra NM. Bone material strength as measured by microindentation in vivo is decreased in patients with fragility fractures independently of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(5):2039-45.
156. Duarte Sosa D, Fink Eriksen E. Women with previous stress fractures show reduced bone material strength. *Acta Orthop.* 2016;87(6):626-31.
157. Giuffrida G, Cappellini MD, Carubbi F, Di Rocco M, Iolascon G. Management of bone disease in Gaucher disease type 1: clinical practice. *Adv Ther.* 2014;31(12):1197-212.
158. Guerri-Fernandez RC, Nogues X, Quesada Gomez JM, Torres Del Pliego E, Puig L, Garcia-Giralt N, et al. Microindentation for in vivo measurement of bone tissue material properties in atypical femoral fracture patients and controls. *J Bone Miner Res.* 2013;28(1):162-8.
159. Farr JN, Drake MT, Amin S, Melton LJ, 3rd, McCready LK, Khosla S. In vivo assessment of bone quality in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Bone Miner Res.* 2014;29(4):787-95.
160. Rudang R, Zoulakis M, Sundh D, Brisby H, Diez-Perez A, Johansson L, et al. Bone material strength is associated with areal BMD but not with prevalent fractures in older women. *Osteoporos Int.* 2016;27(4):1585-92.
161. Mellibovsky L, Prieto-Alhambra D, Mellibovsky F, Guerri-Fernandez R, Nogues X, Randall C, et al. Bone Tissue Properties Measurement by Reference Point Indentation in Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2015;30(9):1651-6.

162. Furst JR, Bandeira LC, Fan WW, Agarwal S, Nishiyama KK, McMahon DJ, et al. Advanced Glycation Endproducts and Bone Material Strength in Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(6):2502-10.
163. Musumeci M, Palermo A, D'Onofrio L, Vadala G, Greto V, Di Stasio E, et al. Serum chitotriosidase in postmenopausal women with severe osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2016;27(2):711-6.
164. Bucur RC, Panjwani DD, Turner L, Rader T, West SL, Jamal SA. Low bone mineral density and fractures in stages 3-5 CKD: an updated systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2015;26(2):449-58.
165. Alem AM, Sherrard DJ, Gillen DL, Weiss NS, Beresford SA, Heckbert SR, et al. Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2000;58(1):396-9.

Anexo: publicaciones

Assessment of Bone Health in Patients With Type 1 Gaucher Disease Using Impact Microindentation

Sabina Herrera,¹ Jordi Pérez-López,² Marc Moltó-Abad,² Roberto Güerri-Fernández,¹ Elena Cabezedo,³ Silvana Novelli,⁴ Jordi Esteve,⁵ Albert Hernández,⁶ Inmaculada Roig,⁷ Xavier Solanich,⁸ Daniel Prieto-Alhambra,^{9,10} Xavier Nogués,¹ and Adolfo Díez-Pérez¹

¹Internal Medicine Department, Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Universitat Autònoma de Barcelona and CIBERFES, Barcelona, Spain

²Inborn Errors of Metabolism in Adults, Unit of Rare Diseases, Hospital Valle de Hebron, Barcelona, Spain

³Hematology Department, Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain

⁴Haematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

⁵Haematology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

⁶Internal Medicine, Hospital Comarcal Sant Jaume de Calella, Barcelona, Spain

⁷Department of Hematology and Hemotherapy, Corporació Sanitària Parc Taulí, Barcelona, Spain

⁸Internal Medicine, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

⁹National Institute for Health Research (NIHR) Biomedical Research Unit, University of Oxford, Oxford, UK

¹⁰GREMPAL, CIBERFES, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Gaucher disease (GD), one of the most common lysosomal disorders (a global population incidence of 1:50,000), is characterized by beta-glucocerebrosidase deficiency. Some studies have demonstrated bone infiltration in up to 80% of patients, even if asymptomatic. Bone disorder remains the main cause of morbidity in these patients, along with osteoporosis, avascular necrosis, and bone infarcts. Enzyme replacement therapy (ERT) has been shown to improve these symptoms. This cross-sectional study included patients with type 1 Gaucher disease (GD1) selected from the Catalan Study Group on GD. Clinical data were collected and a general laboratory workup was performed. Bone mineral density (BMD) was measured at the lumbar spine and hip using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). Patients with bone infarcts or any other focal lesion in the area of indentation visible on imaging were excluded. Bone Material Strength index (BMSi) was measured by bone impact microindentation using an Osteoprobe instrument. Analysis of covariance (ANCOVA) models were fitted to adjust for age, sex, weight, and height. Sixteen patients with GD1 and 29 age- and sex-matched controls were included. GD1 was associated with significantly lower BMSi (adjusted beta -9.30; 95% CI, -15.18 to -3.42; $p = 0.004$) and reduced lumbar BMD (adjusted beta -0.14; 95% CI, -0.22 to -0.06; $p = 0.002$) and total hip BMD (adjusted beta -0.09; 95% CI, -0.15 to -0.03; $p = 0.006$), compared to GD1-free controls. Chitotriosidase levels were negatively correlated with BMSi (linear $R^2 = 51.6\%$, $p = 0.004$). Bone tissue mechanical characteristics were deteriorated in patients with GD1. BMSi was correlated with chitotriosidase, the marker of GD activity. Bone disorder requires special consideration in this group of patients, and microindentation could be an appropriate tool for assessing and managing their bone health. © 2017 American Society for Bone and Mineral Research.

KEY WORDS: IMPACT MICROINDENTATION; ANALYSIS/QUANTITATION OF BONE; DXA; DISEASES AND DISORDERS OF/RELATED TO BONE

Introduction

Type 1 Gaucher disease (GD1) is a lysosomal storage disorder first described by Philippe Gaucher in the early 1880s.⁽¹⁾ The disease is characterized by a deficiency of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase, and its substrate, glucocerebroside, is stored in cells of macrophage lineage. Accumulation occurs in the spleen, liver, bone marrow, lungs, and central nervous system.⁽²⁾ GD1 is inherited in an autosomal recessive pattern due to a mutation on the long arm of chromosome 1 (1q21). It is one of the commonest

lysosomal disorders, affecting 1 in 50,000 individuals.⁽³⁾ In addition to potential hematological and visceral involvement, up to 80% of patients with GD1 have some degree of bone disorder,⁽⁴⁾ often asymptomatic.⁽⁵⁾ More than 90% of patients show skeletal effects in radiological exams,⁽⁶⁾ such as osteolytic lesions, vertebral compression, and other fragility fractures.^(7,8) Osteopenia has been detected by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) in more than 40% of cases.⁽⁹⁾ These bone problems do not necessarily correlate with visceral disease; therefore, many patients with severe bone disease do not have visceral problems.⁽¹⁰⁾

Received in original form November 27, 2016; revised form February 12, 2017; accepted February 23, 2017. Accepted manuscript online March 6, 2017.

Address correspondence to: Sabina Herrera, MD, Internal Medicine Department, Hospital del Mar, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. E-mail address: sabinaherreramd@gmail.com; sherrera@hospitaldelmar.cat

Journal of Bone and Mineral Research, Vol. xx, No. xx, Month 2017, pp 1–7

DOI: 10.1002/jbmr.3121

© 2017 American Society for Bone and Mineral Research

Bone disease in GD1 remains one of the main factors in patient morbidity, due to the pain, disability, and frequent need for surgical interventions.⁽¹¹⁾ Enzyme replacement therapy (ERT) improves both visceral and bone disease in GD1.⁽¹²⁾ Patients show an improvement of symptoms, with a significant reduction in pain and in the number of bone crises,⁽¹³⁾ although improvement in bone mineral density (BMD), measured by DXA, or bone marrow infiltration, measured by magnetic resonance imaging (MRI) can take up to several years.⁽¹⁴⁾ Nonetheless, lesions such as bone infarcts and avascular necrosis are irreversible, and it remains to be shown if early ERT can prevent them.⁽¹⁵⁾

Several mechanisms have been identified as responsible for bone disease in these patients. First, focal osteopenia and vascular occlusion have been described as a result of direct infiltration by Gaucher cells.⁽¹⁰⁾ On the other hand, indirect effects on the balance between osteoclasts and osteoblasts, due to the release of inflammatory mediators and macrophage-secreted effectors (eg, lysosomal enzymes) by the GD cells, might play an important role in generalized bone loss.⁽¹⁶⁾

Bone assessment in patients diagnosed with GD1 includes standard X-rays, DXA and MRI, considered the gold standard to detect bone marrow infiltration or other complications.⁽¹⁷⁾ As a direct measurement of bone infiltration, quantitative chemical shift imaging best quantifies the exact amount of fat fraction, but is difficult to interpret, very expensive, and not widely available.⁽¹⁸⁾

Measurement of BMD offers only a partial assessment of bone disease. Material properties such as geometry or mechanical characteristics are strongly related with fragility and the likelihood of future fractures, and deserve specific assessment in these patients. Direct assessment of mechanical properties that are not well captured by DXA or other clinically accessible techniques requires extraction of bone samples, which is not feasible in routine clinical practice. Recently, a new tool has become available for clinical use: reference point indentation. This approach enables *in vivo* measurements of bone material properties at a tissue level (ie, not only bone quantity but also the mechanical properties of bone tissue), integrating nanoscale and microscale components.⁽¹⁹⁾

The aim of our study was to provide a comprehensive assessment of bone health in a group of patients with GD1, incorporating DXA imaging, biochemical markers of bone turnover, and impact microindentation to measure material characteristics at the tissue level.

Subjects and Methods

Cross-sectional study. Patients with GD1 were matched by age and sex to healthy controls.

Subjects

Eligible patients were selected from medical center in Catalonia with experience in managing GD1 patients. Study participants were recruited between July 2015 and January 2016. Patients were contacted through their physician and invited to participate. Inclusion criteria were GD1 diagnosis, aged 18 years and older, and providing signed consent. The Ethics Review Board at our institution approved the study protocol. We excluded patients with active cancer, any chronic advanced disease or condition that may affect bone health (chronic liver or renal disease, thyroid or parathyroid disorder, glucocorticoid treatment, rheumatoid arthritis, chronic malabsorption, or

immobilization). Patients with focal tibial lesions (ie, bone infarcts or avascular necrosis) visible by imaging in the measurement area were also excluded.

Control group

Healthy volunteers (no history of fractures, use of potentially bone-acting drugs, or any kind of bone disease) were recruited as a control group from our reference database for microindentation. Controls underwent impact microindentation and DXA as explained below and demographic data (age, sex, weight, and height) were collected.

Study variables

The following clinical parameters were recorded for patients with GD1: age, sex, weight, height, hemoglobin concentration, platelet count, chitotriosidase levels, age at first GD diagnosis, years since diagnosis, disease severity at time of inclusion using the Zimran severity score index (SSI).⁽²⁰⁾ Type and duration of treatment received, splenectomy, avascular necrosis, and focal bone lesions or splenic nodules ascertained from previous MRI were also recorded.

Biochemical markers of bone turnover in our cohort were measured by Nordic Bioscience laboratory in samples taken after 8 hours fasting. The following markers were determined in plasma using electrochemiluminescence immunoassay (Elecys 2010; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany): procollagen type 1 N propeptide (P1PN) and C-terminal telopeptide (CTX-I).

BMD measurement

In all patients and controls, BMD was measured at lumbar spine and hip using DXA imaging (Hologic QDR 4500 SR; Hologic, Inc., Bedford, MA, USA).

Impact microindentation testing

The recently described impact microindentation protocol⁽²¹⁾ was followed, using an Osteoprobe handheld impact microindenter (Active Life Scientific, Santa Barbara, CA, USA) to make a microscopic indentation in the anterior face of the mid-tibia. In brief, after disinfecting the skin and applying local anesthesia, a test probe with a conic 10- μ m microscopic edge is applied through the skin until contacting the bone surface. The operator slowly pulls down the mobile part of the device, keeping the probe perpendicular to the bone surface until reaching the bone surface. This provokes a preload force of 10 N until a trigger system releases a mechanism that applies 30 N force at high speed, making a microscopic indent in the cortex of the tibia. The indentation distance is translated to a computerized unit. Each individual is measured at eight points separated by at least 2 mm in two parallel lines of four indents each along the axis of the tibia. Outlier measurements are flagged by the manufacturer's software and the decision to remove these measurements from analysis is made after completing at least three to four indentations.

Although infrequent, when the operator perceives a grossly abnormal texture of the indented bone (eg, a cork or pore span material) the measurement is rejected. After making eight valid measurements in bone, the operator takes five measurements in a block of BMSi-100 reference material used as a calibration phantom. The indentation units, expressed as Bone Material Strength index (BMSi), are defined as 100 times the ratio of the

indentation distance from the impact into the calibration material, divided by the indentation distance from the impact into the bone. The procedure is painless, takes approximately 3 min, and is free of complications. The only contraindications are local problems such as skin or soft tissue infection or the presence of moderate-severe local edema or a high fat pad on the tibia that prevents reaching the bone surface.

Statistical analysis

Continuous variables were summarized as mean and standard deviation (SD). Unadjusted hazard ratios (HRs) were estimated to test differences in sociodemographic variables between cases and controls. Agreement between cases and controls was assessed by χ^2 goodness of fit. Analysis of covariance was used to obtain and compare age, sex, height, and weight-adjusted means. A p value of <0.05 was considered to indicate significance. All reported p values are two-sided. The analysis was performed using SPSS for Windows, version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

All patients in the service area with a diagnosis of GD1 were invited to participate (40), and 17 (42.5%) provided informed consent. One patient was excluded due to the presence of focal lesions in the tibia as seen in the MRI. Characteristics of the 16 patients included in the study are shown in Table 1. The participating patients included seven (43.7%) men and nine (56.3%) women with a mean age of 51.31 ± 14.4 years (range, 21 to 69 years), weight 71 ± 12.0 kg and height 165.9 ± 9.1 cm. All but four patients were receiving specific ERT during the study period, with a median of 10.5 years (range, 0.25 to 19 years) of treatment and 21 ± 16.4 years since diagnosis. Two patients had never received any treatment. Mean hemoglobin concentration was 14.1 g/dL (range, 10.1 to 16.4 g/dL), platelet count 148,692 (range, 63,000 to 260,000), and Zimran SSI 6.46 (range, 1 to 16). Mean chitotriosidase level was 1775.7 (range, 35 to 3770). Three patients (18.8%) had undergone splenectomy, three (18.8%) had visceral nodules, and two (12.6%) had avascular necrosis. Mean BMSi was 72.74 ± 9.98 overall, 74.8 ± 9.33 for men and 71.1 ± 10.7 for women. Mean lumbar BMD was 0.896 g/cm^2 (0.997 g/cm^2 for men and 0.808 g/cm^2 for women) and mean total hip BMD was 0.717 g/cm^2 (0.812 g/cm^2 and 0.655 g/cm^2 , respectively). According to lumbar T score, 10 patients (62.5%) had osteopenia, one (6.25%) had osteoporosis (6.25%), and four (25%) had normal BMD. There was no history of fractures in this group of patients.

