



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](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>

# **Estudio del impacto de la infección por VIH en el metabolismo óseo**

**Tesis doctoral**

**Elisabet Lerma Chippirraz**

**Dirección: Dr. Adolfo Díez Pérez**

**Dr. Hernando Javier Knobel Freud**

**Programa de Doctorat en Medicina,  
Departament de Medicina.**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Barcelona, 2019**



## **Estudio del impacto de la infección por VIH en el metabolismo óseo**

Tesis doctoral presentada por la doctorando: **Elisabet Lerma Chippirraz** para obtener el grado de Doctor por la Universidad Autònoma de Barcelona

---

Directores de tesis:

**Dr. Adolfo Díez Pérez**

Hospital del Mar, Parc de Salut Mar

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina, Departament de Medicina

**Dr. Hernando Javier Knobel Freud**

Hospital del Mar, Parc de Salut Mar

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina, Departament de Medicina

Tutor de tesis:

**Dr. Adolfo Díez Pérez**

Hospital del Mar, Parc de Salut Mar

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina, Departament de Medicina

**Programa de Doctorat en Medicina, Departament de Medicina.**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Barcelona, 2019**



Es imposible pensar en este documento sin echar un vistazo atrás y recordar a las personas que han pasado por mi vida. Aunque es imposible nombrarlas a todas y seguro que me dejo en el tintero a gente importante, es vital agradecer a todas y cada una de ellas ese paso, dado que de todos aprendí quien y como quería ser.



## AGRADECIMIENTOS

Sin lugar a dudas, este trabajo y el que desarrollo diaramente sería imposible sin los pacientes, a ellos a quienes nos debemos los trabajadores de la salud, gracias. Gracias porque mi día a día no existiría sin vosotros.

Evidentemente a mi familia, los que están y los que se fueron, que han estado siempre al pie del cañón, creyendo en mí en todo momento. Lo que para la humanidad fue un pequeño paso, fue para mí un avance de gigantes, y evidentemente sin ellos, imposible: Gracias papa, mama, Moni, Pol, Santi, Lili y Pato.

A Joan y Esther que han pasado a formar parte de mi familia.

A mis directores de tesis: Dr. Adolfo Díez Pérez y Dr. Hernando Knobel Freud que siempre han tenido el bolígrafo a punto para las firmas de última hora de todos los veranos.

Al Dr. Roberto Güerri Fernández, que sabes que sin tu apoyo y el de las llamadas transcontinentales, esto hoy no sería una realidad, aportaste luz cuando todo era muy oscuro. Por supuesto a la Dra. Jade Soldado que ha microindentado como una campeona.

A la Dra. Alicia González, referente en mí día a día, para lo bueno y para estirarme las orejas cuando hace falta, gracias por confiar siempre en mí.

A mis niñas del 'Despacho de la alegría' y al 'Pipeta Team', que han soportado estoicamente el proceso de elaboración de esta tesis aportando sonrisas y distensión siempre: Inma, Mar, Silvia, Ana, Iván y Sonia.

A Gemma, que también estuvo siempre dispuesta para una risa, una lágrima, un artículo...

A la Dra. Kanjou y la Dra. Romera, que siempre están a punto cuando se activa el botón del pánico.

A mi pequeña bola peluda, que me ha estirado a la calle cuando parecía que el ordenador y el texto iban a vencerme

Y especialmente a Jorge, mi apoyo, mi compañero, mi admirador y mi crítico número uno. Sin tu apoyo, tu soporte informático, las miles de horas en el estudio...no hubiera sido posible, pero sobretodo sin el respeto y el amor.

Gracias





## ABREVIATURAS

1,25OH vitamina D: Dihidroxitamina D

25OH vitamina D: Hidroxicolecalciferol

ARN: Ácido ribonucleico

BMD: Bone Mineral Density

BMPs: Bone morphogenic proteins

BMSc: Células estromales medulares

BMSi: Bone material strength index

Ca: Calcio

CaSR: Calcium sensing receptor

CCR5: Receptor 5 quimiocina cisteina-cisteina

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CKD-EPI: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

CLIA: Quimioluminiscencia

CMH: Célula madre hematopoyética

CMV: Citomegalovirus

COBI: cobicistat

CPOC: Célula precursora de los osteoclastos

CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated-protein 4. Proteína de superficie de los linfocitos T que regula negativamente el proceso de coestimulación entre células presentadoras de antígenos y las células T

CTX: Telopéptido carboxiterminal del colágeno

DcR3: Decoy receptor 3. Perteneciente a la superfamilia de receptores TNF. Actúa como receptor señuelo, e inhibe la apoptosis inducida por Fas ligando.

DCs: Células dendríticas

DE: Desviación estándar

Dkk-1: Dickkopf-related protein 1

DMO: Densidad mineral ósea

DMP-1: Dentin matrix acidic phosphoprotein-1

DPD: Deoxipiridolina

DXA: Densitometría

EFV: Efavirenz

eGFR: Estimated glomerular filtration rate

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: 'ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas'

EVG: Elvitegravir

FAO: Fosfatasa alcalina ósea

FART5b: Fosfatasa ácida resistente al tartrato 5b

FG: Filtrado glomerular

Fib-4 score: Score de fibrosis hepática

FoxP3: Factor forkhead box P3. Determinante del desarrollo y la función de las células T reguladoras

FPV: Fosamprenavir

FTC: Emtricitibina

FZD: Frizzled

GC: Glucocorticoides

GM-CSF: Factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos

Gnas: Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha stimulating activity polypeptide 1

Got2: Glutamic oxaloacetic transaminase 2

GRANMO: Calculadora de Grandària Mostral

HAART: Highly active antiretroviral therapy

HIV: Human Immunodeficiency Virus

IDI: Distancia de indentación

IFN: Interferón

IGF-1: Insuline-like growth factor 1

IL: Interleuquina

IMC: Índice de masa corporal

IMIM: Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques

INI: Inhibidores de la transcriptasa inversa

IPs: Inhibidores de la proteasa

IQR: Rango intercuartil

ISCD: International society for clinical densitometry

LRP5/6 receptor: Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6

Ls-BMD: Lumbar spine bone mineral density

LTNP: Long term non progressors. Progresores lentos

MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1

MCSF: Macrophag colony stimulating factor

MicroSv: Microsievert, unidad de radiación

MRP: Multidrug resistance protein

MSCs: Células mesenquimales

MyoD: Myogenic differentiation protein

N: Newtons

NFATc1: Nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1: induce la transcripción de genes implicados en la diferenciación de los osteoclastos.

NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey

NK: Natural killers

NNRTis: Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa

NRTIs: Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa

NTX: Telopéptido aminoterminal del colágeno

OAT: Organic anion transport

OB: Osteoblastos

OC: Osteoclastos

OMS: Organización mundial de la salud

OPG: Osteoprotegerina

P: Fósforo

P1CP: Propéptido C-terminal del procolágeno tipo I

P1NP: Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I

PCR: Proteína C reactiva

PGE-2: Prostaglandina E2

PPAR- $\gamma$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PreP: Profilaxis preexposición

PSMar: Parc de Salut Mar

PTH: Hormona paratiroidea

PYD: Piridolina

RANK/RANKL: Receptor activator of nuclear factor  $\kappa\beta$  y ligando

RMN: Resonancia magnética nuclear

RPV: Rilpivirina

RTIs: Inhibidores de la transcriptasa inversa

RTV: Ritonavir

RUNX2: Runt-related transcription factor 2. Factor de transcripción esencial para la diferenciación de los osteoblastos, la producción de matriz y la mineralización durante la formación ósea.

RX: Radiografía

SFRPs: Frizzled related proteins

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SIV: Simian immunodeficiency virus

Snord23: Small nucleolar RNA, C/D Box23

SOST: Esclerostina

SOX9: Sex determining regionY-box 9

SQV: Saquinavir

STAT-6: Signal transducer and activator of transcription-6. Esta proteína juega un papel central en el ejercicio de las respuestas biológicas mediadas por IL4

sTNF-R: Receptor soluble TNF

TAC: Tomografía axial computarizada

TAF: Tenofovir alafenamida

TAR: Tratamiento antiretroviral

TARGA: Tratamiento antiretroviral de gran actividad

TBS: Trabecular bone score

TDF: Tenofovir disoproxil fumarato

TFV: Tenofovir

TGF: Transforming growth factor

Th: Células T helper

thBMD: Total hip bone mineral density

TNF: Tumoral necrosis factor

TRAF-6: TNF receptor-associated factor 6. Componente esencial de la señalización RANK/RANKL en la formación de los osteoclastos

TSH: Thyroid stimulating hormone

VIH: Virus inmunodeficiencia humana

VSG: Velocidad de sedimentación globular

W: Week

Wnt: Vía señalización Wnt, término proveniente de la unión del nombre del gen wingless (WG) de la *Drosophila* y su homólogo Int-1 (integration 1) de los mamíferos

# ÍNDICE

<b>Agradecimientos</b>	<b>7</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>9</b>
<b>INDICE</b>	<b>15</b>
<b>Resumen</b>	<b>21</b>
<b>Abstract</b>	<b>23</b>
<b>I-. INTRODUCCIÓN</b>	<b>25</b>
<b>1-. Inmunosenescencia y estado proinflamatorio</b>	<b>27</b>
<b>2-. Interfaz inmuno-esquelética</b>	<b>30</b>
<b>2.1-. Remodelado óseo fisiológico</b>	<b>30</b>
<b>2.1.1-. Células óseas</b>	<b>32</b>
A) Osteoclastos	32
B) Osteoblastos	32
C) Osteocitos	33
<b>2.1.2-. Células del sistema inmune</b>	<b>33</b>
A) Células T	33
- <i>Th1 y Th2</i> :	34
- <i>Th17</i>	34
- <i>Th reguladores</i>	34
- <i>Th reguladores CD4</i>	34
- <i>Th reguladores CD8</i>	34



- $\gamma\delta$ Tcells	34
B) Células B	35
C) Células Natural Killer	35
D) Células dendríticas	35
E) Neutrófilos	36
F) Macrófagos	36
<b>2.1.3-. Citoquinas</b>	<b>36</b>
A) RANK/RANKL	36
B) OPG	37
C) TNF- $\alpha$	37
D) IFN- $\gamma$	38
E) MCS-F	38
F) Interleuquinas	38
IL-1 $\beta$	38
IL-3	38
IL-4	38
IL-6	39
IL-7	39
IL-8	39
IL-10	39
IL-17	39

G) Proteínas de la vía Wnt (Wingless and Int-1)	40
<b>2.1.4-. Osteoclastogénesis y eje RANK/RANKL/OPG</b>	<b>41</b>
<b>2.1.5-. Papel células B y células T en el remodelado óseo</b>	<b>42</b>
<b>3-. Turnover óseo patológico</b>	<b>44</b>
<b>3.1-. Disrupción inmune y pérdida ósea en la infección por VIH</b>	<b>44</b>
<b>3.2-. Papel del tratamiento antiretroviral en el daño óseo</b>	<b>44</b>
<b>3.2.1-. Inhibidores de la transcriptasa inversa (RTIs)</b>	<b>46</b>
<b>3.2.1.1-. Nucleósidos (NRTIs): tenofovir disoproxil fumarato</b>	<b>46</b>
<b>3.2.1.2-. No nucleósidos (NNRTIs): efavirenz (EFV)</b>	<b>48</b>
<b>3. 2.2 -. Inhibidores de la proteasa</b>	<b>48</b>
<b>4-. Marcadores bioquímicos del recambio óseo</b>	<b>50</b>
<b>4.1-. Marcadores de formación ósea</b>	<b>50</b>
A) Fosfatasa alcalina ósea	50
B) Osteocalcina	50
C) P1NP (propéptido aminoterminal del procolágeno I)	50
<b>4.2-. Marcadores de resorción ósea</b>	<b>50</b>
A) CTX	50
B) Fosfatasa ácida resistente al tartrato 5b	50
C) Piridinolina y deoxipiridinolina	51
<b>5-. Herramientas para medir la salud ósea. Marcadores subrogados</b>	<b>52</b>
<b>5.1-. Densitometría ósea (DXA)</b>	<b>52</b>

5.2-. TBS (trabecular bone score)	54
5.3-. Microindentación	56
<b>II-. HIPÓTESIS</b>	<b>59</b>
<b>III-. OBJETIVOS</b>	<b>61</b>
<b>IV-. RESOLUCIÓN PRESENTACIÓN TESIS COMO COMPENDIO PUBLICACIONES</b>	<b>63</b>
<b>Artículo 1:</b>	<b>65</b>
<b>Bone density microarchitecture and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate'</b>	
<b>Artículo 2:</b>	<b>73</b>
<b>Inflammation status in HIV-positive individuals correlates with changes in bone tissue quality after initiation of antiretroviral therapy'</b>	
<b>V-. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS</b>	<b>81</b>
<b>VI-. RESUMEN GLOBAL DE DISCUSIÓN</b>	<b>91</b>
<b>VII-. CONCLUSIONES</b>	<b>99</b>
<b>VIII-. LINEAS DE FUTURO</b>	<b>101</b>
<b>IX-. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>103</b>
<b>X-. ANEXOS</b>	<b>135</b>
<b>Consideraciones éticas</b>	<b>137</b>
<b>Hoja de información al paciente</b>	<b>139</b>
<b>Consentimiento informado</b>	<b>143</b>
<b>Becas y financiación</b>	<b>145</b>

## Índice de tablas

Tabla 1-. Características basales de la población del estudio 1-----	81
Tabla 2-. Cambios de densidad mineral ósea, marcadores de resorción ósea y metabolismo calcio del estudio 1-----	82
Tabla 3-. Comparación entre los pacientes cuyo BMSi permaneció estable y aquellos en los que empeoró tras 48 semanas de TAR con TDF (estudio 1)-----	84
Tabla 4-. Características basales de la población de estudio 2-----	85
Tabla 5-. Parámetros de calidad tisular ósea, marcadores de inflamación y de recambio óseo para los diferentes grupos (estudio 2)-----	86
Tabla 6-. Correlación de Spearman entre la inflamación basal y los marcadores óseos y el cambio porcentual en los parámetros óseos (estudio 2)-----	88

## Índice de figuras

Figura 1-. Modelo de envejecimiento acelerado en la infección por VIH-----	29
Figura 2-. Mecanismo de pérdida ósea a través de interfaz inmuno-esquelética--	31
Figura 3-. Control molecular de la diferenciación osteoclástica-----	32
Figura 4-. Señales moleculares que desempeñan un papel clave en la diferenciación y activación osteoblástica. -----	33
Figura 5-. Papel de las citoquinas en la osteoinmunología. -----	37
Figura 6-. Receptores para los ligandos Wnt y sus inhibidores endógenos -----	40
Figura 7-. Papel de RANK-RANKL-OPG en la formación fisiológica de los osteoclastos. -----	42
Figura 8-. Papel de la interfaz inmuno-esquelética en la formación fisiológica de los osteoclastos-----	43
Figura 9-. Pérdida ósea asociada a infección VIH e iniciada por TAR-----	45
Figura 10A-. Acción tubular de TDF-----	47

<b>Figura 10B-. Acción tubular de TAF-----</b>	<b>48</b>
<b>Figura 11-. Remodelado óseo fisiológico-----</b>	<b>51</b>
<b>Figura 12-. Representación de los principios del TBS y ejemplo de donde el TBS aparece como independiente de la DMO-----</b>	<b>55</b>
<b>Figura 13-. Procedimiento de indentación para medir las propiedades del material óseo in vivo e imágenes de microindentación en hueso vivo-----</b>	<b>57</b>
<b>Figura 14-. Valores BMSI dependientes de edad y sexo-----</b>	<b>58</b>
<b>Figura 15-. Cambios DXA, TBS y BMSi a las 48 semanas de TAR (estudio 1)----</b>	<b>83</b>
<b>Figura 16-. Análisis bivariado estudio 1: correlación BMSi y edad basales en pacientes VIH-----</b>	<b>83</b>
<b>Figura 17 a y b-. Análisis bivariado estudio 1: a) BMSi y CD4 basales; b) BMSi y DMO en cadera-----</b>	<b>84</b>
<b>Figura 18-. Correlación entre calidad tisular ósea (BMSi) e IL-17A basal en paciente VIH (a) y en controles sanos (b) (estudio 2)-----</b>	<b>87</b>
<b>Figura 19-. Correlación entre cambios relativos a la semana 48 respecto a la basal en calidad de tejido óseo BMSi e IL-1<math>\beta</math> (a) y esclerostina (b)(estudio 2)-----</b>	<b>88</b>

## Resumen

Existe un envejecimiento poblacional de la comunidad afecta de VIH lo que implica que se diagnostiquen enfermedades relacionadas con la edad, tales como la osteoporosis.

La activación del sistema inmune que conlleva el VIH generaría un desacoplamiento entre la osteogénesis y la osteoclastogénesis favoreciendo así el daño óseo, pero este mecanismo parece insuficiente, por lo que probablemente, también participan en esta afectación ósea tanto el mismo virus como el TAR. Por otro lado, el aumento de la prevalencia de osteoporosis y el riesgo de fractura no se correlacionan con los resultados de la DXA y escalas de medición aplicables en la población general, no son extrapolables a los pacientes con infección por VIH. Esto plantea, por lo tanto un problema a la hora de asesorar a este grupo de pacientes en relación a su salud ósea.

Nuestra hipótesis es que la densidad mineral ósea medida por DXA es insuficiente para valorar la calidad ósea de dichos pacientes y, por tanto, la necesidad de intervención, por lo que se precisan de otras herramientas que ayuden en el asesoramiento del estado del hueso. Consideramos que siendo la microindentación un sistema directo de la calidad ósea, se trataría de una herramienta a utilizar en el medio clínico, juntamente con marcadores de inflamación, en la valoración de la salud ósea. Por lo tanto, creemos que:

- La DMO no es suficiente para evaluar la evolución final de la resistencia ósea tras el inicio de tratamiento antiretroviral.

- Existe una estrecha relación entre la calidad tisular ósea y el estado inflamatorio imprimido por la infección por VIH.

- El estado inflamatorio previo al inicio de tratamiento antiretroviral, influye en la evolución de los diferentes componentes de la resistencia ósea.

Para evaluar lo anteriormente expuesto, se ha comparado el estado óseo pre y post inicio del tratamiento antiretroviral (TAR) así como las diferencias existentes entre estos pacientes y aquellos no VIH, tanto en estado basal como en situación de TAR.

Asimismo, se han utilizado diferentes parámetros tanto analíticos, como de imagen para la evaluación ósea, a la par de una técnica novedosa como la microindentación.

De todo ello se desprende que, evidentemente, la situación inflamatoria derivada de la infección por VIH produce alteración ósea y que, a pesar de que la medición de DXA y TBS empeoran tras inicio de TAR, probablemente la mejoría del estatus inflamatorio cambia las condiciones ambientales a nivel de hueso, permitiendo una mejoría en la calidad del tejido óseo, que se traduce en una mejoría del BMSi o microindentación.

## Abstract

The HIV community is aging, which implies that age-related diseases are diagnosed, such as osteoporosis.

The activation of the immune system associated to HIV would generate a decoupling between osteogenesis and osteoclastogenesis, thus favoring bone damage, but this mechanism seems not enough, so probably, both the same virus and HAART are also involved in this bone affectation. On the other hand, the increase in the prevalence of osteoporosis and the risk of fracture do not correlate with the results of DXA and the scales of measurement, applicable in general population, are not extrapolated to patients with HIV infection. This raises, therefore, a problem when advising this group of patients in relation to their bone health.

Our hypothesis is that the bone mineral density measured by DXA is insufficient to assess the bone quality of these patients and, therefore, the need for intervention, so that other tools are needed to help in the assessment of bone status. We consider that, as microindentation is a direct system of bone quality, it would be a tool to be used in the clinical environment, together with markers of inflammation, in the assessment of bone health. Therefore, we believe that:

- BMD is not enough to evaluate the final evolution of bone resistance after the initiation of antiretroviral treatment.

- There is a close relationship between bone tissue quality and the inflammatory state printed by HIV infection.

- Inflammatory state prior to the start of antiretroviral treatment, influences the evolution of the different components of bone strength.

To evaluate the above, we compared the bone condition before and after the start of antiretroviral treatment (ART), as well as the differences between these patients and those without HIV, both at baseline and under ART.

Likewise, different analytical and imaging parameters have been used for bone evaluation, along with a novel technique such as microindentation. From all this it follows that, evidently, the inflammatory situation derived from HIV infection



produces bone alteration and that, although the measurement of DXA and TBS worse after initiation of ART, probably the improvement of the inflammatory status changes the environmental conditions at bone, allowing an improvement in the quality of the bone tissue, which results in an improvement of BMSi or microindentation.

# I INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el inicio del tratamiento antiretroviral de gran actividad (TARGA) ha mejorado progresivamente la supervivencia de los pacientes infectados por VIH, pero ello ha conllevado un aumento de comorbilidades relacionadas con la edad, tales como enfermedad cardiovascular, neoplásica o metabólica (1). Este incremento de longevidad se prevé que prosiga en los próximos años, así, cohortes como la holandesa (ATHENA) estiman que para 2030 la media de edad de los pacientes VIH pasará de 43.9 a 56.6 años (2).

De las patologías emergentes en estos pacientes, la enfermedad ósea tiene un papel relevante tanto en forma de osteopenia como de osteoporosis, que se refleja en un aumento del riesgo de fracturas (3); se estima que en comparación a la población general los pacientes VIH tienen 6.4 veces más riesgo de osteopenia, 3.7 más de osteoporosis (4) y 1.7 de fracturas por fragilidad (5).

En los dos primeros años desde el diagnóstico de la infección por VIH hay una pérdida de densidad mineral ósea del 2 al 6%, comparable a la que sucede en mujeres postmenopáusicas, que posteriormente se estabiliza (6,7).

Las causas de este aumento de fragilidad ósea son múltiples; por un lado, se encuentra el efecto directo del virus sobre la homeostasis del sistema inmunitario y su potencial contribución a la pérdida ósea, lo que se conoce como interfaz inmuno-esquelética (8). A ello se suma la inmunosenescencia, dado que el paciente VIH presenta una serie de cambios, especialmente en las células T, similar a los de la población de edad avanzada, que va a añadir carga al envejecimiento fisiológico. Por otro lado, se asocian otros factores específicos relacionados con la condición de VIH, tales como el tiempo de exposición a la enfermedad, el valor de CD4, la infección por hepatitis C y la exposición a TAR; además, esta población presenta una mayor prevalencia de los factores de riesgo clásico para osteoporosis, entre ellos, peor situación socioeconómica y nutricional, mayor tasa de consumo de tóxicos (drogas ilegales, tabaco y enol), menor índice de masa corporal, menores niveles de vitamina D y mayor riesgo de hipogonadismo (9).

La consecuencia de esta interrelación hueso-sistema inmunitario mediado por la infección VIH, lleva a un riesgo de fractura incrementado; así, por ejemplo, en población española VIH, el riesgo de fractura de cadera aumenta hasta 5 veces, independientemente de los factores de riesgo clásico (10). Un hecho a destacar es que deben valorarse qué factores propician este incremento de riesgo, dado que su relación con la DMO no acaba de ser concluyente en los diversos estudios. Incluso en la población general, aunque la densidad mineral ósea y el riesgo de fractura tienen una relación inversa muy estrecha, menos del 50% de los pacientes con criterios de osteoporosis sufrirán una fractura. Por lo tanto, la DXA nos da una información limitada, poniendo de relieve que otros componentes de calidad ósea como la resistencia, la composición o la microarquitectura, que precisan de métodos invasivos para su obtención, también desempeñan un papel importante. Recientemente, el uso de la microindentación ha permitido discriminar entre pacientes con y sin fracturas y ha demostrado su utilidad en la detección de alteraciones de tejido óseo en situaciones en las que la DMO está relativamente preservada a pesar de contar con factores de riesgo para aumento de fractura por fragilidad, como en pacientes con osteopenia, diabetes y en terapias por GC (11-13).

Por lo tanto, dado que los mecanismos por los que se establece el daño óseo en los pacientes VIH no están bien caracterizados, la microindentación ósea es una herramienta para aplicar en esta población, para explorar la calidad tisular esquelética.

En conclusión, es importante una correcta evaluación de la salud ósea de estos pacientes de cara a la instauración de estrategias preventivas. El conocimiento de la fisiopatología del daño óseo en los pacientes VIH nos debe permitir realizar una vigilancia más estrecha, dado que la complejidad de la misma hace que las guías de práctica clínica difieran de las de la población no VIH y que incluso, determinadas herramientas, útiles en la población general, no sean válidas para estos pacientes porque infraestiman el riesgo de osteopenia, osteoporosis e incluso de fractura.

## 1-. Inmunosenescencia y estado proinflamatorio

El envejecimiento y la infección por VIH se han asociado a inmunosenescencia, es decir, a un deterioro gradual del sistema inmune marcado especialmente por la disfunción de las células T, a través de un cambio en su estado de activación y su perfil secretorio hacia un aumento de moléculas proinflamatorias. Este estado inflamatorio persistente, ha sido vinculado a un mayor riesgo de morbilidad y posterior mortalidad, en pacientes con VIH, quienes experimentan envejecimiento prematuro (14).

Conforme la población envejece, el sistema inmune experimenta una serie de cambios que son más aparentes o al menos se conocen más, en las células T. Estos mismos cambios suceden en el sistema inmune de los pacientes VIH sin tratamiento antiretroviral (15) **Figura 1**. Entre estos cambios encontramos:

- a) Disminución del número y la funcionalidad de las células madre hematopoyéticas.
- b) Involución tímica (16).
- c) Disminución de células T naïve circulantes.

El fallo en la respuesta inmune adaptativa con la edad es una de las mayores causas de morbimortalidad en el anciano. La producción tímica de nuevas células T disminuye progresivamente y en este proceso intervienen varios factores, entre ellos la infección viral (siendo el CMV el más comúnmente asociado) y la atrofia tímica, que puede ser debida al efecto timosupresivo de citoquinas proinflamatorias como la IL-6 (17). Después de los 50 años, el pool de células T preexistentes naïve y memoria, de donde se forman prácticamente todas las células T, se agota progresivamente por pérdida del mecanismo homeostático. En el caso de los pacientes VIH se suma la pérdida de CD4.

Además, recientes estudios sugieren que la ablación tímica en modelos murinos y la pérdida de células T naïve se traduce en una activación de los CD4 que se correlaciona con un aumento de la carga microbiana (por aumento de translocación bacteriana intestinal) en la periferia, lo que indicaría que se requiere la reposición tímica de células de forma continua, para mantener una mucosa intestinal eficiente (18).

- d)** Aumento de células T CD28<sup>-</sup> bien diferenciadas con potencial proliferativo limitado (19,20).

Los CD28 tienden a regularse a la baja a medida que las células memoria se diferencia a células efectoras, con un aumento de expresión de CD57, que es un predictor de incompetencia inmune en pacientes VIH y añosos. CD28 son moléculas co-estimuladoras que permiten que las células T generen una respuesta efectiva tras la presentación de antígenos. La población de células CD28<sup>-</sup> resultante (con telómeros más cortos y menor capacidad de proliferar) compromete tanto la respuesta de células T como B. En los pacientes VIH se ha comprobado que el aumento de población de CD8 es a expensas de células CD28<sup>-</sup> y, a pesar de que el mecanismo para la pérdida acelerada de expresión de CD28 en estos pacientes todavía debe ser elucidado, parece que puede deberse a una combinación de diferenciación acelerada inducida por antígenos y prolongación de la supervivencia por resistencia a la apoptosis, innata al subgrupo de CD8.

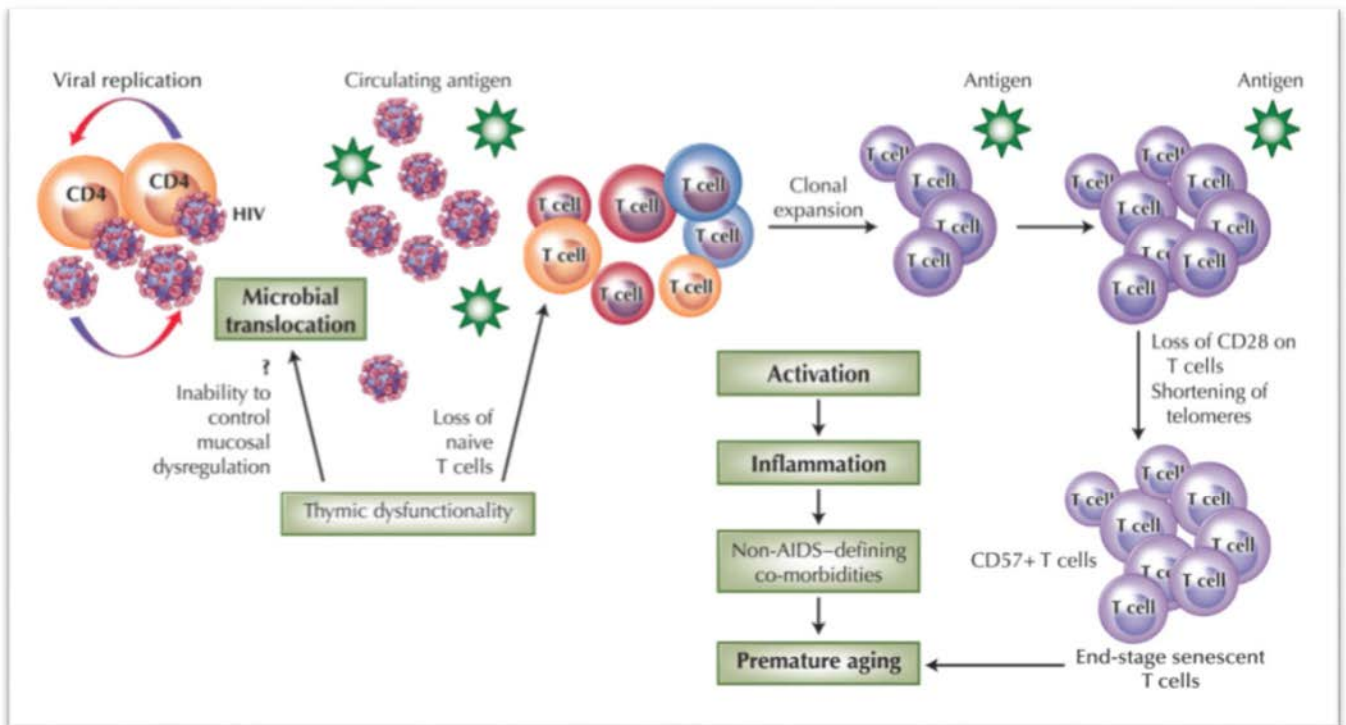
- e)** Aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias incluyendo IL-6 y TNF- $\alpha$  (21).

El acúmulo de CD8 en los pacientes VIH y en los pacientes de edad avanzada, sugiere que la activación de estas células probablemente contribuye con mediadores inflamatorios. Las células de la inmunidad innata (monocitos, células dendríticas, natural killers), se activan por partículas VIH infecciosas y no infecciosas y secretan citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) que causan daño celular de una manera similar a la que lo hace el envejecimiento. Hay estudios recientes en los que el aumento periférico de células proinflamatorias Th17 y el descenso de células T reguladoras antiinflamatorias, se asocian a enfermedad coronaria aguda y aterosclerosis (22).

