

ESTEROIDES SEXUALES Y HUESO: ¿TIENE SEXO EL HUESO?

E. GARCÍA FERNÁNDEZ, S. GUADALIX IGLESIAS,
H. REQUEJO SALINAS, E. JÓDAR GIMENO Y F. HAWKINS CARRANZA

SERVICIO DE ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN
HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE. MADRID.

Es conocido que los esteroides sexuales ejercen un papel regulador en el metabolismo óseo. En los últimos años se han efectuado importantes avances para esclarecer en qué consiste y cómo se realiza esta regulación, definiendo, aparte del ya conocido mecanismo genómico a través del receptor esteroideo, una acción autocrina y paracrina mediada por citocinas y un mecanismo no genómico y no dependiente del sexo que abre una nueva línea de investigación con importantes implicaciones terapéuticas.

Los avances en las técnicas de laboratorio y en la investigación transgénica han permitido establecer la localización y función de los receptores esteroideos en los distintos componentes del compartimento óseo, con hallazgos sumamente interesantes en el campo de los andrógenos y de su receptor.

El objetivo de este artículo es revisar los datos derivados de las investigaciones *in vitro* e *in vivo* en animales y humanos sobre el mecanismo de acción de los esteroides sexuales en el hueso y su papel en la homeostasis ósea y en la protección frente a la osteoporosis. Prestaremos especial atención a la importancia del sexo en la modulación de su efecto.

PALABRAS CLAVE: estrógenos, testosterona, fisiología ósea, esteroides sexuales, hueso, osteoblasto, osteoclasto.

It is known that sexual steroids have a regulating role in bone metabolism. In recent years, important advances have been made to clarify what this regulation consists in and how it occurs, defining, in addition to the already known genomic mechanism through the steroid receptor, an autocrine and paracrine action mediated by cytokines and a non-genomic mechanism, not gender dependent, that opens a new line of investigation with important therapeutic implications.

The advances in laboratory techniques and transgenic investigation have made it possible to establish the site and function of the steroid receptors in the different bone compartment components, with extremely interesting findings in the field of androgens and their receptor.

This article aims to review the data derived from *in vitro* and *in vivo* research in animals and humans on the action mechanism of sexual steroids on the bone and their role in bone homeostasis and on protection against osteoporosis. We give special attention to the importance of gender in the modulation of their effect.

KEY WORDS: estrogens, testosterone, bone physiology, sexual steroids, bone, osteoblast, osteoclast.

INTRODUCCIÓN

Si bien es conocido que los esteroides sexuales ejercen un papel regulador sobre el metabolismo óseo, en los últimos años se ha comenzado a especular sobre la dependencia del sexo en este efecto.

Los receptores de esteroides sexuales son factores de transcripción citonucleares cuyas estructuras son modificadas por medio de la unión con el ligando. Aparte del ya conocido proceso del receptor de hormonas sexuales, que una vez modificado por su ligando actúa como promotor de genes, otros procesos que modulan los efectos de las hormonas sexuales en las células diana son:

1. Diversos mediadores moleculares que actúan de forma autocrina y paracrina.

2. El papel que las fuerzas biomecánicas desempeñan en el nivel de masa ósea.

3. Los efectos no genómicos y no dependientes del sexo, recientemente descubiertos, de estrógenos (E) y andrógenos (A).

En este artículo se abordan estos y otros hallazgos moleculares que tratan de explicar las acciones fisiológicas de las hormonas esteroideas sobre el hueso.

Por otra parte se revisarán los datos obtenidos de las investigaciones *in vitro* e *in vivo* en animales y humanos sobre el modo de acción de los A (directo e indirecto) sobre el hueso y su importancia en la homeostasis ósea y en la protección frente a la osteoporosis.

SÍNTESIS Y METABOLISMO DE LOS ESTEROIDES SEXUALES

En mujeres premenopáusicas más del 95% del estradiol (E2) y la mayor parte de estrona (E1) proceden de la secreción ovárica. El resto de E circulantes en la mujer premenopáusica y la mayor parte de ellos