The 16 GD1 cases were compared to 29 age- and sex-matched controls, of which five (17.2%) were men and 24 (82.8%) were women; mean age was 48 ± 12.1 years (range, 20 to 69 years). Results of univariate analysis are summarized in Table 2A, showing significantly lower BMSi values in GD1 patients than in controls. Differences remained after adjustment for age, sex, weight, and height (Table 2B): patients with GD1 had significantly lower BMSi compared to controls (adjusted beta -9.30 ; 95% CI, -15.18 to -3.42 ; $p = 0.004$; Fig. 1). Similarly, multivariate adjustment did not attenuate the observed reduction in BMD observed in GD1 patients at both sites tested: lumbar (adjusted beta -0.14 ; 95% CI, -0.22 to -0.06 ; $p = 0.002$) and total hip (adjusted beta -0.09 ; 95% CI, -0.15 to -0.03 ; $p = 0.006$) (Fig. 2A, B).

Higher chitotriosidase levels in GD1 patients showed a negative linear correlation with BMSi ($R^2 = 51.6\%$): age-, sex-, weight-, and height-adjusted beta -0.004 ; 95% CI, -0.007 to -0.002 ; $p = 0.005$ (Fig. 3). This difference was maintained after further adjustment for BMD ($p = 0.01$). Similarly, patients with GD1 and high chitotriosidase levels had significantly lower hip BMD (adjusted beta -0.00005 ; 95% CI, -0.00010 to -0.00008 ; $p = 0.027$) but not lumbar BMD (adjusted beta -0.00001 ; 95% CI, -0.00003 to 0.00001 ; $p = 0.27$). There were no significant differences between patients and controls in P1NP ($p = 0.471$) or in CTX-I ($p = 0.286$) levels.

There were no significant differences in BMSi, lumbar BMD, or hip BMD in patients who had been under treatment compared to those who had never received any specific treatment, although ERT was mildly associated with higher BMSi (74.45 versus 60.75, respectively; $p = 0.67$); the small sample size limited the statistical power of this analysis. Moreover, disease severity and number of years since diagnosis were not associated with significant differences in BMSi, lumbar BMD, or hip BMD. Furthermore, no differences were associated with disease severity (severe versus mild) or time since diagnosis (more than 15 years versus 15 years or less).

Discussion

The literature lacked a description of in vivo measurement of the biomechanical properties of bone tissue using impact microindentation in patients with GD1. We found that these patients had a significantly lower BMSi compared to matched controls. These results are important because patients with GD1 have a high prevalence of bone disease, a prominent cause of morbidity,⁽¹⁰⁾ but are often asymptomatic.⁽⁵⁾ After adjusting by age, sex, weight, height, and lumbar BMD, a significant deterioration in the mechanical characteristics of bone tissue persisted, in comparison with matched controls.

Our patient demographics were similar to that of the previously described Spanish cohort.⁽²²⁾ Our group was slightly older (51.31 ± 14.4 years compared to 44.8 ± 16.6 years), men were 43% of our group, compared to 53%, and ERT was prescribed for 75% of our group, compared to 72% of the Spanish cohort. In the Spanish cohort, 36% of the patients had osteopenia or osteoporosis, whereas in our group 62% had osteopenia and 6% had osteoporosis. This difference could be explained by the lack of BMD data for 31% of the Spanish cohort and also because our cohort had more women, and our patients were older. Our percentage of osteopenia is in accordance with other groups' data: Stirmemann and colleagues⁽²³⁾ reported 57% osteopenia, Drugan and colleagues⁽²⁴⁾ found 46% with osteopenia or osteoporosis in their series, and Fiore and colleagues⁽²⁵⁾ reported 83% osteopenia/osteoporosis. In all cases, the samples are very small and too heterogeneous for rigorous comparisons between studies.

Low bone mass can be detected in very early stages of GD; although it develops mainly during adolescence, it has been reported in childhood.^(1,2) Patients who do not achieve peak bone mass or have low BMD are at a major risk of fractures.⁽²⁶⁾ ERT has been shown to improve visceral involvement and, at a slower rate, skeletal disease, contributing to increased BMD and reduction in bone crisis and bone pain.⁽²⁷⁾ More than one-half of the patients in our series had osteopenia, regardless of treatment received. Our patients with GD1 had a significantly lower BMSi compared to matched controls. Whether this finding

Table 1. Characteristics of Type 1 Gaucher Disease Patients

Patient	Age (years)	Gender	Years since diagnosis	Treatment received	Years of treatment	Zimran Severity Score index ^a	BMSI (g/cm ²)	Lumbar BMD (g/cm ²)	Lumbar T-score	Total hip BMD (g/cm ²)	Total hip T-score	Chit (nmol/h/mL)	s-PINP (ng/mL)	s-CTX-I (ng/mL)
1	69	Female	37	Imiglucerase (1999–2014); Velaglugerase (2014–ongoing)	17	9	65.2	0.826	-2.1	0.534	-2.8	301.9	128.6	0.284
2	48	Male	46	Imiglucerase (2006–2014); Velaglugerase (2014–ongoing)	9	15	83.7	0.97	-1.1	NA	NA	661.8	52	0.185
3	27	Female	12	Velaglugerase (2004–ongoing)	12	2	73.9	0.891	-1.4	0.723	-1.1	1011	55.81	0.325
4	68	Female	13	Miglustat (2006); no current treatment	0.25	1	73	0.833	-1.9	0.714	-1.2	1236	NA	NA
5	51	Male	19	Imiglucerase (2001–2005); Miglustat (2015–ongoing)	14	2	80.4	1.161	0.6	0.828	-0.8	161	NA	NA
6	42	Male	39	Imiglucerase (dates NA)	1	9	60.1	0.859	-2.1	0.707	-1.6	NA	NA	NA
7	57	Female	NA	Imiglucerase (2008–2010); Velaglugerase (2011–ongoing)	8	2	77.3	0.731	-2.9	0.636	-1.9	236	32.09	0.202
8	57	Male	2	Velaglugerase (2015–ongoing)	1.5	4	65	0.855	-2.1	0.618	-2.3	6471	NA	NA
9	21	Female	5	No treatment	0	5	48.9	0.737	0.73	0.622	0.62	6300	NA	NA
10	51	Male	27	No treatment	0	9	72.6	0.975	-1.1	0.916	-0.1	3769	NA	NA
11	32	Female	20	Velaglugerase (dates NA)	3	3	80.9	0.846	-1.8	0.668	-1.6	626	38.04	0.185
12	59	Male	56	Imiglucerase (dates NA)	15	16	78.4	1.01	-0.3	0.779	-0.6	1498	44.43	0.121
13	61	Female	NA	Imiglucerase (2015–ongoing)	0.5	4	83.2	0.805	-2.2	0.685	-1.5	35	33.03	0.244
14	67	Female	22	Imiglucerase; no current treatment	19	4	75	0.8	-2.2	0.663	-1.7	298	18.1	0.098
15	50	Male	15	Imiglucerase (2002–2012); Velaglugerase (2012–ongoing)	14	5	83.9	1.146	0.5	.944	-0.1	NA	15.32	0.093
16	62	Female	34	Imiglucerase (2003–2005); Miglustat (2005–ongoing)	13	4	62.3	NA	NA	NA	NA	1800	NA	NA

BMSI = Bone Mineral Strength index; BMD = bone mineral density; Chit = chitotriosidase; s-PINP = serum procollagen type 1 N propeptide; s-CTX-I = serum C-terminal telopeptide; NA = not available.

^aZimran Severity Score index: 0–3 = borderline to mild disease; 3–6 = moderate disease; 6–9 = marked disease; >9 = severe disease.

Table 2. Comparison Between Patients With Gaucher Disease and Healthy Controls

(A) Univariate/unadjusted comparison			
	Cases	Controls	<i>p</i>
Age (years), mean ± SD (range)	51.31 ± 14.4 (21–69)	48.72 ± 15.8 (20–69)	0.592
Women (%)	56	79	0.134
BMSi, mean ± SD	72.74 ± 9.98	81.76 ± 1.44	0.020
Lumbar BMD (g/cm ²), mean ± SD	0.896 ± 0.13	0.991 ± 0.15	0.430
Total hip BMD (g/cm ²), mean ± SD	0.717 ± 0.12	0.769 ± 0.11	0.148
CTX (ng/mL), mean ± SD	0.193 ± 0.40	0.250 ± 0.45	0.286
P1NP (ng/mL), mean ± SD	46.38 ± 34.05	53.43 ± 22.01	0.471
(B) Multivariate/adjusted comparison			
	Gaucher disease (adjusted beta) ^a	95% CI	<i>p</i>
BMSi	−9.30	−15.18 to −3.42	0.004
Lumbar BMD (g/cm ²)	−0.14	−0.22 to −0.06	0.002
Hip BMD (g/cm ²)	−0.09	−0.15 to −0.03	0.006

BMSi = Bone Mineral Strength index; BMD = bone mineral density; CTX = C-terminal telopeptide; P1NP = N-terminal propeptide of type 1 collagen.
^aAdjusted mean difference between patients and healthy controls, after adjustment for sex, weight, and height. Negative values mean that Gaucher-free controls had higher BMSi/BMD values than patients with Gaucher disease.

implies an increased risk of fracture cannot be firmly established because no clear international reference values have yet been published. However, the average value in our patients is lower than those associated with fragility fracture⁽²⁸⁾ or previous stress fracture⁽²⁹⁾ in other studies using the same technique. Bone turnover biomarkers are not currently used in clinical practice because studies to date have produced inconsistent results.^(24,30) In our series, bone turnover markers had normal values, with no differences between patients and healthy controls. DXA is recommended for bone assessments in patients with GD1 (as well as MRI and quantitative chemical shift imaging), although all of these techniques have limitations.⁽³¹⁾ DXA reflects only the amount of mineral, and can be jeopardized by degenerative lesions on the spine or by bilateral hip prosthesis; MRI and quantitative chemical shift imaging are not widely available in clinical practice.

Bone strength has three components: BMD, geometry/microarchitecture, and tissue properties. Impact microindentation is a new tool that measures a key aspect of the latter.

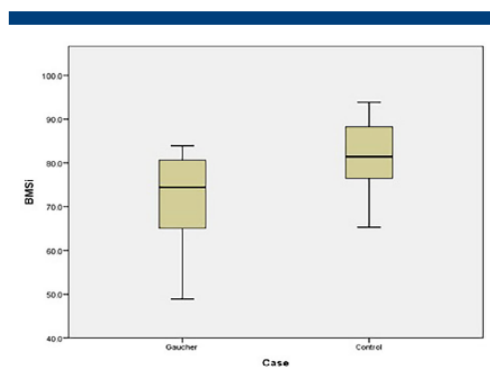


Fig. 1. Box-plot describing BMSi distribution among Gaucher disease cases and controls.

Available for clinical use, this technique enables *in vivo* measurements of the mechanical properties of bone material. The unique test conditions of impact microindentation make it difficult to determine which classical biomechanical properties estimated by quasi-static tests are measured by this new technique. Many factors may influence the resistance of the tissue to penetration by the probe, including collagen orientation and cross-linking, mineral to matrix ratio, interlamellar interfaces, or postyield behavior, among others.⁽²¹⁾ Several studies in humans have explored the use of impact micro-indentation in situations where BMSi explains increased fracture propensity (ie, bone fragility) more accurately than DXA imaging. The studies in which DXA fails but BMSi seems to succeed, at least in part, in explaining the increased fracture risk have included patients with fragility fractures,⁽³²⁾ atypical femoral fractures in patients with long-term bisphosphonate treatment,⁽¹⁹⁾ women with type 2 diabetes,⁽³³⁾ elderly patients,⁽³⁴⁾ and glucocorticoid-treated individuals.⁽³⁵⁾

Chitotriosidase levels were inversely correlated with BMSi, similar to previous findings in patients with type 2 diabetes mellitus, in which impact microindentation values were inversely correlated with both glycosylated hemoglobin levels⁽³³⁾ and advanced glycation end products.⁽³⁶⁾ Therefore, tissue mechanical properties are related to pathophysiological markers of the disease in both populations. This strongly suggests a deterioration in the mechanical properties of bone tissue as the disease becomes metabolically more severe. Moreover, Musumeci and colleagues⁽³⁷⁾ have described elevated serum chitotriosidase levels in postmenopausal women with severe osteoporosis, observing a similar inverse correlation between BMD and chitotriosidase.

The major strength of our study was that it applied a new technique that has been used in other conditions where DXA is not fully informative about bone fragility. Another strength is the access to 16 patients with a disease that has a very low prevalence: our sample constitutes more than 40% of all GD patients in our region. Moreover, we very carefully assessed focal lesions in the bone and avoided these areas for impact microindentation.