- f)** Disminución de la ratio CD4/CD8

En los modelos murinos de ablación tímica en los que la pérdida de células T naïve se traduce en alteración del microbioma intestinal, se observa que la disminución de CD4 es mayor que la de CD8;

Probablemente debido a una expansión de CD8 como respuesta a la depleción de CD4 a nivel periférico y tisular (23).



**Figura 1-** Modelo de envejecimiento acelerado en la infección por VIH. La replicación viral resulta en la liberación de viriones (VIH infeccioso y no infeccioso) a la circulación. La replicación residual persistente, activa las células inmunes a pesar del TAR. La translocación microbiana se suma a la carga antigénica. La pérdida de la función tímica altera la homeostasis de las células T. La activación inmune debida a la exposición de antígenos antimicrobianos circulantes es el evento central en la vía senescente. Las células activadas experimentan una expansión clónica en respuesta al antígeno persistente, lo que resulta en diferenciación y acumulación de células senescentes en etapa terminal no funcionales. Las células activadas liberan mediadores inflamatorios, causando una inflamación óptima y subóptima asociada con comorbilidades no definitorias de SIDA y envejecimiento prematuro. Referencia: Desai S, Landay A. Early immune senescence in HIV disease. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2010 Feb;7(1):4-10. doi: 10.1007/s11904-009-0038-4. (21)

## **2-. Interfaz inmunoesquelética**

En condiciones fisiológicas el sistema inmune actúa protegiendo el esqueleto, pero en aquellas circunstancias en las que hay una disrupción inmune, como ocurre en el caso de la infección por VIH, la inmunoactivación promueve la destrucción ósea por estimulación de la resorción mediada por osteoclastos. Esta relación entre el sistema inmune y el sistema esquelético es lo que se denomina interfaz inmunoesquelética (24).

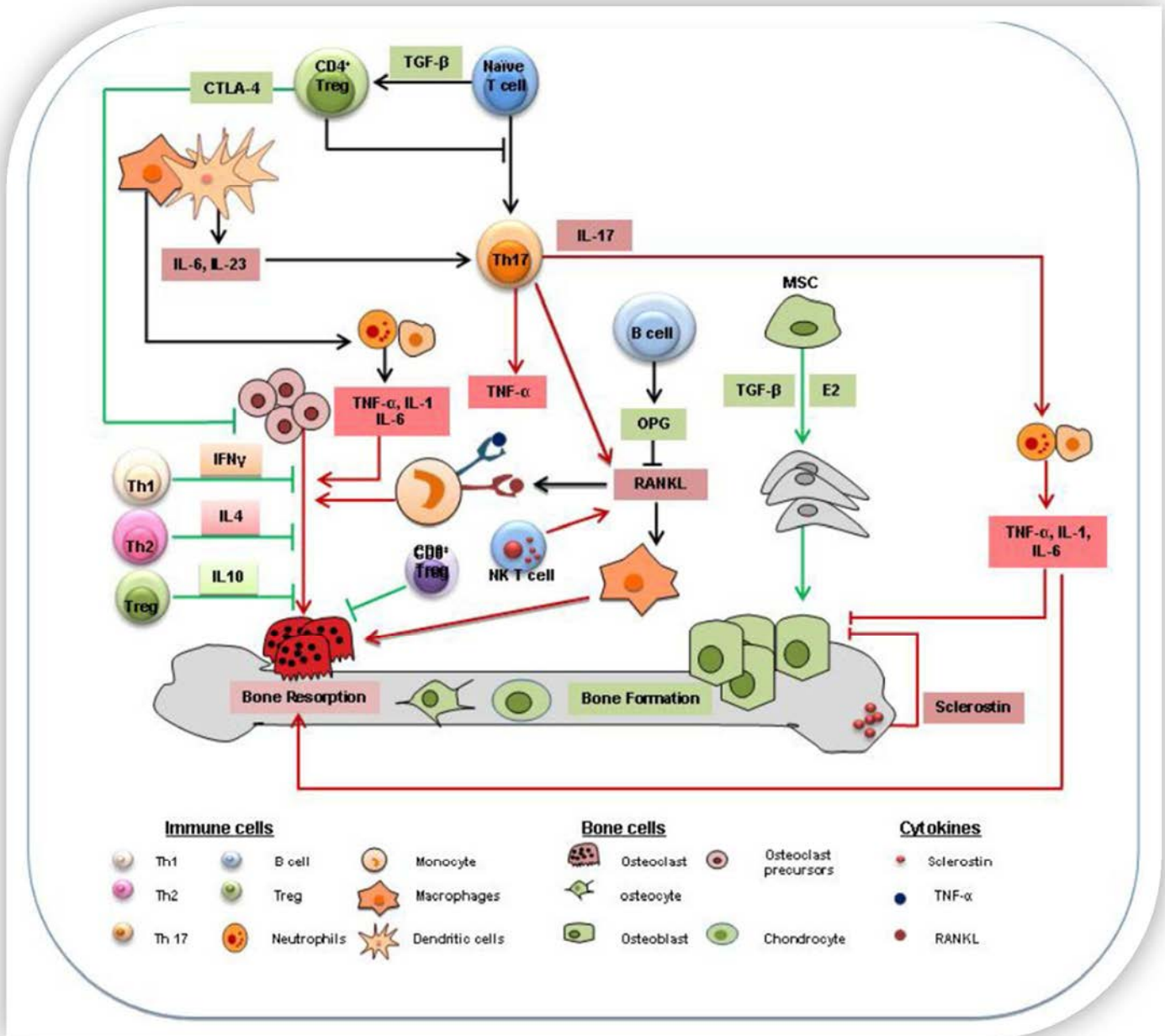
### **2.1-. Remodelado óseo fisiológico**

El esqueleto es un sistema dinámico que se mantiene gracias a un equilibrio entre la resorción ósea por parte de los osteoclastos (provenientes de células de estirpe hematopoyética, monocitos y macrófagos) y la formación de nuevo tejido por parte de los osteoblastos (que son células derivadas de precursores mesenquimales), todo ello regulado por factores sistémicos (hormonales) y locales (óseos), así como por interacciones celulares directas. Este equilibrio, conocido como remodelado óseo, es vital para que el esqueleto pueda ejercer su función metabólica y de sostén. Dado que la formación y la resorción ósea no se pueden dar a la vez sobre la misma superficie ósea, parece que existe un claro efecto contraregulador entre osteoclastos y osteoblastos (25). Así en 2012, por primera vez, el grupo de Takayanagi describe como la formación ósea por osteoblastos inhibe a su vez la resorción por parte de los osteoclastos (26).

El remodelado óseo se da en los compartimentos de remodelado, con la participación de diferentes grupos celulares y en una secuencia de 4 fases diferentes: inicialmente hay un reclutamiento de osteoclastos al lugar de resorción, donde labran una laguna de Howship a la que posteriormente acudirán células de estirpe macrofágica para allanar dicha laguna y permitir la entrada de los osteoblastos maduros que rellenan la cavidad de sustancia osteoide, la cual, más adelante, se mineraliza para formar el hueso maduro (27).

Para entender el remodelado, en el contexto de la interacción inmuno-esquelética, es importante conocer a todos los protagonistas de este proceso:

### **Figura 2**



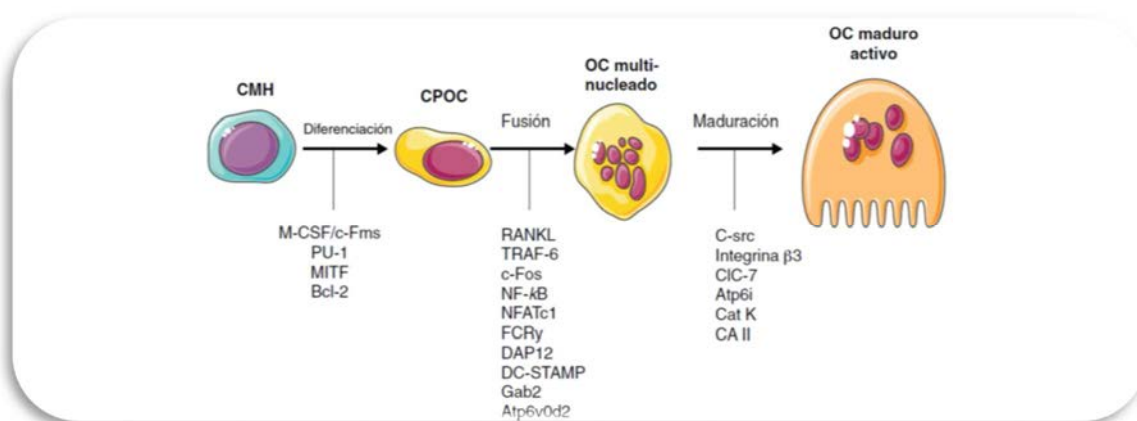
**Figura 2.- Mecanismo de pérdida ósea a través de la interfaz inmunoesquelética**, que funciona mediante interacciones entre diferentes células del sistema inmune y células óseas. Los subtipos de Th (Th1, Th2, Th17 y Th regs) modulan la salud ósea. Th1 y Th2 secretan IFN- $\gamma$  e IL-4 respectivamente, que inhiben la osteoclastogénesis. Th reg secretan posteriormente IL-10, CTLA4 (que puede unirse a CD80/CD86 en los precursores de los osteoclastos) que promueven la apoptosis e inhiben la resorción ósea. Además, Th17 promueve la expresión de diferentes citoquinas osteoclastogénicas (IL-1, IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$ ), que van a incentivar la osteoclastogénesis y, por tanto, la pérdida ósea. Las células B producen OPG; que bloquea la expresión de RANKL, principal responsable de la osteoclastogénesis. La esclerostina, producida por osteocitos, inhibe el proceso de formación ósea por parte de los osteoblastos. Otras células inmunes como macrófagos, células dendríticas y monocitos secretan otras citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, provocando un aumento de la expresión y la diferenciación de la osteoclastogénesis que incrementa la pérdida ósea. **Referencia -Dar HY, Azam Z, Anupam R, Mondal RK, Srivastava RK. Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system. Front Biosci (Landmark Ed). 2018 Jan 1;23:464-492. (28)**



### 2.1.1-. Células óseas

A) **Osteoclastos**: son células multinucleadas que provienen de precursores hematopoyéticos (estirpe monocítica-macrofágica) y cuya morfología con bordes festoneados diseñada para secretar y reabsorber diferentes moléculas en la superficie ósea, les permite desarrollar su función de resorción (28).

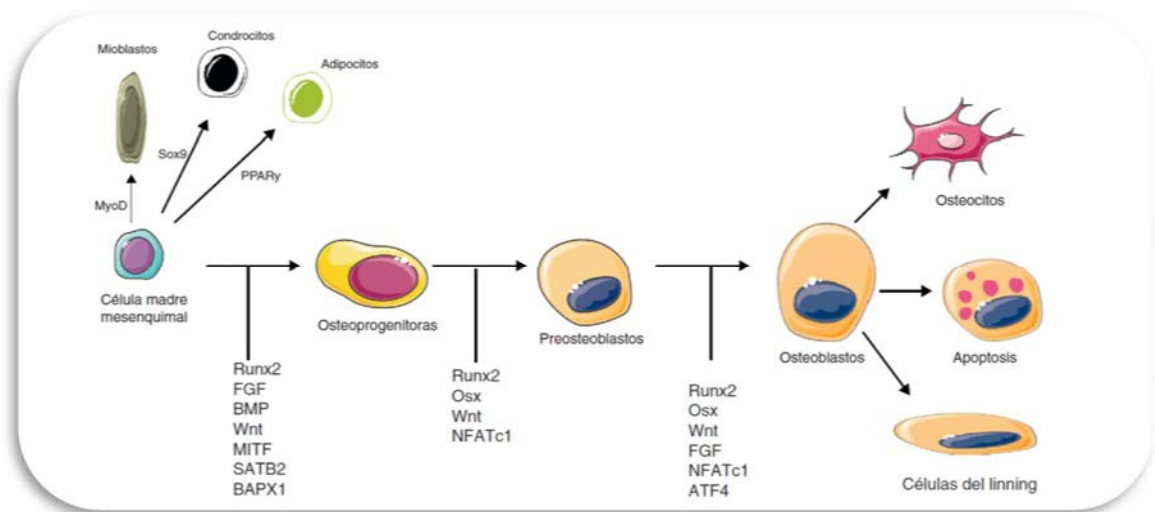
La formación de osteoclastos implica una diferenciación de células precursoras bajo la influencia de ciertas señales, entre ellas RANKL y MCSF, que son secretados por los preosteoblastos (29). Durante la diferenciación y la maduración, los osteoclastos adquieren marcadores específicos y se fusionan para dar lugar a células multinucleadas gigantes. **Figura 3**



**Figura 3-. Control molecular de la diferenciación osteoclástica.** CMH: célula madre hematopoyética. CPOC: célula precursora de osteoclastos. OC: osteoclasto. Referencia: Arbolea L, Castañeda S. *Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue*. Reumatol Clin. 2013 Sep-Oct;9(5):303-15). (27)

B) **Osteoblastos**: Derivados de células madres mesenquimales con capacidad de diferenciación osteogénica. Estas células se diferencian a osteoblastos bajo la expresión de dos factores de transcripción RunX2 (30,31) y Osteotrix, cuya expresión a su vez, es una respuesta a estímulos externos como: PTH, PGE-2, IGF-1 (que tiene un papel destacado en el mantenimiento de la masa ósea y muscular, así como en el envejecimiento), BMPs (pertenecientes a la superfamilia de TGF-β y actualmente los factores osteogénicos de mayor relevancia) y proteínas de la vía Wnt (28). Los osteoblastos forman clústers que tapizan la superficie ósea y son responsables de la secreción de proteínas que

forman la matriz ósea. Finalmente, estas células pueden morir por apoptosis o transformarse en osteocitos en la matriz calcificada (32). **Figura 4**



**Figura 4.- Señales moleculares que desempeñan un papel clave en la diferenciación y activación osteoblástica.** MyoD: myogenic differentiation 1 protein; PPARγ: peroxisome proliferator-activated receptor gamma; Sox9: sex determining region Y-box 9. **Referencia: Arboleya L, Castañeda S. Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. Reumatol Clin. 2013 Sep-Oct;9(5):303-15). (27)**

**C) Osteocitos:** son el grupo celular predominante en el compartimento óseo, así como el más longevo, derivado de los osteoblastos (33). Se comunican entre ellas mediante una red de canalículos, que permiten movilizar los recursos necesarios para remodelar el hueso en respuesta a cambios mecánicos o lesiones. Entre los productos que secretan los osteocitos encontramos: RANKL, OPG, PGE2, óxido nítrico, DMP-1 y la esclerostina que es un inhibidor de la vía Wnt (por medio de su unión a los receptores LRP5) y por lo tanto inhibe la formación ósea (34), hasta el punto que la sobreexpresión de la misma conlleva una disminución de la densidad mineral ósea. En resumen, se trata de osteoblastos diferenciados que conforman la matriz ósea.

### 2.1.2.- Células sistema inmune

**A) Células T:** células clave en la respuesta inmune adaptativa, tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes subtipos Th1, Th2, Th reg o Th17, en función de la presión de estímulos recibidos durante la fase de activación. La

relación de este grupo celular con el hueso ha quedado demostrada en diferentes estudios; las células Th inactivadas suprimen la formación de osteoclastos in vivo e in vitro (35); en contraste, su activación, en contexto de inflamación, produce un aumento de la producción de RANKL y TNF- $\alpha$ , por lo que se promueve la pérdida ósea por aumento de la osteoclastogénesis (36). En contrapartida los CD8 suprimen la osteoclastogénesis a través de varias proteínas como OPG (37).

**-Th1 y Th2:** la diferencia entre ambas depende del perfil de citoquinas secretadas (38). Mientras que Th1 tienen una acción principal en la erradicación de patógenos intracelulares con ayuda de IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , los Th2 están implicados en la eliminación de microorganismos extracelulares, infecciones parasitarias y condiciones alérgicas por medio de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 (39). A su vez, ambos inhiben la formación de osteoclastos mediante IFN- $\gamma$  e IL-4 respectivamente (40).

**-Th17:** en circunstancias de activación, bajo condiciones inflamatorias y en presencia de TGF- $\beta$ , las células T se diferencian a Th17 que secretan IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, además de cierta cantidad de IFN- $\gamma$  (41). En relación con el hueso, los Th17 promueven la osteoclastogénesis vía IL-17, la cual induce, en células estromales y osteoblastos, la producción de RANK-L (42).

**-Th reguladores:** son células tanto CD4 como CD8 y ambos expresan FoxP3 que es determinante en el desarrollo y función de estas células (43, 44).

**-Th reguladores CD4:** suprimen la osteoclastogénesis por contacto célula-célula directo y por medio de citoquinas como TGF- $\beta$  e IL-4 (45).

**-Th reguladores CD8:** Probablemente el escaso conocimiento de este subgrupo celular se debe a que solo representan del 0.2 al 2% del total de CD8, pero se ha descubierto que las Th reg FoxP3 CD8, inducidas por osteoclastos, suprimen tanto la actividad como la formación de los osteoclastos (46). Por lo tanto, existe una retroalimentación entre osteoclastos y Th reg CD8.

**- $\gamma\delta$  T cells:** la mayor parte de las células T en circulación expresan receptores de cadenas  $\alpha\beta$  (47), pero hay un subgrupo, que representa del 1 al 10% de las

células circulantes, que expresa el heterodímero  $\gamma\delta$  y que tienen una función predominantemente innata (a diferencia de las  $\alpha\beta$  que son principalmente adaptativas). Expresan factores de crecimiento que se han demostrado críticos en la curación de fracturas esqueléticas (48).

**B) Células B:** diferenciadas desde las células madre hematopoyéticas de la médula ósea, regulan la osteoclastogénesis (49) bien a través de la expresión de RANKL o DcR3 (50,51) o bien como consecuencia indirecta de la secreción de IL-7 (52), siendo además la mayor fuente de expresión de OPG en el medio óseo, por lo que su ausencia incentiva la osteoclastogénesis (53). Su estrecha relación con células T tiene también un papel regulador variable sobre el hueso, por un lado, su activación por citoquinas Th1 suprime la osteoclastogénesis, pero, por el contrario, las citoquinas Th2, la promueven (54); en segundo lugar, la cooperación de ambas líneas celulares limita la reabsorción ósea in vivo mediante la regulación de la secreción de OPG por células de línea B a través de la vía coestimuladora CD40 / CD40L (55).

**C) Células Natural Killers:** Son células que están implicadas en la eliminación tanto de células aberrantes como de aquellas infectadas por virus (56) y median en el inicio y desarrollo de la respuesta inmune mediada por células T y B a través de la liberación tanto de citoquinas como de factores de crecimiento. Su acción sobre la osteoclastogénesis se debe, por un lado, a la expresión por parte de las NK de MCSF y de RANKL (57), y por otro, al aumento del desarrollo, maduración y actividad de los osteoclastos inducido por el subtipo de células NK invariantes (58).

**D) Células dendríticas:** se trata fundamentalmente de células presentadoras de antígenos, con un papel importante en el inicio y la regulación de la inmunidad mediada por células T. A pesar de su ausencia en el compartimento óseo, regulan la pérdida ósea en circunstancias inflamatorias, mediante la modulación de la actividad de las células T (59). Por otro lado, en modelos in vitro se ha visto que monocitos derivados de células dendríticas, bajo presencia de RANKL y MCSF (60), se pueden diferenciar en osteoclastos. Finalmente, las células dendríticas pueden conducir a la activación y expansión de células Th17, secretoras de IL-17, que induce la osteoclastogénesis (61).

**E) Neutrófilos:** parte fundamenta de la inmunidad innata, en las situaciones de daño óseo producen inflamación masiva, así como proteínas y lípidos (62). Regulan las funciones de los osteoblastos (63) y son capaces de secretar RANKL (64) lo que activa la resorción ósea.

**F) Macrófagos:** Células derivadas de la línea mieloide, cuyo papel es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y la reparación tisular. Tienen la capacidad de formar células multinucleadas gigantes que bajo RANKL se pueden diferenciar a osteoclastos (65). Además, forman entre el 10-15% del tejido óseo donde tienen influencia en el desarrollo, la homeostasis y reparación de éste (66).

### **2.1.3-. Citoquinas:**

El remodelado óseo está regulado estrechamente por una compleja trama de hormonas, citoquinas e interacciones celulares directas, cuyo desequilibrio conlleva un aumento o un descenso de masa ósea. Las citoquinas son proteínas cuya función es coordinar la respuesta del sistema inmunológico y lo hacen actuando directamente sobre la proliferación, diferenciación y función de las células implicadas: **Figura 5**

**A) RANK/RANKL:** miembro de la superfamilia de TNF, expresada por varios tipos celulares (preosteoblastos y células T activadas, células B y osteocitos) y cuya expresión es inducida en respuesta a varios factores como PTH, vitamina D, prostaglandinas, además de citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  o IL-1. Su acción principal es la diferenciación de los osteoclastos y el estímulo de su capacidad de resorción ósea mediante la unión a su receptor en los precursores monocíticos (67). Se sabe que este sistema está bajo estricta regulación de estradiol y progesterona, lo que explica que el descenso de circulación de hormonas femeninas a partir de la menopausia induzca un aumento de la señalización de esta vía y, por tanto, osteoporosis (68). Además, RANK/RANKL participan en la maduración y supervivencia de células del sistema inmune, demostrando la estrecha relación entre ambos sistemas (69).

Cytokine	Source	Effect on OCs	Effect on immunity	Function in bone Homeostasis
IL-1	Macrophage and DCs	OC↑	Pro-inflammation	Directly activates RANK signaling to promote osteoclastogenesis
IL-3	Activated T cells	OB↑	Blocks RANKL induced osteoclast	Inhibits osteoclastogenesis
IL-4	Th2	OC↓	Humoral Immunity	Inhibits osteoclastogenesis
IL-6	Macrophage, DCs	OC↑	Pro-inflammation, Th17 induction	Activation of osteoclastogenesis
IL-7	BMSC	OC↑	Promotion of T/B cell development	B cell development
IL-10	Treg	OC↓	Anti-inflammation	Suppress bone resorption
IL-17	T cells	OC↑	Pro-inflammatory cytokine	RANKL expression and vigorous pro-inflammatory potency
IL-18	Macrophage	OC↓	Th1 differentiation, IFN- $\gamma$ induction	Inhibits TNF- $\alpha$ mediated osteoclast formation in a T cell independent manner
IL-23	Macrophage and DCs	OC↑	Th17 induction	Indirect osteoclast activation
IL-27	Macrophage and DCs	OC↓	Th1 and Treg↑; Th17 induction	Inhibits osteoclast formation, blocking RANK dependent osteoclastogenesis
GM-CSF	Th1	OC↓	Pro-inflammation	Inhibits osteoclastogenesis
IFN- $\gamma$	Th1, NK cells	OC↓	Cellular immunity	Inhibits osteoclastogenesis
OPG	Osteoclasts	OC↓	Decoy receptor for RANKL	Inhibits osteoclastogenesis
RANK	Osteoclasts, DCs	OC↑	DCs activation	Osteoclast differentiation and activation
RANKL	Osteoblast, Th cells	OC↑	DCs maturation and osteoclast differentiation	Direct osteoclast activation through RANK
TNF- $\alpha$	Th17, Macrophage DCs	OC↑	Pro-inflammatory cytokine	Indirect osteoclastic activation through RANKL
TGF- $\beta$	Multiple cell lines	OC↑	Blocks activation of lymphocytes and monocytes derived phagocytosis	Indirect osteoclast activation, Inhibits osteoblast differentiation

**Figura 5-. Papel de las citoquinas en la osteoimmunología.** IL: interleuquina; OC: osteoclasto; OB: osteoblasto; DCs: células dendríticas; BMSC: células estromales de médula ósea; GM-CSF: factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos; RANK/RANKL: receptor activador del factor NF- $\kappa$ B/ligando del RANK; **Referencia:** Dar HY, Azam Z, Anupam R, Mondal RK, Srivastava RK. Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system. Front Biosci (Landmark Ed). 2018 Jan 1;23:464-492). (28)

**B) OPG:** glicoproteína perteneciente a la superfamilia de receptores TNF; producida por células madre mesenquimales es responsable de la supresión de la osteoclastogénesis y su expresión viene regulada principalmente por estrógenos (70). Se produce como un receptor señuelo que evita la interacción entre RANKL y su receptor RANK, interacción necesaria para el desarrollo de osteoclastos funcionalmente activos (71).

**C) TNF- $\alpha$ :** citoquina producida por monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T. Su acción en las enfermedades óseas inflamatorias es primordial en la destrucción de hueso, dado que facilita el reclutamiento de los osteoclastos e inhibe la diferenciación de los osteoblastos (72), además promueve la actividad de RANKL (73).

**D) IFN- $\gamma$ :** Se trata de una citoquina secretada por células NK, Th1 y células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> (74). Tiene un papel dual en la osteoclastogénesis, con una acción directa sobre la inhibición y otra indirecta sobre la estimulación, que es dependiente de las concentraciones de citoquinas en el medio (75, 76).

**E) MCS-F:** factor estimulador de colonias de macrófagos. Junto con RANKL, regula la proliferación y la diferenciación de los osteoclastos (77). Formado por los osteoblastos de la médula ósea, tiene acción directa sobre los precursores de los osteoclastos, actuando como factor de supervivencia para estos (78).

### **F) Interleuquinas:**

**IL-1 $\beta$ :** la familia de la IL-1 incluye varios miembros y son varios los trabajos que señalan su papel en la inducción de la resorción ósea y la osteoporosis, mediante (79):

- el aumento de expresión de RANKL (80), teniendo un papel importante en la osteoclastogénesis,

- la regulación de la producción de OPG (81),

- la mediación de la diferenciación de monocitos a osteoclastos, tras la estimulación por RANKL y vitamina D (82),

- el aumento de síntesis de PG en el hueso (83),

- la estimulación de la actividad de los osteoclastos a través del aumento de la producción de M-CSF y la inhibición de la apoptosis de los mismos (81),

- la inhibición de la actividad de los osteoblastos por diferentes mecanismos, entre ellos el aumento de Dkk1 y de esclerostina (84).

**IL-3:** esta citoquina, secretada por células T activadas (85) es un potente inhibidor de la osteoclastogénesis e inhibe la formación y la resorción óseas (86) inducidas por RANKL y TNF- $\alpha$ . Además in vitro, IL-3 aumenta la diferenciación de los osteoblastos y la mineralización de la matriz óseas (87).

**IL-4:** citoquina reguladora de la inmunidad, secretada por células Th2; inhibe la habilidad de células de linaje macrófágico de producir algunas citoquinas

inflamatorias tales como IL-1, TNF- $\alpha$  o IL-6 (88). Por otro lado, es un potente inhibidor in vivo e in vitro de la osteoclastogénesis mediante la producción de OPG a través de la activación de STAT-6 (89).

**IL-6:** esta citoquina, producida por macrófagos, monocitos, células endoteliales y células T y B, no solo inicia y aumenta la inflamación, sino que además estimula la resorción desarrollando progenitores osteoclasticos (90), modulando la actividad de RANKL e induciendo varios factores, entre ellos IL-1 y TNF- $\alpha$  (91). Asimismo, la concentración sérica de IL-6 se correlaciona negativamente con la DMO (92).

**IL-7:** producida por células estromales y osteoblastos, incentiva la osteoclastogénesis por inducción de la producción, por parte de células T, de RANKL y TNF- $\alpha$  (93). Asimismo, el aumento de producción de IL-7 inducida por IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  también produce pérdida ósea por dos mecanismos, la producción por parte de células T activadas de RANKL y la mejora en la expansión de Th17 productoras de IL-17 (94).

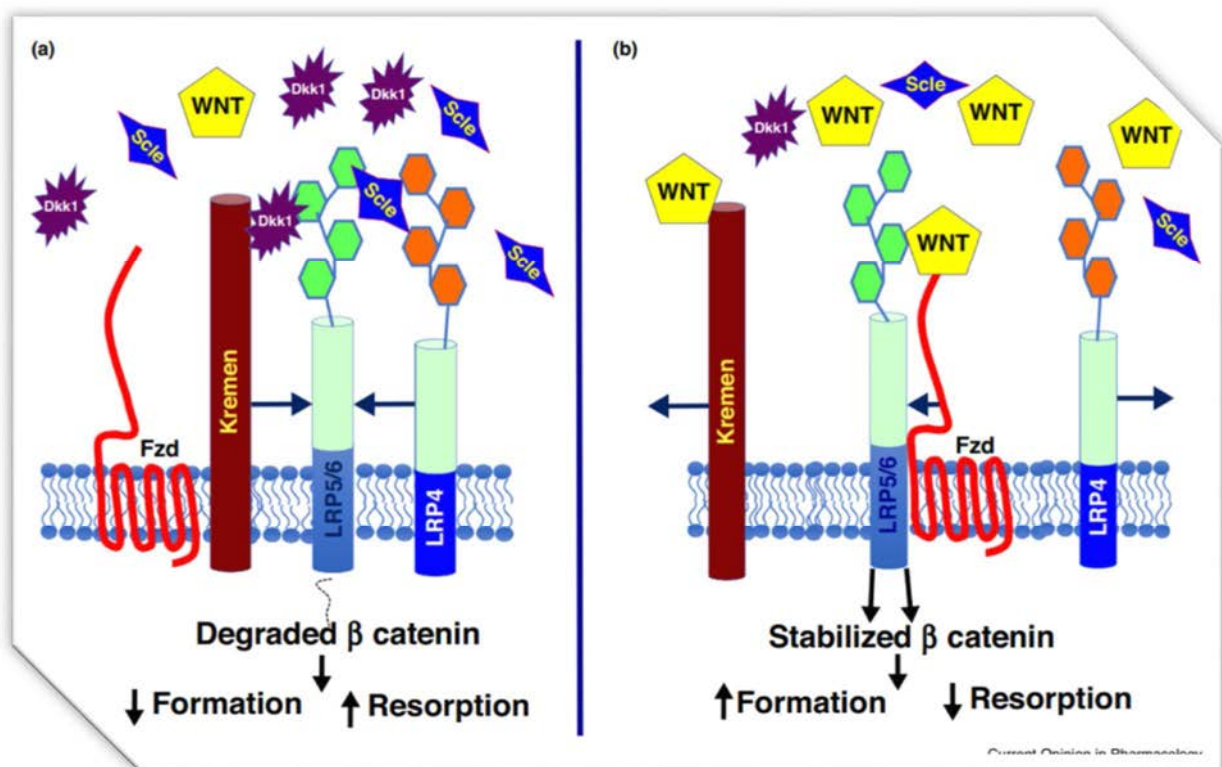
**IL-8:** regulador autocrino de la osteoclastogénesis vía inducción de RANKL (95). In vitro, el uso de anticuerpos contra la IL-8 inhibe la osteoclastogénesis (6).

**IL-10:** se trata de una citoquina que suprime las respuestas inflamatoria e inmunoproliferativa (97), capaz de modular múltiples células y otras citoquinas (98, 99). En relación con el esqueleto, es un factor regulador de la homeostasis del hueso, tanto en condiciones normales como en condiciones inflamatorias (100) y su papel fundamentalmente es de inhibición de la osteoclastogénesis. A pesar de ello, parece que en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis las concentraciones de determinados haplotipos de IL-10 son mayores que en aquellas con DMO dentro de la normalidad (101), probablemente debido a la inhibición de la formación de osteoclastos, por intervención directa sobre OPG (102), RANKL y NFATc1 (103). Estos resultados dan idea de la complejidad del sistema de las citoquinas.