en la mujer posmenopáusica proceden de la conversión periférica de precursores de esteroides. En varones más del 95% de la testosterona (T) procede de la secreción testicular. La T sérica en mujeres premenopáusicas procede un 25% de secreción ovárica, un 25% de secreción adrenal y un 50% de conversión periférica. En la mujer posmenopáusica las fuentes son similares, excepto la secreción ovárica de T, que disminuye. En la mayoría de los tejidos diana, la 5 α -dihidrotestosterona (DHT), formada a partir de T por la acción de la enzima 5 α -reductasa, es la principal fuente de actividad androgénica. El córtex adrenal, y en menor medida las gónadas, secretan grandes cantidades de A C19: dehidroepiandrosterona (DHEA), DHEA sulfato (DHEA-S) y Δ 4-androstenediona. Aunque se trata de A débiles por sí mismos, son una importante fuente para la síntesis extragonadal de potentes esteroides sexuales, ya que gracias a la aromataza se convierten en E1 y gracias a la esteroide sulfatasa, la 17- β -dihidroxiesteroide deshidrogenasa y la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en T.

Correspondencia: E. García Fernández.
Servicio de Endocrinología y Nutrición.
Hospital 12 de Octubre.
Avda. Córdoba s/n. 28041 Madrid.
Correo electrónico: elenagarciafer@terra.es

La biosíntesis extragonadal desempeña un importante papel. Muchos tejidos periféricos, incluyendo el hueso, pueden sintetizar E1 a partir de C19 esteroides. E2 y DHT pueden ser sintetizados directamente desde T. El principal lugar de conversión es el tejido adiposo. La biosíntesis extragonadal se incrementa en personas obesas y en mujeres posmenopáusicas¹.

Labrie et al² llamaron «acción autocrina» al proceso por el que los esteroides son sintetizados por una célula diana y su acción se lleva a cabo sin ser liberado al fluido extracelular. Los tejidos extragonadales que sintetizan E1 y E2 utilizan las mismas vías enzimáticas que las empleadas en la síntesis gonadal, con la excepción de que no pueden sintetizar C19 esteroides y dependen de precursores circulantes por tanto. Las enzimas clave involucradas en estos procesos se encuentran presentes en osteoblastos. La enzima aromatasa también se expresa en los condrocitos³. De los esteroides sexuales activos en tejidos periféricos, el 50% del total de los A en el varón adulto, el 75% de los E en mujeres premenopáusicas y casi todos los E en mujeres posmenopáusicas proceden de esta síntesis extragonadal.

La biosíntesis de esteroides sexuales es en gran medida tejido-específica: en las gónadas el principal E sintetizado es E2, en el tejido adiposo es E1 y en la placenta es estríol. La expresión del gen de la aromatasa en estos lugares se halla bajo control de promotores tejido-específicos que son regulados por diferentes factores de transcripción y citocinas. Existen pruebas de que la producción extragonadal de E es un proceso regulado. Se ha demostrado que la interleucina -6(IL-6) regula la actividad de 17β-HSD en células de cáncer de mama⁴ y que la IL-1β y el factor de necrosis tumoral α (TNFα) regulan la actividad de CYP19 aromatasa en osteoblastos¹. La producción de estas mismas citocinas proinflamatorias en el microambiente del hueso se incrementa por el déficit de E. Finalmente, Eyre et al⁵ demostraron que la línea celular osteoblástica en ratas, ROS 17/2,8, podía sintetizar E1, E2 y T a partir de Δ4-androstenodiona y que esta síntesis podía ser favorecida por 1,25-dihidroxivitamina D y dificultada por glucocorticoides.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTEROIDES SEXUALES SOBRE EL HUESO

MECANISMO GENÓMICO

Receptores esteroideos

Los receptores esteroideos pertenecen a la familia de los «receptores nucleares», en la cual se incluyen moléculas que ligan además de hormonas esteroideas vitamina A, ácido retinoico y hormonas tiroideas.

La secuencia de aminoácidos del receptor para esteroides ha sido plenamente identificada. Se trata de una proteína de 777 aminoácidos, organizada en varios dominios con funciones específicas (fig. 1).

La región aminoterminal (AF-1) participa en la transactivación a través de la cual se promueve la transcripción génica. Adyacente a esta región se encuentra una región básica que contiene dos dedos de zinc que se unen al ADN. La secuencia de aminoácidos localizada entre ambos dedos es la responsable de establecer contactos específicos con secuencias de ADN. El segundo dedo de zinc estabiliza la unión y aumenta la afinidad del receptor por estas secuencias. El último dominio es la región carboxiterminal, que es responsable de la unión al ligando, la dimerización o heterodimerización del receptor y la asociación con *heat shock proteins*. Asimismo, también contribuye a la transactivación dependiente del ligando (función situada en un subdominio llamado AF-2), que se relaciona con la actividad transcripcional.