Our study also had several limitations. Due to the low prevalence of the disease, the sample was small and

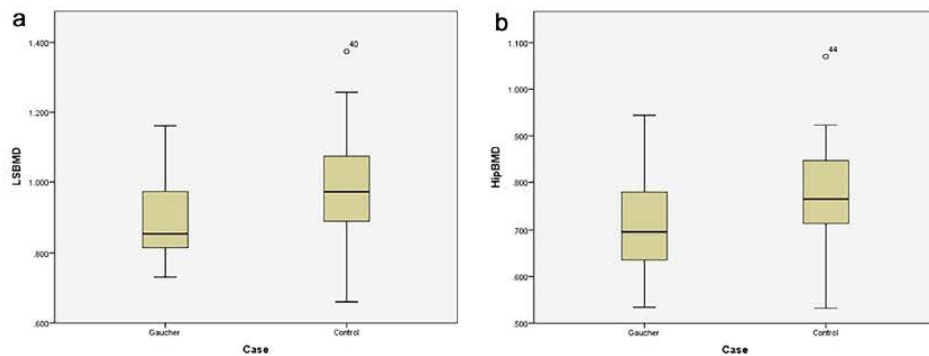


Fig. 2. (A) Box-plot describing LSBMD distribution among Gaucher disease cases and controls. (B) Box-plot describing HipBMD distribution among Gaucher disease cases and controls. LSBMD = lumbar spine BMD; HipBMD = hip BMD.

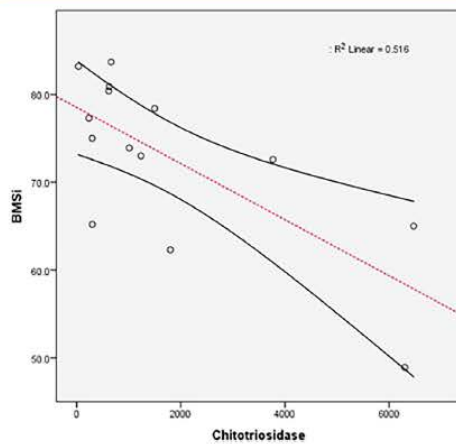


Fig. 3. Scatterplot (with fitted, unadjusted, and linear regression lines) of chitotriosidase and BMSi.

heterogeneous, including men and women, with a broad age range; therefore, the results are greatly underpowered, a common issue in studies focused on rare diseases. Second, we used the Zimran SSI, most commonly applied as a pretreatment assessment, as an index of disease severity. Finally, we used this technique to explore only the cortical compartment of the bone, in the tibia, which does not necessarily reflect biomechanical characteristics in other skeletal regions.

Conclusion

Bone disease is one of the main causes of morbidity in patients with GD1 and deserves careful management. Therefore, early diagnosis and a complete assessment of the bone disease are

important, especially with the availability of ERT. Current techniques are either not widely available or fail to detect early changes. Use of impact microindentation is feasible in this group of patients. Beyond bone density loss, BMSi values decrease in these patients and significantly correlates with chitotriosidase levels, the marker of GD1 activity. We believe that a comprehensive evaluation of bone health may also contribute to a better assessment of the disease and of treatment effects, aspects which deserve further investigation.

Disclosures

SH and JPL have received speaker's fees from Shire. ADP owns shares of Active Life Sci, the manufacturer of Osteoprobe.

Acknowledgments

This study was supported in part by an unrestricted grant from Shire Pharmaceuticals; the company had no influence on data acquisition or analysis or on the writing of the manuscript. We acknowledge Natalia Garcia Giral, MD, PhD, for her valuable help in the laboratory measurements and Elaine Lilly, PhD, for English language revision.

Authors' roles: Study design: SH, JPL, MMA, RGF, EC, SN, JE, AH, IR, XS, DPA, XN, and ADP. Study contact: SH, JPL, MMA, EC, SN, JE, AH, and IR. Study conduct: SH, RGF, XS, and DPA. Data collection: SH, JPL, MMA, RGF, EC, SN, JE, AH, IR, XS, XN, and ADP. Data analysis: DPA. Data interpretation: SH, JPL, DPA, XN, and ADP. Drafting manuscript: SH, JPL, DPA, XN, and ADP. Revising manuscript content: SH, JPL, DPA, XN, and ADP. Approving final manuscript: SH, JPL, MMA, RGF, EC, SN, JE, AH, IR, XS, DPA, XN, and ADP.

References

1. Fumić K, Stavljenić-Rukavina A, Mrsić M, Potočki K. [Gaucher disease: diagnosis and treatment]. *Acta Med Croatica.* 2004;58(5):353–8. Croatian.
2. Grabowski GA. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet.* 2008;372:1263–71.

3. Bodamer OA, Hung C. Laboratory and genetic evaluation of Gaucher disease. *Wien Med Wochenschr.* 2010;160(23–24):600–4.
4. Goker-Alpan O. Therapeutic approaches to bone pathology in Gaucher disease: past, present and future. *Mol Genet Metab.* 2011; 104:438–47.
5. Balwani M, Fuerstman L, Komreich R, Edelmann L, Desnick RJ. Type 1 Gaucher disease: significant disease manifestations in "asymptomatic" homozygotes. *Arch Intern Med.* 2010;170(16):1463–9.
6. Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, et al. The Gaucher Registry. Demographics and disease of 1698 patients with Gaucher disease. *Arch Intern Med.* 2000;160(18):2835–43.
7. Grabowski GA, Andria G, Baldellou A, et al. Pediatric non-neuronopathic Gaucher disease: presentation, diagnosis and assessment. Consensus statements. *Eur J Pediatr.* 2004;163:58–66.
8. Rodrigue SW, Rosenthal DI, Barton NW, Zurakowski D, Mankin HJ. Risk factors for osteonecrosis in patients with type 1 Gaucher's disease. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;(362):201–7.
9. Pastores GM, Wallenstein S, Desnick RJ, Luckey MM. Bone density in Type 1 Gaucher disease. *J Bone Miner Res.* 1996;11(11):1801–7.
10. Wenstrup RJ, Roca-Espiau M, Weinreb NJ, Bembí B. Skeletal aspects of Gaucher disease: a review. *Br J Radiol.* 2002;75 Suppl 1:A2–12.
11. Weinreb NJ, Barranger J, Packman S, et al. Imiglucerase (Cerezyme®) improves quality of life in patients with skeletal manifestations of Gaucher disease. *Clin Genet.* 2007;71(6):576–88.
12. Mistry PK, Weinreb NJ, Kaplan P, Cole JA, Gwosdow AR, Hangartner T. Osteopenia in Gaucher disease develops early in life: response to imiglucerase enzyme therapy in children, adolescents and adults. *Blood Cells Mol Dis.* 2011;46(1):66–72.
13. Sims KB, Pastores GM, Weinreb NJ, et al. Improvement of bone disease by imiglucerase (Cerezyme) therapy in patients with skeletal manifestations of type 1 Gaucher disease: results of a 48-month longitudinal cohort study. *Clin Genet.* 2008;73(5):430–40.
14. Wenstrup RJ, Kacena KA, Kaplan P, et al. Effect of enzyme replacement therapy with imiglucerase on BMD in type 1 Gaucher disease. *J Bone Miner Res.* 2007;22(1):19–26.
15. Drelichman G, Fernández Escobar N, Basack N, et al. Skeletal involvement in Gaucher disease: an observational multicenter study of prognostic factors in the Argentine Gaucher disease patients. *Am J Hematol.* 2016 Oct;91(10):E448–53.
16. Barak V, Acker M, Nisman B, et al. Cytokines in Gaucher's disease. *Eur Cytokine Netw.* 1999;10(2):205–10.
17. Vom Dahl S, Poll L, Di Rocco M, et al. Evidence-based recommendations for monitoring bone disease and the response to enzyme replacement therapy in Gaucher patients. *Curr Med Res Opin.* 2006;22(6):1045–64.
18. Johnson LA, Hoppel BE, Gerard EL, et al. Quantitative chemical shift imaging of vertebral bone marrow in patients with Gaucher disease. *Radiology.* 1992;182(2):451–5.
19. Guerri-Fernandez RC, Nogues X, Quesada Gomez JM, et al. Micro-indentation for in vivo measurement of bone tissue material properties in atypical femoral fracture patients and controls. *J Bone Miner Res.* 2013;28(1):162–8.
20. Zimran A, Kay A, Gelbart T, et al. Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients. *Medicine (Baltimore).* 1992;71(6):337–53.
21. Diez-Perez A, Bouxsein ML, Eriksen EF, et al. Technical note: recommendations for a standard procedure to assess cortical bone at the tissue-level in vivo using impact microindentation. *Bone Rep.* 2016;5:181–5.
22. Giraldo P, Pérez-López J, Núñez R, et al. Patients with type 1 Gaucher disease in Spain: a cross-sectional evaluation of health status. *Blood Cells Mol Dis.* 2016;56(1):23–30.
23. Stirnemann J, Belmatoug N, Vincent C, Fain O, Fantin B, Mentré F. Bone events and evolution of biologic markers in Gaucher disease before and during treatment. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(4):R156.
24. Drugan C, Jebeleanu G, Grigorescu-Sido P, Caillaud C, Craciun AM. Biochemical markers of bone turnover as tools in the evaluation of skeletal involvement in patients with type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;28(1):13–20.
25. Fiore CE, Barone R, Pennisi P, Pavone V, Riccobene S. Bone ultrasonometry, bone density, and bone turnover markers in type 1 Gaucher disease. *J Bone Miner Metab.* 2002;20:24–38.
26. Khan A, Hangartner T, Weinreb NJ, Taylor JS, Mistry PK. Risk factors for fractures and avascular osteonecrosis in type 1 Gaucher disease: a study from the International Collaborative Gaucher Group (ICGG) Gaucher Registry. *J Bone Miner Res.* 2012;27(8):1839–48.
27. Weinreb NJ, Charrow J, Andersson HC, et al. Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. *Am J Med.* 2002;113(2):112–9.
28. Malgo F, Hamdy NAT, Papapoulos SE, Appelman-Dijkstra NM. Bone material strength as measured by microindentation in vivo is decreased in patients with fragility fractures independently of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 May;100(5):2039–45.
29. Duarte Sosa D, Eriksen EF. Women with previous stress fractures show reduced bone material strength. *Acta Orthop.* 2016; 87(6): 626–31.
30. Giuffrida G, Cingari MR, Parrinello N, et al. Bone turnover markers in patients with type 1 Gaucher disease. *Hematol Rep.* 2012;4(4):70–9.
31. Giuffrida G, Cappellini MD, Carubbi F, Di Rocco M, Iolascon G. Management of bone disease in Gaucher disease type 1: clinical practice. *Adv Ther.* 2014 Dec;31(12):1197–212.
32. Diez-Perez A, Güerri R, Nogues X, et al. Microindentation for in vivo measurement of bone tissue mechanical properties in humans. *J Bone Miner Res.* 2010;25(8):1877–85.
33. Farr JN, Drake MT, Amin S, Melton LJ, McCready LK, Khosla S. In vivo assessment of bone quality in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Bone Miner Res.* 2014;29(4):787–95.
34. Rudäng R, Zoulakis M, Sundh D, et al. Bone material strength is associated with areal BMD but not with prevalent fractures in older women. *Osteoporos Int.* 2016;27(4):1585–92.
35. Mellibovsky L, Prieto-Alhambra D, Mellibovsky F, et al. Bone tissue properties measurement by reference point indentation in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2015;30(9): 1–22.
36. Furst JR, Bandeira LC, Fan W-W, et al. Advanced glycation endproducts and bone material strength in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Jun;101(6):2502–10.
37. Musumeci M, Palermo A, D'Onofrio L, et al. Serum chitotriosidase in postmenopausal women with severe osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2016 Feb;27(2):71–6.

Bone density, microarchitecture, and material strength in chronic kidney disease patients at the time of kidney transplantation

M. J. Pérez-Sáez, ^{1,2,3}

S. Herrera, ^{2,4,5}

D. Prieto-Alhambra, ^{2,5,6}

L. Vilaplana, ^{2,4,5}

X. Nogués, ^{2,4,5}

M. Vera, ^{1,2}

D. Redondo-Pachón, ^{1,2,3}

M. Mir, ^{1,2}

R. Güerri, ^{2,4,5}

M. Crespo, ^{1,2,3}

A. Díez-Pérez, ^{2,4,5}

Email adiez@parcdesalutmar.cat

J. Pascual, ^{1,2,3}

Email julpascual@gmail.com

¹ Department of Nephrology, Hospital del Mar, Autonomous University of Barcelona, Passeig Marítim 25-29, 08003 Barcelona, Spain AQ1

² Institut Mar d'Investigacions Mèdiques, Barcelona, Spain

³ REDINREN, Instituto Carlos III, Madrid, Spain

⁴ Department of Internal Medicine, Hospital del Mar, Autonomous University of Barcelona, Passeig Maritim 25-29, 08003 Barcelona, Spain

⁵ RETICEF, Instituto Carlos III, Madrid, Spain

⁶ Oxford NIHR Musculoskeletal Biomedical Research Unit, Nuffield Department of Orthopaedics, Rheumatology and Musculoskeletal Sciences, University of Oxford, Windmill Road, Oxford, OX3 7HE UK AQ2

Abstract

Summary

Bone health is assessed by bone mineral density (BMD). Other techniques such as trabecular bone score and microindentation could improve the risk of fracture's estimation. Our chronic kidney disease (CKD) patients presented worse bone health (density, microarchitecture, mechanical properties) than controls. More than BMD should be done to evaluate patients at risk of fracture.

Introduction

BMD measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) is used to assess bone health in end-stage renal disease (ESRD) patients. Recently, trabecular bone score (TBS) and microindentation that can measure microarchitectural and mechanical properties of bone have demonstrated better correlation with fractures than DXA in different populations. We aimed to characterize bone health (BMD, TBS, and strength) and calcium/phosphate metabolism in a cohort of 53 ESRD patients undergoing kidney transplantation (KT) and 94 controls with normal renal function.

Methods

Laboratory workout, lumbar spine/hip BMD measurements (using DXA), lumbar spine TBS, and bone strength were carried out. The latter was assessed with an impact microindentation device, standardized as percentage of a reference value, and expressed as bone material strength index (BMSi) units. Multivariable linear regression was used to study differences between cases and controls adjusted by age, gender, and body mass index.