**IL-17:** producida por el subtipo de CD4 Th17. La familia incluye al menos 6 isoformas (de la A a la F) (104). Tiene una potente actividad inflamatoria, de forma que puede inducir una amplia variedad de citoquinas en diferentes tipos



celulares implicados en el daño tisular (105). Sobre la osteoclastogénesis, a pesar de tener un papel controvertido, (106) parece que su acción es dosis-dependiente, de tal manera que a bajas concentraciones estimula la diferenciación y actividad de los osteoclastos, pero en cambio, dosis más elevadas pueden causar el efecto contrario. Algunos autores apuntan a un efecto sinérgico entre IL-17A y RANKL en la promoción de la formación de los osteoclastos, alegando que ambos estimulan la maduración de los mismos (107), y a su vez, IL-17 induce PGE2 que da lugar a la producción de RANKL por parte de los osteoblastos (108).



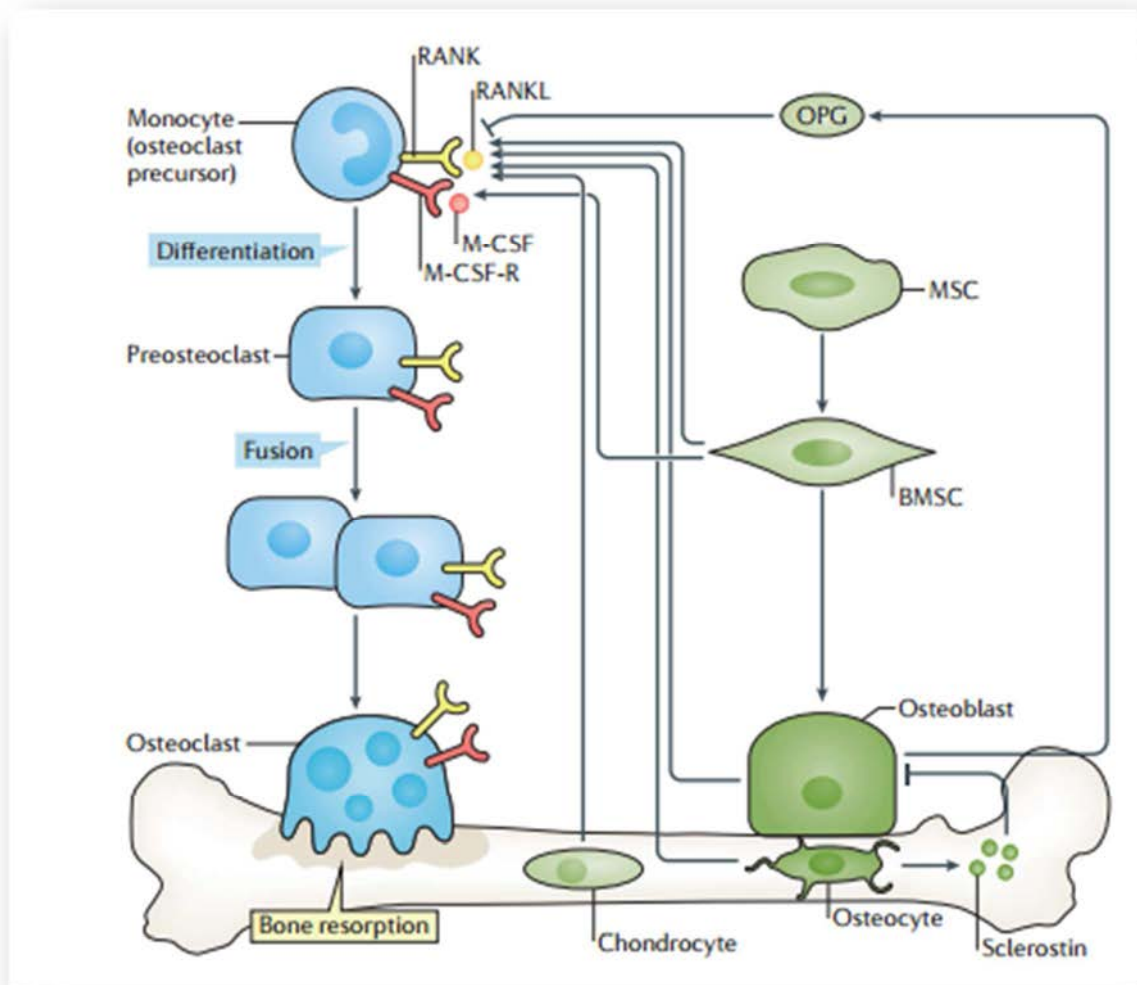
**Figura 6- Receptores para los ligandos Wnt y sus inhibidores endógenos:** (a) Cuando la estequiometría de los Wnt vs esclerostina/Dkk1 favorece a los inhibidores, Dkk1 y la esclerostina se unen LRP5/6, evitando la unión de Wnt y reclutando Kremen o LRP4, respectivamente, lo que lleva a su internalización y la eliminación de LRP5/6 de la superficie celular; en estas circunstancias, la señalización Wnt no se activa, lo que lleva a la degradación de la  $\beta$ -catenina y por tanto hay una baja formación de hueso y una alta resorción ósea. (b) Cuando la estequiometría de Wnt frente a esclerostina/Dkk1 favorece a Wnt, previene la unión de los inhibidores y permite la unión de Wnt y el reclutamiento de receptores Frizzled (Fzd) a LRP5/6; la señalización Wnt se activa, estabilizando la  $\beta$ -catenina para permitir su translocación al núcleo y la activación de los genes diana para aumentar la formación ósea y disminuir la reabsorción ósea. Referencia: Baron R, Gori F. Targeting WNT signaling in the treatment of osteoporosis. *Curr Opin Pharmacol.* 2018 Jun;40:134-141. (112)

**G) Proteínas de la vía Wnt (Wingless and Int-1):** Son una familia formada por una serie de ligandos con un papel óseo fundamentalmente anabólico, participando en la diferenciación de los osteoblastos y, por lo tanto, en el

desarrollo normal del hueso y del cartílago. Su unión, en las células mesenquimales, a receptores tales como Frizzled y LRP5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein 5/6) (109), produce la activación y translocación nuclear de beta catenina, lo que a su vez induce la transcripción de genes implicados en la diferenciación de los osteoblastos (110). Además, Wnt actúa sobre BMP, RANKL y OPG, por tanto también influye en la diferenciación y función de los osteoclastos. En aquellas circunstancias en las que predominan los antagonistas de esta vía, como Dkk1 y esclerostina, la señalización Wnt no se activa, lo que lleva a la degradación de la b-catenina y por tanto hay una baja formación de hueso y una alta resorción ósea (111,112).

#### **2.1.4-. Osteoclastogénesis y eje RANK-RANKL-OPG**

En los últimos años se han ido descubriendo mediadores que regulan la actividad de estas células, tales como la osteoprotegerina (OPG) (113), que es un potente inhibidor de la diferenciación de los osteoclastos y el ligando OPG (OPGL), más conocido como RANKL (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK)). RANKL se describe por primera vez como una citoquina derivada de células T que media en la proliferación de las mismas y en la función de las células dendríticas. Además de su papel inmune, se considera a RANKL como una citoquina clave para la formación y la actividad de los osteoclastos. En presencia de concentraciones permisivas de M-CSF (114), RANKL se une a su receptor (115) en los precursores de los osteoclastos permitiendo su diferenciación. Como quiera que OPG es un receptor señuelo para RANKL, la ratio OPG/RANKL es un factor determinante para la diferenciación de los osteoclastos y la resorción ósea. Los osteoblastos y sus precursores son las principales células en la producción de OPG y RANKL, aunque no las únicas, (116), dado que parece que los linfocitos B también secretan OPG y mantienen, in vivo, la homeostasis ósea. Asimismo, los osteocitos son fuente de esclerostina, un antagonista de la vía Wnt (117) que, por lo tanto, disminuye la formación ósea. **Figura 7**

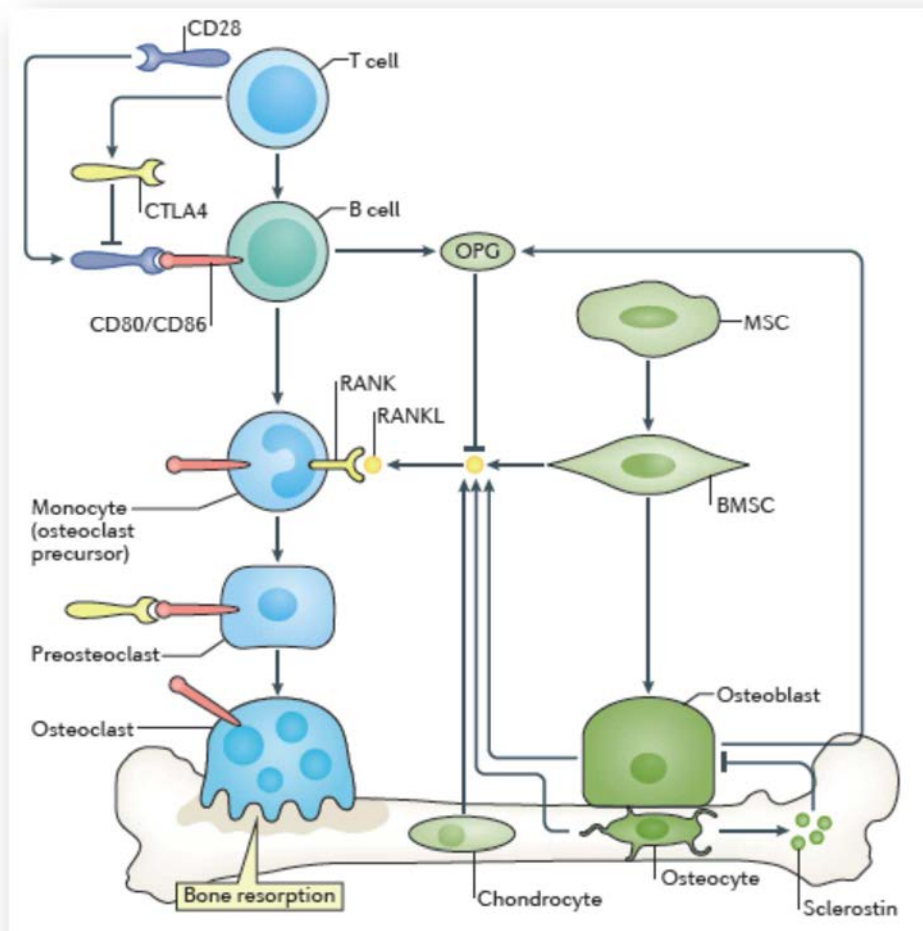


**Figura 7.- Papel de RANK-RANKL-OPG en la formación fisiológica de los osteoclastos.** Los precursores de los osteoclastos derivados de células de linaje monocítico, expresan RANK, receptor de RANKL. En presencia de concentraciones permisivas de M-CSF, RANKL promueve la diferenciación de los monocitos a pre-osteoclastos que se fusionan en células multinucleadas. OPG, es un receptor señuelo de RANKL y modera su actividad. Los osteoblastos derivan de células mesenquimales (MSCs) que se diferencian a progenitores pluripotentes, a menudo referidos como células estromales medulares (BMSCs). Bajo las condiciones apropiadas, las BMSCs se diferencian en osteoblastos capaces de sintetizar y mineralizar la matriz ósea. Ambas, BMSCs y osteoblastos, se consideran la mayor fuente de RANKL y OPG. Algunos osteoblastos pueden diferenciarse posteriormente en osteocitos que permanecen encapsulados en el hueso sensando el microambiente y secretando factores que regulan la remodelación ósea como RANKL y la esclerostina (factor inhibidor de la formación ósea). **Referencia: Weitzmann MN, Otokun. Physiological and pathophysiological bone turnover - role of the immune system. Nat Rev Endocrinol. 2016 Sep;12(9):518-32. (8)**

### 2.1.5.- Papel de las células T y B en el remodelado óseo

Los linfocitos T, piedra angular de la respuesta adaptativa, regulan, mediante secreción de factores, la función de las células presentadoras de antígenos y la inmunidad humoral. Estas células son, además, productoras de CD40, que al unirse a su receptor en las células B, permite, por parte de los últimos, la producción de OPG, por lo que el correcto funcionamiento entre células B y T permite regular la ratio basal de RANKL/OPG. Además de CD40, participan en

este proceso otras moléculas activadoras de los linfocitos T, como CD28 cuyos ligandos CD80 y CD86 (que pueden ser expresados por los monocitos como células presentadoras de antígenos) son inhibidos por medio de CTLA4 (118), lo que, in vitro, inhibe la formación de osteoclastos. Por lo tanto, queda demostrado que tanto las células B como las T moderan de forma fisiológica la resorción ósea mediante la regulación de la ratio RANKL/OPG y por efecto directo de CTLA4 en los precursores de los osteoclastos. **Figura 8**



**Figura 8-. Papel de la interfaz inmunoesquelética en la formación fisiológica de los osteoclastos.** Bajo condiciones fisiológicas las células B, reguladas por interacciones coestimuladoras con las células T, suplementan los niveles de OPG en la médula ósea. OPG, producida por diferentes fuentes, modera y estabiliza el remodelado. Algunas subpoblaciones de células T reg, secretan CTLA4, que se une a CD80/CD86 en los precursores de los osteoclastos, promoviendo la apoptosis y disminuyendo la resorción. **Referencia: Weitzmann MN, Ootokun. Physiological and pathophysiological bone turnover - role of the immune system. Nat Rev Endocrinol. 2016 Sep;12(9):518-32. (8)**

### **3-. Turnover óseo patológico.**

#### **3.1-. Disrupción inmune y pérdida ósea en la infección por VIH**

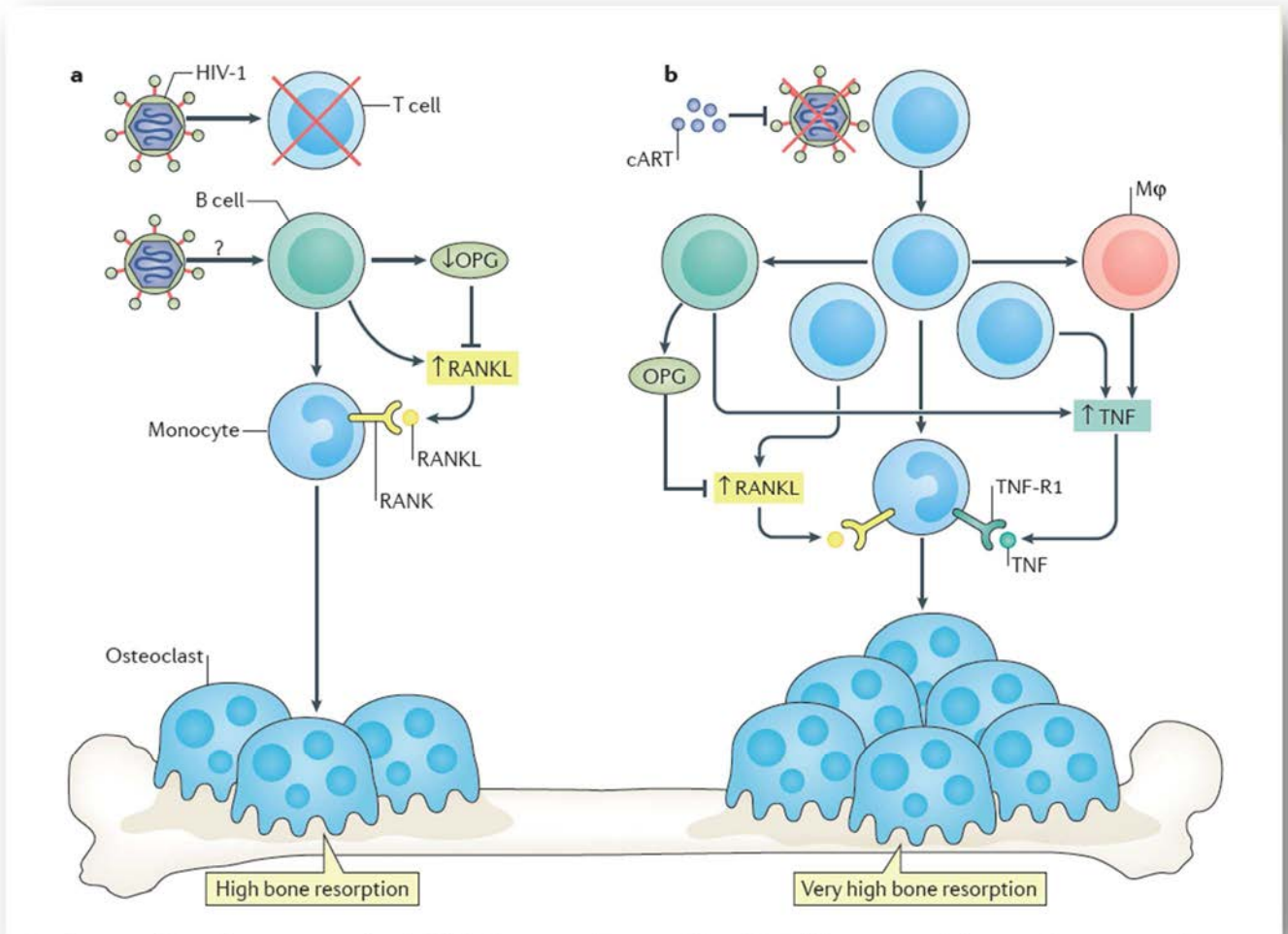
Los estudios sugieren que el VIH tiene efectos directos e indirectos sobre los osteoblastos, los osteoclastos y la regulación entre ambos (119). De hecho, estos estudios demuestran que las proteínas virales tienen un efecto inhibitorio sobre los osteoblastos: disminuyen la funcionalidad y la diferenciación de estos y aumentan la apoptosis (120). Asimismo, estas proteínas aumentan la actividad de los osteoclastos (121).

La infección por VIH comporta un descenso de CD4 y una pérdida en la funcionalidad de los linfocitos. En modelos murinos transgénicos (122), se ha visto que la estructura ósea y la densidad mineral ósea están marcadamente reducidas por resorción y aumento de la ratio RANKL/OPG. En estudios llevados a cabo en humanos infectados por VIH, parece que la producción de OPG por parte de células B está disminuida y hay un marcado aumento de RANKL (123) viéndose en los pacientes una clara relación con un descenso de la DMO. Esto demuestra que hay un respaldo inmunológico que probablemente contribuye a la pérdida ósea. **Figura 9**

#### **3.2-. Papel del tratamiento antiretroviral en el daño óseo**

A pesar de la indicación de TAR en todos los pacientes VIH y la mejoría de determinadas enfermedades secundarias a la introducción del mismo, el hueso presenta paradójicamente un deterioro continuo y en algunos casos, incluso una exacerbación de dicho empeoramiento. Dado que esta pérdida ósea acontece, en mayor o menor medida, prácticamente con todos los fármacos (entre el 2-6% durante los primeros dos años), la evidencia sugiere que un importante componente de la pérdida ósea es independiente del TAR (124, 125). Se piensa que la repoblación/reactivación de células T que sigue al inicio del TAR, genera un estado proinflamatorio que favorece la pérdida osteoclástica de hueso. Estos linfocitos T activados producen diferentes tipos de citoquinas osteoclastogénicas como RANKL o TNF- $\alpha$ , que como hemos dicho, es una citoquina que promueve la expresión de RANKL por parte de los osteoblastos y tiene una acción sinérgica

con RANKL para amplificar el proceso de resorción. Diferentes estudios demuestran que dicha activación de linfocitos T tras el inicio de TAR produce un aumento en la resorción ósea, un descenso de DMO y una alteración en la microarquitectura cortical y trabecular (126). **Figura 9**



**Figura 9.- Pérdida ósea asociada a infección VIH e iniciada por TAR.** La inmunodeficiencia característica del VIH produce daño y delección de las células T y B, que en las células B, reduce la producción de OPG y aumenta la producción de RANKL. A su vez, la ratio RANKL/OPG está aumentada y resulta en pérdida ósea. La activación y repoblación de células T que sigue al inicio del TAR, lleva a la secreción de citoquinas osteoclastogénicas, incluyendo RANKL y TNF por parte tanto de células T como de otros componentes inmunes como células B y macrófagos. La secreción de estos factores aumenta la pérdida ósea, más allá de la inducida por el desbalance de la ratio RANKL/ OPG en las células B causada por la infección VIH. **Referencia: Weitzmann MN, Ofotokun. Physiological and pathophysiological bone turnover - role of the immune system. Nat Rev Endocrinol. 2016 Sep;12(9):518-32. (8)**

En los últimos años los tratamientos actuales se toleran mejor, debido a un descenso de sus efectos adversos. Además, el aumento de la longevidad de estos pacientes ha propiciado un mayor tiempo de exposición al TAR, sin que se tengan muy claros los efectos a largo plazo de las potenciales toxicidades acumuladas.

Hay una evidencia cada vez mayor de que la pérdida ósea asociada al VIH empeora de forma paradójica con el TAR (4). El efecto es universal en todas las familias de antiretrovirales, pero la magnitud en el descenso de la DMO puede variar dependiendo del régimen farmacológico. La mayoría de esta pérdida de masa ósea ocurre durante los primeros 1-2 años tras el inicio del TAR con una posterior estabilización.

### **3.2.1-. Inhibidores de la transcriptasa inversa (RTIs)**

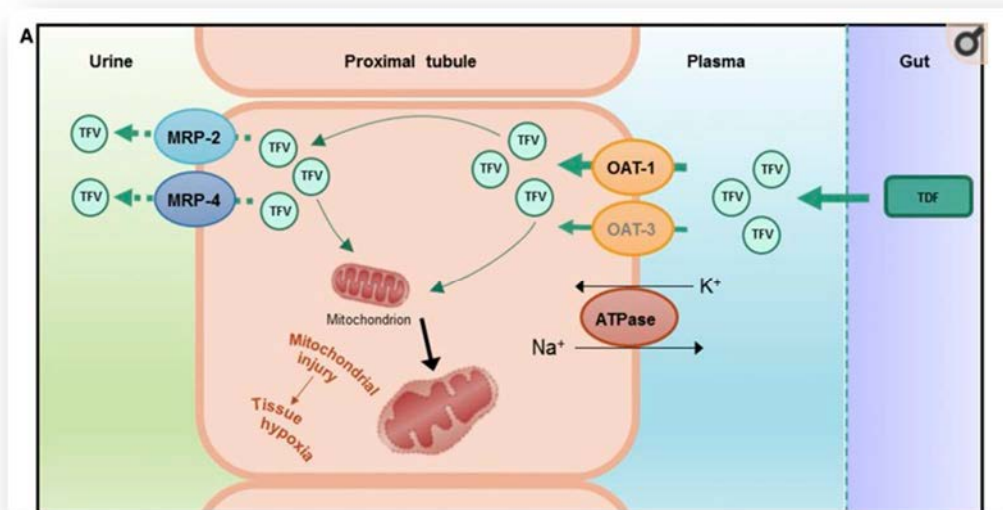
#### **3.2.1.1-. Nucleósidos (NRTIs): tenofovir disoproxil fumarato**

Tenofovir disoproxil fumarato es uno de los NRTIs que se ha relacionado con mayor pérdida de DMO en pacientes VIH, con un 1-3% más que otros fármacos de la misma familia y este efecto también se ha observado en población no VIH sometida a TDF como tratamiento pre-exposición o bien como tratamiento para la hepatitis B, lo que confirma este efecto deletéreo del fármaco más allá de lo que se puede atribuir al virus o a la activación inmune (127). Algunas de las hipótesis apuntan a que la toxicidad ósea de TDF se debe a que el daño directo sobre el túbulo renal (**figura 10A**) produce una hipofosfatemia que se traduce en un aumento de paratohormona (PTH) que favorece directamente la resorción ósea, demostrándose en algunos estudios la hiperfosfaturia como factor de riesgo independiente para el descenso de DMO (128). Además del daño de la función renal, se produce un defecto en la 1 alfa hidroxilación que es clave para la producción de la forma activa de vitamina D, la 1.25 OH vitamina D (9). Más allá de los efectos renales, algunos estudios *in vitro* sugieren que la exposición de los osteoblastos a TDF produce una disregulación genética de los mismos que se traduce en una disminución del crecimiento, la actividad y la diferenciación de los mismos (129). Al propio efecto del TDF por sí mismo, hay que añadir la sinergia de otros fármacos; así parece que la biodisponibilidad de TDF aumenta entre un 22 y un 37% con rilpivirina (RPV), inhibidores de la proteasa (IPs) y cobicistat (COBI), por lo que aumentaría el efecto deletéreo de TDF sobre el hueso en regímenes que contengan esta combinación, así como aquellos en los que se precise su administración con comidas, especialmente,

aquellas más grasas, dado que aumentan la biodisponibilidad de TDF hasta un 40% (130).

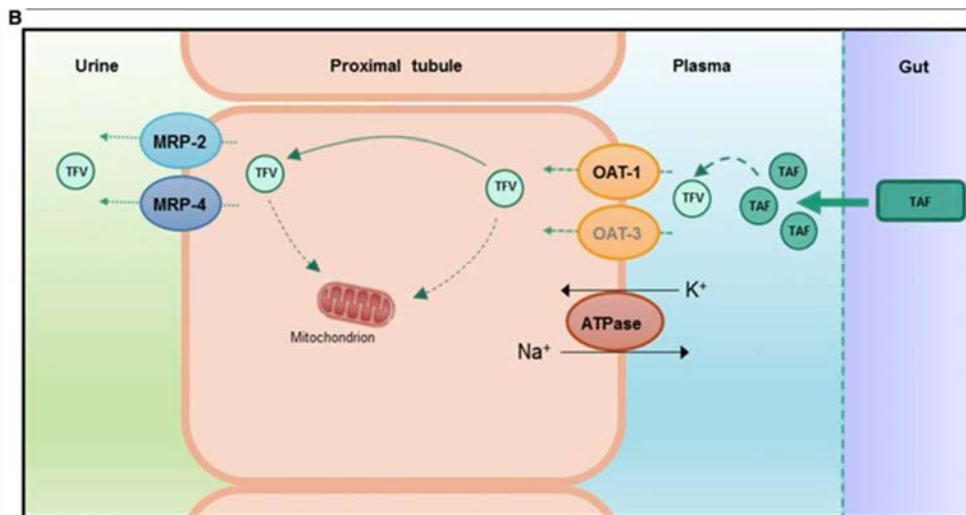
Además del descenso de DMO algunos estudios relacionan TDF con un aumento en el riesgo de fractura (131), pero esta relación clínica no queda del todo clara, dado que las cohortes estudiadas tienen un tiempo de exposición corto, una n pequeña en cuanto a fracturas y además hay un déficit de datos en los mismos en relación a la información de fracturas por fragilidad.

Recientemente se ha comercializado tenofovir alafenamida (TAF), que es una prodroga de tenofovir, cuya farmacocinética permite una concentración intracelular en células diana para el VIH del 90% con una escasa concentración plasmática, lo que comporta menor afectación renal y ósea (figura10B). Así en estudios en pacientes naïve en los que se compara el uso de tenofovir alafenamida vs tenofovir disoproxil fumarato coformulado con EVG/COBI/FTC se objetiva una descenso significativamente menor en la densidad mineral ósea en la columna vertebral (% de cambio medio -1,30 vs -2,86;  $p < 0,0001$ ) y la cadera (-0,66 vs -2,95;  $p < 0,0001$ ) a las 48 semanas en la rama de TAF (132) y esto mismo se objetiva en estudios de switching desde terapias con TDF a TAF (133).



**Figura 10 A-. Acción tubular de TDF.** Las células tubulares proximales realizan la excreción renal de tenofovir (TFV), el metabolito activo de TDF y TAF. (A) El TDF se metaboliza rápidamente a TFV, dentro del plasma. El influjo de TFV en la célula tubular proximal en la membrana basolateral ocurre a través del transportador de aniones orgánico humano 1 (OAT-1) y, en menor grado, de OAT-3; El flujo de TFV a la orina en la membrana apical está mediado por la proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos tipo 4 (MRP-4) y posiblemente, MRP-2. La acumulación de TFV dentro de las células tubulares proximales conduce a lesiones mitocondriales e hipoxia tisular. **Referencia: Jotwani V, Atta MG, Estrella MM. Kidney Disease in HIV: Moving beyond HIV-Associated Nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2017;28(11):3142-3154. (134)**





**Figura 10 B.- Acción tubular de TAF.** (B) El TAF es estable dentro del plasma y se metaboliza en gran parte a TFV dentro de las células diana, lo que resulta en niveles más bajos de TFV en el plasma y menos probabilidades de lesión tubular. El propio TAF no es un sustrato para OAT-1 o OAT-3. **Referencia:** Jotwani V, Atta MG, Estrella MM. *Kidney Disease in HIV: Moving beyond HIV-Associated Nephropathy.* J Am Soc Nephrol. 2017;28(11):3142-3154. (134)

### 3.2.1.2.- No nucleósidos (NNRTIs): efavirenz (EFV)

En el caso de los NNRTIs parece que el que tiene mayor repercusión ósea, mediante alteración del metabolismo de vitamina D, es el EFV. Como inductor enzimático del citocromo p450, EFV aumenta el metabolismo de 25OH vitamina D a componentes inactivos por inducción de la 24 hidroxilasa. En diferentes cohortes, como la suiza (135), la cohorte SUN (136), el estudio MONET (137), ECHO (138), o las publicaciones de Brown y McComsey (139), las pautas basadas en EFV, comparadas con otros regímenes, demuestran un mayor descenso de vitamina D. Incluso comparado con otros NNRTIs como RPV, el riesgo de hipovitaminosis D es mayor en la rama de EFV (138).

### 3.2.2.- Inhibidores de la proteasa (IPs)

El papel de los IPs en el hueso es controvertido, a pesar de que la mayoría de los estudios señalan un efecto deletéreo sobre la DMO. En los estudios clínicos, los tratamientos basados en IPs se correlacionan con descensos significativamente mayores de la DMO en comparación a aquellos regímenes basados en NNRTIs (140) o en inhibidores de la integrasa (INI) (141). Asimismo, parece que parte de este efecto, estaría mediado por el uso concomitante de

TDF, como se demuestra en los estudios en los que se objetiva un aumento de la DMO en los tratamientos libres de NRTIs cuando el brazo comparador incluye TDF, particularmente cuando se combina con IPs (142). El mecanismo de pérdida ósea ligado a los IPs no está claramente establecido, con datos in vitro controvertidos. Gibellini demuestra que la exposición de los osteoblastos a FPV, pero no a otros IPs, produce un aumento de expresión de OPG y un consecuente descenso en la producción de RANKL (143). Fakruddin objetiva que tanto RTV como SQV producen un bloqueo de la señal que impide la diferenciación de los osteoclastos (121). En otros estudios, diferentes IPs alteran la diferenciación de los osteoclastos (144), tienen acción sobre los genes que regulan la expresión de los osteoblastos (145), o bien inducen un envejecimiento prematuro de los precursores de los osteoblastos, alterando su potencial de diferenciación (146).

## 4-. Marcadores bioquímicos del recambio óseo

### 4.1-. Marcadores de formación ósea: Figura 11

**A) Fosfatasa alcalina ósea:** es una isoforma de la fosfatasa alcalina, y se trata de una hidrolasa cuya función principal es la retirada de grupos fósforo de diferentes moléculas (147). Producida por los osteoblastos, está implicada en el proceso de mineralización (148). La fosfatasa alcalina ósea hidroliza el pirofosfato, que es un inhibidor de la maduración de la matriz ósea, liberando en este proceso, P inorgánico (149).

**B) Osteocalcina:** también llamada proteína del ácido gammacarboxiglutámico del hueso, es una proteína de 49 aminoácidos secretada por los osteoblastos, siendo la proteína no colagénica más abundante en la matriz ósea (150). Dado que pasa a la circulación sistémica desde la matriz en el momento de resorción, sus niveles séricos tienen un componente dual de formación y resorción.

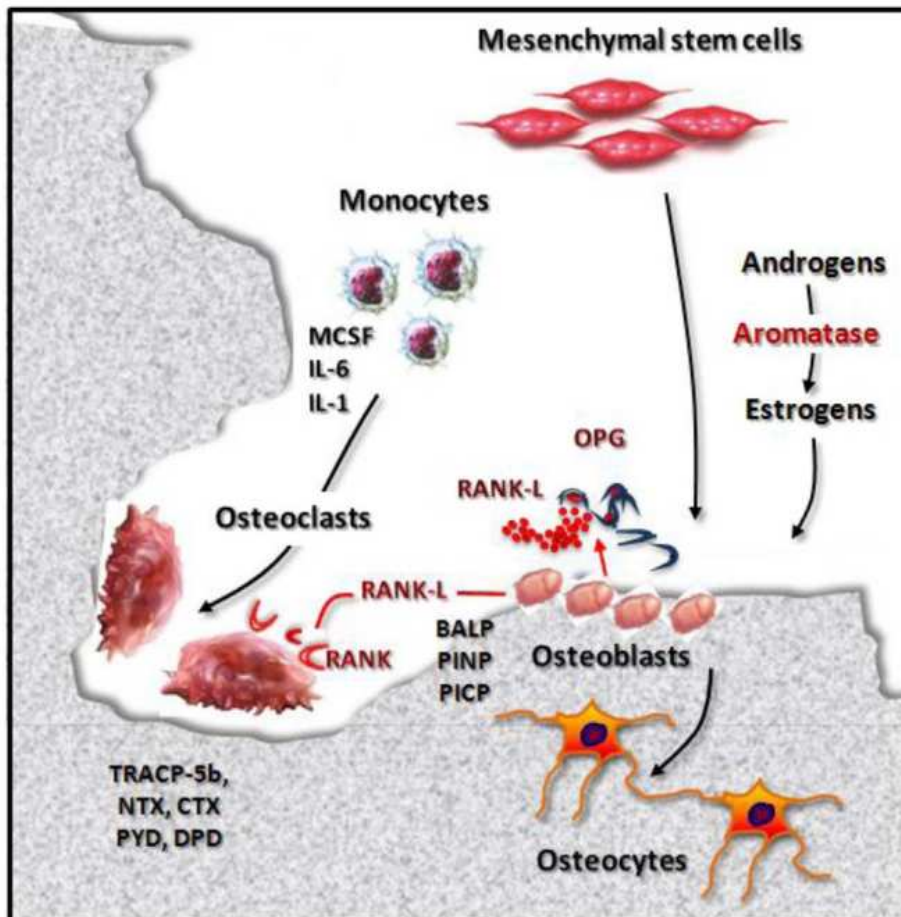
**C) P1NP (propéptido aminoterminal del procolágeno I):** se trata de un propéptido resultado de la escisión del terminal N del procolágeno sintetizado por los osteoblastos. (151).

### 4.2-. Marcadores de resorción ósea: Figura 11

**A) CTX (telopéptido carboxiterminal del colágeno):** Generada por la actividad de la catepsina K (enzima proteolítica que degrada el colágeno), se trata de un marcador bioquímico de la actividad osteoclástica consecuencia de la degradación del colágeno óseo (152). Parece que la ratio P1NP/ $\beta$ CTX es útil en pacientes de edad avanzada como marcador simple de predicción de fracturas osteoporóticas (153).

**B) Fosfatasa ácida resistente al tartrato 5b:** expresada de forma precoz en el desarrollo de los osteoclastos (154), regula la unión de los mismos al hueso mediante la defosforilación de proteínas de adhesión fosforiladas. Además, mediante la producción de radicales de oxígeno, permite la génesis de productos de degradación de la matriz, que son liberados a suero junto con FART5b, correlacionándose con la cantidad de hueso reabsorbido (155).

C)  **Piridinolina y deoxipiridinolina**: ambos son productos de degradación del colágeno tipo I que pueden ser detectados en orina y muestran mayor variabilidad diurna (156).



**Figura 11- Remodelado óseo fisiológico:** es el resultado de las actividades opuestas de osteoclastos y osteoblastos. Los osteoclastos derivan de células de linaje monocítico/macrofágico y ejercen una función de resorción ósea, a través de la secreción de iones  $H^+$  y enzimas como FART-5b, La osteoclastogénesis está incentivada por citoquinas proinflamatorias (como M-CSF, IL-6, IL-1). Durante la erosión ósea, el colágeno tipo 1 experimenta una escisión proteolítica que resulta en la liberación de péptidos de degradación (NTX, CTX, PYD, DPD), que se pueden medir en sangre y orina. Los osteoblastos tienen un origen mesenquimal y están adscritos a la osteogénesis. En particular, sintetizan procolágeno, cuya escisión de los terminales N y C produce los péptidos P1NP y P1CP. Además secretan FAO necesaria para la mineralización de la matriz ósea. Algunos osteoblastos se transforman en osteocitos, células dendríticas que actúan como mecano-transductores. El remodelado óseo está regulado por el eje RANK-L/RANK/OPG. Los osteoblastos y las células estromales liberan RANK-L que por unión a su receptor RANK expresado por los pre-osteoclastos, promueve la diferenciación a osteoclastos. OPG inhibe parcialmente este proceso para prevenir resorción ósea excesiva. De forma similar, las hormonas sexuales ejercen un efecto predominantemente anabólico. Referencia: D'Oronzo S; Brown J, Coleman R. The role of biomarkers in the management of bone-homing malignancies. J Bone Oncol. 2017 Sep 11:9; 1-9 (151)

## **5-. Herramientas para medir la salud ósea. Marcadores subrogados**

El hueso es un material jerárquico formado por una matriz de colágeno mineralizada repleta de células, que proporciona soporte mecánico, metaboliza minerales y almacena médula ósea para la hematopoyesis. La osteoporosis es, conceptualmente, una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por el descenso de DMO y el deterioro de la microarquitectura del tejido óseo con un consecuente aumento de la fragilidad y de la susceptibilidad a las fracturas. La definición operativa se basa en los resultados de la densitometría ósea, a pesar de que la existencia de fractura por fragilidad (definida como fracturas causadas por una noxa que en un hueso normal sería insuficiente para provocar daño (157)), con o sin corroboración por DXA, se considera criterio diagnóstico e indicación de tratamiento (158). A pesar de que la DMO medida por DXA es un determinante mayor de resistencia ósea y de riesgo de fractura, la mayoría de los individuos con fractura por fragilidad tiene valores de DMO en rango osteopénico o incluso normal (159). Esto implica que existen claramente otros factores diferentes a la DMO implicados en dichas fracturas. Es por ello que en los sucesivos años se han desarrollado nuevas técnicas para estudio tanto del hueso trabecular como de la microarquitectura, con la finalidad de complementar los datos ofrecidos por la DXA. Ello nos permite contar, entre las herramientas para la medición de la salud ósea, no solo con pruebas de imagen sofisticadas como la RMN y el TAC, si no también con otras más accesibles a la práctica clínica diaria como el TBS (trabecular bone score) y la microindentación.

### **5.1-. Densitometría ósea (DXA)**

La densitometría mide la densidad mineral ósea, DMO. A pesar de existir diferentes tecnologías para esta medición, la más usada es la absorciometría radiológica de doble energía (DXA) que mide la relación entre la cantidad total de tejido óseo y el área proyectada de hueso ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) (160), es decir, da un parámetro de densidad por área (más que volumétrica), dado que la medición es bidimensional. La DXA empieza a usarse en los '80 como medida para

diagnóstico y seguimiento de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas (161), y actualmente, es el sistema de evaluación de salud ósea más extendido. El principio de la DXA es la medición de transmisión de rayos X producidos por una fuente estable a alta y baja energía. Estas dos energías permiten la discriminación entre tejido blando y hueso y mediante el cálculo de la masa de atenuación de los dos materiales es posible determinar, entre otros parámetros, la DMO. Las técnicas de DXA actuales son accesibles y emiten poca radiación (entre 0.1-6 microSv), con una correcta resolución de imagen, pudiendo realizarse en toda la superficie corporal. Como limitaciones encontramos que la medición depende del tamaño del hueso (debido a que estamos usando una medición bidimensional en un objeto con 3 dimensiones: esto explica alguna de las diferencias relacionadas con sexo, etnia y tamaño corporal), que la técnica no permite la separación de compartimento óseo cortical del trabecular y que los datos son variables en función de la composición corporal. La DMO se describe mayormente con los valores de T y Z scores, siendo ambas, unidades de desviación estándar (DE). El T-score es el número de DE que la DMO de un paciente difiere del valor promedio esperado en individuos jóvenes y sanos y la definición operativa de osteoporosis se basa en este parámetro (T-score<-2.5). En cambio, el Z-score es la comparación con respecto al valor de referencia conseguido en personas sanas de similar edad, raza y sexo (y en algunos sistemas también peso (162)). En 1994, la OMS redacta el primer informe en el que se recomendaba el uso de unos umbrales de T-score para la clasificación de los resultados de DMO en 4 categorías (158):

-Normal: T-score >-1 DE

-Osteopenia: T-score entre -1 y -2.5 DE

-Osteoporosis: T-score igual o inferior a -2.5 DE

-Osteoporosis establecida o severa: T-score igual o inferior a -2.5 DE con fractura previa.

Los rangos de referencia para calcular el T-score se basan en los datos de referencia del National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III para mediciones de cuello femoral en mujeres blancas de 20-29 años (163) y en

las bases de datos del fabricante, para la columna (164). La DMO se mide en lugares centrales, cadera y columna, porque son los que tienen mayor evidencia publicada para la estimación de riesgo de fracturas, así como bases de datos y normativas claras, y son la base del diagnóstico de osteoporosis para la OMS y la ISCD (158).

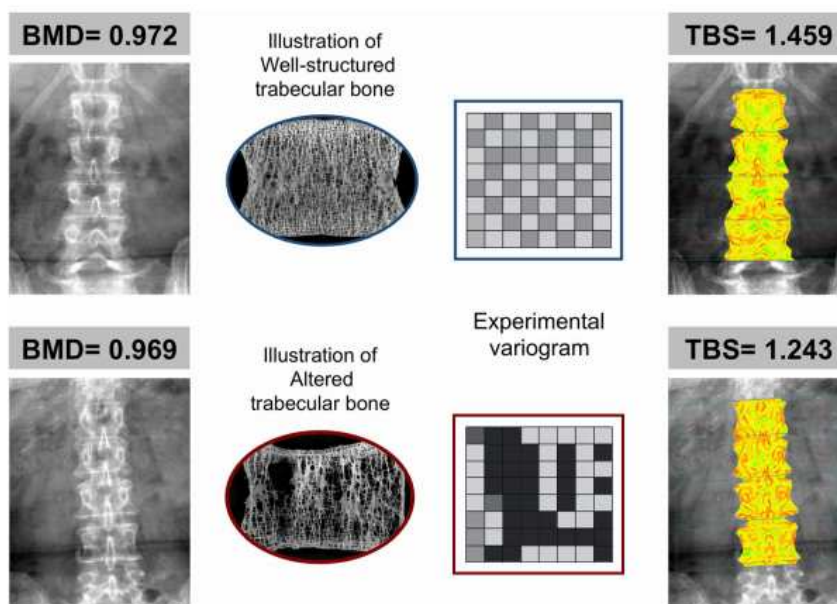
La DMO constituye una herramienta importante en el asesoramiento del riesgo relativo de fracturas, como han demostrado diferentes estudios, a pesar de la inclusión en los mismos de poblaciones de diferentes orígenes (165, 166). En cambio, el riesgo absoluto de fractura depende de la incidencia en la población, que es harto variable (166). Hay que tener en cuenta que la sensibilidad y especificidad de la DXA para las fracturas depende de los puntos de corte que se usen: así se ve que, para osteoporosis tiene una sensibilidad baja (entre 28 y 35.7%) y una alta especificidad (entre 78.8 y 86%) (167, 168), pero en cambio, cuando el punto de corte es la osteopenia, las tasas de sensibilidad y de especificidad se invierten siendo del 86.3% y del 39.4% respectivamente (167), por lo tanto hay una gran superposición entre los pacientes que se fracturarán y aquellos que no lo harán, con lo que añadir factores clínicos y otras exploraciones, que se exponen más adelante, puede mejorar la sensibilidad sin perder especificidad (169).

## **5.2.- TBS (trabecular bone score).**

El TBS es una medida que se puede aplicar a cualquier prueba de imagen radiológica, incluida la DXA (157,170). Se trata de un índice de textura que cuantifica las variaciones locales de grises en las imágenes de DXA, dando un índice indirecto de microarquitectura trabecular. El principio que usa se basa en que una microestructura trabecular densa proyectada en un plano genera un elevado número de variaciones de píxeles de pequeña amplitud (171); utilizando variogramas experimentales de esas imágenes en proyección 2D, se puede diferenciar entre las microarquitecturas 3D que presentan misma DMO, pero características trabeculares diferentes (172, 173). En base a un modelo de regresión lineal multivariable, se ha establecido un modelo que permite la

interpretación de la relación entre TBS y los parámetros de microarquitectura ósea 3D. Scores más altos se traducen en una arquitectura ósea más sólida y, por tanto, mayor resistencia a la fractura, mientras que el hueso más susceptible de fracturarse presenta scores más bajos. **Figura 12.** Así, el grupo de trabajo de usuarios de TBS establece como puntos de cortes para mujeres postmenopáusicas (174).

Índice TBS	Valor
>1.350	Normal
1.2-1.350	Alteración parcial de microarquitectura
<1.2	Alteración de la microarquitectura



**Figura 12-** Representación de los principios del TBS y ejemplo de donde el TBS aparece como independiente de la DMO. Los paneles superiores muestran la DMO (BMD) y el TBS de una mujer de 73 años, con un IMC de 24.2 kg/m<sup>2</sup>, DMO columna lumbar de 0.972 g/cm<sup>2</sup>, y TBS de 1.459. Los paneles inferiores muestran la DMO (BMD) y el TBS de una mujer de 74 años, con un IMC 24.3 kg/m<sup>2</sup>, DMO de columna lumbar de 0.969 g/cm<sup>2</sup>, y TBS de 1.243. Aunque las imágenes de la arquitectura ósea y el variograma experimental son ilustraciones y no representan imágenes reales del esqueleto de estos pacientes, se colocaron aquí para demostrar los principios de TBS: las trabéculas más numerosas y conectadas y menos dispersas se traducen en un alto valor de TBS, mientras que un número y conectividad trabecular bajos y una separación trabecular alta se traducen en un TBS bajo. Referencia: Silva BC, Leslie WD, Resch H, Lamy O, Lesnyak O, Binkley N, McCloskey EV, Kanis JA, Bilezikian JP. Trabecular bone score: a noninvasive analytical method based upon the DXA image. Bone Miner Res. 2014 Mar;29(3):518-30). (171)

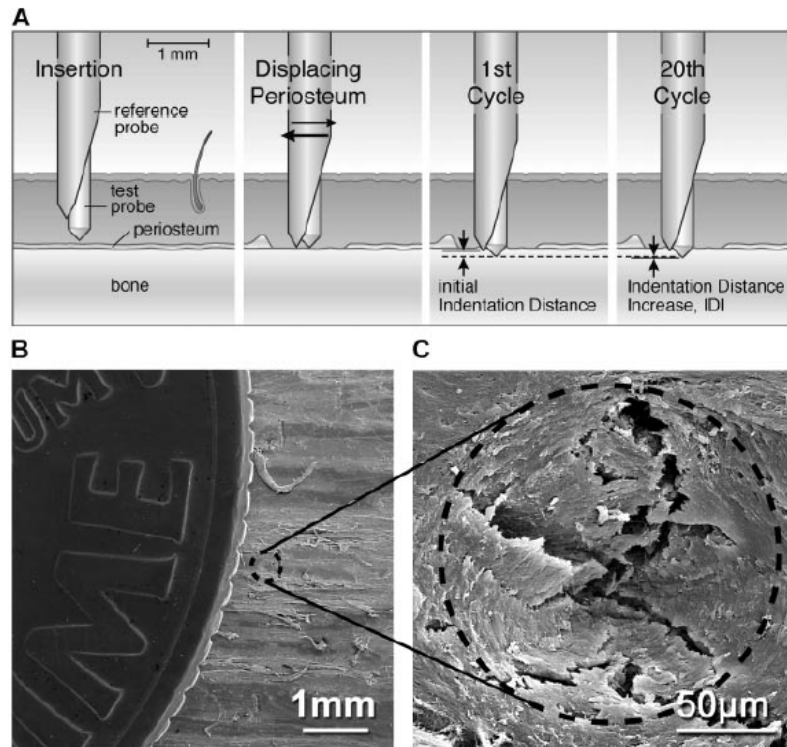
Como ventajas, esta técnica puede utilizarse de forma retrospectiva sobre imágenes de DXA preexistentes y se puede comparar directamente con la DMO



dado que se mide en las mismas localizaciones óseas (174). El TBS además tiene una capacidad comparable a la DXA para la predicción de fracturas en osteoporosis primaria y algo superior para las de causa secundaria (como sucede en la DM o en los usuarios de glucocorticoides) (159, 176), aumentando la capacidad predictiva de fractura con el uso combinado de ambas técnicas. Por lo tanto, el TBS puede resultar de utilidad en aquellos casos en los que la DMO no es suficiente para asesorar el riesgo de fractura en la práctica clínica.

### 5.3-. Microindentación

La resistencia ósea es la habilidad del hueso a soportar un trauma sin ruptura, con lo que dicho concepto integra calidad y cantidad de hueso. La densitometría solo valora la cantidad de hueso y cada vez hay una mayor evidencia que el riesgo de fractura estimado por DXA está infraestimado (tiene una sensibilidad y especificidad modestas), dado que solo una proporción pequeña de la disminución del riesgo de fractura puede explicarse por el aumento de la DMO. Esto sugiere que los determinantes de la resistencia ósea, más que los de masa ósea, son los que contribuyen en mayor medida a la fragilidad ósea en los pacientes (177). El hueso es un complejo geométrico, compuesto por una elaborada matriz de propiedades mecánicas y son muchos los mecanismos que pueden alterar la resistencia mecánica ósea, tales como microgrietas, microdaños, cambios de la mineralización, variación de los cristales minerales, o los cambios de la matriz orgánica con alteración del colágeno y proteínas no colagénicas. El proceso de fractura se inicia con microgrietas secundarias a la separación de las fibras mineralizadas de colágeno; la microindentación se basa en la simulación de este proceso. En 2010 el grupo de Díez es el primero en validar la aplicabilidad de la microindentación en la clínica como técnica para predecir el riesgo de fractura. Midiendo la distancia de indentación, se valora la capacidad ósea para resistir la generación y propagación de grietas, que son la base anatómica de las fracturas, y objetivan que, comparadas con mujeres sanas, las mujeres con fracturas osteoporóticas tienen un aumento significativo de la distancia de indentación o IDI (178). **Figura 13**



**Figura 13-** Procedimiento de indentación para medir las propiedades del material óseo in vivo e imágenes de microindentación en hueso vivo. (A) Ilustración del método para obtener mediciones de indentación, incluida la inserción del conjunto de la sonda de prueba, desplazando el periostio con la sonda de referencia; la indentación de primer ciclo y la del último ciclo, que permite determinar la BMSi (B) Imagen microcopia electrónica (rodeada por línea punteada) que se compara con una moneda de diez centavos (la moneda más pequeña de EE. UU.). (C) Imagen microscopio electrónico ampliado: microgrieta creada durante los ciclos de carga repetitivos a una fuerza constante. Referencia: : Díez-Pérez A, Güerri R, Nogués X, Cáceres E, Peña MJ, Mellibovsky L, Randall C, Bridges D, Weaver JC, Proctor A, Brimer D, Koester KJ, Ritchie RO, Hansma PK. Microindentation for in vivo measurement of bone tissue mechanical properties in humans. *J Bone Miner Res.* 2010 Aug;25(8):1877-85. (178)

Actualmente se utiliza una técnica de microindentación por impacto, OSTEOPROBE<sup>R</sup>: tras anestesia local de la zona pretibial con mepivacaina al 2% se realiza una punción con una inclinación de 90° con una aguja esterilizada (diámetro 375μm, radio de nitidez de la punta <4microm) hasta contactar con la superficie ósea. Sosteniendo el dispositivo perpendicular a la tibia, se desplaza el mismo hasta que después de una fuerza de precarga de 10N, el mecanismo de disparo libera una fuerza de impacto de 30N. Esto hace que la aguja se desplace dentro del hueso y el transductor mida la distancia de indentación. Tras 8 indentaciones repetidas sobre hueso, separadas aproximadamente 2mm, y otras 5 en un estándar de polimetilmetacrilato (phantom), y habiendo descartado aquellas mediciones que están 1.5 veces por encima o por debajo del rango

intercuartil, el software proporciona un resultado que se expresa como BMSi (Bone material strength index) y que es una media armónica de las diferentes indentaciones (hueso y phantom) (179, 180).

Esta técnica se ha testado en diferentes poblaciones en las que existe discrepancia entre densidad mineral ósea y propensión a fracturas, tales como diabetes tipo 2, fractura femoral atípica, fracturas por estrés, tratamiento con glucocorticoides, pacientes con osteopenia, fracturas por fragilidad e individuos infectados con VIH, entre otros (181). Recientemente se ha demostrado que incluso los pacientes osteoporóticos en tratamiento con bifosfonatos con una correcta pauta y una correcta adherencia y que presentan fracturas intratratamiento, tienen peor BMSi que aquellos pacientes sin fracturas intratratamiento, demostrando ser mejor que la DXA en la predicción de fractura en este grupo (182). Por lo tanto, la microindentación complementa, los métodos existentes de análisis óseo, particularmente cuando la densidad mineral ósea no explica suficientemente la propensión a la fractura.

Dado lo novedoso de la técnica, no tenemos una curva de normalidad, pero parece que los valores de BMSi son independientes de edad y de la depleción estrogénica, aunque son diferentes entre sexo masculino y femenino, como se ha propuesto recientemente (183). **Figura 14**

	Mujeres (n=69)	Hombres (n=19)
Edad, años (mediana, rango)	49, 30-81	34, 24-89
IMC Kg/m <sup>2</sup> (media +/- DE)	24.3+/-4.5	24.6+/-3.1
BMSi(media +/- DE)	82+/-7.4	88+/-7.6

**Figura 14- Valores BMSi en función de edad y sexo.** IMC: índice de masa corporal; DE desviación estándar; BMSi: índice de resistencia mineral ósea. Referencia: Taymouri F, Nogués X, Güerri-Fernández R, Mellibovsky L, Díez-Pérez A, García-Giralt N, Ovejero D. La resistencia mecánica tisular ósea es independiente de la edad en individuos sanos. Rev Osteoporos Metab Miner. 2018; 10 (4): 125-30. (183)

## II HIPÓTESIS

La calidad tisular ósea (medida por microindentación) es superior a la medición de la DMO para evaluar el estado óseo tras el inicio del tratamiento antiretroviral y el estado inflamatorio (propio de la infección y previo al inicio de la TAR) influye en dicha calidad tisular.



### III OBJETIVOS

Se plantea como objetivo principal (para lo que se desarrollan dos estudios):

Evaluar, mediante tres técnicas (DXA, TBS, BMSi) los cambios óseos producidos por la inflamación secundaria al VIH y compararlos con los generados con el inicio de un tratamiento antiretroviral basado en TDF en pacientes naïve.

Como objetivos secundarios:

-Demostrar que el TAR, incluso basado en una pauta con TDF, mejora la calidad ósea.

-Demostrar la necesidad de nuevas técnicas para el asesoramiento de la salud ósea en dichos pacientes, considerando las peculiaridades de la enfermedad y de los tratamientos que comporta.

Estos objetivos son los cubiertos por las dos publicaciones generadas por esta tesis:

Estudio 1: ***'Bone density microarchitecture and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate'*** (184). Güerri-Fernández R, Lerma-Chippirraz E, Fernandez Marron A, García-Giralt N, Villar-García J, Soldado-Folgado J, González-Mena A, Trenchs-Rodríguez M, Guelar A, Díez-Pérez A, Brown TT, Knobel H. Bone density, microarchitecture, and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate. AIDS. 2018 Apr 24;32(7):913-920.

Estudio 2: ***'Inflammation status in HIV-positive individuals correlates with changes in bone tissue quality after initiation of antiretroviral therapy'*** (185)  
Lerma-Chippirraz E, Pineda-Moncusí M, González-Mena A, Soldado-Folgado J, Knobel H, Trenchs-Rodríguez M, Díez-Pérez A, Brown TT, García-Giralt N, Güerri-Fernández R. Inflammation status in HIV-positive individuals correlates with changes in bone tissue quality after initiation of ART. J Antimicrob Chemother. 2019 Feb 14.



# IV RESOLUCIÓN PRESENTACIÓN TESIS COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

## RESOLUCIÓ DE LA SOL·LICITUD DE PRESENTACIÓ DE TESI COM A COMPENDI DE PUBLICACIONS

Nom i cognoms del sol·licitant: **ELISABET LERMA CHIPPIRAZ**  
DNI: 36574505C  
Adreça postal: C/ Peronella, 26 A  
Codi postal – Població: 08030 - BARCELONA

Vista la instància presentada per en/na **ELISABET LERMA CHIPPIRAZ** de sol·licitud de presentació de tesi doctoral com a compendi de publicacions,

De conformitat amb el que disposa la Normativa acadèmica de la UAB aplicable als estudis universitaris regulats de conformitat amb amb el Reial Decret 99/2011, de 28 de gener (text refós aprovat per l'Acord de Consell de Govern de 19 de març de 2015),

### RESOLC

Acceptar la presentació de la tesi doctoral de **ELISABET LERMA CHIPPIRAZ** com a compendi de publicacions amb els articles següents:

- Güerri-Fernández R, Lerma-Chippirraz E, Fernandez Marron A, García-Giralt N, Villar-García J, Soldado-Folgado J, González-Mena A, Trenchs-Rodríguez M, Guelar A, Díez-Pérez A, Brown TT, Knobel H. "Bone density, microarchitecture, and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate". A: *AIDS*. (Epub:2018 Apr ;doi: 10.1097/QAD.0000000000001780 ; Q1; F.I.:4,914)
- Lerma-Chippirraz E, Pineda-Moncusó M, González-Mena A, Soldado-Folgado J, Knobel H, Trenchs Rodríguez M, Díez-Pérez A, Brown TT, , García-Giralt N, Güerri-Fernández R. "Inflammation status in HIV-positive individuals correlates with changes in bone tissue quality after initiation of ART". A: *J Antimicrob Chemother*. (Epub: 14/02/2019; Doi: 10.1093/jac/dkz014; Q1; F.I.:5.217).

**Aquesta acceptació tindrà validesa sempre que no passin més de 6 mesos entre la publicació online de l'últim article i la data d'autorització de dipòsit del departament de medicina. (Excepcionalment es permetrà que no passin més de 15 mesos quan la publicació online de l'últim l'article sigui anterior al 20 de febrer de 2019).**

La comissió acadèmica del programa de doctorat en Medicina,

**Jaume Alijotas Reig**  
Coordinador/a del programa de doctorat

**UAB**  
Universitat Autònoma de Barcelona  
Departament de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona - Registro General Fac Medicina
Sortida
005 Núm. 20190000881
01/03/2019 10:51:16

Barcelona, 28 de febrer de 2019

Contra aquesta resolució, que no esgota la via administrativa, les persones interessades poden interposar recurs d'alçada davant del Rector Magnífic de la UAB, en el termini d'un mes, a comptar des del dia següent a la recepció d'aquesta notificació o, si s'escau, des del dia següent de la seva publicació, de conformitat amb el que preveu l'article 115 de la Llei 30/1992, de 26 de novembre, de Règim Jurídic de les Administracions Públiques i del Procediment Administratiu Comú, modificada per la Llei 4/1999, de 13 de gener, i l'article 76 de la Llei 26/2010, de 3 d'agost, de Règim Jurídic i de Procediment de les Administracions Públiques de Catalunya de la Generalitat de Catalunya.

Passeig de la Vall d'Hebron, 119 - 129 - 08035 Barcelona. Spain  
Tel: 34 - 93 428 56 21 - Fax: 34 - 93 428 32 64  
d.medicina@uab.cat  
www.uab.cat





Güerri-Fernández R, Lerma-Chippirraz E, Fernandez Marron A, García-Giralt N, Villar-García J, Soldado-Folgado J, González-Mena A, Trenchs-Rodríguez M, Guelar A, Díez-Pérez A, Brown TT, Knobel H. **Bone density, microarchitecture, and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate.** AIDS. 2018 Apr 24;32(7):913-920.

doi: 10.1097/QAD.0000000000001780.

PMID: 29424785

[Pàginas 65-72](#)

Lerma-Chippirraz E, Pineda-Moncusí M, González-Mena A, Soldado-Folgado J, Knobel H, Trenchs-Rodríguez M, Díez-Pérez A, Brown TT, García-Giralt N, Güerri-Fernández R. **Inflammation status in HIV-positive individuals correlates with changes in bone tissue quality after initiation of ART.** J Antimicrob Chemother. 2019 Feb 14. pii: dkz014.  
doi: 10.1093/jac/dkz014. [Epub ahead of print]  
PMID: 30768163

**Pàginas: 73-80**

## V RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

Considerando que tenofovir disoproxil fumarato es el antiretroviral cuya afectación ósea es la más reconocida, diseñamos un primer estudio para evaluar el papel de dicho fármaco sobre la salud ósea en pacientes VIH naïve (184).

Las características basales de la población se resumen en la **tabla 1**.