Results

Among cases, serum calcium was 9.6 ± 0.7 mg/dl, phosphorus 4.4 ± 1.2 mg/dl, and intact parathyroid hormone 214 pg/ml [102–390]. Fourteen patients (26.4%) had prevalent asymptomatic fractures in spinal X-ray. BMD was significantly lower among ESRD patients compared to controls: lumbar 0.966 ± 0.15 vs 0.982 ± 0.15 (adjusted $p = 0.037$), total hip 0.852 ± 0.15 vs 0.902 ± 0.13 (adjusted $p < 0.001$), and femoral neck 0.733 ± 0.15 vs 0.775 ± 0.12 (adjusted $p < 0.001$), as were TBS (1.20 [1.11–1.30] vs 1.31 [1.19–1.43] (adjusted $p < 0.001$)) and BMSi (79 [71.8–84.2] vs 82. [77.5–88.9] (adjusted $p = 0.005$)).

Conclusions

ESRD patients undergoing transplant surgery have damaged bone health parameters (density, microarchitecture, and mechanical properties) despite acceptably controlled hyperparathyroidism. Detecting these abnormalities may assist in identifying patients at high risk of post-transplantation fractures.

Keywords

Bone mineral disease
Bone ~~mineral~~material strength index
Chronic kidney disease

Microindentation
Trabecular bone score

Electronic supplementary material

The online version of this article (doi: 10.1007/s00198-017-4065-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Introduction

In the early period after transplant, mineral and bone disease experiences a deep change, with a readjustment of secondary hyperparathyroidism (HPT) parameters and an initial decrease in bone mineral density (BMD), up to 20% in the first 6 months, with further stabilization [1, 2]. According to this, a higher risk of fracture in kidney transplant (KT) population is observed in the first years after transplant, when also the dose of glucocorticoids administered is higher [3].

In order to prevent these fractures, predicting the population at risk has become a matter of concern for transplant community. The assessment of bone in end-stage renal disease (ESRD)-KT candidates is currently performed as in the general population, with BMD measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) because it is available and non-invasive. However, there are limitations for DXA use alone since bone quantity only captures the amount of mineral but cannot measure either microarchitecture or tissue characteristics (i.e., bone tissue quality) aspects relevant for the resistance to fracture in these patients [4, 5]. In order to improve the bone strength's estimation, other techniques have been developed, such as trabecular bone score (TBS) that can assess trabecular microarchitecture at the lumbar spine by analyzing DXA images with specific software [6, 7]. TBS has been applied in hemodialysis patients [8]. Reference point indentation (RPI) is another novel technique that claims to directly measure the mechanical properties of bone at a tissue level [9, 10]. RPI provides the resistance of cortical bone tissue to the opening of micro-cracks with a very fine probe, the phenomenon closely mimicking the initiating crack of the starting fracture [9, 11]. In previous studies, RPI has

demonstrated better performance than DXA to discriminate osteoporotic fracture risk among healthy controls [9] and better clinical correlation with fractures in patients with atypical fracture compared to controls or patients with typical fractures [10], type 2 diabetes mellitus post-menopausal women compared to non-diabetic controls [12], or patients with osteopenia and fragility fractures [13]. Furthermore, we have recently reported the feasibility of RPI to better assess bone strength and risk of fracture in long-term stable renal allograft recipients [14].

We therefore aimed to analyze bone health (density, trabecular microarchitecture, and tissue-level quality/strength) in a cohort of ESRD patients at the time of undergoing KT surgery.

Material and methods

A cross-sectional study was performed in a sample of ESRD patients recruited between July/2012 and February/2014 during hospital admission for KT surgery. Written informed consent was obtained, and the Ethics Review Board in our institution approved the study protocol.

A general clinical history, physical examination, and routine laboratory measurements, including levels of intact parathyroid hormone (iPTH) (electrochemiluminescence, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) and 25-OH vitamin D (25[OH]D) (ELISA, IDS, Boldon, UK), were measured hours before the KT procedure. iPTH and 25[OH]D results are expressed as medians and interquartile ranges [IQR].

Bone health assessments including spine X-ray (anterioposterior and lateral), DXA scan, and bone microindentation were taken within the first week post-operatively (i.e., post-transplant). Spinal X-rays were informed by two independent observers using Genant's semiquantitative method [15] accepting grade I or above (loss >20% of one of the vertebral heights) as a fracture. Discrepancies were solved by consensus. BMD was measured using DXA scans at lumbar spine and proximal hip (Hologic QDR 4500 SL® (Hologic Inc. Bedford, MA,

USA)). DXA-based TBS was evaluated using the same lumbar spine BMD measurements using iNsite® v 2.1 (Med-Imaps, Merignac, France). Bone microindentation was performed at the anterior face of tibia with a handheld reference point indenter device, Osteoprobe® (Active Life Scientific, Santa Barbara, CA, USA) following the recently described protocol [16]. In brief, after local anesthesia, a preload of 10 N followed by a 30-N indentation was performed with a test probe with a conic edge of 4 µm. Average values of eight indents were calculated by a computerized algorithm. Five calibration indents were then performed in a polymethylmethacrylate block (BMSi-100 Reference Material). Ratio between both tibia and the reference material measurements yields the final parameter of bone mineral strength index (BMSi) as previously described [9].

The results were compared with those found in a control group of healthy individuals, selected from our reference data for microindentation. They were healthy people without history of fragility fracture, bone disease, rheumatoid arthritis, metabolic or endocrine diseases, concurrent or prior treatment with bisphosphonates, oral corticosteroids, or any other bone-active drug. DXA, TBS, and microindentation were performed following the same protocol than ESRD patients, and a lateral radiograph of the spine was obtained if there is any history of trauma or spinal symptoms to rule out vertebral fractures.

Statistical analyses were performed with SPSS v 22.0 (IBM®) by using a Student's *t* test for parametric variables and Mann-Whitney *U* test for non-parametric variables. Multivariable linear regression models were fitted to analyze the association between chronic kidney disease (CKD) status and BMD, TBS, and BMSi after adjustment for age, gender, and body mass index (BMI). We also use it to analyze the association between being fractured at the time of transplantation and BMD, TBS, and BMSi.

Results

Patients

Fifty-three patients were included in the study. Mean age was 55.8 ± 12.1 years, with 77.8% of Caucasians and 53.7% female. Mean BMI was $27.5 \pm 5.7 \text{ kg/m}^2$ with 25.9% of diabetic patients. It was the first transplant for 90.74% of them with a median time on dialysis of 21 months [IQR 11–36].

We compared patients with 94 healthy controls with a mean age of 50.2 ± 16 years, 78.7% female, and BMI $24.8 \pm 4 \text{ kg/m}^2$ (supplementary Table S1).

Laboratory measurements

Just before KT, the patients had serum calcium levels of $9.6 \pm 0.7 \text{ mg/dl}$ (corrected by serum albumin), phosphorus $4.4 \pm 1.2 \text{ mg/dl}$, 25[OH]D 7.9 ng/ml [3.1–16.7], and iPTH 214 pg/ml [102–390]. To achieve this HPT control, 76% were receiving phosphorus binders, 28% native vitamin D, 17% active vitamin D, 22% analogs of vitamin D, and 32% calcimimetics.

Bone tests

Bone health assessments were taken at a median time of 8 days [IQR 6–16] after transplant surgery. Fourteen patients (26.4%) had prevalent asymptomatic fractures in spinal X-ray at the time of KT. Mean baseline values of BMD were 0.966 ± 0.15 (lumbar), 0.852 ± 0.15 (total hip), and 0.733 ± 0.15 (femoral neck). Median TBS was 1.20 [IQR 1.11–1.3]. RPI was performed in 35 of 53 ESRD-KT candidates with median BMSi value of 79 [IQR 71.8–84.2].

The results for patients and controls are shown in Table 1. DXA was performed in 77 controls. Controls had better BMD (g/cm^2) at the lumbar spine, total hip, and femoral neck when we adjusted the model by age, BMI and sex, and better Z-score adjusting the model by BMI. They also had higher values of BMSi and TBS in the univariate analysis and after the adjustment.

Table 1

Bone study comparison between end-stage renal disease patients and healthy controls

	Patients (n = 53)	Controls (n = 94)	p value (crude)	B coefficient [95% CI] (age, sex, and BMI adjusted)	p value (adjusted)
Dorso-lumbar X-ray	14 with fracture	–			
Dual-energy X-ray absorptiometry					
BMD lumbar (g/cm ²) Z-score ^a	0.966 ± 0.15 0.1 [-0.95–0.9]	0.982 ± 0.15 0.05 [-0.5–1]	0.558 0.370	–0.05 [–0.1 to (–0.003)] –0.189 [–1.03 to (–0.004)]	0.037 0.032
BMD total hip (g/cm ²) Z-score ^a	0.852 ± 0.15 –0.4 [-1.15–0.5]	0.902 ± 0.13 0.05 [-0.6–0.8]	0.061 0.013	–0.1 [–0.14 to (–0.05)] –3.55 [–1.05 to (–0.413)]	<0.001 <0.001
BMD femoral neck (g/cm ²) Z-score ^a	0.733 ± 0.15 –0.4 [-1.1–0.6]	0.775 ± 0.12 0.2 [-0.5–0.7]	0.070 0.062	–0.8 [–0.12 to (–0.04)] –0.282 [–0.859 to (–0.227)]	<0.001 <0.001
Trabecular bone score ^b					
Values are expressed by mean ± standard deviation or median [interquartile range]					
<i>BMD</i> bone mineral density, <i>BMSi</i> bone mineral strength index					
^a Z-score is BMI adjusted					
^b Performed in all patients and 77 controls					
^c Performed in 35 patients and all controls					

	Patients (n = 53)	Controls (n = 94)	p value (crude)	B coefficient [95% CI (age, sex, and BMI adjusted)	p value (adjusted)
	1.20 [1.11–1.3]	1.31 [1.19–1.43]	<0.001	-1.13 [-0.165 to (-0.06)]	<0.001
Reference point indentation ^c					
BMSi (units)	79 [71.8–84.2]	82.6 [77.5–88.9]	0.004	-4.7 [-8 to (-1.5)]	0.005
Values are expressed by mean ± standard deviation or median [interquartile range]					
<i>BMD</i> bone mineral density, <i>BMSi</i> bone mineral strength index					
^a Z-score is BMI adjusted					
^b Performed in all patients and 77 controls					
^c Performed in 35 patients and all controls					

Given the known higher risk of fracture and markedly lower absolute BMD values between women compared to men, we have performed the analysis in men and women separately. We found a similar behavior regarding BMD at hip and BMSi values despite gender in ESRD patients (supplementary Tables S2 and S3).

We compared bone parameters between patients who had preexisting asymptomatic fractures at the time of transplantation and those without fractures. BMD, TBS, and BMSi were similar between both subgroups (supplementary Table S4). They also remained unmodified after excluding diabetic patients (supplementary Table S5). On the other hand, longer time on dialysis and higher PTH levels seem to have a negative impact on BMD, with no alteration in TBS or BMSi values (supplementary Tables S6 and S7). Finally, we did not find any difference in bone parameters after adjustment for age, sex, and BMI according to previous management with vitamin D, paricalcitol, or

cinacalcet (data not shown).

Discussion

We have performed a cross-sectional study in a cohort of ESRD patients undergoing KT, in whom we assessed bone and mineral status using three different techniques that measure bone density, trabecular microarchitecture, and tissue-level quality. We describe an important deterioration in all these markers of bone strength providing a comprehensive picture of the skeletal impact of ESRD. Despite all this, calcium/phosphate and iPTH levels were relatively controlled, stressing the value of preoperative specific bone health assessments (DXA or similar) for the identification of patients at high risk of post-transplantation fractures.

Bone and mineral disease related to CKD represents a constellation of disorders that may affect vascular system and skeleton of renal patients. The analytical values recommended by the guidelines [17] are not always easy to achieve in this population. In comparison with other studies [4, 8], our cohort of ESRD patients presented with better levels of phosphorus and PTH according to guidelines but with a significant 25[OH]D deficiency.

Low bone mass is frequently seen in patients in predialysis CKD [18] and ESRD [4, 8]. Measurements of BMD by DXA have classically perceived as the minimal workup for bone assessment. However, real-life practice suggests that they are not a common practice in the management of CKD patients, as their capability to predict fractures in this population is not fully established [17]. Although recent reports show a higher risk of fractures among CKD patients with lower BMD values [18], other aspects such as bone quality [5] might substantially contribute to the 4.4-fold higher risk of fractures in ESRD population [19]. In addition, the limitations of DXA in CKD go further because measurements can be affected by extra-skeletal calcifications (common in this population), osteomalacia, and osteosclerosis [5]. Our patients had lower values of BMD at lumbar spine, total hip, and femoral neck and a high prevalence of asymptomatic fractures, confirming a fragile

bone status that may worsen early after transplantation. Previous studies in ESRD population have reported low BMD values predominantly in total hip and femoral neck [20]. We do not have a clear explanation for this discrepancy, and we could speculate that some uncontrolled characteristic of our series might account for this finding.

Stepping forward, TBS has been reported to be below normal ranges in dialysis patients [8]. We have recently showed similar TBS values between a cohort of long-term KT recipients and controls, demonstrating an almost complete recovery in their values more than 10 years after transplantation [14]. However, our ESRD patients had significantly lower TBS values than controls, indicating previous microarchitectural damage and potentially a higher fracture risk following transplantation, particularly when exposed to agents such as corticosteroids.

The development of minimally invasive techniques that may improve the estimation of the bone strength in populations at risk of fracture has been achieved by RPI, a novel technique that directly measures the mechanical properties of bone at a tissue level [9, 10]. In previous studies, RPI has demonstrated potential value in estimating bone strength in several clinical scenarios where BMD does not fully account for the increased risk of fracture [9, 12, 13, 21]. In KT patients, RPI has been tested in a pilot study [14], assessing the feasibility of the technique. In our cohort, BMSi values are also lower than controls, confirming poor bone mechanical properties of the tissue among ESRD patients undergoing KT.