**Table 1. Baseline characteristics of study population.**

	Overall
<i>N</i>	40
Age (years)	38 (9) <sup>a</sup>
Male ( <i>n</i> , %)	33 (82.5)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.6 (2.6)
Smoking ( <i>n</i> , %)	19 (47.5)
Alcohol (>10 g/day)	1 (2.5)
Ex-IDU ( <i>n</i> , %)	2 (5)
Recreational drugs ( <i>n</i> , %)	12 (30)
Previous fracture ( <i>n</i> , %)	2 (5)
Family history of fracture ( <i>n</i> , %)	2 (5)
Prevalent spine fractures ( <i>n</i> , %)	0
eGFR less than 60 ml/min	0
eGFR [CKD-EPI (ml/min)]	86 (2.2)
Years since HIV diagnosis	2.5 (4.15)
Nadir CD4 <sup>+</sup> cell count (per ml)	385 (263)
Current CD4 <sup>+</sup> cell count (per ml)	419 (276)
Ever met AIDS criteria ( <i>n</i> , %)	3 (20)
Osteoporosis, <i>n</i> (%)	

**Tabla 1-. Características basales de la población del estudio 1.** \*Los resultados se expresan en valores medios (DE) salvo indicaciones específicas Referencia: Güerri-Fernández R, Lerma-Chippirraz E, Fernández Marron A, García-Giralt N, Villar-García J, Soldado-Folgado J, González-Mena A, Trenchs-Rodríguez M, Guelar A, Díez-Pérez A, Brown TT, Knobel H. Bone density, microarchitecture, and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate. AIDS. 2018 Apr 24;32(7):913-920. (184)

Se incluyeron 40 pacientes, de los que el 82.5% fueron varones, con una edad media de 38 años. Entre los factores de riesgo clásicos para osteoporosis, como en otras poblaciones VIH, la incidencia de tabaquismo fue elevada con un 47.5% así como la de uso de drogas recreacionales (30%), con una tasa baja de enolismo (2.5%) y de antecedentes de consumo de drogas por vía parenteral (5%). En general los pacientes no tenían antecedentes de fractura en familiares de primer grado (5%), ni de fractura previa (5%).

La media de tiempo desde el diagnóstico de VIH fue de 2.5 años, con una media de CD4 en el momento de inicio del TAR de 419 cel/ml. Solo 3 de los 40 (20%) pacientes habían presentado alguna vez una enfermedad definitoria de SIDA.

Antes del inicio de TAR el 45% (n 18) de los pacientes mostraban descenso de DMO presentando 2 de ellos osteoporosis.

Se valoraron los cambios experimentados a nivel de los parámetros óseos desde la visita basal y tras 48 semanas desde el inicio del TAR (**tabla 2**)

	Baseline	24-weeks	Diff.	P value*	48 weeks	Diff.	P value*
<b>Bone mineral density</b>							
Femoral neck BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.837 (0.12) <sup>a</sup>	0.832 (0.124)	-0.005	0.662	0.805 (0.11)	-0.02	0.016
Femoral neck t-score	-0.5 (0.9)	-0.6 (0.8)	-0.016	0.8316	-0.8 (0.8)	-0.3	0.032
Lumbar spine BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.984 (0.11)	0.951 (0.11)	-0.032	<0.001	0.958 (0.11)	-0.032	<0.001
Lumbar spine t-score	-0.8 (1.1)	-1.1 (1.1)	-0.3	0.019	-1.1 (1.1)	-0.3	0.001
Total hip BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.954 (0.11)	0.953 (0.12)	-0.001	0.925	0.943 (0.12)	-0.11	0.547
Total hip t-score	-0.3 (0.7)	-0.4 (0.7)	-0.1	0.325	-0.5 (0.7)	-0.2	0.251
TBS	1.357 (0.09)				1.322 (0.09)	-0.034	0.011
BMSi	86.07 (6.1)	86.32 (4.75)	0.25	0.818	89.07 (4.2)	3	<0.001
<b>Bone turnover</b>							
Amino pro-peptide of type 1 collagen (ng/ml)	50.6 (19.8)	76.9 (30.6)	26.3	<0.001	76.6 (25.8)	26	<0.001
Bone alkaline phosphatase (µg/ml)	16.7 (14.2)	17.7 (6.7)	1	0.714	19.9 (7.98)	3.2	0.087
C-telopeptide (ng/ml)	0.309 (0.114)	0.544 (0.221)	0.24	<0.001	0.436 (0.137)	0.127	<0.001
<b>Calcium metabolism</b>							
Parathormone (pg/ml)	35.3 (22.9)	38.9 (15.3)	3.6	0.266	44.8 (21.6)	9.5	0.002
25[OH]Vitamin D (ng/ml)	20.6 (10.4)	23.7 (10.2)	3.1	0.067	27.2 (16.8)	6.6	0.004
Calcium (mg/dl)	9.4 (0.4)	9.5 (0.4)	0.1	0.228	9.6 (0.3)	0.2	0.046
Phosphorus (mg/dl)	3.04 (0.54)	3.3 (0.52)	0.26	0.021	3.05 (0.7)	0.01	0.917
Creatinine	0.83 (0.17)	0.91 (0.12)	0.08	0.012	0.92 (0.17)	0.09	<0.001

**Tabla 2- Cambios de densidad mineral ósea, marcadores de resorción ósea y metabolismo calcio del estudio 1.** Los valores se expresan con valores medios (DE) salvo indicaciones específicas. p-value: valor de p respecto a la basal. Referencia: Güerri-Fernández R, Lerma-Chippirraz E, Fernandez Marron A, García-Giralt N, Villar-García J, Soldado-Folgado J, González-Mena A, Trenchs-Rodríguez M, Guelar A, Díez-Pérez A, Brown TT, Knobel H. Bone density, microarchitecture, and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate. AIDS. 2018 Apr 24;32(7):913-920. (184)

Tras 48 semanas de TAR todos los parámetros de remodelado, P1NP, fosfatasa alcalina ósea y CTX, presentaron un aumento significativo. En relación a otros parámetros analíticos, como era esperable en pacientes expuestos a TDF, se observó un aumento de PTH y creatinina, desde la visita basal. En cuanto a los marcadores subrogados de salud ósea, tras inicio de TAR, los pacientes experimentaron un descenso de TBS y de DMO, siendo este último más marcado e incipiente en columna lumbar (p<0.001) que en cuello femoral (p=0.016), sin que se identificaran cambios significativos en cadera total (p=0.547).

A diferencia de lo ocurrido con la DMO y el TBS, la calidad tisular ósea aumentó significativamente a las 48 semanas de TAR pasando de 86.07 (6.1) a 89.07 (4.2) (3.49%, p<0.001). **Fig. 15**

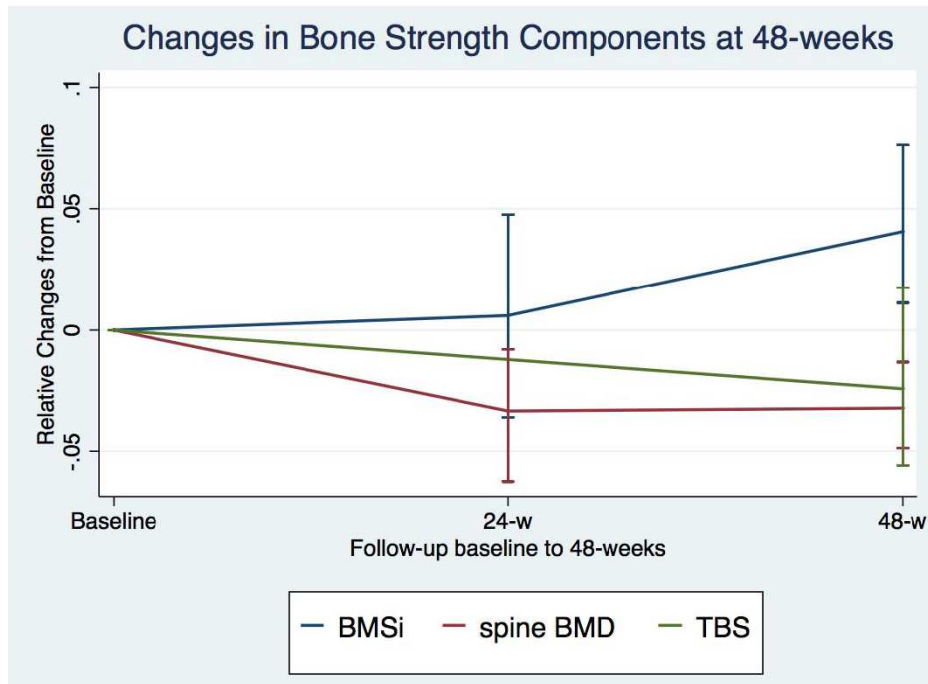


Figura 15-. Cambios DXA, TBS y BMSi a las 48 semanas de TAR estudio 1. Referencia: Güerri-Fernández R, Lerma-Chippirraz E, Fernandez Marron A, García-Giralt N, Villar-García J, Soldado-Folgado J, González-Mena A, Trenchs-Rodríguez M, Guelar A, Díez-Pérez A, Brown TT, Knobel H. Bone density, microarchitecture, and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate. AIDS. 2018 Apr 24;32(7):913-920. (184)

Basalmente la calidad tisular ósea se correlacionó negativamente con la edad (figura 16) y positivamente con CD4 nadir (figura 17a), TBS basal, DMO en cadera (figura 17b).

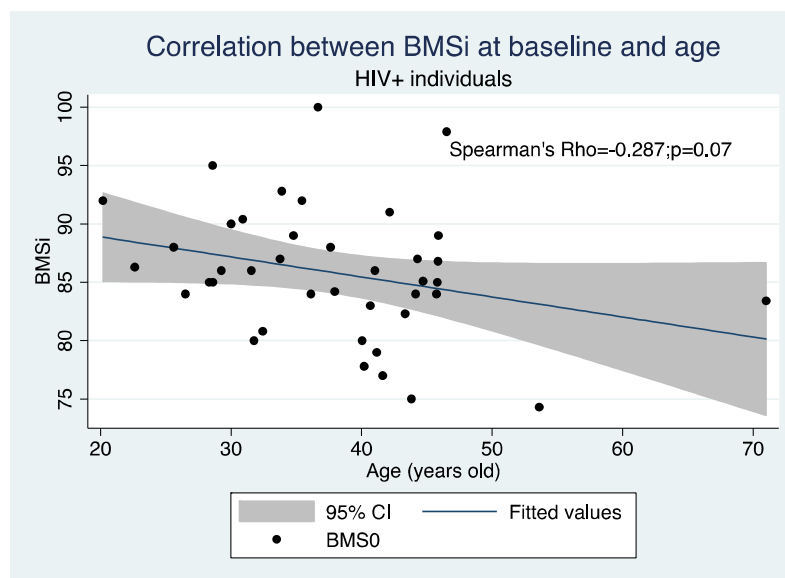


Figura 16-. Análisis bivariado: correlación BMSi y edad basales en pacientes VIH estudio 1. Referencia: Güerri-Fernández R, Lerma-Chippirraz E, Fernandez Marron A, García-Giralt N, Villar-García J, Soldado-Folgado J, González-Mena A, Trenchs-Rodríguez M, Guelar A, Díez-Pérez A, Brown TT, Knobel H. Bone density, microarchitecture, and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate. AIDS. 2018 Apr 24;32(7):913-920. (184)

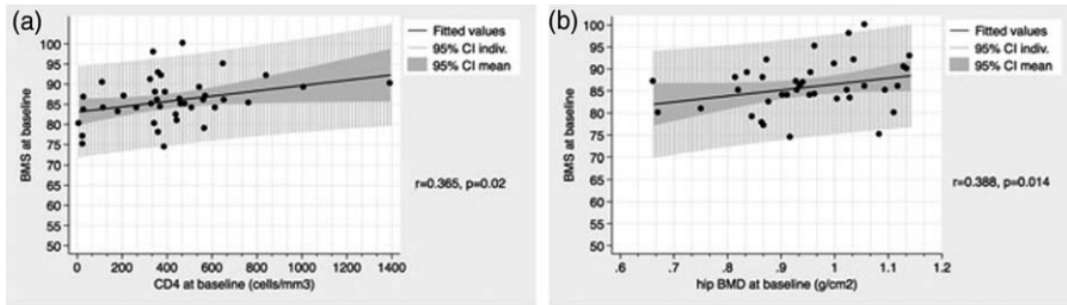


Figura 17 a y b-. Análisis bivariado estudio 1: a) BMSi y CD4 basales; b) BMSi y DMO en cadera. Referencia: Güerri-Fernández R, Lerma-Chippirraz E, Fernandez Marron A, García-Giralt N, Villar-García J, Soldado-Folgado J, González-Mena A, Trenchs-Rodríguez M, Guelar A, Díez-Pérez A, Brown TT, Knobel H. Bone density, microarchitecture, and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate. AIDS. 2018 Apr 24;32(7):913-920. (184)

Al comparar las diferencias entre el grupo que aumentó los parámetros de BMSi (n=32) tras 48 semanas de TAR con los que presentaron un descenso del mismo (n=8), (tabla 3), no se encontraron diferencias significativas en la media de edad, sexo o recuento de CD4 nadir, salvo que los pacientes que experimentaron descenso de BMSi presentaron valores basales más elevados de BMSi (89 (7.4) vs 85 (4.6), p=0.02) y de TBS (1.447 (0.08) vs 1.337 (0.08); p=0.008), en comparación a los que lo elevaron. En contrapartida, los valores en día 0 más bajos de TBS ( $\beta$ coeff -20.6; p=0.01) y de BMSi ( $\beta$ coeff -0.59; p<0.001) se relacionaron con mayores incrementos de BMSi a las 48 semanas tras ajustar por edad, sexo e IMC, sin encontrarse influencia significativa de recuento nadir de CD4, filtrado glomerular basal ni niveles basales de vitamina D.

	BMSi stable	BMSi declined	P value
N	32	8	
Age (years)	38 (9) <sup>a</sup>	38 (7)	0.979
Male (n, %)	27 (84)	6 (75)	0.533
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.5 (2.5)	24.2 (3.1)	0.478
Smoking (n, %)	16 (50)	3 (37.5)	0.741
Alcohol (>10 g/day)	2 (6.5)	0 (0)	0.468
Ex-IDU (n, %)	3 (9.3)	0 (0)	0.233
Recreational drugs (n, %)	11 (34)	1 (12.5)	0.198
Previous fracture (n, %)	1 (3.12)	1 (12.5)	0.329
Family history of fracture (n, %)	1 (3.12)	1 (12.5)	0.329
Prevalent spinal fracture (n, %)	0	0	
eGFR <60 ml/min at 48 weeks	0	0	
eGFR CKD-EPI (ml/min) at 48 weeks	83 (2.2)	81 (2.3)	0.522
Years since HIV diagnosis	2.3 (4.2)	3.3 (3.6)	0.525
Nadir CD4 <sup>+</sup> cell count (per ml)	390 (284)	367 (165)	0.829
Ever met AIDS criteria (n, %)	3 (21)	0 (0)	0.496
Spine BMD at baseline	0.973 (0.113)	1.05 (0.105)	<b>0.089</b>
TBS at baseline	1.337 (0.08)	1.447 (0.08)	<b>0.008</b>
BMSi at baseline	85 (4.6)	89 (7.4)	<b>0.02</b>

Tabla 3-. Comparación entre los pacientes cuyo BMSi permaneció estable y aquellos en los que empeoró tras 48 semanas de TAR con TDF (estudio 1). BMD: bone mineral density; BMSi: bone material strength index; CKD-EPI: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; eGFR: estimated glomerular filtration rate; TBS: trabecular bone score. En negrita los valores de p <0.05. a Resultados expresados como valor medio (DE) salvo indicación. Referencia: Güerri-Fernández R, Lerma-Chippirraz E, Fernandez Marron A, García-Giralt N, Villar-García J, Soldado-Folgado J, González-Mena A, Trenchs-Rodríguez M, Guelar A, Díez-Pérez A, Brown TT, Knobel H. Bone density, microarchitecture, and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate. AIDS. 2018 Apr 24;32(7):913-920. (184)

En conclusión, en esta primera fase de nuestro trabajo demostramos que como era sabido, los tratamientos antiretrovirales basados en TDF causan descenso de DMO pero en cambio la calidad tisular ósea, aumenta a pesar de la pauta elegida, lo que dio pie a la segunda fase del trabajo, es decir, la valoración del impacto que la actividad inflamatoria mediada por el virus tiene sobre la salud ósea.

Para ello se diseñó (185) un estudio de dos ramas en el que se incluyeron 40 pacientes en total, 20 pacientes por rama considerando una rama de pacientes no VIH sanos y una rama de pacientes VIH naïve emparejados por edad y sexo. Las características basales de la población se resumen en la **tabla 4**; no hubo diferencias en las características sociodemográficas ni el consumo de tóxicos basales de ambos grupos: La muestra fue constituida mayoritariamente por varones, 15 (75%) en los controles vs 16 (80%) en la rama VIH ( $p=0.336$ ), con una edad media de 38-37 años (38 años (35-42) vs 37 (31-43);  $p=0.423$ ), con una discreta tendencia a mayor uso de drogas recreacionales en la rama VIH (15% (3); vs 35% (7);  $p= 0.097$ ), pero sin diferencias en consumo de tabaco (8 (40%) vs 8 (40%)), enol (0 vs 1 (5%);  $p=0.314$ ) o drogas por vía parenteral ( 0 vs 1 (5%);  $p=0.314$ ). Ninguno de los pacientes incluidos tenía antecedentes de fractura y tampoco hubo diferencias significativas en relación a la existencia de fracturas en familiares de primer grado (2 (10%) vs 1 (5%);  $p=0.605$ ).

	Controls	HIV-positive individuals	P
N	20	20	
Age (years), median (IQR)	38 (35–42)	37 (31–43)	0.423
Male, n (%)	15 (75)	16 (80)	0.336
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), median (IQR)	23 (20–24)	24 (22–26)	0.281
Smoking, n (%)	8 (40)	8 (40)	
Alcohol >10 g/day, n (%)	0 (0)	1 (5)	0.314
Ex-IVDU, n (%)	0 (0)	1 (5)	0.314
Recreational drugs, n (%)	3 (15)	7 (35)	0.097
Previous fracture, n (%)	0 (0)	0 (0)	
Family history of fracture, n (%)	2 (10)	1 (5)	0.605
Prevalent spine fractures, n (%)	0 (0)	0 (0)	
eGFR <60 mL/min, n (%)	0 (0)	0 (0)	
eGFR (CKD-EPI) (mL/min), median (IQR)	92 (75–97)	88 (72–91)	0.345
Years since HIV diagnosis, median (IQR)		1 (0–2)	
Nadir CD4+ count (per mL), median (IQR)		364 (327–443)	
Current CD4+ count (per mL), median (IQR)	748 (678–1437)	374 (341–460)	0.093
Ever met AIDS criteria, n (%)		1 (5)	

eGFR, estimated glomerular filtration rate; CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration.

**Tabla 4.- Características basales de la población de estudio 2.** Referencia: Lerma-Chippirraz E, Pineda-Moncusí M, González-Mena A, Soldado-Folgado J, Knobel H, Trenchs-Rodríguez M, Díez-Pérez A, Brown TT, García-Giralt N, Güerri-Fernández R. Inflammation status in HIV-positive individuals correlates with changes in bone tissue quality after initiation of ART. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Feb 14. (185)



La media de tiempo desde el diagnóstico de VIH fue de 1 año (0-2), con una media de CD4 en el momento de inicio del TAR de 374 cel/ml (341-460, frente a un recuento de CD4 en población control de 748 (678-1437). Solo 1 paciente VIH había presentado alguna vez una enfermedad definitoria de SIDA.

Al comparar lo sucedido entre los controles sanos y los pacientes VIH naïve (**tabla 5**), se objetivó, como se había previsto, que en términos de inflamación, valorado mediante PCR, VSG y receptor soluble 2 de TNF- $\alpha$ , los paciente VIH naïve presentaban mayor actividad inflamatoria.

	Controls	HIV group at baseline	<i>p</i> <sup>a</sup>	HIV group at 48 weeks	<i>p</i> <sup>b</sup>	<i>p</i> <sup>c</sup>
<b>Bone parameters</b>						
BMSi	89 (88-93)	86 (83-90)	<b>0.034</b>	90 (88-93)	<b>0.02</b>	0.765
TBS	1.374 (1.29-1.39)	1.339 (1.28-1.38)	0.336	1.291 (1.225-1.397)	<b>0.007</b>	<b>0.002</b>
lumbar spine BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.988 (0.92-1.06)	1.019 (0.91-1.11)	0.929	0.97 (0.88-1.091)	<b>0.001</b>	0.951
femoral neck BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.831 (0.75-0.98)	0.841 (0.79-1.02)	0.734	0.818 (0.733-0.957)	<b>0.001</b>	0.092
<b>Inflammation markers</b>						
hs-CRP (mg/dL)	0.04 (0.002-0.19)	0.31 (0.1-0.6)	<b>0.003</b>	0.08 (0.06-0.24)	<b>0.026</b>	0.142
ESR (mm/h)	3 (2-9)	16 (10-22)	<b>0.003</b>	6 (3-14)	<b>0.003</b>	0.255
fibrinogen (mg/dL)	350 (289-395)	320 (290-410)	0.734	366 (306-391)	0.753	0.688
D-dimer (IU/mL)	97 (63-144)	131 (87-257)	0.242	100 (76-180)	0.601	0.982
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	16.9 (10.4-38.4)	11.5 (7.4-20.5)	0.183	7.58 (4.5-15.9)	0.394	<b>0.023</b>
IL-10 (pg/mL)	3.24 (3.24-3.57)	3.57 (3.24-4.15)	0.163	3.24 (3.24-3.57)	0.182	0.881
IL-17A (pg/mL)	13.6 (4.9-23.8)	3.21 (1.46-5.28)	<b>0.002</b>	5.1 (3.2-13.8)	0.169	<b>0.003</b>
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	1.87 (1.28-2.79)	1.87 (1.28-2.79)	0.707	2.03 (1.65-2.41)	0.332	0.705
IL-2 (pg/mL)	2.41 (0.58-2.91)	2.41 (0.58-2.91)	0.535	2.41 (0.58-2.89)	0.317	0.683
IL-4 (pg/mL)	5.78 (2.52-10.72)	2.52 (1.27-5.78)	<b>0.023</b>	4.01 (2.66-5.37)	0.186	<b>0.024</b>
IL-6 (pg/mL)	2.86 (2.86-2.99)	2.92 (2.86-2.99)	0.895	2.86 (1.24-2.99)	0.516	0.438
IL-8 (pg/mL)	21.1 (6.7-37.3)	9.31 (4.51-15.46)	0.144	5.14 (2.99-9.85)	<b>0.033</b>	<b>0.005</b>
soluble CD40 (ng/mL)	6.47 (4.4-7.5)	5.35 (2.6-8.3)	0.342	5.5 (4-8.1)	0.609	0.446
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	12.6 (9.8-19.3)	18.9 (16.7-26.6)	<b>0.026</b>	13.9 (12-17.3)	<b>0.003</b>	0.668
IL-6 soluble receptor (ng/mL)	34.7 (32.1-41.1)	41.3 (31.5-49.7)	0.343	34.1 (26-47.4)	<b>0.05</b>	0.766
TNF- $\alpha$ soluble receptor 1 (ng/mL)	1.9 (1.6-2.3)	1.9 (1.7-2.3)	0.825	1.4 (1.1-1.8)	<b>0.03</b>	<b>0.015</b>
TNF- $\alpha$ soluble receptor 2 (ng/mL)	7.5 (6.7-9.1)	13.7 (11.4-15.6)	<b>0.001</b>	9.2 (8.5-10.4)	<b>0.003</b>	<b>0.006</b>
<b>Bone metabolism markers</b>						
DKK1 (ng/mL)	3.8 (2.7-4.6)	3.1 (2.6-4.1)	0.179	2.7 (2.4-3.4)	0.177	<b>0.022</b>
osteoprotegerin (ng/mL)	0.5 (0.4-0.6)	0.4 (0.3-0.5)	0.428	0.4 (0.3-0.5)	0.461	0.272
sclerostin (ng/mL)	1.5 (0.9-1.8)	1.5 (1-2)	0.819	1.2 (0.8-1.6)	<b>0.05</b>	0.545
P1NP (ng/mL)	45.6 (37.1-71.3)	50.9 (34-59.5)	0.571	71.3 (54.7-95.3)	<b>0.003</b>	<b>0.035</b>
CTX (ng/mL)	0.31 (0.14-0.46)	0.26 (0.21-0.41)	0.968	0.38 (0.31-0.46)	<b>0.007</b>	0.105
bone alkaline phosphatase ( $\mu$ g/mL)	11.7 (6.6-16.3)	13.4 (10.1-16.8)	0.319	16.1 (12.5-23.1)	<b>0.005</b>	<b>0.021</b>
25-OH vitamin D (ng/mL)	28.3 (14.1-43)	21.4 (10.3-28.6)	0.145	23.4 (14.2-31.6)	0.356	0.704
PTH (pg/mL)	23 (14-31)	27 (22-32)	0.317	42 (32-67)	0.434	<b>0.009</b>

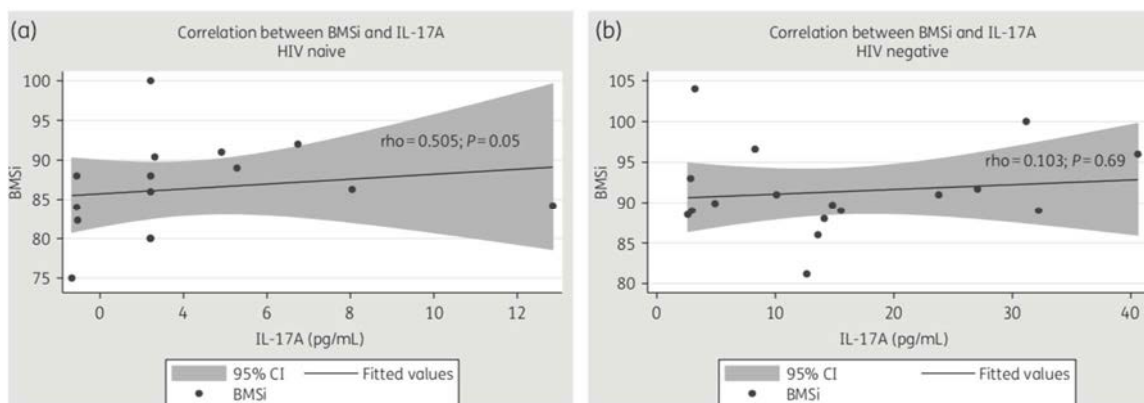
**Tabla 5-. Parámetros de calidad tisular ósea, marcadores de inflamación y de recambio óseo para los diferentes grupos (estudio 2).** Los resultados se expresan como medias (IQR). En negrita las diferencias significativas entre grupos. <sup>a</sup>Corresponde al valor de p al comparar los controles sanos con los pacientes VIH naïve. <sup>b</sup>Corresponde al valor de p al comparar al grupo de VIH naïve vs al grupo VIH tras 48 semanas de TAR. <sup>c</sup>Corresponde al valor de p al comparar los controles sanos vs los pacientes VIH tras 48 semanas de TAR. **Referencia: Lerma-Chippirraz E, Pineda-Moncusí M, González-Mena A, Soldado-Folgado J, Knobel H, Trenchs-Rodríguez M, Díez-Pérez A, Brown TT, García-Giralt N, Güerri-Fernández R. Inflammation status in HIV-positive individuals correlates with changes in bone tissue quality after initiation of ART. J Antimicrob Chemother. 2019 Feb 14 (185).**

En contraposición, los controles sanos presentaron valores significativamente más elevados de IL-17A. Tras 48 semanas de TAR, los parámetros inflamatorios cayeron en los pacientes VIH, alcanzando valores comparables a los de los controles, a excepción de IL-8, IFN- $\gamma$  y el receptor soluble 1 de TNF- $\alpha$ , que incluso descendieron a valores inferiores a los de la población control. A pesar

del aumento de IL-17A, a las 48 semanas de TAR su valor en el grupo VIH persistió significativamente inferior al de los controles ( $p=0.003$ ).

En relación a los parámetros de remodelado óseo, no hubo diferencias a nivel basal entre ambos grupos, pero, tras 48 semanas de TAR, sí que hubo un aumento significativo en comparación a la situación basal. En cambio, el inicio de TAR provocó un descenso de ambos antagonistas de la vía Wnt, tanto de esclerostina como de Dkk1.

En cuanto a las herramientas para medir la calidad ósea, no se encontraron diferencias basales de DMO ni de TBS entre ambos grupos, pero sí en los valores de BMSi, mostrando los pacientes VIH naïve resultados significativamente inferiores, en comparación a los controles sanos (89 (88-93) vs 86 (83-90),  $p=0.034$ ). Tras inicio de TAR, tanto de la DMO en columna lumbar ( $p=0.001$ ) y en cuello femoral ( $p=0.001$ ), como el TBS ( $p=0.007$ ) descendieron en los pacientes VIH. En cambio, el BMSi aumentó tras 48 semanas de tratamiento, llegando a alcanzar valores similares a los de la población control ( $p=0.765$ ). Se observó una relación positiva entre IL-17A y BMSi a nivel basal en los pacientes VIH ( $\rho=0.505$ ;  $p=0.05$ ) que desapareció en la semana 48 y que no se vio en los pacientes control (**figura 18**).



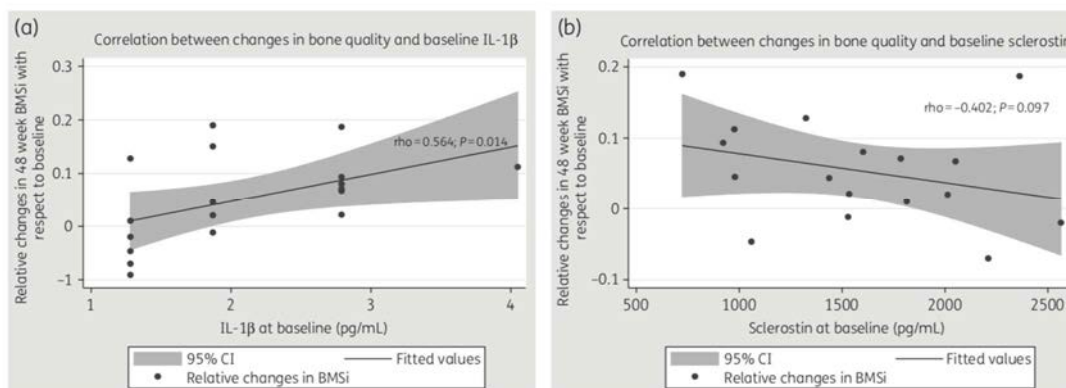
**Figura 18-** Correlación entre calidad tisular ósea (BMSi) e IL-17A basal en pacientes VIH (a) y en controles sanos (b) (estudio 2). Referencia: Lerma-Chippirraz E, Pineda-Moncusí M, González-Mena A, Soldado-Folgado J, Knobel H, Trenchs-Rodríguez M, Díez-Pérez A, Brown TT, García-Giralt N, Güerri-Fernández R. Inflammation status in HIV-positive individuals correlates with changes in bone tissue quality after initiation of ART. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Feb 14 (185).

Al evaluar los factores asociados a los cambios en la calidad ósea relacionados con el TAR (**tabla 6**), se objetivó que los pacientes con mayores niveles de IL-1  $\beta$  basales, presentaron mayores aumentos de BMSi a las 48 semanas de TAR,

persistiendo esta asociación después de ajustar por recuento de CD4 y de CV. En cambio, se observó una correlación negativa con los niveles basales de esclerostina ( $\rho = -0.402$ ;  $p = 0.097$ ) **figura 19** y con el tiempo desde el diagnóstico de VIH ( $\rho = -0.466$ ;  $p = 0.04$ ; coef  $\beta -0.01$ , regresión lineal), persistiendo este último tras ajuste por edad, sexo y recuento de CD4.

	Percentage change in BMSi	Percentage change in thBMD	Percentage change in lsBMD	Percentage change in TBS
IFN- $\gamma$	-0.134	0.254	0.176	0.374
IL-10	0.127	0.253	-0.054	0.258
IL-17A	-0.147	0.295	<b>0.537<sup>a</sup></b>	0.419
IL-1 $\beta$	<b>0.564<sup>a</sup></b>	-0.095	0.141	0.392
IL-2	<b>0.578<sup>a</sup></b>	-0.157	0.104	0.356
IL-4	-0.406	-0.154	0.325	0.149
IL-6	0.173	-0.001	<b>-0.704<sup>b</sup></b>	-0.224
IL-8	0.019	-0.282	-0.193	-0.107
Soluble CD40	<b>-0.471<sup>a</sup></b>	0.046	-0.216	0.091
TNF- $\alpha$	-0.218	-0.017	0.194	0.161
IL-1 soluble receptor	-0.004	-0.165	<b>0.489<sup>a</sup></b>	0.386
IL-6 soluble receptor	-0.249	-0.214	0.332	0.101
TNF- $\alpha$ soluble receptor 1	-0.191	-0.117	-0.014	-0.168
TNF- $\alpha$ soluble receptor 2	-0.143	0.183	0.181	0.237
Sclerostin	<b>-0.402<sup>c</sup></b>	-0.397	0.105	-0.155
DKK1	0.248	-0.358	0.101	0.067
Osteoprotegerin	0.068	-0.332	0.052	-0.853

**Tabla 6.- La correlación de Spearman entre la inflamación basal y los marcadores óseos y el cambio porcentual en los parámetros óseos (estudio 2).** thBMD: total hip BMD; ls-BMD: lumbar spine BMD. En negrita correlaciones significativas. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$ , <sup>c</sup> $p = 0.09$ . Referencia: Lerma-Chippirraz E, Pineda-Moncusí M, González-Mena A, Soldado-Folgado J, Knobel H, Trenchs-Rodríguez M, Díez-Pérez A, Brown TT, García-Giralt N, Güerri-Fernández R. Inflammation status in HIV-positive individuals correlates with changes in bone tissue quality after initiation of ART. J Antimicrob Chemother. 2019 Feb 14 (185).



**Figura 19.- Correlación entre cambios relativos a la semana 48 respecto a basal en la calidad del tejido óseo (BMSi) e (a) IL-1 $\beta$  y (b) esclerostina (estudio 2).** Referencia: Lerma-Chippirraz E, Pineda-Moncusí M, González-Mena A, Soldado-Folgado J, Knobel H, Trenchs-Rodríguez M, Díez-Pérez A, Brown TT, García-Giralt N, Güerri-Fernández R. Inflammation status in HIV-positive individuals correlates with changes in bone tissue quality after initiation of ART. J Antimicrob Chemother. 2019 Feb 14 (185).

En cuanto al TBS no se encontró ningún tipo de correlación con cualquiera de los marcadores analizados, mientras que los cambios de DMO nivel de columna lumbar se correlacionaron negativamente con los valores basales de IL-6 ( $\rho = -0.704$ ;  $p = 0.001$ ) y positivamente con los de IL-17A ( $\rho = 0.537$ ;  $p = 0.04$ ).

Es decir, la combinación de ambos estudios deja patente que el inicio del TAR, incluso basado en una pauta que contenga TDF, mejora la calidad ósea por el descenso que produce sobre la actividad inflamatoria inducida por el virus.



## VI RESUMEN GLOBAL DISCUSIÓN

Básandonos en el impacto óseo de TDF sobre la DMO, quisimos comprobar en una primera fase las consecuencias del mismo sobre el BMSi (184); viendo que éste mejoraba tras introducción de TAR, se planteó la posibilidad de que la inflamación inducida por el VIH fuera la mayor responsable del daño óseo, por lo que se diseñó un segundo estudio (185) en el que se demuestra que el descenso del componente inflamatorio asociado al VIH, secundario al TAR, produce una mejoría en la calidad ósea.

Es conocida la repercusión de TDF sobre la pérdida de densidad mineral ósea en los pacientes VIH naïve (4,123,186), oscilando en un aumento del 1 al 3% de pérdida en comparación a pacientes expuestos a otros NRTIs (187). Esta influencia negativa ha podido ser objetivada incluso en pacientes no infectados por VIH que realizan TDF en un régimen de PreP (127,188), demostrando la acción ósea de TDF más allá del efecto del propio virus. El primer paso de nuestro trabajo, demuestra la repercusión no homogénea de TDF sobre los diferentes parámetros que influyen en el riesgo de fractura, es decir, mientras que la exposición a TDF repercute negativamente sobre DMO (con un descenso en nuestro caso del 3%, similar a lo que se objetiva en otros estudios (4, 189)) y TBS, el BMSi se mantiene o incluso mejora tras 48 semanas de exposición a un régimen basado en TDF. Estos resultados son acordes con datos publicados recientemente, en los que la supresión viral y el tiempo de exposición al TAR, incluso en terapias basadas en TDF, se han asociado a disminución del riesgo de fractura osteoporótica en el paciente VIH (190).

La pérdida de DMO en los pacientes expuestos a TDF a pesar de no estar del todo elucidada, parece responder a dos mecanismos: en primer lugar, los estudios de Grigsby (129,191) han demostrado, en modelos murinos in vitro, que la exposición tanto de osteoblastos como de osteoclastos a concentraciones fisiológicas de TDF produce una alteración en los perfiles de expresión genética de ambos (Gnas, Got2 y Snord23 para osteoclastos y 6 vías de señalización diferente para osteoblastos, con especial repercusión sobre la vía Wnt), lo que se traduce en células funcionalmente defectuosas que repercuten, finalmente,

en la formación y la resorción ósea. El segundo mecanismo que se le imputa a TDF para producir pérdida ósea es la pérdida de fósforo urinario inducida por disfunción tubular proximal (128). Tras la administración de TDF, que es una prodroga, es metabolizado a TFV en plasma, desde donde, mediante un transportador de aniones orgánico pasa a las células del túbulo proximal renal, para ser excretado posteriormente, a la orina en el espacio tubular (134,192). La eliminación renal está retrasada en comparación a la captación por parte de las células del túbulo proximal, lo que conlleva un acúmulo de fármaco a dicho nivel, que puede causar disfunción y con ello, una alteración del metabolismo del P, el cual, a su vez produce un descenso de la DMO similar a lo sucedido, por ejemplo, en la osteomalacia hipofosfatémica o en el síndrome de Fanconi (193). Estas alteraciones óseas se han observado incluso en situaciones de hiperfosfatemia con fosfatemia normal. A pesar de que en nuestro estudio no se hizo valoración de P urinario, sí que se midió el P sérico, sin que se evidenciaran cambios significativos del mismo, aunque, como era esperable, sí que se objetivó un aumento no patológico, pero significativo, de los niveles séricos de creatinina, traduciendo la acción de TDF sobre el túbulo. Además, también se apreció un aumento significativo en los valores de PTH tras 48 semanas de tratamiento, a pesar del aumento concomitante y también significativo, de los valores de vitamina D; esta observación ha sido registrada en otros estudios, en los que la corrección del déficit de vitamina D solo corrige parcialmente el aumento de PTH, demostrando que el uso de TDF es factor de riesgo para el mantenimiento del hiperparatiroidismo secundario (194). Recientes estudios sugieren que este incremento de PTH se debe a que TDF actúa como un componente calcilítico sobre el receptor CaSR (calcium sensing receptor) (195). Este receptor, sensa los niveles séricos de Ca, en función de cuyas concentraciones activa o inhibe la producción de PTH. Los elementos calcilíticos se unen a CaSR disminuyendo la señal intracelular, favoreciendo de esta manera, la producción de PTH por parte de las células paratiroides (196). La relevancia de este aumento sostenido de PTH se debe a que produce pérdida de DMO por exceso de estimulación de la resorción ósea (197), dado que, sobre los osteocitos, tiene influencia en el remodelado óseo a través de la regulación de la transcripción de mediadores paracrinos: así estimula la producción de RANKL, lo que conlleva un aumento

de osteoclastogénesis, pero por contra, inhibe la expresión de esclerostina a nivel óseo (198).

A pesar de que los pacientes VIH tienen más osteoporosis, y especialmente aquellos expuestos a TDF e IPs, la incidencia de fractura (199) en estos pacientes solo se correlaciona parcialmente con el descenso de la DMO (200), lo que sugiere que probablemente existen otros factores, tales como la alteración de la microarquitectura y la calidad tisular ósea, que influyen sobre dicho riesgo de fractura (201). Así, por ejemplo, en la cohorte EUROSIDA (202), el análisis multivariado reveló que el riesgo de fractura se asociaba a mayor edad, menor IMC, raza caucásica y el uso de drogas por vía parenteral. Asimismo, la exposición a TDF cuando se expresaba como una variable dicotómica (uso vs no uso), se asoció a riesgo de fractura, pero esta asociación se perdió tras ajuste multivariado, lo que da lugar a la idea de una susceptibilidad individual al riesgo de fractura inducida por TDF. Este concepto, remarca la importancia de la necesidad de nuevas técnicas para la medición de la salud ósea, que, por el momento, ha sido valorada en términos de osteopenia u osteoporosis, mediante DXA.

En la actualidad otras herramientas como el TBS, nos permiten medir otros aspectos de la calidad ósea. En este estudio, el inicio de TAR provocó un descenso del TBS con una media pre-TAR de 1.357 (0.09 DE) que a las 48 semanas disminuyó a 1.322 (0.09 DE), lo que implica, según el grupo de usuarios del TBS (174), una alteración parcial de la microarquitectura ósea tras 48 semanas de exposición a TDF, sugiriendo que dicha exposición no solo altera la cantidad de hueso sino también la organización del mismo. En estudios previos, se ha demostrado que el TBS permite mejorar la predicción del riesgo de fractura en osteoporosis secundaria (159), así Ciullini demuestra que, en el paciente VIH, el riesgo de fractura vertebral tiene una correlación más cercana al TBS que no a la DMO (157).

Finalmente, se determinó la calidad del tejido óseo mediante microindentación in vivo, observando que a comparación de lo sucedido con la DXA y el TBS, el BMSi aumenta tras 48 semanas de TAR, indicando una mejoría del strength o calidad tisular ósea. Hay que tener en cuenta que la fractura, tanto en hueso



cortical como trabecular, se inicia con la separación de las fibras mineralizadas de colágeno y la formación de microgrietas, que es el mismo principio de la microindentación, es decir, la formación de microgrietas similares a las que suceden en las fracturas óseas experimentales (203). Para entender esta diferencia entre los 3 métodos hay que considerar en primer lugar que la microindentación, precisamente por el principio por el que se rige, es más sensible para detectar los cambios óseos precoces que la DXA (13, 204), es decir, posiblemente la mejoría de las condiciones inflamatorias e inmunológicas tras inicio de TAR inducen cambios en el hueso identificables por microindentación, pero no por DEXA. En resumen, a pesar de que TDF induce, por los diferentes mecanismos comentados, pérdida de DMO, produce a la par, un control inmunológico e inflamatorio que conllevan cambios microambientales óseos y con ello, una mejoría de la calidad tisular ósea (6).

Tras haber visto que el inicio de TAR mejora la calidad tisular ósea, se planteó un segundo estudio para valorar el papel de la inflamación mediada por VIH sobre el hueso. Para ello se compararon controles sanos vs VIH naïve que iniciaron TAR. Los resultados demuestran que los cambios en vías inmunológicas e inflamatorias inducidas por el TAR pueden repercutir sobre una mejoría de la calidad del tejido óseo medida por BMSi (205) que no se ve en la DXA ni en el TBS, lo que hace surgir la hipótesis de que los cambios en la DMO y en la microestructura ósea pueden estar regulados por vías diferentes:

En primer lugar, los cambios en la calidad ósea son más dinámicos y precoces que los observados en la DMO. Así en estudios llevados a cabo en pacientes expuestos a GC, el BMSi detecta alteraciones en el hueso en las primeras semanas de tratamiento, antes de que la DXA experimente algún cambio, probablemente porque detecta microfracturas generadas por el GC, que puedan ser finalmente las causantes de la fractura precoz, más que la pérdida de DMO (13).

En segundo lugar, creemos que en esta discrepancia entre DMO y BMSi, tiene vital importancia el compartimento molecular. Debemos recordar que el hueso es un tejido complejo formado por una matriz de colágeno organizada en estructuras jerárquicas de heterodímeros de colágeno I, flanqueados en ambos

extremos de la fibra por telopéptidos lineares y que se interconectan mediante enlaces enzimáticos y no enzimáticos (206). Se ha demostrado que el colágeno I, que compone >90% de la matriz orgánica y especialmente el tipo de enlaces del mismo, influye en la calidad tisular ósea y es importante para preservar sus propiedades (207-211); así la reducción de dichos enlaces produce un aumento de la fragilidad ósea (212) como se demuestra en hueso joven con latirismo parcial (213) (intoxicación secundaria a la ingesta de almortas, legumbre rica en aminoácidos), donde el descenso del 10% de los enlaces de colágeno produce un descenso del 15% del strength mecánico. En un estudio conducido por Basen (214), en hueso esponjoso de cuerpos vertebrales en muestras de autopsias, se demuestra que el tipo de enlaces de las fibras de colágeno, contribuyen de forma significativa a la predicción de las propiedades mecánicas óseas, apoyando así, como en otros estudios (215, 216) que el 20-30% de la variación en la rigidez y la calidad del hueso no se debe a la densidad del mismo. En modelos de sepsis en roedores, se ha observado que la inflamación conduce a la reducción de la calidad ósea en las primeras 24h (pero sin cambios en la DMO) y que esto muy probablemente se debe no al aumento del remodelado, sino a la pérdida de los enlaces de colágeno (217). Daumer et al. también sugieren que el stress oxidativo inducido por condiciones inflamatorias tiene una influencia directa sobre dichos enlaces (218). Además, otros trabajos han sugerido que la conformación de dicha matriz de colágeno puede tener un efecto regulador sobre las diferentes células de la estirpe ósea (219, 220).

Nuestra propuesta es que la pérdida de los enlaces de colágeno inducida por el estatus inflamatorio, explicaría la disminución de la calidad ósea pre-TAR y la mejoría de ésta, tras 48 semanas de tratamiento, permitiría las condiciones adecuadas para la hidroxilación y el reestablecimiento de los enlaces de colágeno.

En cuanto al status inflamatorio, como era previsible, la ausencia de TAR conllevó mayor inflamación en los pacientes VIH, en comparación a los controles, con niveles séricos de PCR, VSG y receptor soluble 1 TNF- $\alpha$  significativamente mayores. Sin embargo, en este estudio los pacientes VIH mantuvieron valores significativamente inferiores de IL-17A, que, aunque a las 48 semanas

aumentaron, nunca llegaron a igualar los valores de los controles. Esto puede deberse a que la infección aguda por VIH (y también por SIV) (221) produce pérdida de linfocitos Th17 (222, 223), lo que a su vez facilita la translocación microbiana que media parcialmente, en la activación inmune crónica (224, 225) y que se acompaña de la pérdida de expresión de IL-17A. Entre los mecanismos causantes del descenso de Th17 se propone, por un lado, la expresión por parte de Th17 de CCR5 (coreceptor del virus) (226) y la sobreexpresión de varios genes contraregulatorios (227-229). A pesar de que se observa una recuperación de Th17, tras inicio de TAR, ésta suele ser parcial y parece que nunca llega a ser del 100% (230, 231), lo que también explica el leve ascenso de IL-17 tras tratamiento, pero con niveles inferiores a la de los controles no VIH.

En la actualidad se sabe que el ascenso de viremia que sigue a la infección por VIH comporta un ascenso rápido de algunas citoquinas como, IL-15, TNF- $\alpha$ , MCP-1 y más lento de otras como IL-6, IL-8, IL-18 e IL-10 (232). En nuestro caso, tras inicio de TAR los pacientes VIH exhibieron valores inferiores a los de los controles de IL-8, IFN- $\gamma$  y receptor soluble TNF- $\alpha$ .

En el caso de la IL-8, diversos estudios demuestran que esta interleuquina juega un papel importante en el reclutamiento de CD4 a los ganglios linfáticos, durante la fase aguda de la infección, proporcionando nuevas dianas al virus para su replicación (233), con niveles elevados tanto en suero como en tejido linfático (234). Parece ser además que el patrón fenotípico y genotípico de IL-8 está claramente aumentado en pacientes con infección no tratada o no controlada, en comparación a los pacientes en TAR con control virémico y a los LTNP (235). Es decir, el TAR disminuye los niveles de IL-8.

De la misma forma, a pesar de encontrar datos discordantes en la literatura en relación a IFN- $\gamma$  (236-239), encontramos un descenso del mismo post-TAR. Es de especial relevancia el papel que esta citoquina tiene sobre el hueso, dado que en condiciones de infección ósea la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de los Th1 inhibe fuertemente la diferenciación de los precursores osteoclastos por bloqueo de la vía de señalización RANK/RANKL (240, 241), es decir que el descenso de sus niveles puede ser uno de los muchos implicados en el descenso de DMO tras inicio del TAR.

Finalmente, también se observó un marcado descenso de sTNF-R1, lo que indica una correcta respuesta al TAR y una clara mejoría de la inflamación, dado que en diferentes estudios se ha demostrado que los valores más elevados de sTNF-R1 se relacionan con peores evoluciones tanto en pacientes VIH en TAR (242) como en controladores de élite, en los que se ha demostrado que son predictores de descenso de CD4 (243). En cuanto al impacto óseo de este descenso de sTNF-R1, hay que tener en cuenta, que los datos son, de nuevo, discordantes; mientras que algunos estudios demuestran una correlación positiva entre sTNF-R1 y descenso de DMO (244) en otros, no existe (245). TNF- $\alpha$  induce, a través de sTNF-R1, la diferenciación de células madre monocíticas a osteoclastos, pero parece que esto depende de la regulación de otros factores (246). Estas discrepancias, dejan patente que el turnover óseo es un proceso complejo, multifactorial, influido por múltiples elementos, de cuyo balance también depende el resultado final.

En cuanto a los marcadores de remodelado óseo, P1NP, CTX y FAO, experimentaron, como en otros estudios (247-250) un aumento tras 48 semanas de TAR. Normalmente, los pacientes VIH en TAR presentan un aumento de los marcadores de remodelación ósea, entre las primeras 12-48 semanas de TAR, seguido de una fase plateau que se mantiene durante años (251). Además los regímenes que contienen TDF, se asocian a valores más altos de P1NP, CTX, osteocalcina y FAO en comparación a pautas libres de TDF (187, 252).

En contrapartida, el tratamiento produjo un descenso a las 48 semanas de Dkk1 y esclerostina, datos que también se han visto en otros trabajos. A pesar de que, en los pacientes VIH, hay datos discordantes en cuanto a la esclerostina (253, 254), creemos que los datos de este trabajo son congruentes por un lado con el aumento de PTH, que como se ha comentado previamente tiene un efecto inhibitorio sobre la misma, y en segundo lugar, con los avances en el conocimiento de la vía Wnt y del papel inhibitorio de esclerostina sobre la formación ósea a través del antagonismo directo sobre los receptores LPR5/6 (255), tal como sucede con los nuevos anticuerpos antiesclerostina como Romosozumab, diseñados para el tratamiento de la osteoporosis (256). Asimismo, otros estudios plantean también el papel que DKK1 tiene sobre la

pérdida de DMO inducida por VIH, dado que su sobreexpresión exagera el efecto inhibitorio de la glicoproteína gp120 sobre la diferenciación y la funcionalidad de los osteoblastos (257). El planteamiento es que el descenso de ambos antagonistas de la vía Wnt tras inicio, puede permitir, a la larga, la estabilización de la DMO.

Como limitaciones del estudio encontramos:

- Se trata de estudios conducidos en 1 solo centro.
- La muestra poblacional es pequeña y el tiempo de duración limitada.
- La microindentación es una técnica nueva que precisa de más tiempo y más centros con experiencia de cara a valorar su implementación y su utilidad en el asesoramiento del riesgo de fractura. Por el momento solo disponemos de estudios aislados, por lo que falta una curva de normalidad de dicha técnica.
- Los pacientes se sometieron a un solo régimen de TAR, lo que hace que lo que puede ser aplicable para el utilizado en este estudio (TDF/FTC/EVG/COBI), pueda no serlo para otras pautas.
- No se han evaluado los siguientes parámetros analíticos: fosfaturia que tiene un valor predictivo en la valoración del daño renal y óseo inducidos por TDF, ni tampoco se ha valorado en la toma de muestras de vitamina D, la estacionalidad o la influencia de la dieta sobre la misma.

En resumen, la restauración del sistema inmune tras inicio de TAR y su influencia indirecta en vías como Wnt, puede mejorar la calidad ósea. A pesar de que el papel del TAR sobre los marcadores de remodelado óseo es incierto, parece ser opuesto entre BMSi y DMO/TBS, pudiendo explicarse la mejoría de la calidad ósea por la influencia de la inflamación sobre la transcripción proteica.

## VII CONCLUSIONES

La mejoría del patrón de inflamación secundaria al control inmune tras inicio del tratamiento antiretroviral, provoca una mejoría de la calidad ósea, a pesar de que es conocido que el TDF induce descenso de la densidad mineral ósea.

Los cambios microambientales óseos, tras el control de la inflamación, justifican una mejoría secundaria de la calidad del hueso al favorecer la formación de puentes de colágeno de forma más precoz que la mejoría de la densidad mineral ósea, lo que sugiere que los cambios en la DMO y en la microestructura ósea están regulados por vías diferentes.

La vía Wnt juega un papel fundamental en la regulación del hueso en individuos infectados por el VIH.

La información ofrecida por la DXA no valora adecuadamente el riesgo de fractura en pacientes VIH, por lo que se deben introducir nuevas herramientas como la microindentación en la valoración de su salud ósea.



## VIII LINEAS DE FUTURO

De los resultados que se han observado en estos estudios se desprende la importancia que tiene el inicio del tratamiento antiretroviral en pacientes con infección por VIH a nivel óseo. Aunque este estudio se ha basado en una única pauta de TAR (TDF/FTC/EVG/COBI), creemos que este beneficio es extensible a cualquier pauta, por lo que en la actualidad estamos valorando, el comportamiento óseo con otras pautas de TAR, basadas en NRTIs diferentes a TDF.

Asimismo, hay que tener en cuenta que los pacientes VIH, como pacientes con otras entidades clínicas, no son homogéneos y presentan comportamientos diferentes. Así encontramos, progresores lentos, controladores de élite y pacientes inmunodiscordantes. Todo esto hace que nos planteemos evaluar la salud ósea de los diferentes grupos, con la intención de mejorar e individualizar las medidas terapéuticas y/o preventivas en cuanto al hueso, en dichos pacientes.

De los estudios llevados a cabo, así como de la literatura revisada, se desprende la posibilidad que el comportamiento molecular del colágeno, influenciado por la condición inflamatoria subyacente al virus y al tratamiento antiretroviral, tenga un papel directo sobre la calidad del hueso. Es por ello que está en proyecto el desarrollar, en un futuro próximo, estudios para evaluar el comportamiento del colágeno en estos pacientes.

Finalmente, dado lo insuficiente de la DXA en el asesoramiento del riesgo de fractura en la población VIH y la falta de datos para normalizar la microindentación en esta misma comunidad, creemos necesario el desarrollo de estudios multicéntricos, con un reclutamiento mayor de pacientes para validar la técnica de microindentación en pacientes VIH.





## IX BIBLIOGRAFÍA

- 1-. Hawkins KL, Zhang L, Ng DK, Althoff KN, Palella FJ Jr, Kingsley LA, Jacobson LP, Margolick JB, Lake JE, Brown TT, Erlandson KM. Abdominal obesity, sarcopenia, and osteoporosis are associated with frailty in men living with and without HIV. *AIDS*. 2018 Jun 19;32(10):1257-1266.
- 2-. Smit, M., Brinkman, K., Geerlings, S., Smit, C., Thyagarajan, K., Sighem, A. v., de Wolf, F., Hallett, T. B., ATHENA observational cohort (2015). Future challenges for clinical care of an ageing population infected with HIV: a modelling study. *The Lancet. Infectious diseases*, 15(7), 810-8.
- 3-. Kalyan S, Pick N, Mai A, Murray MCM, Kidson K, Chu J, Albert AYK, Côté HCF, Maan EJ, Goshtasebi A, Money DM, Prior JC. Premature Spinal Bone Loss in Women Living with HIV is Associated with Shorter Leukocyte Telomere Length. *Int J Environ Res Public Health*. 2018 May 18;15(5).
- 4-. Brown, T.T.; Qaqish, R.B. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: A meta-analytic review. *AIDS*. 2006 Nov 14;20(17):2165-74.
- 5-. Prior, J.; Burdge, D.; Maan, E.; Milner, R.; Hankins, C.; Klein, M.; Walmsley, S. Fragility fractures and bone mineral density in HIV positive women: A case-control population-based study. *Osteoporos. Int*. 2007, 18, 1345–1353.
- 6-. Brown TT, Ross AC, Storer N, Labbato D, McComsey GA. Bone turnover, osteoprotegerin/RANKL and inflammation with antiretroviral initiation: tenofovir versus non-tenofovir regimens. *Antivir Ther*. 2011;16(7):1063-72.
- 7-. Overton ET, Chan ES, Brown TT, Tebas P, McComsey GA, Melbourne KM, et al. Vitamin D and Calcium attenuate bone loss with antiretroviral therapy initiation: A Randomized Trial. *Ann Intern Med*. 2015 Jun 16;162(12):815-24.
- 8-. Weitzmann MN, Ofotokun. Physiological and pathophysiological bone turnover- role of the immune system. *Nat Rev Endocrinol*. 2016 Sep;12(9):518-32.
- 9-. Rothman MS, Bessesen MT. HIV infection and osteoporosis: pathophysiology, diagnosis, and treatment options. *Curr Osteoporos Rep*. 2012 Dec;10(4):270-7.

- 10-. Guerri-Fernandez, R.; Vestergaard, P.; Carbonell, C.; Knobel, H.; Aviles, F.F.; Castro, A.S.; Nogués, X.; Prieto-Alhambra, D.; Díez-Perez, A. HIV infection is strongly associated with hip fracture risk, independently of age, gender, and comorbidities: A population-based cohort study. *JBone Miner Res.* 2013 Jun;28(6):1259-63.
- 11-. Malgo F, Hamdy NAT, Papapoulos SE, et al. 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.
- 12-. 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 Apr;29(4):787-95.
- 13-. Mellibovsky L, Prieto-Alhambra D, Mellibovsky F, Güerri-Fernández R, Nogués X, Randall C, Hansma PK, Díez-Perez A. Bone Tissue Properties Measurement by Reference Point Indentation in Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2015 Sep;30(9):1651-6.
- 14-. Duffau P, Ozanne A, Bonnet F, Lazaro E, Cazanave C, Blanco P, Rivière E, Desclaux A, Hyernard C, Gensous N, Pellegrin I, Wittkop L. Multimorbidity, age-related comorbidities and mortality: association of activation, senescence and inflammation markers in HIV adults. *AIDS.* 2018 Jul 31;32(12):1651-1660.
- 15-. Deeks, S.G. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med.* 2011;62:141-55.
- 16-. Hazra R, Mackall C. Thymic function in HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2005 Feb;2(1):24-8.
- 17-. Linton PJ, Dorshlinnd K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004 Feb;5(2):133-9.
- 18-. Bourgeois C, Hao Z, Rajewsky K, Potocnik AJ, Stockinger B. Ablation of thymic export causes accelerated decay of naive CD4 T cells in the periphery because of activation by environmental antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jun 24;105(25):8691-6.

- 19-. Kalayjian RC, Landay A, Pollard RB, et al. Age-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus (HIV) disease: association of age and HIV infection with naive CD8+ cell depletion, reduced expression of CD28 on CD8+ cells, and reduced thymic volumes. *J. Infect. Dis.* 2003; 187:1924–1933.
- 20-. van Baarle D, Tsegaye A, Miedema F, Akbar A. Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: rapid ageing during chronic stimulation of the immune system. *Immunol Lett.* 2005 Feb 15;97(1):19-29.
- 21-. Desai S, Landay A. Early immune senescence in HIV disease. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2010 Feb;7(1):4-10..
- 22-. Cheng X, Yu X, Ding YJ, Fu QQ, Xie JJ, Tang TT, Yao R, Chen Y, Liao YH. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol.* 2008 Apr;127(1):89-97.
- 23-. Robert C. Güerri-Fernández, Netanya S. Utay, Zhong-Min Ma, Surinder Mann, Talía Sainz, Marjorie Pion, Richard Pollard, Alan Landay, David M. Asmuth. Inflammation within the small intestine is associated with immune reconstitution. CROI 2019. March 4–7, 2019 | Seattle, Washington. Abstract 205.
- 24-. Manolagas, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000 Apr;21(2):115-37.
- 25-. Harre U, Schett G. Bone research in 2012: the ups and downs of bone in health and rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2013 Feb;9(2):67-8.
- 26-. Saeki Y, Kudo-Tanaka E, Ohshima S, Matsushita M, Tsuji S, Maeda Y, Yoshimura M, Watanabe A, Katada Y, Harada Y, Ichikawa K, Suenaga Y, Ohta Y, Tohma S; NHO iR-net Study Group. Baseline anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) titers and serum interleukin-6 (IL-6) levels possibly predict progression of bone destruction in early stages of rheumatoid arthritis (ERA). *Rheumatol Int.* 2013 Feb;33(2):451-6.
- 27-. Arboleya L, Castañeda S. Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. *Reumatol Clin.* 2013 Sep-Oct;9(5):303-15.

- 28-. Dar HY, Azam Z, Anupam R, Mondal RK, Srivastava RK. Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018 Jan 1;23:464-492.
- 29-. T. Wada, T. Nakashima, N. Hiroshi, J. M. Penninger: RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006 Jan;12(1):17-25.
- 30-. Baek WY, Kim JE. Transcriptional regulation of bone formation. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011 Jan 1;3:126-35.
- 31-. Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013 Jun;19(3):254-63.
- 32-. Marie PJ, Kassem M. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *Eur J Endocrinol*. 2011 Jul;165(1):1-10.
- 33-. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006 Jan;235(1):176-90.
- 34-. Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, Reeve J. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J*. 2005 Nov;19(13):1842-4.
- 35-. Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP, Weitzmann MN. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood*. 2007 May 1;109(9):3839-48.
- 36-. Brunetti G, Colucci S, Rizzi R, Mori G, Colaianni G, Oranger A, Zallone A, Liso V, Grano M. The role of OPG/TRAIL complex in multiple myeloma: the OPG/TRAIL complex in an in vitro osteoclastogenesis model derived from human multiple myeloma-bone disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Apr;1068:334-40.
- 37-. Choi Y, Woo KM, Ko SH, Lee YJ, Park SJ, Kim HM, Kwon BS. Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. *Eur J Immunol*. 2001 Jul;31(7):2179-88.