In addition, this bone deteriorated status remained when we performed sensitivity analysis in order to discriminate by other risk factors for fractures (fractured patients, women, and diabetics). Longer time on dialysis and higher levels of PTH were also related to worse BMD.

Our study has some limitations. Other bone biomarkers apart from PTH were not available. The relatively limited number of study subjects prevents from carrying out subgroup analyses that might provide a deeper insight on the mechanisms of bone deterioration. However,

fractures imply an important morbidity and mortality. Therefore, a comprehensive evaluation in the advanced CKD population of bone resistance to fracture, including microarchitectural and tissue mechanical strength with feasible and convenient techniques, is warranted, especially in those undergoing KT. Obviously, longitudinal analyses will be necessary to confirm the usefulness of the applied bone assessment techniques in ESRD patients.

In summary, ESRD patients undergoing KT present altered bone properties (in terms of bone density, trabecular microarchitecture, and tissue-level strength) despite well-controlled analytical HPT. Bone health assessments should be considered for the identification of high-risk patients regardless of pretransplantation lab findings.

Acknowledgements

This study was performed in part by a research grant from the Spanish Society of Nephrology. MJPS has support from a Rio Hortega contract 2016-17, ISCIII. MJPS and SH did this work as part of their doctoral thesis at the Universitat Autònoma Barcelona. MC and JP are supported by grants PI13/0598, PI16/00617 Intensification Programs (Spanish Ministry of Health ISCIII) 2015-16, and RedinRen RD16/0009/0013. Microindentation techniques are supported in part by RETICEF, Instituto Carlos III (FEDER Funds).

Compliance with ethical standards

Written informed consent was obtained, and the Ethics Review Board in our institution approved the study protocol

AQ3

Conflict of interest Maria José Pérez-Sáez, Sabina Herrera, Laia Vilaplana, Xavier Nogués, Dolores Redondo-Pachón, Marisa Mir, Roberto Güerri, Marta Crespo, and Julio Pascual declare that they have no conflict of interest.

Daniel Prieto-Alhambra's institutions have received research funding in the form of unrestricted research grants from AMGEN, BIOIBERICA, and Servier Laboratoires.

Adolfo Díez-Pérez is a shareholder of Active Life Scientific.

Electronic supplementary material

Table S1

(DOCX 11 kb)

Table S2

(DOCX 12 kb)

Table S3

(DOCX 12 kb)

Table S4

(DOCX 13 kb)

Table S5

(DOCX 13 kb)

Table S6

(DOCX 13 kb)

Table S7

(DOCX 13 kb)

References

1. Copley JB, Wüthrich RP (2011) Therapeutic management of post-kidney transplant hyperparathyroidism. *Clin Transplantation* 25(1):24–39
2. Mikuls TR, Julian BA, Bartolucci A, Saag KG (2003) Bone mineral density changes within six months of renal transplantation. *Transplantation* 75(1):49–54
3. Naylor KL, Li AH, Lam NN, Hodsman AB, Jamal SA, Garg AX (2013) Fracture risk in kidney transplant recipients: a systematic review. *Transplantation* 95(12):1461–1470
4. Malluche HH, Davenport DL, Cantor T, Moniere-Faugere MC (2014) Bone mineral density and serum biochemical predictors of bone loss in patients with CKD on dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 9:1254–1262
5. Ott SM (2016) Bone strength: more than just bone density. *Kidney Int* 89(1):16–19
6. McCloskey EV, Odén A, Harvey NC et al (2016) A meta-analysis of trabecular bone score in fracture risk prediction and its relationship to FRAX. *J Bone Miner Res* 31(5):940–948
7. Silva BC, Leslie WD, Resch H et al (2014) Trabecular bone score: a non invasive analytical method based upon the DXA image. *J Bone Miner Res* 29:518–530
8. Burnerová L, Ronová P, Veresová J et al (2016) Osteoporosis and impaired trabecular bone score in hemodialysis patients. *Kidney Blood Press Res* 41:345–354
9. Díez-Pérez A, Güerri R, Nogués X et al (2010) Microindentation for in vivo measurement of bone tissue mechanical properties in humans. *J Bone Mineral Res* 25(8):1877–1885

10. Güterri-Fernández RC, Nogués X, Quesada Gómez JM et al (2013) Microindentation for in vivo measurement of bone tissue properties in atypical femoral fracture patients and controls. *J Bone Mineral Res* 28(1):162–168
11. Hansma P, Yu H, Schultz D et al (2009) The tissue diagnostic instrument. *Rev Sci Instrum* 80(5):054303
12. Farr JN, Drake MT, Amin S et al (2014) In vivo assessment of bone quality in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Bone Mineral Res* 29(4):787–795
13. Malgo F, Hamdy NA, Papapoulos SE et al (2015) Bone material strength as measured by microindentation in vivo is decreased in patients with fragility fractures independently of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 100(5):2039–2045
14. Pérez-Sáez MJ, Herrera S, Prieto-Alhambra D, et al. (2016) Bone density, microarchitecture and tissue quality long-term after transplant. *Transplantation* [epub ahead of print]
15. Genant HK, Wu CY, van Kujik C, Nevitt M (1993) Vertebral fracture assessment using a semi-quantitative technique. *J Bone Miner Res* 8:1137–1148
16. Díez Pérez A, Bouxsein ML, Eriksen EF et al (2016) Recommendations for a standard procedure to assess cortical bone at the tissue-level in vivo using impact microindentation. *Bone Reports* 5:181–185
17. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group (2009) KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 113:S1–S130
18. Bucur RC, Panjwani DD, Turner L, Rader T, West SL, Jamal SA

(2015) Low bone mineral density and fractures in stages 3-5 CKD: an updated systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 26:449–458

19. Alem AM, Sherrard DJ, Gillen DL et al (2000) Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* 58:396–399

20. Ott SM (2009) Review article: bone density in patients with chronic kidney diseases stages 4-5. *Nephrology (Carlton)* 14(4):395–403

21. Mellibovsky L, Prieto-Alhambra D, Mellibovsky F et al (2015 Sep) Bone tissue properties measurement by reference point indentation in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* 30(9):1651–1656

ANEXO: Publicación sobre uso clínico de la microindentación

Bone 95 (2017) 175–182



Contents lists available at ScienceDirect

Bone

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bone



Review Article

Clinical experience with microindentation *in vivo* in humans



Sabina Herrera, Adolfo Diez-Perez *

Department of Internal Medicine, Hospital del Mar Institute of Medical Investigation, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2016
Revised 31 October 2016
Accepted 2 November 2016
Available online 11 November 2016

Keywords:

Bone microindentation
Bone mechanics
Cortical bone assessment
Reference Point Indentation

ABSTRACT

Densitometry and imaging techniques are currently used in clinical settings to measure bone quantity and spatial structure. Recently, Reference Point Indentation has opened the possibility of directly assessing the mechanical characteristics of cortical bone in living individuals, adding a new dimension to the assessment of bone strength. Impact microindentation was specifically developed for clinical studies and has been tested in several populations where there are discrepancies between bone density and fracture propensity, such as type 2 diabetes, atypical femoral fracture, stress fractures, glucocorticoid treatment, patients with osteopenia and fragility fractures, and individuals infected with HIV, among others. Microindentation will complement, not replace, existing bone analysis methods, particularly where bone mineral density does not fully explain fracture propensity. The available evidence provides solid proof of concept; future studies will fully define the role of microindentation for the assessment of bone health both in clinics and in research.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Foreword	176
2. Measurement of bone strength.	176
3. Reference Point Indentation techniques.	176
4. Early clinical studies: cyclic microindentation	176
4.1. Discriminant ability between fractures and controls	176
4.2. Atypical femoral fractures.	177
5. Clinical studies with impact microindentation	177
5.1. Type 2 diabetes mellitus	177
5.2. Racial differences in material properties	177
5.3. Patients with osteopenia and fragility fractures	178
5.4. Glucocorticoid-induced bone fragility	179
5.5. Patients with HIV	179
5.6. Chronic atrophic gastritis	179
5.7. Kidney transplant	179
5.8. Stress fractures	179
5.9. Fractures in the elderly	179
5.10. Correlation with subcutaneous fat	179
6. Preliminary results of other clinical studies	179
7. Discussion	179
8. Future development needs and opportunities	180
Conflict of interest	181
Acknowledgments	181
References	181

* Corresponding author at: Department of Internal Medicine, Hospital del Mar, P. Maritim 25-29, 08003 Barcelona, Spain.
E-mail address: ADiez@parcdesalutmar.cat (A. Diez-Perez).

Abbreviations and glossary of terms

BMD	Areal bone mineral density measured by DXA.
BMSi	Bone Material Strength index. Ratio of the penetration of a probe into the bone compared to a reference standard of polymethyl methacrylate, measured by impact microindentation. Expressed in absolute units [1].
CID	Creep indentation distance. Calculated as a constant force during the 1st indentation cycle in cyclic microindentation. Expressed in microns [2].
Cyclic microindentation	Application to the bone of a series of cycles of force, using the BioDent™ laboratory instrument [2].
IDI	Indentation Distance Increase. Difference in distance penetrated between the 1st and the last indentation cycle in cyclic microindentation. Expressed in microns [2].
Impact microindentation	Application of a single, high-speed force on the outer cortical bone using a hand-held instrument (Osteoprobe™) [1].
RPI	Reference Point Indentation. Generic term that encompasses both impact microindentation and cyclic microindentation.
TID	Total Indentation Distance. Difference in penetration achieved between the beginning of the 1st and the end of the last indentation cycle in cyclic microindentation. Expressed in microns [2].

1. Foreword

Reference Point Indentation (RPI), a novel technique for direct measurement of mechanical characteristics of cortical bone at a tissue level, was first published in a clinical series of patients in 2010 [2] and since then a number of preclinical and clinical studies have been performed. The present study aimed to review the published clinical experience in different groups of patients and to discuss how RPI can contribute to the assessment of bone health as well as potential development of this new technique. Preclinical results were not included in the analysis.

2. Measurement of bone strength

From a clinical perspective, bone strength could be understood as the ability of bone to resist trauma without breaking. According to the currently accepted definition of osteoporosis [3], bone strength reflects the integration of bone quantity and bone quality. Bone quantity can be measured in the clinical setting by various techniques. Among them, dual-energy X-ray densitometry (DXA) is the most widely used and a standard for the diagnosis and management of osteoporosis. DXA is an excellent predictor of fracture risk [4] and efficiently captures the influence of treatments on bone propensity to fracture [5] in the average patient with osteoporosis.

However, two other aspects contributing to the mechanical strength of bone are important for estimating mechanical competence. The first is the spatial distribution of bone tissue, either at a macroscopic (geometric) or at a microscopic (microarchitectural) level, and the second is the composition of the bone tissue. Spatial distribution of bone tissue can be assessed in clinical practice by a variety of imaging techniques, from radiography to high-definition computed tomography [6] or magnetic resonance imaging [7]. The higher the definition of the images, the better the possibility of accurately measuring microscopic structures. The bone tissue components are also relevant for bone strength. A very long list of tissue constituents contributes to better or worse

mechanical behavior of the bone tissue, including, among others, collagen characteristics [8], crystallinity [9], degree of mineralization and homogeneity [10] and non-collagen proteins [11].

Ultimately, bone mechanical performance is the final result of the integration of bone density, macro/microarchitecture and tissue composition, which can be calculated by building image-based algorithms. Finite-elements analysis [4], the most widely used technique, can estimate overall mechanical competence and also simulate vector forces applied to the bone and their ability to resist them. This strategy integrates the quantitative and architectural components of bone strength, although tissue composition is based on the optical density of the voxel unit. However, its feasibility in clinical practice is restricted due to the limited availability of CT (or MRI) devices. Only the DXA-based TBS (trabecular bone score) is an easy and practical technique for measuring structure in the vertebrae [12].

Direct measurement of the mechanical characteristics of bone requires destructive testing, in which force is applied to a small bone or a sample of bone until it breaks. These tests require sophisticated technology only available in a few biomechanics laboratories. Moreover, invasive bone sampling is required in living patients, either a bone biopsy or a specimen obtained during a surgical procedure. This makes the study cumbersome, expensive and not feasible in daily clinical practice.

Therefore, there is a need for a convenient technique for the assessment of the mechanical characteristics of bone tissue in clinical settings. This was the basis for the development of the Reference Point Indentation (RPI) techniques. We review below the clinical experience published to date.

3. Reference Point Indentation techniques

Two different approaches have been developed for measuring RPI parameters. Both are based on the principle that the deeper a test probe penetrates into a cortical bone's outer surface (at the anterior midtibia), the less resistant is the bone tissue to a mechanical challenge. The early development of RPI was based on a cyclic indentation technique (Fig. 1a); more recently, impact microindentation (Fig. 1b) has been developed for clinical use. Details on both techniques have been previously published [13]. Cyclic microindentation parameters are expressed primarily in terms of indentation distances, although other biomechanical parameters can be calculated, such as the slopes of the loading-unloading curves or the calculation of dissipated energy (Fig. 2A) [2]. Impact microindentation results are expressed as Bone Material Strength index (BMSi) units representing the ratio between the penetration of the probe into the bone and its penetration in a methyl methacrylate reference phantom (Fig. 2B) [14]. The technical protocol for measuring patients with impact microindentation has been recently described [15].

4. Early clinical studies: cyclic microindentation

The first two studies on microindentation in living humans were performed with a cyclic microindentation device. They are summarized in Table 1.

4.1. Discriminant ability between fractures and controls

The first clinical study that validated RPI, using cyclic microindentation [2], was performed in 27 women with osteoporosis-related fractures and 8 controls of comparable ages. Two parameters, Total Indentation Distance (Total ID) and Indentation Distance Increase (IDI), were significantly greater in patients with fracture than in controls, with good (above 90%) areas under the receiver operating characteristic (ROC) curve. The study showed that this technique is capable of discriminating cases with and without fractures, independently of BMD.