- 38-. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol.* 2005 Jul 1;175(1):5-14
- 39-. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996 Oct 31;383(6603):787-93.
- 40-. Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol.* 2006 Jun;18(3):349-56.
- 41-. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, Weitzmann MN, Pacifici R. IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):122-32.
- 42-. Zhao R. Immune regulation of bone loss by Th17 cells in oestrogen-deficient osteoporosis. *Eur J Clin Invest.* 2013 Nov;43(11):1195-202
- 43-. Reiner SL. Development in motion: helper T cells at work. *Cell.* 2007 Apr 6;129(1):33-6.
- 44-. Nie J, Li YY, Zheng SG, Tsun A, Li B. FOXP3(+) Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2015 Sep 28;6:493.
- 45-. Kim YG, Lee CK, Nah SS, Mun SH, Yoo B, Moon HB. Human CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit the differentiation of osteoclasts from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun 15;357(4):1046-52.
- 46-. Buchwald ZS, Kiesel JR, DiPaolo R, Pagadala MS, Aurora R. Osteoclast activated FoxP3+ CD8+ T-cells suppress bone resorption in vitro. *PLoS One.* 2012;7(6):e38199.
- 47-. Hayday AC:  $\gamma\delta$  T Cells and the Lymphoid Stress-Surveillance Response. *Immunity.* 2009 Aug 21;31(2):184-96.
- 48-. Kalyan S. It May Seem Inflammatory, but Some T Cells Are Innately Healing to the Bone. *J Bone Miner Res.* 2016 Nov;31(11):1997-2000.
- 49-. ranger A, Carbone C, Izzo M, Grano M. Cellular mechanisms of multiple myeloma bone disease. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:289458.

- 50-. Colucci S, Brunetti G, Mori G, Oranger A, Centonze M, Mori C, Cantatore FP, Tamma R, Rizzi R, Liso V, Zallone A, Grano M. Soluble decoy receptor 3 modulates the survival and formation of osteoclasts from multiple myeloma bone disease patients. *Leukemia*. 2009 Nov;23(11):2139-46
- 51-. Heider U, Langelotz C, Jakob C, Zavrski I, Fleissner C, Eucker J, Possinger K, Hofbauer LC, Sezer O. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2003 Apr;9(4):1436-40.
- 52-. Giuliani N, Colla S, Morandi F, Lazzaretti M, Sala R, Bonomini S, Grano M, Colucci S, Svaldi M, Rizzoli V. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2472-83.
- 53-. Zaiss MM, Frey B, Hess A, Zwerina J, Luther J, Nimmerjahn F, Engelke K, Kollias G, Hünig T, Schett G, David JP. Regulatory T cells protect from local and systemic bone destruction in arthritis. *J Immunol*. 2010 Jun 15;184(12):7238-46.
- 54-. Choi Y, Kim JJ. B cells activated in the presence of Th1 cytokines inhibit osteoclastogenesis. *Exp Mol Med*. 2003 Oct 31;35(5):385-92.
- 55-. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018 May;154(1):3-20.
- 56-. Lanier LL: Nk Cell Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225–274 (2004)
- 57-. Kalle Söderström, Emily Stein, Paula Colmenero, Ulrich Purath, Ulf Müller-Ladner, Cristina Teixeira de Matos, Ingo H. Tarner, William H. Robinson, Edgar G. Engleman. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 20; 107(29): 13028–13033.
- 58-. Hu M, Bassett JH, Danks L, Howell PG, Xu K, Spanoudakis E, Kotsianidis I, Boyde A, Williams GR, Horwood N, Roberts IA, Karadimitris A. Activated invariant NKT cells regulate osteoclast development and function. *J Immunol*. 2011 Mar 1;186(5):2910-7.

- 59-. Page G, Miossec P. RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes. *Arthritis Rheum.* 2005 Aug;52(8):2307-12.
- 60-. Rivollier A, Mazzorana M, Tebib J, Piperno M, Aitsiselmi T, Rabourdin-Combe C, Jurdic P, Servet-Delprat C. mature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood.* 2004 Dec 15;104(13):4029-37..
- 61-. Dhodapkar KM, Barbuto S, Matthews P, Kukreja A, Mazumder A, Vesole D, Jagannath S, Dhodapkar MV. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood.* 2008 Oct 1;112(7):2878-85.
- 62-. Chen M, Lam BK, Kanaoka Y, Nigrovic PA, Audoly LP, Austen KF, Lee DM. Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *J Exp Med.* 2006 Apr 17;203(4):837-42.
- 63-. Allaeyes I, Rusu D, Picard S, Pouliot M, Borgeat P, Poubelle PE. Osteoblast retraction induced by adherent neutrophils promotes osteoclast bone resorption: implication for altered bone remodeling in chronic gout. *Lab Invest.* 2011 Jun;91(6):905-20.
- 64-. Poubelle PE, Chakravarti A, Fernandes MJ, Doiron K, Marceau AA. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2):R25.
- 65-. Chen EH, Grote E, Mohler W, Vignery A. Cell-cell fusion. *FEBS Lett.* 2007 May 22;581(11):2181-93.
- 66-. Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, Maylin ER, Ripoll VM, Hume DA, Pettit AR. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2008 Jul 15;181(2):1232-44.
- 67-. Nagy V, Penninger JM. The RANKL-RANK Story. *Gerontology.* 2015;61(6):534-42.



- 68-. Zallone A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Apr;1068:173-9.
- 69-. Guerrini MM, Sobacchi C, Cassani B, Abinun M, Kilic SS, Pangrazio A, Moratto D, Mazzolari E, Clayton-Smith J, Orchard P, Coxon FP, Helfrich MH, Crockett JC, Mellis D, Vellodi A, Tezcan I, Notarangelo LD, Rogers MJ, Vezzoni P, Villa A, Frattini A. Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations. *Am J Hum Genet.* 2008 Jul;83(1):64-76.
- 70-. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology.* 1998 Mar;139(3):1329-37.
- 71-. Bengtsson AK, Ryan EJ. Immune function of the decoy receptor osteoprotegerin. *Crit Rev Immunol.* 2002;22(3):201-15.
- 72-. Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T. Immunological reaction in TNF- $\alpha$ -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:181849.
- 73-. Shett G. Review: Immune cells and mediators of inflammatory arthritis. *Autoimmunity.* 2008 Apr;41(3):224-9.
- 74-. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:33-63.
- 75-. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature.* 2000 Nov 30;408(6812):600-5.
- 76-. Kim JW, Lee MS, Lee CH, Kim HY, Chae SU, Kwak HB, Oh J. Effect of interferon- $\gamma$  on the fusion of mononuclear osteoclasts into bone-resorbing osteoclasts. *BMB Rep.* 2012 May;45(5):281-6.

- 77-. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, Kurokawa T, Suda T. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest.* 1993 Jan;91(1):257-63.
- 78-. Kim JM, Lee K, Kim MY, Shin HI, Jeong D. Suppressing effect of syndecan ectodomains and N-desulfated heparins on osteoclastogenesis via direct binding to macrophage-colony stimulating factor. *Cell Death Dis.* 2018 Nov 2;9(11):1119.
- 79-. Ruscitti P, Cipriani P, Carubbi F, Liakouli V, Zazzeroni F, Di Benedetto P, Berardicurti O, Alesse E, Giacomelli R. The role of IL-1 $\beta$  in the bone loss during rheumatic diseases. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:782382.
- 80-. Huynh NC, Everts V, Pavasant P, Ampornaramveth RS. Interleukin-1 $\beta$  induces human cementoblasts to support osteoclastogenesis. *Int J Oral Sci.* 2017 Dec 13;9(12):e5.
- 81-. Polzer K, Joosten L, Gasser J, Distler JH, Ruiz G, Baum W, Redlich K, Bobacz K, Smolen JS, van den Berg W, Schett G, Zwerina J. Interleukin-1 is essential for systemic inflammatory bone loss. *Ann Rheum Dis.* 2010 Jan;69(1):284-90.
- 82-. Lee SK, Kalinowski J, Jastrzebski S, Lorenzo JA. 1,25(OH) $_2$  vitamin D $_3$ -stimulated osteoclast formation in spleen-osteoblast cocultures is mediated in part by enhanced IL-1  $\alpha$  and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand production in osteoblasts. *J Immunol.* 2002 Sep 1;169(5):2374-80.
- 83-. Lorenzo JA, Sousa SL, Alander C, Raisz LG, Dinarello CA. Comparison of the bone-resorbing activity in the supernatants from phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood mononuclear cells with that of cytokines through the use of an antiserum to interleukin 1. *Endocrinology.* 1987 Sep;121(3):1164-70.
- 84-. Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Mar 1;11(3):234-50.
- 85-. Schrader, J. W. 2003. Interleukin-3. In *The Cytokine Handbook*. A. W. Thomson, and M. T. Lotze, eds. Academic Press, London, U.K. p. 201–225.

- 86-. Gupta N, Barhanpurkar AP, Tomar GB, Srivastava RK, Kour S, Pote ST, Mishra GC, Wani MR. IL-3 inhibits human osteoclastogenesis and bone resorption through downregulation of c-Fms and diverts the cells to dendritic cell lineage. -. J Immunol. 2010 Aug 15;185(4):2261-72.
- 87-. Singh K, Piprode V, Mhaske ST, Barhanpurkar-Naik A, Wani MR. IL-3 Differentially Regulates Membrane and Soluble RANKL in Osteoblasts through Metalloproteases and the JAK2/STAT5 Pathway and Improves the RANKL/OPG Ratio in Adult Mice. J Immunol. 2018 Jan 15;200(2):595-606
- 88-. Kamel Mohamed SG, Sugiyama E, Shinoda K, Hounoki H, Taki H, Maruyama M, Miyahara T, Kobayashi M. Interleukin-4 inhibits RANKL-induced expression of NFATc1 and c-Fos: a possible mechanism for downregulation of osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Apr 15;329(3):839-45.
- 89-. Ujiiie Y, Karakida T, Yamakoshi Y, Ohshima T, Gomi K, Oida S. Interleukin-4 released from human gingival fibroblasts reduces osteoclastogenesis. Arch Oral Biol. 2016 Dec;72:187-193.
- 90-. Krela-Kaźmierczak I, Szymczak-Tomczak A, Łykowska-Szuber L, Wysocka E, Michalak M, Stawczyk-Eder K, Waszak K, Linke K, Eder P. Interleukin 6, osteoprotegerin, sRANKL and bone metabolism in inflammatory bowel diseases. Adv Clin Exp Med. 2018 Apr;27(4):449-453.
- 91-. Park JY, Pillinger MH. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Bull NYU Hosp Jt Dis. 2007;65(1):4–10.
- 92-. Ito H. Novel therapy for Crohn's disease targeting IL-6 signaling. Expert Opin Ther Targets. 2000;8(4):287–294.
- 93-. Toraldo G, Roggia C, Qian WP, Pacifici R, Weitzmann MN. IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:125-130.

- 94-. Weitzmann MN, Cenci S, Rifas L, Brown C, Pacifici R. Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines. *Blood* 2000;96:1873-1878.
- 95-. Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw.* 2018 Feb 7;18(1):e8.
- 96-. Kopesky P, Tiedemann K, Alkekhia D, Zechner C, Millard B, Schoeberl B, Komarova SV. Autocrine signaling is a key regulatory element during osteoclastogenesis. *Biol Open.* 2014 Jul 25;3(8):767-76.
- 97-. Zhang Q, Chen B, Yan F, Guo J, Zhu X, Ma S, Yang W. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *Biomed Res Int.* 2014;2014:284836.
- 98-. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:929-79.
- 99-. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008 Dec;226:205-18.
- 100-. Carmody EE, Schwarz EM, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Viral interleukin-10 gene inhibition of inflammation, osteoclastogenesis, and bone resorption in response to titanium particles. *Arthritis Rheum.* 2002 May;46(5):1298-308.
- 101-. Park BL, Han IK, Lee HS, Kim LH, Kim SJ, Shin JS, Kim SY, Shin HD. Association of interleukin 10 haplotype with low bone mineral density in Korean postmenopausal women. *J Biochem Mol Biol.* 2004 Nov 30;37(6):691-9.
- 102-. Liu D, Yao S, Wise GE. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci.* 2006 Feb;114(1):42-9.
- 103-. Evans KE, Fox SW. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC Cell Biol.* 2007 Jan 19;8:4.

- 104-. Ke D, Fu X, Xue Y, Wu H, Zhang Y, Chen X, Hou J. IL-17A regulates the autophagic activity of osteoclast precursors through RANKL-JNK1 signaling during osteoclastogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Mar 11;497(3):890-896.
- 105-. Lee Y. The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases. *BMB Rep*. 2013 Oct;46(10):479-83.
- 106-. Kitami S, Tanaka H, Kawato T, Tanabe N, Katono-Tani T, Zhang F, Suzuki N, Yonehara Y, Maeno M. IL-17A suppresses the expression of bone resorption-related proteinases and osteoclast differentiation via IL-17RA or IL-17RC receptors in RAW264.7 cells. *Biochimie*. 2010 Apr;92(4):398-404.
- 107-. Adamopoulos IE, Chao CC, Geissler R, Laface D, Blumenschein W, Iwakura Y, McClanahan T, Bowman EP. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(1):R29.
- 108-. Funaki Y, Hasegawa Y, Okazaki R, Yamasaki A, Sueda Y, Yamamoto A, Yanai M, Fukushima T, Harada T, Makino H, Shimizu E. Resolvin E1 Inhibits Osteoclastogenesis and Bone Resorption by Suppressing IL-17-induced RANKL Expression in Osteoblasts and RANKL-induced Osteoclast Differentiation. *Yonago Acta Med*. 2018 Mar 28;61(1):8-18.
- 109-. Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science*. 2012 Jul 6;337(6090):59-64.
- 110-. Galli C, Passeri G, Macaluso GM. Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. *J Dent Res*. 2010 Apr;89(4):331-43.
- 111-. Brunetti G, Oranger A, Mori G, Specchia G, Rinaldi E, Curci P, Zallone A, Rizzi R, Grano M, Colucci S. Sclerostin is overexpressed by plasma cells from multiple myeloma patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Nov;1237:19-23.
- 112-. Baron R, Gori F. Targeting WNT signaling in the treatment of osteoporosis. *Curr Opin Pharmacol*. 2018 Jun;40:134-141.

- 113-. Wei Liu, Chao Xu, Hongyan Zhao, Pengpeng Xia, Ruilong Song, Jianhong Gu, Xuezhong Liu, Jianchun Bian, Yan Yuan, Zongping Liu. Osteoprotegerin Induces Apoptosis of Osteoclasts and Osteoclast Precursor Cells via the Fas/Fas Ligand Pathway. *PLoS One*. 2015; 10(11): e0142519. Published online 2015 Nov 16.
- 114-. Teitelbaum. Bone resorption by osteoclasts. *S.L.Science*. 2000 Sep 1;289(5484):1504-8.
- 115-. McGrath EE. OPG/RANKL/RANK pathway as a therapeutic target in cancer. *J Thorac Oncol*. 2011 Sep;6(9):1468-73
- 116-. Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, Pascual V, Hood LE, Clark EA. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J Immunol*. 1998 Dec 1;161(11):6113-21.
- 117-. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, Langdahl BL, Reginster JY, Zanchetta JR, Wasserman SM, Katz L, Maddox J, Yang YC, Libanati C, Bone HG. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med*. 2014 Jan 30;370(5):412-20.
- 118-. Axmann R, Herman S, Zaiss M, Franz S, Polzer K, Zwerina J, Herrmann M, Smolen J, Schett G. CTLA-4 directly inhibits osteoclast formation. *Ann Rheum Dis*. 2008 Nov;67(11):1603-9.
- 119-. Takeda K, Adhikari R, Yamada KM, Dhawan S. Hemin activation of innate cellular response blocks human immunodeficiency virus type-1-induced osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 14;464(1):7-12.
- 120-. Gibellini D, De Crignis E, Ponti C, Cimatti L, Borderi M, Tschon M, Giardino R, Re MC. HIV-1 triggers apoptosis in primary osteoblasts and HOBIT cells through TNFalpha activation. *J Med Virol*. 2008 Sep;80(9):1507-14.
- 121-. Fakruddin JM, Laurence J. HIV envelope gp120-mediated regulation of osteoclastogenesis via receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) secretion and its modulation by certain HIV protease inhibitors through

interferon-gamma/RANKL cross-talk. *J Biol Chem*. 2003 Nov 28;278(48):48251-8.

122-. Vikulina T, Fan X, Yamaguchi M, Roser-Page S, Zayzafoon M, Guidot DM, Ofotokun I, Weitzmann MN. Alterations in the immuno-skeletal interface drive bone destruction in HIV-1 transgenic rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Aug 3;107(31):13848-53.

123-. Titanji K, Vunnava A, Sheth AN, Delille C, Lennox JL, Sanford SE, Foster A, Knezevic A, Easley KA, Weitzmann MN, Ofotokun I. Dysregulated B cell expression of RANKL and OPG correlates with loss of bone mineral density in HIV infection. *PLoS Pathog*. 2014 Nov 13;10(10):e1004497.

124-. Brown TT, McComsey GA, King MS, Qaqish RB, Bernstein BM, da Silva BA. Loss of bone mineral density after antiretroviral therapy initiation, independent of antiretroviral regimen. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 Aug 15;51(5):554-61.

125-. Piso RJ, Rothen M, Rothen JP, Stahl M. Markers of bone turnover are elevated in patients with antiretroviral treatment independent of the substance used. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011 Apr;56(4):320-4.

126-. Ofotokun I, Titanji K, Vunnava A, Roser-Page S, Vikulina T, Villinger F, Rogers K, Sheth AN, Lahiri CD, Lennox JL, Weitzmann MN. Antiretroviral therapy induces a rapid increase in bone resorption that is positively associated with the magnitude of immune reconstitution in HIV infection. *AIDS*. 2016 Jan 28;30(3):405-14.

127-. Mulligan K, Glidden DV, Anderson PL, Liu A, McMahan V, Gonzales P, Ramirez-Cardich ME, Namwongprom S, Chodacki P, de Mendonca LM, Wang F, Lama JR, Chariyalertsak S, Guanira JV, Buchbinder S, Bekker LG, Schechter M, Veloso VG, Grant RM; Preexposure Prophylaxis Initiative Study Team. Effects of Emtricitabine/Tenofovir on Bone Mineral Density in HIV-Negative Persons in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin Infect Dis*. 2015 Aug 15;61(4):572-80.

- 128-. Casado JL, Santiuste C, Vazquez M, Bañón S, Rosillo M, Gomez A, Perez-Elías MJ, Caballero C, Rey JM, Moreno S. Bone mineral density decline according to renal tubular dysfunction and phosphaturia in tenofovir-exposed HIV-infected patients. *AIDS*. 2016 Jun 1;30(9):1423-31.
- 129-. Grigsby IF, Pham L, Mansky LM, Gopalakrishnan R, Carlson AE, Mansky KC. Tenofovir treatment of primary osteoblasts alters gene expression profiles: implications for bone mineral density loss. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 26;394(1):48-53.
- 130-. Nkhoma ET, Rosenblatt L, Myers J, Villasis-Keever A, Coumbis J. Real-World Assessment of Renal and Bone Safety among Patients with HIV Infection Exposed to Tenofovir Disoproxil Fumarate-Containing Single-Tablet Regimens. *PLoS One*. 2016 Dec 12;11(12):e0166982.
- 131-. Bedimo R, Maalouf NM, Zhang S, Drechsler H, Tebas P. Osteoporotic fracture risk associated with cumulative exposure to tenofovir and other antiretroviral agents. *AIDS*. 2012 Apr 24;26(7):825-31.
- 132-. Sax PE, Wohl D, Yin MT, Post F, DeJesus E, Saag M, Pozniak A, Thompson M, Podzamczek D, Molina JM, Oka S, Koenig E, Trottier B, Andrade-Villanueva J, Crofoot G, Custodio JM, Plummer A, Zhong L, Cao H, Martin H, Callebaut C, Cheng AK, Fordyce MW, McCallister S; GS-US-292-0104/0111 Study Team. Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate, coformulated with elvitegravir, cobicistat, and emtricitabine, for initial treatment of HIV-1 infection: two randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trials. *Lancet*. 2015 Jun 27;385(9987):2606-15.
- 133-. Mills A, Arribas JR, Andrade-Villanueva J, DiPerri G, Van Lunzen J, Koenig E, Elion R, Cavassini M, Madruga JV, Brunetta J, Shamblaw D, DeJesus E, Orkin C, Wohl DA, Brar I, Stephens JL, Girard PM, Huhn G, Plummer A, Liu YP, Cheng AK, McCallister S; GS-US-292-0109 team. Switching from tenofovir disoproxil fumarate to tenofovir alafenamide in antiretroviral regimens for virologically suppressed adults with HIV-1 infection: a randomised, active-controlled, multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Infect Dis*. 2016 Jan;16(1):43-52.



134-. Jotwani V, Atta MG, Estrella MM. Kidney Disease in HIV: Moving beyond HIV-Associated Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(11):3142-3154.

135-. Mueller NJ, Fux CA, Ledergerber B, Elzi L, Schmid P, Dang T, Magenta L, Calmy A, Vergopoulos A, Bischoff-Ferrari HA; Swiss HIV Cohort Study. High prevalence of severe vitamin D deficiency in combined antiretroviral therapy-naive and successfully treated Swiss HIV patients. *AIDS.* 2010 May 15;24(8):1127-34.

136-. Dao CN, Patel P, Overton ET, Rhame F, Pals SL, Johnson C, Bush T, Brooks JT; Study to Understand the Natural History of HIV and AIDS in the Era of Effective Therapy (SUN) Investigators. Low vitamin D among HIV-infected adults: prevalence of and risk factors for low vitamin D Levels in a cohort of HIV-infected adults and comparison to prevalence among adults in the US general population. *Clin Infect Dis.* 2011 Feb 1;52(3):396-405.

137-. Fox J, Peters B, Prakash M, Arribas J, Hill A, Moecklinghoff C. Improvement in vitamin D deficiency following antiretroviral regime change: Results from the MONET trial. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011 Jan;27(1):29-34.

138-. Wohl DA, Orkin C, Doroana M, Pilotto JH, Sungkanuparph S, Yeni P, Vanveggel S, Deckx H, Boven K. Change in vitamin D levels and risk of severe vitamin D deficiency over 48 weeks among HIV-1-infected, treatment-naive adults receiving rilpivirine or efavirenz in a Phase III trial (ECHO). *Antivir Ther.* 2014;19(2):191-200.

139-. Brown TT, McComsey GA. Association between initiation of antiretroviral therapy with efavirenz and decreases in 25-hydroxyvitamin D. *Antivir Ther.* 2010;15(3):425-9.

140-. Duvivier C, Kolta S, Assoumou L, Ghosn J, Rozenberg S, Murphy RL, Katlama C, Costagliola D; ANRS 121 Hippocampe study group. Greater decrease in bone mineral density with protease inhibitor regimens compared with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor regimens in HIV-1 infected naive patients. *AIDS.* 2009 Apr 27;23(7):817-24.

- 141-. Brown TT, Moser C, Currier JS, Ribaldo HJ, Rothenberg J, Kelesidis T, Yang O, Dubé MP, Murphy RL, Stein JH, McComsey GA. Changes in Bone Mineral Density After Initiation of Antiretroviral Treatment With Tenofovir Disoproxil Fumarate/Emtricitabine Plus Atazanavir/Ritonavir, Darunavir/Ritonavir, or Raltegravir. *J Infect Dis.* 2015 Oct 15;212(8):1241-9.
- 142-. Orkin C, Llibre JM, Gallien S, Antinori A, Behrens G, Carr A. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor-reducing strategies in HIV treatment: assessing the evidence. *HIV Med.* 2018 Jan;19(1):18-32.
- 143-. Gibellini D, Borderi M, de Crignis E, Clo A, Miserocchi A, Viale P, et al. Analysis of the effects of specific protease inhibitors on OPG/RANKL regulation in an osteoblast-like cell line. *The new microbiologica.* 2010; 33(2):109–15
- 144-. Santiago F, Oguma J, Brown AM, Laurence J. Noncanonical Wnt signaling promotes osteoclast differentiation and is facilitated by the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Jan 6;417(1):223-30.
- 145-. Malizia AP, Cotter E, Chew N, Powderly WG, Doran PP. HIV protease inhibitors selectively induce gene expression alterations associated with reduced calcium deposition in primary human osteoblasts. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007 Feb;23(2):243-50
- 146-. Hernandez-Vallejo SJ, Beaupere C, Larghero J, Capeau J, Lagathu C. HIV protease inhibitors induce senescence and alter osteoblastic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells: beneficial effect of pravastatin. *Aging Cell.* 2013 Dec;12(6):955-65.
- 147-. Hegde SS, Revankar AV, Patil AK. Identification of bone-specific alkaline phosphatase in saliva and its correlation with skeletal age. *Indian J Dent Res.* 2018 Nov-Dec;29(6):721-725.
- 148-. Seibel MJ. Molecular markers of bone turnover: Biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int* 2000;11 Suppl 6:S18-29.
- 149-. Halling Linder C, Ek-Rylander B, Krumpel M, Norgård M, Narisawa S, Millán JL, Andersson G, Magnusson P. Bone Alkaline Phosphatase and Tartrate-

Resistant Acid Phosphatase: Potential Co-regulators of Bone Mineralization. *Calcif Tissue Int.* 2017 Jul;101(1):92-101.

150-. Chi PJ, Lin YL, Tasi JP, Wang CH, Hou JS, Lee CJ, Hsu BG. Osteocalcin and carotid-femoral pulse wave velocity in patients on peritoneal dialysis. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi.* 2019 Jan-Mar;31(1):23-28.

151-. D'Oronzo S, Brown J, Coleman R. The role of biomarkers in the management of bone-homing malignancies. *J Bone Oncol.* 2017 Sep 11;9:1-9.

152-. Cesur MG, Ozturk VO, Afacan B, Sirin FB, Alkan A, Ozer T. Comparison of BALP, CTX-I, and IL-4 levels around miniscrew implants during orthodontic tooth movement between two different amounts of force. *Angle Orthod.* 2019 Feb 7.

153-. Muller MK, Gero D, Reitnauer D, Vetter D, Eshmuminov D, Hornemann T, Bueter M. The Impact of Roux-en-Y Gastric Bypass on Bone Remodeling Expressed by the P1NP/ $\beta$ CTX Ratio: a Single-Center Prospective Cohort Study. *Obes Surg.* 2019 Jan 6.

154-. Tähtelä R, Seppänen J, Laitinen K, Katajamäki A, Risteli J, Välimäki MJ. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in monitoring bisphosphonate treatment with clodronate: a comparison with urinary N-terminal telopeptide of type I collagen and serum type I procollagen amino-terminal propeptide. *Osteoporos Int.* 2005 Sep;16(9):1109-16.

155-. Halleen JM, Kaija H, Stepan JJ, Vihko P, Väänänen HK. Studies on the protein tyrosine phosphatase activity of tartrate-resistant acid phosphatase. *Arch Biochem Biophys.* 1998 Apr 1;352(1):97-102.

156-. Panteghini M, Pagani F. Biological variation in urinary excretion of pyridinium crosslinks: recommendations for the optimum specimen. *Ann Clin Biochem.* 1996 Jan;33 ( Pt 1):36-42.

157-. Ciullini L, Pennica A, Argento G, Novarini D, Teti E, Pugliese G, Aceti A, Conti FG. Trabecular bone score (TBS) is associated with sub-clinical vertebral fractures in HIV-infected patients. *J Bone Miner Metab.* 2018 Jan;36(1):111-118.

- 158-. Kanis A. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1994;843:1–129
- 159-. Ulivieri FM, Silva BC, Sardanelli F, Hans D, Bilezikian JP, Caudarella R (2014) Utility of the trabecular bone score (TBS) in secondary osteoporosis. *Endocrine* 47:435–448
- 160-. Crabtree N, Ward K. Bone Densitometry: Current Status and Future Perspective. *Endocr Dev.* 2015;28:72-83.
- 161-. Mazess RB, Barden HS: Bone densitometry for diagnosis and monitoring osteoporosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1989; 191:261–271
- 162-. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J; Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis (ESCEO) and the Committees of Scientific Advisors and National Societies of the International Osteoporosis Foundation (IOF). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2019 Jan;30(1):3-44.
- 163-. Looker AC, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP, Johnston CC, Jr, Lindsay R. Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults. *Osteoporos Int.* 1998;8:468–48
- 164-. Watts NB, Lleslie WD, Foldes AJ, Miller PD. 2013 International Society for Clinical Densitometry Position Development Conference: Task Force on Normative Databases. *J Clin Densitom.* 2013 Oct-Dec;16(4):472-81.
- 165-. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ.* 1996 May 18;312(7041):1254-9.
- 166-. Kanis JA, Odén A, McCloskey EV, Johansson H, Wahl DA, Cooper C; IOF Working Group on Epidemiology and Quality of Life. A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide. *Osteoporos Int.* 2012 Sep;23(9):2239-56.

- 167-. Pasco JA, Seeman E, Henry MJ, Merriman EN, Nicholson GC, Kotowicz MA. The population burden of fractures originates in women with osteopenia, not osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2006;17(9):1404-9..
- 168-. Cauley JA, Lui LY, Ensrud KE, Zmuda JM, Stone KL, Hochberg MC, Cummings SR. Bone mineral density and the risk of incident nonspinal fractures in black and white women. *JAMA.* 2005 May 4;293(17):2102-8.
- 169-. Jain RK, Vokes T. Dual-energy X-ray Absorptiometry. *J Clin Densitom.* 2017 Jul - Sep;20(3):291-303.
- 170-. 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 Nov;26(11):2762-9.
- 171-. Silva BC, Leslie WD, Resch H, Lamy O, Lesnyak O, Binkley N, McCloskey EV, Kanis JA, Bilezikian JP. Trabecular bone score: a noninvasive analytical method based upon the DXA image. *J Bone Miner Res.* 2014 Mar;29(3):518-30.
- 172-. Hans D, Barthe N, Boutroy S, Winzenrieth R, Pothuaud L, Krieg M-A. Correlations between trabecular bone score, measured using anteroposterior dual-energy X-ray absorptiometry acquisition, and 3-dimensional parameters of bone microarchitecture: an experimental study on human cadaver vertebrae. *J Clin Densitom.* 2011 Jul-Sep;14(3):302-12.
- 173-. Pothuaud L, Barthe N, Krieg M-A, Mehsen N, Carceller P, Hans D. Evaluation of the potential use of trabecular bone score to complement bone mineral density in the diagnosis of osteoporosis: a preliminary spine BMD-matched, case-control study. *J Clin Densitom.* 2009 Apr-Jun;12(2):170-6.
- 174-. Cormier C, Lamy O, Poriau S. TBS in routine clinical practice: proposals of use [Internet]. Plan-les-Outes, Switzerland: Medimaps Group; 2012; Available from:<http://www.medimapsgroup.com/upload/MEDIMAPSUK-WEB.pdf>
- 175-. Bousson V, Bergot C, Sutter B, Thomas T, Bendavid S, Benhamou CL, Blain H, Brazier M, Breuil V, Briot K, Chapurlat R, Chapuis L, Cohen Solal M, Fardellone P, Feron JM, Gauvain JB, Laroche M, Legrand, Lespessailles E, Linglart A, Marcelli C, Roux C, Souberbielle JC, Tremollieres F, Weryha G, Cortet

B; Groupe de Recherche et d'Information sur les Ostéoporoses (GRIO). Trabecular Bone Score: Where are we now?. *Joint Bone Spine*. 2015 Oct;82(5):320-5.