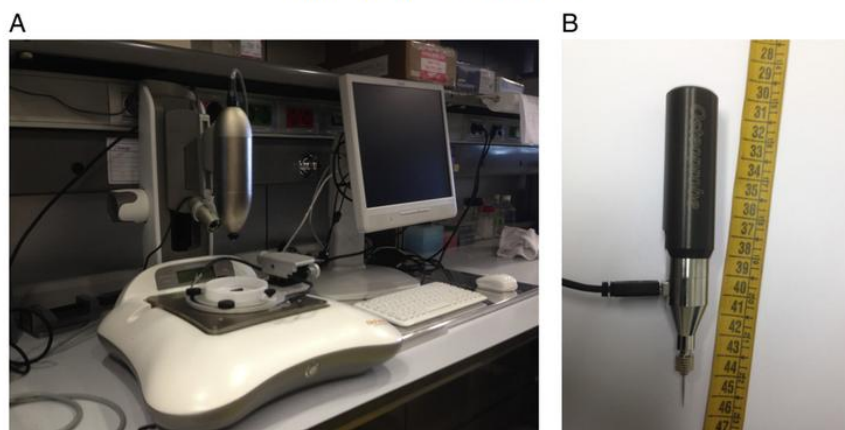


Fig. 1. RPI devices. a) Cyclic Reference Point Indenter (BioDent®); b) Impact Reference Point Indenter (Osteoprobe®).

4.2. Atypical femoral fractures

The second study using cyclic RPI was done in patients with atypical femoral fractures (AFF) after long-term bisphosphonate treatment [16]. Four groups of patients were included: AFF exposed to bisphosphonates ($n = 6$), typical osteoporotic fractures with no previous treatment ($n =$

38), patients on long-term bisphosphonates with no complications ($n = 6$), and fracture-free controls ($n = 20$). Significant differences were observed between control, typical fracture and AFF groups for Total ID and IDI; the deterioration in bone material properties at a tissue level in patients with AFF was similar to that of the osteoporotic fracture group. Moreover, RPI parameters in the group on long-term treatment with no complications did not differ from controls, suggesting that bisphosphonate therapy itself does not deteriorate the microindentation properties of bone tissue.

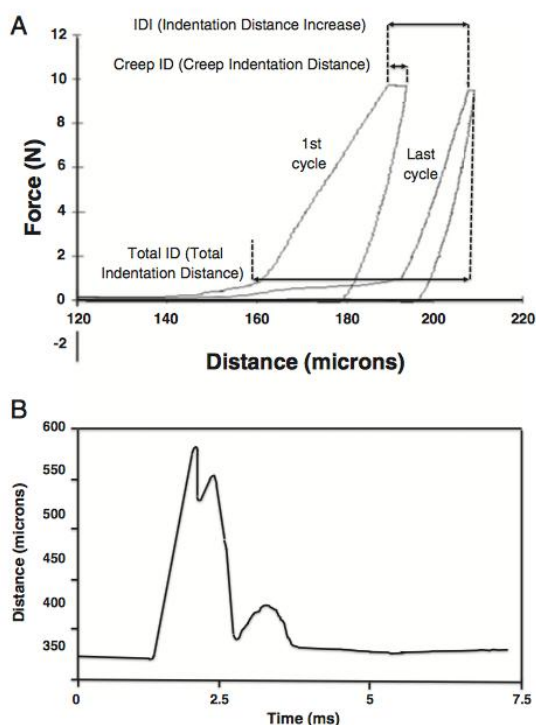


Fig. 2. Schematic representation of the screen captures for A) Cyclic RPI with the force/distance curve and; B) Impact RPI with the distance/time curve (early version of the device).

5. Clinical studies with impact microindentation

Several studies have been performed with impact microindentation in living humans. These are summarized in Table 2.

5.1. Type 2 diabetes mellitus

The first clinical study using impact microindentation [17] studied 60 postmenopausal women, 30 diagnosed with type 2 diabetes for >10 years and 30 age-matched non-diabetic controls. Compared to controls, patients had significantly lower Bone Material Strength index (BMSi) although their bone mineral density (BMD) was similar to age-matched, non-diabetic women. Moreover, the average glycated hemoglobin level over the previous 10 years was negatively correlated with BMSi.

A second study in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus [18] has found that BMSi was significantly reduced in these patients and inversely associated with the duration of the diabetes. Advanced glycation end product accumulation was inversely associated with BMSi and lower bone formation biochemical markers in patients with diabetes but not in controls, further indicating the contribution of BMD-independent factors to the bone disease in these patients.

5.2. Racial differences in material properties

Given that previous studies had failed to identify differences in bone mass or calcium metabolism that could explain the high risk of hip fractures in Norwegian women, Duarte Sosa et al. [19] compared 42 Norwegian with 46 Spanish women, a population with a 50% lower rate of hip fracture. The participants had normal BMD values, without vertebral fractures or secondary osteoporosis. The BMSi value of Norwegian women was significantly lower than in Spanish women, but total hip BMD was significantly higher in the Norwegian participants. Regression

Table 1
Published studies of clinical experience with cyclic microindentation.

Study authors and year	Study design	Study population	Outcomes
Díez-Pérez A, et al. <i>J Bone Miner Res</i> 2010;25:1877–85.	Series of cases and controls.	27 women with osteoporosis-related fractures and 8 controls of comparable ages	Measured Total Indentation Distance and Indentation Distance Increase were significantly greater in fracture patients than in controls. Areas under the receiver operating characteristic curve for the two measurements were above 90%.
Güerri-Fernandez R, et al. <i>J Bone Miner Res</i> 2013;28:162–8.	Series of cases and controls.	Four groups of patients ($n = 70$): 6 atypical femoral fractures, 38 typical osteoporotic fractures, 6 taking long-term bisphosphonates, and 20 controls without fracture	After adjusting by age, significant differences were observed between controls and typical and atypical fractures for Total Indentation Distance and for Indentation Distance Increase.

analysis revealed that indentation values did not vary with BMD. The researchers concluded that impaired bone material properties and geometrical factors linked to higher stature provide a plausible hypothesis for the higher risk of fractures in the Scandinavians.

5.3. Patients with osteopenia and fragility fractures

It is well known that, numerically, most fragility fractures occur in patients with osteopenia assessed by DXA [20,21]. Malgo et al. [22]

Table 2
Studies with impact microindentation. The bold numbers in the study group column represent the total number of indented patients in each study (i.e. cases and controls). The sum of all these patients is 1244 and the total number of studies performed with this device is 14.

Study authors and year	Microindenter used	Study design	Study population	Outcomes
Farr JN et al. <i>J Bone Miner Res</i> . 2014 Apr;29(4):787–95		Series of cases and controls.	60 postmenopausal women including 30 patients diagnosed with T2D for >10 years and 30 age-matched, nondiabetic controls	T2D patients had significantly lower BMS, adjusted $p = 0.022$. In patients with T2D, the average glycated hemoglobin level over the previous 10 years was negatively correlated with BMS ($r = -0.41$; $p = 0.026$)
Duarte Sosa D, et al. <i>J Bone Miner Res</i> 2014;30:1784–9	Impact microindentation	Series of cases and controls??	42 Norwegian and 46 Spanish women with normal BMD values, without vertebral fractures or secondary osteoporosis. 88	BMSi value of Norwegian women was significantly inferior when compared to Spanish women $p < 0.001$
Malgo F, et al. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> 2015;100:2039–45	Impact microindentation	Cross-sectional study	90 patients with low bone mass with or without a fragility fracture. Sixty-three patients had sustained one or more fragility fractures.	BMS values were lower in patients with a fragility fracture compared with nonfracture patients ($p = 0.032$) despite similar BMD. In patients with osteopenia, BMS was significantly lower in fracture patients than in nonfracture $p = 0.015$
Mellibovsky L, et al. <i>J Bone Miner Res</i> 2015;30:1651–6.	Impact microindentation	Series of cases	52 consecutive cases were included in the study within 4 weeks of initiating glucocorticoid treatment. 19 patients received treatment with calcium plus 25 (OH) vitamin D; 14 risenedronate; 14 denosumab; and 5 received teriparatide.	Changes in cortical bone indentation properties, at the tissue level, can be tracked longitudinally using the Reference Point Indentation technique in patients exposed to systemic glucocorticoid treatment. These changes occur very early (within the first few weeks) after starting glucocorticoids, well before BMD imaging by DXA can detect any alteration.
Güerri-Fernandez R, et al. <i>J AIDS</i> . 2016 Jul 1;72(3):314–8	Impact microindentation	Series of cases and controls.	50 infected with HIV and 35 controls. 85	HIV infection is associated with bone damage, independently of BMD. $p < 0.001$
Sundh D, et al. <i>J Bone Miner Res</i> 2016;31:749–57	Impact microindentation	Series of cases	202 women, bone parameters and subcutaneous fat were measured at the tibia	BMSi was inversely correlated to body mass index (BMI) ($r = -0.17$, $p = 0.01$), whole body fat mass ($r = -0.16$, $p = 0.02$), and, in particular, to tibia s.c. fat ($r = -0.33$, $p < 0.001$).
Aasared KM et al. <i>Scand J Gastroenterol</i> 2016 Feb 8	Impact microindentation	Cross-sectional study	17 chronic atrophic gastritis 41 sex- and age-matched controls. 58	Lower lumbar BMD, increased frequency of osteopenia and osteoporosis in male, but not female patients with CAG. BMS did not differ between the groups.
Pérez-Sáez MJ et al. <i>Transplantation</i> 2016. Pub ahead of print	Impact microindentation	Series of cases and controls.	40 long-term after kidney transplant and 94 sex-age matched controls. 134	BMD was lower at lumbar spine ($p = 0.025$), total hip ($p < 0.001$) and femoral neck ($p < 0.001$) in KTR than in controls. BMSi was also lower in KTR ($p = 0.012$) although this difference disappeared after adjusted model by age, gender and body mass index ($p = 0.145$).
Duarte Sosa D, et al. <i>Acta Orthop</i> . 2016 Jun 20:1–6.	Impact microindentation	Series of cases and controls.	30 women with previous stress fractures and in 30 normal controls. 60?	BMSi was inferior in patients with previous stress fracture, but was unrelated to BMD and bone turnover. $p = 0.02$
Rudäng R et al. <i>Osteoporosis int</i> 2016 APR; 27(4): 1585–92	Impact microindentation	Cohort	211 older women	BMSi was positively associated with aBMD of the total hip ($\beta = 0.14$, $p = 0.04$), non-dominant radius ($\beta = 0.17$, $p = 0.02$), and lumbar spine (L1–L4) ($\beta = 0.14$, $p < 0.05$). No association in crude or adjusted BMSi with prevalent fractures.
Malgo F et al. abstract al ENDO2016, Boston, Massachusetts	Impact microindentation	Cross-sectional study	32 well-controlled acromegalic patients and 32 age-matched controls. 64	Adjusted for BMI, LS BMD was not significantly different between acromegaly patients and controls, but BMSi was lower than in controls $p = 0.004$
Furst JR et al. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> 2016 JUN;101(6):2502–10.	Impact microindentation	Cross-sectional study	16 postmenopausal women with T2D and 19 matched controls. 35	BMSi was reduced by 9.2% in T2D ($p = 0.02$) and was inversely associated with the duration of T2D ($r = -0.68$, $p = 0.004$). Increased SAF was associated with reduced BMSi ($r = -0.65$, $p = 0.006$) and lower bone formation marker procollagen type 1 amino-terminal propeptide ($r = -0.63$, $p = 0.01$) in T2D, whereas no associations were seen in controls

carried out a cross-sectional study of 90 patients with low bone mass with or without fragility fractures; 63 of the patients had sustained one or more fragility fractures. BMSi values were lower in patients with a fragility fracture compared with non-fracture patients, despite similar BMD, and were comparable in patients with a fragility fracture whether they had osteopenia or osteoporosis. In patients with osteopenia, BMSi was significantly lower in patients with fracture than in the non-fracture group. The fact that BMSi values were significantly decreased in patients with fragility fractures regardless of osteopenia or osteoporosis suggests that bone material properties are compromised in these patients and play an important role in the development of fractures regardless of BMD.

5.4. Glucocorticoid-induced bone fragility

Mellibovsky et al. [23] analyzed a series of patients who were within 4 weeks of initiating glucocorticoid treatment. As a bone-protective therapy, they received either calcium + vitamin D alone or were treated with risedronate, denosumab or teriparatide. BMSi was measured at baseline, 7 weeks and 20 weeks. There was no association between initial individual glucocorticoid dose and BMSi change. After adjustments, BMSi significantly decreased in the Ca + D-alone group, did not significantly change in the risedronate group and significantly increased in both the denosumab and teriparatide-treated groups, with significant changes already detectable at the first follow-up visit (after 7 weeks of therapy). No changes were detected in BMD in such a short period of time. This was the first study to show early changes in cortical bone indentation properties after systemic glucocorticoid treatment with microindentation, at a time when BMD imaging by DXA cannot detect any alteration.

5.5. Patients with HIV

Patients with HIV have an increased risk of fracture [24]. This led to the first study designed to measure BMSi in a group of individuals infected with the HIV virus [25]. Impact microindentation results showed a significantly lower BMSi in patients with HIV than in controls; the study groups had no significant differences in BMD at any of the sites examined.

5.6. Chronic atrophic gastritis

Men, but not women, with chronic atrophic gastritis [26] have been found to have lower lumbar BMD, a higher frequency of osteoporosis at the lumbar spine and osteopenia at total hip, compared to controls. A trend toward a lower trabecular bone score was observed in the patient group, compared to controls. BMSi did not differ by sex or between patients and controls, probably as a result of the small number of patients included in the study.

5.7. Kidney transplant

In a long-term (> 10 years) series of patients who received a kidney transplant [27], BMD was lower at the lumbar spine, total hip and femoral neck, compared to controls. A decrease in BMSi was also observed, although this difference disappeared in the adjusted model (for age, gender and body mass index (BMI)). These results suggest that bone tissue mechanical characteristics are restored in the long term after kidney transplant, even if there is not a complete normalization of BMD.

5.8. Stress fractures

Mean BMSi in a group of women with stress fracture was significantly lower than in controls [28]. The fracture group also had a significantly lower mean BMD than the controls. There was no correlation between BMSi and BMD or bone turnover. This study suggests that a

deterioration of material properties of bone is associated with – or contributes to – stress fractures.

5.9. Fractures in the elderly

In a cohort of elderly women with and without fractures, Rudäng et al. [29] found that BMSi was positively associated with BMD of the total hip, non-dominant radius, and lumbar spine, although there was no association between crude or adjusted BMSi and prevalent fractures. In this study, BMSi was associated with areal BMD but was not related to fracture.

5.10. Correlation with subcutaneous fat

A study by Sundh et al. [30] measured bone parameters and subcutaneous fat at the tibia in a group of Scandinavian women. BMSi was inversely correlated to body mass index, whole body fat mass and, in particular, to subcutaneous fat. This tibia fat was found to be independent of covariates and associated with BMSi, cortical porosity (Ct. Po) and cortical volumetric (Ct. v) BMD. BMSi was independent of covariates associated with cortical porosity and cortical volumetric BMD at the distal tibia. In this first study to associate fat mass with BMSi, fat was independently and inversely associated with BMSi and Ct. v BMD but positively associated with Ct. Po. This would suggest a possible adverse effect of adipose tissue on bone quality and bone microstructure.

6. Preliminary results of other clinical studies

Some clinical results have been communicated as abstracts to medical meetings and therefore can be only briefly discussed. Malgo et al. [31] studied well-controlled patients with acromegaly and matched controls with microindentation, finding no differences in BMD but lower BMSi in the patient group. In patients with type 1 Gaucher's disease, Herrera [32] also reported decreased BMSi. A study by Rufus et al. on the feasibility of impact microindentation found excellent patient tolerance and acceptance in a population-based sample and controls [33]. In patients with diabetes, Karim et al. [34] found that individuals with T2D had increased cortical porosity, a nonsignificant trend for increased Advanced Glycation Endproducts (AGE) and compromised biomechanical properties in femoral neck specimens. Similar results were reported by Nilsson et al. [35], showing that microindentation (BMSi) was significantly lower in elderly women with T2D, compared to controls. In older adults with T2D, Barnouin [36] assessed the relationship between aerobic fitness and bone material strength and suggested a correlation of aerobic fitness with higher BMSi. Sundh et al. [37] tested 20 healthy but inactive post-menopausal women, finding that intense mechanical loading resulted in a rapid improvement of bone material properties before any increase in bone mass.

7. Discussion

Bone RPI is emerging as a feasible technique for the clinical settings. After the initial validation study using cyclic microindentation [2], clinical development has focused on impact microindentation, which is much more convenient for clinicians and for patients. Although both techniques follow the same general principle, it is important to note that because the mechanical challenge is different they do not measure the same mechanical properties [13]. Therefore, the results obtained with the former cannot be extrapolated to the latter. Cyclic microindentation is used in laboratory experiments, while clinical studies are now performed with impact microindentation. Again, the extrapolation of preclinical RPI results to the clinical measurements must be done with great caution. Exactly what we measure with RPI is not fully understood. Both techniques show a weak or nonexistent association with BMD and cortical geometry, but there is also a weak correlation between RPI impact and cyclic variables [39]. What RPI does,

when penetrating the outer cortical bone, is to estimate the propensity for the opening of microscopic cracks. The cyclic approach is more similar to a creep test or a low-cycle fatigue test while the impact technique is more similar to a microhardness test [40]. However, the translation of the classical biomechanical test results to RPI variables, and to BMSi in particular, is an unresolved issue.

From a clinical perspective, the beginning of the interest in RPI was the demonstration of its ability to discriminate between individuals with established osteoporosis and controls [2]. Not by chance, later experiments were centered on situations where the risk of fracture is only partially explained by decreased BMD, as in patients with atypical femoral fractures (using cyclic microindentation) [16], patients with type 2 diabetes mellitus (using impact microindentation) [17], or patients with osteopenia and fragility fractures [22]. The common basis for these results was that bone density does not fully account for the increased fracture risk and, on the other hand, that the correlation between the indentation parameters and BMD was poor. Similar results with decreased BMSi and “preserved” BMD are present in the treatment-naïve HIV-infected population. The discrepancies between BMD and fracture risk are important when comparing Scandinavian and Mediterranean women; here again, lower BMSi can account for at least a part of the increased fracture rates in Norwegians [19]. Stress fractures, another clinical situation where bone fragility is not explained by bone density, also are associated with deterioration in BMSi [28]. Altogether, the evidence supports the idea that, independently of BMD, tissue-level properties captured by RPI may help to explain the increased fragility of bone. Returning to the classical definition of osteoporosis [3], elements other than BMD are relevant for bone health. For example, in type 2 diabetes, the accumulation of AGE correlates with BMSi [18].

Our approach to osteoporosis has been based mainly on the quantitative aspect of how much bone there is, very likely because we have a method to accurately and conveniently measure this dimension: bone densitometry. Only recently have we begun incorporating imaging techniques to assess the architectural aspects of the osteoporotic bone [41,42]. What RPI can add is the direct measurement of tissue-level characteristics of bone, which is not captured by the clinically available methods to assess quantitative or spatial distribution. Osteoporosis can result from the deterioration of any of the three components of bone strength – density, microarchitecture and tissue properties – and likely by a combination of all three, in different proportions for different pathological situations. The poor discrimination capacity of RPI to identify fracture risk in the study performed in the elderly [29] suggests that when certain components are very dominant, such as bone density and microarchitecture in the elderly, tissue assessment by RPI may add very little to the explanation of increased bone fragility, although further studies are needed to assess this particular population. Similarly, patients with chronic atrophic gastritis have a major decrease in BMD and/or architecture [26] probably limiting the discriminant ability of RPI to differentiate between patients and controls. On the opposite, in type 2 diabetes both of these components are relatively preserved and BMSi is the most deteriorated component of bone strength [17].

Finally, just as our understanding of osteoporosis has been centered on bone density, so has our assessment of its treatment. Drug trials have focused on the selection of participants using BMD criteria and have measured efficacy by increases in bone density, which is of course relevant but may not sufficiently capture BMD-independent effects of the drugs [43,44]. This might explain why some treatments show anti-fracture efficacy largely independent of the bone density effects [45]. RPI might contribute to explaining some of the effects of commonly used antiosteoporosis medications, as shown by the very rapid increase in BMSi induced by teriparatide or denosumab in patients initiating glucocorticoids [23]. This rapid variation, after only 7 weeks, in the response of bone to indentation suggests that BMD-independent effects (and, plausibly, remodeling-independent effects) might be induced by the treatments. Our hypothesis is that non-collagenous proteins that constitute the elements that absorb energy in bone during the process of

separation of mineralized collagen fibrils and initiation of microcracks, called sacrificial bonds, might play a role in the indentation properties of bone and in the effects of drugs [46]. Preclinical results also support the effectiveness of treatments on RPI properties, independently of BMD changes [47].

8. Future development needs and opportunities

Reference Point Indentation is at the beginning of its development as a tool for assessing the skeletal health. Although the available evidence shows the technique's potential, large prospective studies are needed to determine whether the technique can independently predict incident fractures. Reference values are also needed, similar to what is available for BMD, and reference intervals for normal, intermediate and pathological BMSi must be tested for validity according to race, gender and geographical region. It is also important to establish how much useful information RPI can contribute to the clinician's assessment of different pathological situations and of patient response to treatment interventions. The available information suggests that most of the potential lies in the scenarios where BMD does not fully explain a patient's skeletal fragility or the anti-fracture effect of treatments. Development and implementation of an automated system in the device's software to identify which measurements are outliers and should be excluded from the calculation of results are an additional technical need; this would exclude the potential for observer bias that exists when the operator makes this decision.

Cortical assessment in the tibia has been pointed out as a limitation of RPI, as the main clinical fragility fractures occur in other areas of the skeleton where trabecular bone also plays a determinant role. Ultimately the clinical evidence can overcome this issue if the prediction of fractures is good enough on its own or adds precision to the combination of various bone assessment techniques. This has been experimentally demonstrated in cadaver experiments [48] for cyclic microindentation, but must also be studied for the impact microindentation tests appropriate for clinical use.

The opportunities for the future are significant. In approaching the individual patient, the clinician currently chooses a treatment strategy supported by the available evidence, obtained in standard populations selected by strict inclusion and exclusion criteria. However, very often the case to be managed does not match that particular study population [49]. Patients with osteoporosis commonly suffer comorbidities and receive multiple drugs that jeopardize the effect expected from a treatment [50]. Access to more exhaustive information about the pathophysiological determinants of fracture propensity would help the clinician to better refine interventions and measure their effects. In other areas of medicine, like heart diseases, the clinician assesses the patient using clinical examination, electrocardiography, sophisticated ultrasounds, angiography and/or isotopes. Although RPI will not replace the available clinical measurements, it has the potential to add information to bone density and structure data and contribute to a comprehensive understanding of the individual patient.

A comprehensive evaluation of the different contributors to bone strength has excellent potential for the development of drug therapies. First, it will help to better identify the BMD-independent effects of the available drugs and translate this into the specific needs of each type of patient. Second, new drugs can be developed that more specifically account for the various deteriorated components of bone health, beyond the one-size-fits-all approach we currently adopt. Third, if we can integrate different surrogates that very accurately analyze the effect of drugs on bone fragility, developing new drugs may become much more accessible. Substantially shorter efficacy studies in reduced populations would then be able to certify the therapeutic benefits, making the pivotal trials much more affordable, with the consequent benefit in exploring new treatment opportunities.

Finally, the present review shows that RPI is a clinically feasible technique with high potential for the evaluation of patients with different

types of osteoporosis and for the assessment of intervention effectiveness. A wide range of research opportunities is presented by this direct *in vivo* assessment of the mechanical properties of bone tissue.

Conflict of interest

A Diez-Perez owns shares of Active Life Scientific, a manufacturer of microindentation devices. S Herrera has no conflict of interest.

Acknowledgments

Supported in part by Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) RD12/0043/0022. FONDO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA. ISCIII. FEDER Funds. Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