176-. Silva BC, Broy SB, Boutroy S, Schousboe JT, Shepherd JA, Leslie WD. Fracture Risk Prediction by Non-BMD DXA Measures: the 2015 ISCD Official Positions Part 2: Trabecular Bone Score. *J Clin Densitom*. 2015 Jul-Sep;18(3):309-30.

177-. Malgo F, Hamdy NA, Rabelink TJ, Kroon HM, Claessen KM, Pereira AM, Biermasz NR, Appelman-Dijkstra NM. Bone material strength index as measured by impact microindentation is altered in patients with acromegaly. *Eur J Endocrinol*. 2017 Mar;176(3):339-347.

178-. Diez-Perez A, Güerri R, Nogues X, Cáceres E, Peña MJ, Mellibovsky L, Randall C, Bridges D, Weaver JC, Proctor A, Brimer D, Koester KJ, Ritchie RO, Hansma PK. Microindentation for in vivo measurement of bone tissue mechanical properties in humans. *Bone Miner Res*. 2010 Aug;25(8):1877-85.

179-. Nyman JS, Granke M, Singleton RC, Pharr GM. Tissue-Level Mechanical Properties of Bone Contributing to Fracture Risk. *Curr Osteoporos Rep*. 2016 Aug;14(4):138-50.

180-.Güerri-Fernández R, Molina-Morant D, Villar-García J, Herrera S, González-Mena A, Guelar A, Trenchs-Rodríguez M, Díez-Pérez A, Knobel H. Bone Density, Microarchitecture, and Tissue Quality After Long-Term Treatment With Tenofovir/Emtricitabine or Abacavir/Lamivudine. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017 Jul 1;75(3):322-327.

181-. Herrera S, Diez-Perez A. Clinical experience with microindentation in vivo in humans. *Bone*. 2017 Feb;95:175-182.

182-. Nogués X, Prieto-Alhambra D, Güerri-Fernández R, Garcia-Giralt N, Rodriguez-Morera J, Cos L, Mellibovsky L, Pérez AD. Fracture during oral bisphosphonate therapy is associated with deteriorated bone material strength index. *Bone*. 2017 Oct;103:64-69.

183-. Taymouri F, Nogués X, Güerri-Fernández R, Mellibovsky L, Díez-Pérez A, Garcia-Giralt N, Ovejero D. La resistencia mecánica tisular ósea es independiente de la edad en individuos sanos. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2018; 10 (4): 125-30.

184-.Güerri-Fernández R, Lerma-Chippirraz E, Fernandez Marron A, García-Giralt N, Villar-García J, Soldado-Folgado J, González-Mena A, Trenchs-Rodríguez M, Guelar A, Díez-Pérez A, Brown TT, Knobel H. Bone density, microarchitecture, and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS.* 2018 Apr 24;32(7):913-920.

185-. Lerma-Chippirraz E, Pineda-Moncusí M, González-Mena A, Soldado-Folgado J, Knobel H, Trenchs-Rodríguez M, Díez-Pérez A, Brown TT, García-Giralt N, Güerri-Fernández R. Inflammation status in HIV-positive individuals correlates with changes in bone tissue quality after initiation of ART. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Feb 14. pii: dkz014.

186-. Stellbrink H-J, Orkin C, Arribas JR, Compston J, Gerstoft J, Van Wijngaerden E, et al. Comparison of changes in bone density and turnover with abacavir-lamivudine versus tenofovir-emtricitabine in HIV-infected adults: 48-week results from the ASSERT study. *Clin Infect Dis.* 2010 Oct 15;51(8):963-72

187-. Moran CA, Weitzmann MN, Ofotokun I. Bone Loss in HIV Infection. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2017 Mar;9(1):52-67.

188-. Adams JL, Shelley K, Nicol MR. Review of real-world implementation data on emtricitabine-tenofovir disoproxil fumarate as HIV pre-exposure prophylaxis in the United States. *Pharmacotherapy.* 2019 Feb 27

189-. McComsey GA, Kitch D, Daar ES, Tierney C, Jahed NC, Tebas P, et al. Bone Mineral Density and Fractures in Antiretroviral-Naive Persons Randomized to Receive AbacavirLamivudine or Tenofovir Disoproxil Fumarate-Emtricitabine Along With Efavirenz or Atazanavir-Ritonavir: AIDS Clinical Trials Group A5224s, a Substudy of ACTG A5202. *J Infect Dis.* 2011 Jun 15;203(12):1791-801.

190-. José A. Barletta, Monica Ye, Michelle Lu, Mia Kibel, Viviane D. Lima, Oghenowede Eyawo, Julio S. Montaner, Robert S. Hogg, Silvia Guillem HAART

is associated with reduced risk of osteoporosis-related fractures. CROI 2019. March 4–7, 2019 | Seattle, Washington. Abstract 686

191-. Grigsby IF, Pham L, Gopalakrishnan R, Mansky LM, Mansky KC. Downregulation of Gnas, Got2 and Snord32a following tenofovir exposure of primary osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 15;391(3):1324-9.

192-. Labarga P, Barreiro P, Martin-Carbonero L, Rodriguez-Novoa S, Solera C, Medrano J, Rivas P, Albalater M, Blanco F, Moreno V, Vispo E, Soriano V. Kidney tubular abnormalities in the absence of impaired glomerular function in HIV patients treated with tenofovir. *AIDS*. 2009 Mar 27;23(6):689-96.

193-. Hamzah L, Samarawickrama A, Campbell L, Pope M, Burling K, Fisher M, Gilleece Y, Walker-Bone K, Post FA. Effects of renal tubular dysfunction on bone in tenofovir-exposed HIV-positive patients. *AIDS*. 2015 Sep 10;29(14):1785-1792.

194-. Lerma-Chippirraz E, Güerri-Fernández R, Villar García J, González Mena A, Guelar Grinberg A, Montero MM, Sorli L, Calzado S, Horcajada JP, Díez-Pérez A, Knobel Freud H. Validation Protocol of Vitamin D Supplementation in Patients with HIV-Infection. *AIDS Res Treat*. 2016;2016:5120831.

195-. Mingione A, Maruca K, Chiappori F, Pivari F, Brasacchio C, Quirino T, Merelli I, Soldati L, Bonfanti P, Mora S. High parathyroid hormone concentration in tenofovir-treated patients are due to inhibition of calcium-sensing receptor activity. *Biomed Pharmacother*. 2018 Jan;97:969-974.

196-. Nemeth EF. Allosteric modulators of the extracellular calcium receptor. *Drug Discov Today Technol*. 2013 Summer;10(2):e277-84.

197-. Wein MN. Parathyroid Hormone Signaling in Osteocytes. *JBMR Plus*. 2017 Nov 10;2(1):22-30.

198-. Keller H, Kneissel M. SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone*. 2005 Aug;37(2):148-58.)

199-. Güerri-Fernandez R, Vestergaard P, Carbonell C, Knobel H, Avilés FF, Castro AS, Nogués X, Prieto-Alhambra D, Diez-Perez A. HIV infection is strongly



associated with hip fracture risk, independently of age, gender, and comorbidities: a population-based cohort study. *J Bone Miner Res.* 2013 Jun;28(6):1259-63.

200-. LaFleur J, Rillamas-Sun E, Colón-Emeric CS, Knippenberg KA, Ensrud KE, Gray SL, Cauley JA, LaCroix AZ. Fracture Rates and Bone Density Among Postmenopausal Veteran and Non-Veteran Women From the Women's Health Initiative. *Gerontologist.* 2016 Feb;56 Suppl 1:S78-90.

201-. Biver E, Calmy A, Delhumeau C, Durosier C, Zawadzynski S, Rizzoli R (2014) Microstructural alterations of trabecular and cortical bone in long-term HIV-infected elderly men on successful antiretroviral therapy. *AIDS* 23;28(16):2417-27.

202-. Borges AH, Hoy J FE. Antiretrovirals, fractures, and osteonecrosis in a large European HIV cohort. In: Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), February 22-25, 2016, Boston Abstract 46. 2016

203-. Fantner GE, Hassenkam T, Kindt JH, Weaver JC, Birkedal H, Pechenik L, Cutroni JA, Cidade GA, Stucky GD, Morse DE, Hansma PK. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nat Mater.* 2005 Aug;4(8):612-6. Epub 2005 Jul 17.

204-. Duarte Sosa D, Vilaplana L, Güerri R, Nogués X, Wang-Fagerland M, Díez-Pérez A, F Eriksen E. Are the High Hip Fracture Rates Among Norwegian Women Explained by Impaired Bone Material Properties?. *J Bone Miner Res.* 2015 Oct;30(10):1784-9.

205-. Güerri-Fernández R, Molina D, Villar-García J, Prieto-Alhambra D, Mellibovsky L, Nogués X, González-Mena A, Guelar A, Trenchs-Rodríguez M, Herrera-Fernández S, Horcajada JP, Díez-Pérez A, Knobel H. Brief Report: HIV Infection Is Associated With Worse Bone Material Properties, Independently of Bone Mineral Density. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2016 Jul 1;72(3):314-8.

206-. Garnero P. The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. *Calcif Tissue Int.* 2015 Sep;97(3):229-40.

- 207-. Wang X, Bank RA, TeKoppele JM, Agrawal CM. The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J Orthop Res.* 2001 Nov;19(6):1021-6.
- 208-. Unger S, Blauth M, Schmoelz W. Effects of three different preservation methods on the mechanical properties of human and bovine cortical bone. *Bone.* 2010 Dec;47(6):1048-53.
- 209-. Currey JD, Foreman J, Laketić I, Mitchell J, Pegg DE, Reilly GC. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J Orthop Res.* 1997 Jan;15(1):111-7.
- 210-. Barth HD, Launey ME, Macdowell AA, Ager JW 3rd, Ritchie RO. On the effect of X-ray irradiation on the deformation and fracture behavior of human cortical bone. *Bone.* 2010 Jun;46(6):1475-85.
- 211-. Burton B, Gaspar A, Josey D, Tupy J, Grynypas MD, Willett TL. Bone embrittlement and collagen modifications due to high-dose gamma-irradiation sterilization. *Bone.* 2014 Apr;61:71-81.
- 212-. Hanson DA, Eyre DR. Molecular site specificity of pyridinoline and pyrrole cross-links in type I collagen of human bone. *J Biol Chem.* 1996 Oct 25;271(43):26508-16.
- 213-. Knott L, Whitehead CC, Fleming RH, Bailey AJ. Biochemical changes in the collagenous matrix of osteoporotic avian bone. *Biochem J.* 1995 Sep 15;310 ( Pt 3):1045-51.
- 214-. Banse X, Sims TJ, Bailey AJ. Mechanical properties of adult vertebral cancellous bone: correlation with collagen intermolecular cross-links. *J Bone Miner Res.* 2002 Sep;17(9):1621-8.
- 215-. Mosekilde L, Mosekilde L, Danielsen CC. Biomechanical competence of vertebral trabecular bone in relation to ash density and age in normal individuals. *Bone.* 1987;8(2):79-85.
- 216-. Kopperdahl DL, Keaveny TM. Yield strain behavior of trabecular bone. *J Biomech.* 1998 Jul;31(7):601-8.

- 217-. Puthuchearu ZA, Sun Y, Zeng K, Vu LH, Zhang ZW, Lim RZL, Chew NSY, Cove ME. Sepsis Reduces Bone Strength Before Morphologic Changes Are Identifiable. *Crit Care Med.* 2017 Dec;45(12):e1254-e1261.
- 218-. Daumer KM, Khan AU, Steinbeck MJ. Chlorination of pyridinium compounds. Possible role of hypochlorite, N-chloramines, and chlorine in the oxidation of pyridinoline cross-links of articular cartilage collagen type II during acute inflammation. *J Biol Chem.* 2000 Nov 3;275(44):34681-92.
- 219-. Ida T, Kaku M, Kitami M, Terajima M, Rosales Rocabado JM, Akiba Y, Nagasawa M, Yamauchi M, Uoshima K. Extracellular matrix with defective collagen cross-linking affects the differentiation of bone cells. *PLoS One.* 2018 Sep 25;13(9):e0204306.
- 220-. Mauney J, Volloch V. Progression of human bone marrow stromal cells into both osteogenic and adipogenic lineages is differentially regulated by structural conformation of collagen I matrix via distinct signaling pathways. *Matrix Biol.* 2009 Jun;28(5):239-50.
- 221-. Bixler SL, Sandler NG, Douek DC, Mattapallil JJ. Suppressed Th17 levels correlate with elevated PIAS3, SHP2, and SOCS3 expression in CD4 T cells during acute simian immunodeficiency virus infection. *J Virol.* 2013 Jun;87(12):7093-101.
- 222-. Cecchinato V, Trindade CJ, Laurence A, Heraud JM, Brenchley JM, Ferrari MG, Zaffiri L, Trynieszewska E, Tsai WP, Vaccari M, Parks RW, Venzon D, Douek DC, O'Shea JJ, Franchini G. Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Mucosal Immunol.* 2008 Jul;1(4):279-88.
- 223-. Favre D, Lederer S, Kanwar B, Ma ZM, Proll S, Kasakow Z, Mold J, Swainson L, Barbour JD, Baskin CR, Palermo R, Pandrea I, Miller CJ, Katze MG, McCune JM. 2009. Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathog.* 5:e1000295.
- 224-. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:265-304.

- 225-. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006 Dec;12(12):1365-71.
- 226-. Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, Asher TE, Scheinberg P, Price DA, Hage CA, Kholi LM, Khoruts A, Frank I, Else J, Schacker T, Silvestri G, Douek DC. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood*. 2008 Oct 1;112(7):2826-35.
- 227-. Nishihara M, Ogura H, Ueda N, Tsuruoka M, Kitabayashi C, Tsuji F, Aono H, Ishihara K, Huseby E, Betz UA, Murakami M, Hirano T. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int Immunol*. 2007 Jun;19(6):695-702.
- 228-. Miller RC, Schlaepfer E, Baenziger S, Cramer R, Zeller S, Byland R, Audigé A, Nadal D, Speck RF. HIV interferes with SOCS-1 and -3 expression levels driving immune activation. *Eur J Immunol*. 2011 Apr;41(4):1058-69.
- 229-. Zhang L, Badgwell DB, Bevers JJ 3rd, Schlessinger K, Murray PJ, Levy DE, Watowich SS. IL-6 signaling via the STAT3/SOCS3 pathway: functional analysis of the conserved STAT3 N-domain. *Mol Cell Biochem*. 2006 Aug;288(1-2):179-89.
- 230-. He Y, Li J, Zheng Y, Luo Y, Zhou H, Yao Y, Chen X, Chen Z, He M. A randomized case-control study of dynamic changes in peripheral blood Th17/Treg cell balance and interleukin-17 levels in highly active antiretroviral-treated HIV type 1/AIDS patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012 Apr;28(4):339-45.
- 231-. El Hed A, Khaitan A, Kozhaya L, Manel N, Daskalakis D, Borkowsky W, Valentine F, Littman DR, Unutmaz D. Susceptibility of human Th17 cells to human immunodeficiency virus and their perturbation during infection. *J Infect Dis*. 2010 Mar 15;201(6):843-54.

- 232-. Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, Lebedeva M, DeCamp A, Li D, Grove D, Self SG, Borrow P. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol*. 2009 Apr;83(8):3719-33.
- 233-. Ott M, Lovett JL, Mueller L, Verdin E. Superinduction of IL-8 in T cells by HIV-1 Tat protein is mediated through NF-kappaB factors. *J Immunol*. 1998 Mar 15;160(6):2872-80.
- 234-. Matsumoto T, Miike T, Nelson RP, Trudeau WL, Lockey RF, Yodoi J. Elevated serum levels of IL-8 in patients with HIV infection. *Clin Exp Immunol*. 1993 Aug;93(2):149-51.
- 235-. Pananghat AN, Aggarwal H, Prakash SS, Makhdoomi MA, Singh R, Lodha R, Ali S, Srinivas M, Das BK, Pandey RM, Kabra SK, Luthra K. IL-8 Alterations in HIV-1 Infected Children With Disease Progression. *Medicine (Baltimore)*. 2016 May;95(21):e3734.
- 236-. Burger R. Impact of interleukin-6 in hematological malignancies. *Transfus Med Hemother*. 2013 Oct;40(5):336-43.
- 237-. Regidor DL, Detels R, Breen EC, Widney DP, Jacobson LP, Palella F, Rinaldo CR, Bream JH, Martínez-Maza O. Effect of highly active antiretroviral therapy on biomarkers of B-lymphocyte activation and inflammation. *AIDS*. 2011 Jan 28;25(3):303-14.
- 238-. Sachdeva RK, Wanchu A, Bagga R, Malla N, Sharma M. Effect of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors on cytokine, chemokine, and immunoglobulin profiles in serum and genital secretions of HIV-infected women. *J Interferon Cytokine Res*. 2010 May;30(5):299-310.
- 239-. Watanabe D, Uehira T, Suzuki S, Matsumoto E, Ueji T, Hirota K, Minami R, Takahama S, Hayashi K, Sawamura M, Yamamoto M, Shirasaka T. Clinical characteristics of HIV-1-infected patients with high levels of plasma interferon- $\gamma$ : a multicenter observational study. *BMC Infect Dis*. 2019 Jan 5;19(1):11.

- 240-. Fox SW, Chambers TJ. Interferon-gamma directly inhibits TRANCE-induced osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Oct 5;276(3):868-72.
- 241-. Pang M, Martinez AF, Jacobs J, Balkan W, Troen BR. RANK ligand and interferon gamma differentially regulate cathepsin gene expression in pre-osteoclastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Mar 18;328(3):756-63.
- 242-. Richert Q, Trajtman A, Arroyave L, Toews J, Becker M, Kasper K, McLaren P, Rueda Z, Keynan Y. Systemic inflammation before and after antiretroviral therapy initiation as a predictor of immune response among HIV-infected individuals in Manitoba. *Cytokine.* 2017 Mar;91:74-81.
- 243-. Gutiérrez-Rivas M, Jiménez-Sousa MÁ, Rallón N, Jiménez JL, Restrepo C, León A, Montero-Alonso M, González-García J, Muñoz-Fernández MÁ, Benito JM, Resino S; ECRIS Integrated in the Spanish AIDS Research Network. High Plasma Levels of sTNF-R1 and CCL11 Are Related to CD4+ T-Cells Fall in Human Immunodeficiency Virus Elite Controllers With a Sustained Virologic Control. *Front Immunol.* 2018 Jun 18;9:1399.
- 244-. Salimi S, Shardell M, Miller R, Gruber-Baldini AL, Orwig D, Fedarko N, Hochberg MC, Guralnik JM, Magaziner J. Soluble Tumor Necrosis Factor Alpha Receptor 1, Bone Resorption, and Bone Mineral Density in the Year Following Hip Fractures: The Baltimore Hip Studies. *J Bone Miner Res.* 2018 Sep;33(9):1649-1656.
- 245-. Cauley JA, Barbour KE, Harrison SL, Cloonan YK, Danielson ME, Ensrud KE, Fink HA, Orwoll ES, Boudreau R. Inflammatory Markers and the Risk of Hip and Vertebral Fractures in Men: the Osteoporotic Fractures in Men (MrOS). *J Bone Miner Res.* 2016 Dec;31(12):2129-2138.
- 246-. Kwak HB, Jin HM, Ha H, Kang MJ, Lee SB, Kim HH, Lee ZH. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of human peripheral blood mononuclear cells into osteoclasts through the induction of p21(WAF1/Cip1). *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 May 20;330(4):1080-6.

- 247-. Zhang L, Su Y, Hsieh E, Xia W, Xie J, Han Y, Cao Y, Li Y, Song X, Zhu T, Li T, Yu W. Bone turnover and bone mineral density in HIV-1 infected Chinese taking highly active antiretroviral therapy -a prospective observational study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2013 Jul 30;14:224.
- 248-. Amiel C, Ostertag A, Slama L, Baudoin C, N'Guyen T, Lajeunie E, Neit-Ngeilh L, Rozenbaum W, De Vernejoul MC. BMD is reduced in HIV-infected men irrespective of treatment. *J Bone Miner Res*. 2004 Mar;19(3):402-9.
- 249-. Marques de Menezes EG, de Paula FJ, Machado AA, de Assis Pereira F, Barbosa Júnior F, Navarro AM. Impact of antiretroviral therapy on bone metabolism markers in HIV-seropositive patients. *Bone*. 2013 Nov;57(1):62-7.
- 250-. Tebas P, Kumar P, Hicks C, Granier C, Wynne B, Min S, Pappa K. Greater change in bone turnover markers for efavirenz/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate versus dolutegravir + abacavir/lamivudine in antiretroviral therapy-naive adults over 144 weeks. *AIDS*. 2015 Nov 28;29(18):2459-64.
- 251-. Rey D, Treger M, Sibilia J, Priester M, Bernard-Henry C, Cheneau C, Javier RM. Bone mineral density changes after 2 years of ARV treatment, compared to naive HIV-1-infected patients not on HAART. *Infect Dis (Lond)*. 2015 Feb;47(2):88-95.
- 252-. Haskelberg H, Hoy JF, Amin J, Ebeling PR, Emery S, Carr A, STEAL Study Group. Changes in bone turnover and bone loss in HIV-infected patients changing treatment to tenofovir-emtricitabine or abacavir-lamivudine. *PLoS One*. 2012;7(6):e38377.
- 253-. Negredo E, Diez-Pérez A, Bonjoch A, Domingo P, Pérez-Álvarez N, Gutierrez M, Mateo G, Puig J, Echeverría P, Escrig R, Clotet B. Switching from tenofovir to abacavir in HIV-1-infected patients with low bone mineral density: changes in bone turnover markers and circulating sclerostin levels. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jul;70(7):2104-7.
- 254-. Mora S, Puzzovio M, Giacomet V, Fabiano V, Maruca K, Capelli S, Nannini P, Lombardi G, Zuccotti GV. Sclerostin and DKK-1: two important regulators of bone metabolism in HIV-infected youths. *Endocrine*. 2015 Aug;49(3):783-90.

255-. Canalis E. Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches. *Nat Rev Endocrinol*. 2013 Oct;9(10):575-83.

256-. Canalis E. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Novel anabolic treatments for osteoporosis. *Eur J Endocrinol*. 2018 Feb;178(2):R33-R44.

257-. Modarresi R, Xiang Z, Yin M, Laurence J. WNT/beta-catenin signaling is involved in regulation of osteoclast differentiation by human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir: relationship to human immunodeficiency virus-linked bone mineral loss. *Am J Pathol*. 2009 Jan;174(1):123-35.





## **X ANEXOS:**

**CONSIDERACIONES ÉTICAS**

**HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**BECAS Y FINANCIACIÓN**



## Consideraciones éticas

Ambos estudios fueron aprobados por el comité de ética del Parc de Salut Mar y llevados a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki:

Nº del comité de ética para el estudio 1: 2013/5250/I

Nº del comité de ética para el estudio 2: 2016/6803/I

Todos los pacientes incluidos fueron previamente informados, y tras la lectura de la información relativa al estudio (SE ADJUNTA EN LOS ANEXOS DOCUMENTACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO) y habiendo contestado todas las posibles dudas, firmaron consentimiento informado.

La información concerniente a los pacientes fue tratada con confidencialidad, anonimizando los datos de todos los participantes, de acuerdo con la legislación española vigente y a las normas de protección de datos internacionales.





## HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

**TÍTULO DEL PROYECTO:** Estudio de la toxicidad ósea en el paciente VIH por medio de la microindentación y su relación con marcadores inflamatorios.

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Dr. Robert Güerri Fernández

**Centro/Hospital:** Hospital del Mar. Barcelona

En el Parc de Salut Mar igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los pacientes, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

El desarrollo de un proyecto de investigación biomédica lleva implícito la utilización de muestras biológicas asociadas a la patología objeto de estudio. En este sentido las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios. Sin embargo hay ocasiones en que estas muestras sobrantes son insuficientes y es necesario obtener alguna pequeña muestra adicional.

De acuerdo con las normas de bioética y la legislación vigente, solicitamos su autorización para utilizar en investigación la información clínica y el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en el Hospital del Mar y obtener una pequeña muestra de sangre, junto con la realización de una prueba sencilla, llamada microindentación, para evaluar la calidad ósea.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma.



## **Información específica del Proyecto de Investigación**

Se está desarrollando un proyecto de investigación con el objetivo de evaluar la calidad ósea en pacientes con infección VIH. Asimismo, se trata de establecer la relación del deterioro de dicha calidad ósea con la inflamación subyacente a la propia infección.

El título del proyecto es **Estudio de la toxicidad ósea en el paciente VIH por medio de la microindentación y su relación con marcadores inflamatorios**. El responsable de este proyecto es el Dr. Robert Güerri Fernández y tanto él como su equipo se hallan vinculados al Hospital Universitario del Mar y al Institut Mar d'Investigació Mèdica (IMIM).

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Parc de Salut Mar.

**Muestras biológicas sobrantes e información asociada:** Se guardará y dispondrá de la información clínica y el material biológico sobrante que se haya obtenido durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos) sin que esto represente ningún perjuicio para usted.

**Obtención de muestras adicionales:** Se guardará y dispondrá de la información clínica y el material biológico sobrante que se haya obtenido durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos) sin que esto represente ningún perjuicio para usted.

También se realizará una determinación de la densidad mineral ósea mediante una densitometría ósea y una determinación de las características mecánicas del hueso mediante microindentación.

**Inconvenientes vinculados a la donación:** ocasionalmente se puede producir un hematoma en la zona de punción como complicación del procedimiento de extracción sanguínea o de la microindentación.

Una vez finalizado el proyecto, el material biológico sobrante pasará a formar parte del Banco de Muestras Biológicas del Parc de Salut Mar (MARBiobanc). Este banco de muestras es un establecimiento autorizado que acoge colecciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación vigente. La investigación se realizará en instalaciones debidamente acondicionadas para ello del PSMAR o de otras instituciones de investigación colaboradoras o que lo



soliciten oficialmente al MARBIobanc (artículo 69.2 de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, de Investigación Biomédica).

Cualquier estudio de investigación para el que se solicite la utilización de estos datos o muestras deberá disponer siempre de la aprobación del Comité Ético de la Investigación (CEIC/CEI) del PSMAR. Este Comité vela para que los investigadores desarrollen sus estudios siguiendo siempre las más estrictas normas éticas y legales.

Para dar su consentimiento hace falta que esté informado de lo siguiente:

- 1) Si usted firma esta autorización de cesión:
  - a. La información clínica y el material biológico excedente de su proceso asistencial
  - b. y el material biológico excedente del proyecto de investigación y los datos obtenidos

pasarán a formar parte y serán custodiados por el Banco de Muestras Biológicas del Parc de Salut Mar (MARBIobanc)

- 2) Este material biológico excedente que usted cede se utilizará únicamente para proyectos de investigación, tanto del propio centro como otros centros externos, nacionales o internacionales, que hayan sido aprobados previamente por los Comités Ético y Científico del Biobanco.
- 3) La finalidad de estos proyectos científicos es la de progresar en el conocimiento de las enfermedades (prevención, diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento), y ser útiles para futuros pacientes. En algunos casos estos proyectos pueden incluir análisis genéticos.
- 4) La cesión de las muestras biológicas que usted realiza es gratuita y su donación, voluntaria.
- 5) Las muestras se conservarán codificadas y se utilizarán siempre de forma confidencial.
- 6) Si usted lo solicita, el MARBIobanc podrá proporcionarle información sobre los estudios de investigación en los que se hayan utilizado sus muestras y sobre los resultados genéricos de estas investigaciones así como también, si se obtuvieran, datos sobre su salud y la de sus familiares.
- 7) Si decide firmar este consentimiento, también podrá revocarlo libremente.
- 8) En caso de producirse un eventual cierre del MARBIobanc la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en el 'Registro Nacional de Biobancos'.





SI TIENE CUALQUIER DUDA en relación con este consentimiento, pregunte al personal sanitario responsable que le ha comunicado esta información o bien al investigador principal de este proyecto de investigación. Asimismo, si usted lo desea, puede consultar sus dudas a su médico. Para cualquier información sobre el Biobanco, puede dirigirse a la dirección que figura al pie de este documento o a la web del MARBiobanc (<http://marbiobanc.imim.es/>).

Si HA ENTENDIDO la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiera tener y decide colaborar con el proyecto de investigación en los términos antes explicados, por favor rellene y firme en la página de detrás el denominado CONSENTIMIENTO INFORMADO Y LLÉVESE COPIA DEL MISMO.

Dirección a través de la cual puede pedir información o revocar o modificar su consentimiento:

Investigador principal: Dr. Robert Güerri-Fernández

IMIM-Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas

Parc de Salut Mar

Dr. Aiguader 88

08003 Barcelona



**Documento de CONSENTIMIENTO INFORMADO para la utilización de DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Estudio de la toxicidad ósea en el paciente VIH por medio de la microindentación y su relación con marcadores inflamatorios.**

**Y SU POSTERIOR CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.**

Nombre:		
DNI:	NHC:	Copia 1
Fecha de nacimiento:	Edad:	

**EL QUE SUSCRIBE**, una vez leída la información adjunta y tras haberlo comentado con el profesional sanitario responsable,

**AUTORIZA** a que se le extariga una muestra de **sangre**

**AUTORIZA** a guardar y utilizar con fines científicos los datos clínicos y el material biológico sobrante obtenidos durante su proceso asistencial con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la aprobación perceptiva del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) y del Comité Científico del Biobanco, del Parc de Salut Mar.

**I-**. Autoriza a que se le comunique información o datos genéticos relevante que pudiera afectar a su salud o a la de algún familiar, derivada de la investigación llevada a cabo (Artículo 49.2 de la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica)<sup>1</sup>

**II-**. Autoriza a que el material biológico sobrante del proyecto de investigación descrito y de las pruebas diagnósticas o terapéuticas e información clínica asociada pueda ser cedida al Biobanco y pueda ser utilizada en proyectos de investigación de otros centros nacionales y/o internacionales siempre que éstos cuenten con la aprobación perceptiva del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) y del Comité Científico del Biobanco, del Parc de Salut Mar.

**III-**. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.



Si desea incluir restricciones al uso de sus muestras, especifique cuales:

Barcelona, a        de                    de 20

**Firma del paciente/tutor o representante legal** (tachar lo que no proceda)

Sr/Sra.

DNI núm:

Firma:

**Firma del Profesional responsable de informar al donante**

Sr/Sra.

DNI núm:

Firma:

<sup>1</sup> Artículo 49.2. Derecho a la información o derecho a no ser informado. Cuando un sujeto fuente haya ejercido el derecho a no ser informado de los resultados de un análisis genético sólo se suministrará la información que sea necesaria para el seguimiento del tratamiento prescrito por el médico y aceptado por el paciente. Cuando esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, se podrá informar a los afectados o a su representante legalmente autorizado. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para estas finalidades.

## Becas y financiación

Este trabajo recibió soporte de:

-Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIPERFES): CB16/10/0245

- Fondos de Investigación en Salud (FIS). Proyecto Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación:

PI 13/00589: Estudio de la toxicidad ósea en paciente VIH por medio de la microindentación y su relación con marcadores inflamatorios

PI 16/01860: Estudio de la toxicidad ósea asociada al tratamiento antiretroviral por microindentación y papel de los miRNA como biomarcadores de afectación ósea

-Fondos FEDER