References

- [1] C. Randall, D. Bridges, R. Guerri, X. Nogueles, L. Puig, E. Torres, L. Mellibovsky, K. Hoffseth, T. Stalbaum, A. Srikanth, J.C. Weaver, S. Rosen, H. Barnard, D. Brimer, A. Proctor, J. Candy, C. Saldana, S. Chandrasekar, T. Lescun, C.M. Nielson, E. Orwoll, D. Herthel, H. Kopeikin, H.T.Y. Yang, J.N. Farr, L. McCready, S. Khosla, A. Diez-Perez, P.K. Hansma, Applications of a new handheld reference point indentation instrument measuring bone material strength, *J. Med. Devices* 7 (2013) 410051–410056, <http://dx.doi.org/10.1115/1.4024829>.
- [2] A. Diez-Perez, R. Güerri, X. Nogueles, E. Cáceres, M.J. Peña, L. Mellibovsky, C. Randall, D. Bridges, J.C. Weaver, A. Proctor, D. Brimer, K.J. Koester, R.O. Ritchie, P.K. Hansma, Microindentation for *in vivo* measurement of bone tissue mechanical properties in humans, *J. Bone Miner. Res.* 25 (2010) 1877–1885, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.73>.
- [3] F.I. Komarov, I.N. Bkarev, A.I. Smolianskiĭ, NIH Consensus Development Panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy, *JAMA* 285 (2001) 785–795, <http://dx.doi.org/10.1097/00007611-200106000-00005>.
- [4] D.L. Kopperdahl, T. Aspelund, P.F. Hoffmann, S. Sigurdsson, K. Siggeirsdottir, T.B. Harris, V. Gudnason, T.M. Keaveny, Assessment of incident spine and hip fractures in women and men using finite element analysis of CT scans, *J. Bone Miner. Res.* 29 (2014) 570–580, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2069>.
- [5] W.D. Leslie, S.R. Majumdar, S.N. Morin, L.M. Lix, Change in bone mineral density is an indicator of treatment-related antifracture effect in routine clinical practice: a registry-based cohort study, *Ann. Intern. Med.* (2016) <http://dx.doi.org/10.7326/M15-2937>.
- [6] C. Graeff, F. Marin, H. Petto, O. Kayser, A. Reisinger, J. Peña, P. Zysset, C.-C. Glüer, High resolution quantitative computed tomography-based assessment of trabecular microstructure and strength estimates by finite-element analysis of the spine, but not DXA, reflects vertebral fracture status in men with glucocorticoid-induced osteoporosis, *Bone* 52 (2013) 568–577, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2012.10.036>.
- [7] J.S. Nyman, M. Granke, R.C. Singleton, G.M. Pharr, Tissue-level mechanical properties of bone contributing to fracture risk, *Curr. Osteoporos. Rep.* 14 (2016) 138–150, <http://dx.doi.org/10.1007/s11914-016-0314-3>.
- [8] P. Garnero, The role of collagen organization on the properties of bone, *Calcif. Tissue Int.* 97 (2015) 229–240, <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-015-9996-2>.
- [9] M.D. Morris, G.S. Mandair, Raman assessment of bone quality, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 469 (2011) 2160–2169, <http://dx.doi.org/10.1007/s11999-010-1692-y>.
- [10] P. Roschger, E.P. Paschalis, P. Fratzl, K. Klaushofer, Bone mineralization density distribution in health and disease, *Bone* 42 (2008) 456–466, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2007.10.021>.
- [11] Y. Bala, E. Seeman, Bone's material constituents and their contribution to bone strength in health, disease, and treatment, *Calcif. Tissue Int.* 97 (2015) 308–326, <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-015-9971-y>.
- [12] D. Hans, A.L. Goertzen, M.A. Krieg, W.D. Leslie, Bone microarchitecture assessed by TBS predicts osteoporotic fractures independent of bone density: the Manitoba study, *J. Bone Miner. Res.* 26 (2011) 2762–2769, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.499>.
- [13] M.R. Allen, E.M. McNerny, J.M. Organ, J.M. Wallace, True gold or pyrite: a review of reference point indentation for assessing bone mechanical properties *in vivo*, *J. Bone Miner. Res.* 30 (2015) 1539–1550, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2603>.
- [14] D. Bridges, C. Randall, P.K. Hansma, A new device for performing reference point indentation without a reference probe, *Rev. Sci. Instrum.* 83 (2012) <http://dx.doi.org/10.1063/1.3693085>.
- [15] A. Diez-Perez, M.L. Bouxsein, E.F. Eriksen, S. Khosla, J.S. Nyman, S. Papapoulos, S.Y. Tang, Technical note: recommendations for a standard procedure to assess cortical bone at the tissue-level *in vivo* using impact microindentation, *Bone Rep.* 5 (2016) 181–185, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bonr.2016.07.004>.
- [16] R.C. Guerri-Fernandez, X. Nogueles, J.M. Quesada Gomez, E. Torres Del Pliego, L. Puig, N. Garcia-Giral, G. Yoskovitz, L. Mellibovsky, P.K. Hansma, A. Diez-Perez, Microindentation for *in vivo* measurement of bone tissue material properties in atypical femoral fracture patients and controls, *J. Bone Miner. Res.* 28 (2013) 162–168, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.1731>.
- [17] J.N. Farr, M.T. Drake, S. Amin, L.J. Melton, L.K. McCready, S. Khosla, *In vivo* assessment of bone quality in postmenopausal women with type 2 diabetes, *J. Bone Miner. Res.* 29 (2014) 787–795, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2106>.
- [18] J.R. Furst, L.C. Bandeira, W.-W. Fan, S. Agarwal, K.K. Nishiyama, D.J. McMahon, E. Dworakowski, H. Jiang, S.J. Silverberg, M.R. Rubin, Advanced glycation endproducts and bone material strength in type 2 diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101 (2016) 2502–2510, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2016-1437>.
- [19] D. Duarte Sosa, L. Vilaplana, R. Güerri, X. Nogueles, M. Wang-Fagerland, A. Diez-Perez, E.F. Eriksen, Are the high hip fracture rates among Norwegian women explained by impaired bone material properties? *J. Bone Miner. Res.* 30 (2015) 1784–1789, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2537>.
- [20] S.C.F. Schuit, M. van der Klift, A.E.A.M. Weel, C.E.D.H. de Laet, H. Burger, E. Seeman, A. Hofman, A.G. Uitterlinden, J.P.T.M. van Leeuwen, H.A.P. Pols, Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study, *Bone* 34 (2004) 195–202 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751578> (accessed August 24, 2016)).
- [21] E.S. Siris, Y.-T. Chen, T.A. Abbott, E. Barrett-Connor, P.D. Miller, L.E. Wehren, M.L. Berger, Bone mineral density thresholds for pharmacological intervention to prevent fractures, *Arch. Intern. Med.* 164 (2004) 1108–1112, <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.164.10.1108>.
- [22] F. Malgo, N.A.T. Hamdy, S.E. Papapoulos, N.M. Appelman-Dijkstra, Bone material strength as measured by microindentation *in vivo* is decreased in patients with fragility fractures independently of bone mineral density, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (2015) 2039–2045, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2014-4346>.
- [23] L. Mellibovsky, D. Prieto-Alhambra, F. Mellibovsky, R. Güerri-Fernández, X. Nogueles, C. Randall, P.K. Hansma, A. Diez-Perez, Bone tissue properties measurement by reference point indentation in glucocorticoid-induced osteoporosis, *J. Bone Miner. Res.* 30 (2015) 1–22, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2497>.
- [24] R. Güerri-Fernandez, P. Vestergaard, C. Carbonell, H. Knobel, F.F. Aviñés, A.S. Castro, X. Nogueles, D. Prieto-Alhambra, A. Diez-Perez, HIV infection is strongly associated with hip fracture risk, independently of age, gender, and comorbidities: a population-based cohort study, *J. Bone Miner. Res.* 28 (2013) 1259–1263, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.1874>.
- [25] R. Güerri-Fernández, D. Molina, J. Villar-García, D. Prieto-Alhambra, L. Mellibovsky, X. Nogueles, A. González-Mena, A. Guelar, M. Trenchs-Rodríguez, S. Herrera-Fernández, J.P. Horcajada, A. Diez-Perez, H. Knobel, Brief report: HIV infection is associated with worse bone material properties, independently of bone mineral density, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 72 (2016) 314–318, <http://dx.doi.org/10.1097/QAI.0000000000000965>.
- [26] K.M. Aasarød, M.P. Mosti, A.K. Stunes, J.E. Reseland, T. Basso, U. Syversen, R. Fossmark, Impaired skeletal health in patients with chronic atrophic gastritis, *Scand. J. Gastroenterol.* 51 (2016) 774–781, <http://dx.doi.org/10.3109/00365521.2016.1141317>.
- [27] M.J. Pérez-Sáez, S. Herrera, D. Prieto-Alhambra, X. Nogueles, M. Vera, D. Redondo-Pachón, M. Mir, R. Güerri, M. Crespo, A. Diez-Perez, J. Pascual, Bone density, microarchitecture and tissue quality long-term after kidney transplant, *Transplantation* (2016) <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0000000000001328>.
- [28] D.D. Sosa, E. Fink Eriksen, Women with previous stress fractures show reduced bone material strength, *Acta Orthop.* (2016) 1–6, <http://dx.doi.org/10.1080/17453674.2016.1198883>.
- [29] R. Rudäng, M. Zoulakis, D. Sundh, H. Brisby, A. Diez-Perez, L. Johansson, D. Mellström, A. Darelid, M. Lorentzon, Bone material strength is associated with areal BMD but not with prevalent fractures in older women, *Osteoporos. Int.* 27 (2016) 1585–1592, <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-015-3419-0>.
- [30] D. Sundh, R. Rudäng, M. Zoulakis, A.G. Nilsson, A. Darelid, M. Lorentzon, A high amount of local adipose tissue is associated with high cortical porosity and low bone material strength in older women, *J. Bone Miner. Res.* 31 (2016) 749–757, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2747>.
- [31] F. Malgo, N.A.T. Hamdy, A.M. Pereira, A. Nienke, R. Biermasz, N.M. Appelman-Dijkstra, Assessment of bone material strength index by reference point indentation in patients with acromegaly, *Endocr. Soc. 98th Annu. Meet. Expo.* April 1–4, 2016 - Bost. Prolactin, GH&IGF Biology and Signaling, 2016 (posters), <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/endo-meetings.2016.np.17.fri-543>.
- [32] A.D.-P. Sabina Herrera, Marc Moltó, Roberto Güerri-Fernández, Elena Cabezudo, Silvana Novelli, Jordi Esteve, Albert Hernández, Inmaculada Roig, Xavier Solanich, Daniel Prieto-Alhambra, Xavier Nogueles, Jordi Pérez, Bone material properties assessment by microindentation in patients with type 1 Gaucher's disease, *ASBMR 2016 Annu. Meet. Sept. 16-19, 2016 Georg. World Congr. Cent. Atlanta, Georg. USA, 2016*. <http://www.asbmr.org/abstracts>.
- [33] P. Rufus, K. Holloway, M. Kotowicz, S. Brennan-Olsen, J.A. Pasco, Microindentation testing of tibial bone using the OsteoProbe®: a feasibility study, *Annu. Sci. Meet. Endocr. Soc. Aust. Soc. Reprod. Biol. Aust. New Zeal. Bone Miner. Soc. Gold Coast Convent. Aust. Cent. 21-24 August 2016, 2016 abs# 336*, <http://www.esa-srb.org.au/assets/ESA-SRB-ANZBMS-2016/All-abstracts-220816.pdf>.
- [34] A. Lamya Karim, Miranda Van Vliet, Kelsey Velie, M.B. Abdeen, Douglas Ayres, Role of advanced glycation end-products and cortical porosity in type 2 diabetes, *ASBMR 2016 Annu. Meet. Sept. 16-19, 2016 Georg. World Congr. Cent. Atlanta, Georg. USA, 2016*. <http://www.asbmr.org/abstracts>.
- [35] R. Anna, G. Nilsson, D. Sundh, M. Nilsson, M. Rudäng, A. Darelid, M. Zoulakis, D. Mellström, M. Lorentzon, Type 2 diabetes mellitus is associated with enhanced bone microarchitecture but lower bone material strength and poorer physical function in elderly women, *ASBMR 2016 Annu. Meet. Sept. 16-19, 2016 Georg. World Congr. Cent. Atlanta, Georg. USA, 2016*. <http://www.asbmr.org/abstracts>.
- [36] Yoann Barnouin, Sanjay Mediwala, Alessandra Celli, John Wade, Georgia Colaneri, Dean Blevins, Reina Villareal, Dennis Villareal, Poor physical fitness is associated with low bone material strength in older adults with type 2 diabetes, *ASBMR 2016 Annu. Meet. Sept. 16-19, 2016 Georg. World Congr. Cent. Atlanta, Georg. USA, 2016*. <http://www.asbmr.org/abstracts>.

- [37] M. Daniel Sundh, M.H. Lorentzon, Martin Nilsson, Michail Zoulakis, High impact mechanical loading increases bone material strength – results from a 3-month intervention study, *ASBMR 2016 Annu. Meet. Sept. 16–19, 2016 Georg. World Congr. Cent. Atlanta, Georg. USA, 2016*. <http://www.asbmr.org/abstracts>.
- [39] I. Karim, M. Van Vliet, M.L. Bouxsein, Comparison of cyclic and impact-based reference point indentation measurements in human cadaveric tibia, *Bone* (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.03.021>.
- [40] K.J. Jepsen, S.H. Schlecht, Biomechanical mechanisms: resolving the apparent conundrum of why individuals with type II diabetes show increased fracture incidence despite having normal BMD, *J. Bone Miner. Res.* 29 (2014) 784–786, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2189>.
- [41] J.F. Griffith, K. Engelke, H.K. Genant, Looking beyond bone mineral density: imaging assessment of bone quality, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192 (2010) 45–56, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05378.x>.
- [42] B.C. Silva, W.D. Leslie, H. Resch, O. Lamy, O. Lesnyak, N. Binkley, E.V. McCloskey, J.A. Kanis, J.P. Bilezikian, Trabecular bone score: a noninvasive analytical method based upon the DXA image, *J. Bone Miner. Res.* 29 (2014) 518–530, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2176>.
- [43] T.M. Keaveny, M.R. McClung, H.K. Genant, J.R. Zanchetta, D. Kendler, J.P. Brown, S. Goemaere, C. Recknor, M.L. Brandi, R. Eastell, D.L. Kopperdahl, K. Engelke, T. Fuerst, H.-S. Radcliffe, C. Libanati, Femoral and vertebral strength improvements in postmenopausal women with osteoporosis treated with denosumab, *J. Bone Miner. Res.* 29 (2014) 158–165, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2024>.
- [44] M. Kleerekoper, S.L. Greenspan, E.M. Lewiecki, P.D. Miller, D.L. Kendler, M. Maricic, T.M. Keaveny, D.L. Kopperdahl, V.A. Ruff, X. Wan, B. Janos, K. Krohn, Assessing the effects of teriparatide treatment on bone mineral density, bone microarchitecture, and bone strength, *J. Bone Joint Surg. Am.* 96 (2014), e90. <http://dx.doi.org/10.2106/BJS.L.01757>.
- [45] B.L. Riggs, L.J. Melton, Bone turnover matters: the raloxifene treatment paradox of dramatic decreases in vertebral fractures without commensurate increases in bone density, *J. Bone Miner. Res.* 17 (2002) 11–14, <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.1.11>.
- [46] G.E. Fantner, T. Hassenkam, J.H. Kindt, J.C. Weaver, H. Birkedal, L. Pechenik, J.A. Cutroni, G.A.G. Cidade, G.D. Stucky, D.E. Morse, P.K. Hansma, Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture, *Nat. Mater.* 4 (2005) 612–616, <http://dx.doi.org/10.1038/nmat1428>.
- [47] M. Aref, M.A. Gallant, J.M. Organ, J.M. Wallace, C.L. Newman, D.B. Burr, D.M. Brown, M.R. Allen, In vivo reference point indentation reveals positive effects of raloxifene on mechanical properties following 6 months of treatment in skeletally mature beagle dogs, *Bone* 56 (2013) 449–453, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.07.009>.
- [48] T. Jenkins, L.V. Coutts, S. D'Angelo, D.G. Dunlop, R.O.C. Oreffo, C. Cooper, N.C. Harvey, P.J. Thurner, Site-dependent reference point microindentation complements clinical measures for improved fracture risk assessment at the human femoral neck, *J. Bone Miner. Res.* 31 (2016) 196–203, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2605>.
- [49] C. Reyes, A. Pottegård, P. Schwarz, M.K. Javaid, T.P. Van Staa, C. Cooper, A. Díez-Pérez, B. Abrahamsen, D. Prieto-Alhambra, Real-life and RCT participants: alendronate users versus FITs' trial eligibility criterion, *Calcif. Tissue Int.* 99 (2016) 243–249, <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-016-0141-7>.
- [50] A. Díez-Pérez, J.D. Adachi, S. Adami, F.A. Anderson, S. Boonen, R. Chapurlat, J.E. Compston, C. Cooper, S.H. Gehlbach, S.L. Greenspan, F.H. Hooven, A.Z. LaCroix, J.W. Nieves, J.C. Netelenbos, J. Pfeilschifter, M. Rossini, C. Roux, K.G. Saag, S. Silverman, E.S. Siris, A. Wyman, S.K. Rushton-Smith, N.B. Watts, Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW) Investigators, Risk factors for treatment failure with antiosteoporosis medication: the global longitudinal study of osteoporosis in women (GLOW), *J. Bone Miner. Res.* 29 (2014) 260–267, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2023>.