En condiciones basales se encuentran situados en el citoplasma formando com-

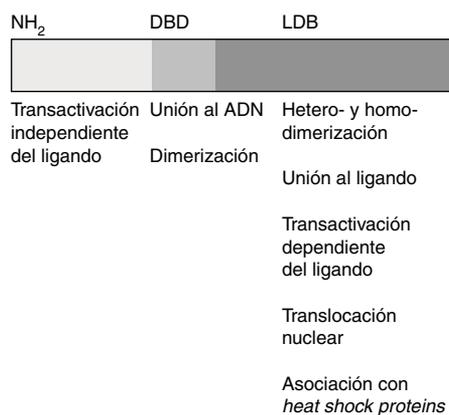


Fig 1. Representación esquemática del receptor esteroideo

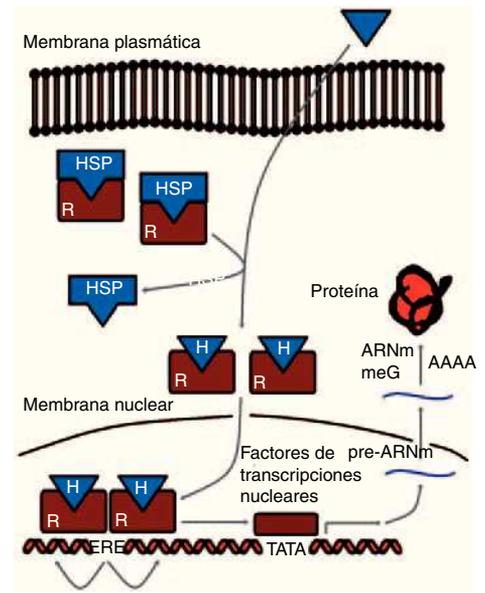


Fig 2. Sistema de señalización del receptor esteroideo

plejos multiméricos con las *heat shock proteins* (hsp 90, hsp 70, hsp 56). Cuando se une la hormona al receptor se disocian estos complejos y el receptor inicia su traslocación al núcleo, donde se une a secuencias específicas del ADN denominadas elementos de respuesta a las hormonas esteroideas (ERE) (fig. 2).

Esta actividad transcripcional se encuentra modulada en los tejidos diana por factores correguladores. Así, hay factores que aumentan la transcripción (coactivadores) y factores que la disminuyen (cosupresores).

Transducción por medio de receptores esteroideos en hueso y cartílago

Hasta 1988 se pensaba que los esteroides sexuales afectaban al esqueleto sólo de forma indirecta, regulando la secreción de hormonas calciotrópicas. Sin embargo, el hallazgo de receptores esteroideos en las distintas células óseas, gracias al desarrollo de técnicas de investigación más sensibles, puso de manifiesto la existencia de una acción directa de estas hormonas sobre el hueso. Así, en 1986 fue clonado el receptor estrogénico alfa (REα); en 1988 el receptor androgénico (RA)^{6,7} y finalmente en 1995 un segundo receptor estrogénico llamado REβ⁸. También han sido descritos heterodímeros REα/REβ.

En el cartílago de crecimiento humano *in vivo* se detectan RA en todas sus capas tanto inmunohistoquímicamente⁹⁻¹³ como por técnicas de hibridación *in situ*¹³ sin diferencias dependientes del sexo^{9,10,14}. Asimismo, también están presentes en todas las capas los RE α ^{10,12,15,16} existiendo controversia sobre la localización de RE β , pues mientras unos estudios los localizan sólo en los condrocitos hipertróficos¹⁷, otros los sitúan en todas las capas^{12,15,18}.

La expresión de RA en cultivo de osteoblastos fue descrita por primera vez en 1989 por Colvard et al¹⁹, y posteriormente múltiples estudios han confirmado la expresión de ARNmRA en osteoblastos y osteocitos^{9,11,13,19-22}. La expresión de RA es mayor en OB del hueso cortical que en los del hueso trabecular, mientras que no existen diferencias significativas en su cantidad dependientes del sexo²³. Recientemente se ha comprobado que los A regulan a la alta la expresión de su propio receptor en los osteoblastos²⁴⁻²⁷.

Los RE se describieron por primera vez en cultivos de osteoblastos humanos en 1988^{28,29}, pero aún hoy no existe consenso sobre su expresión relativa durante el proceso de diferenciación y en cuanto a su localización dentro del esqueleto. Así, parece que RE α predomina en el hueso cortical, mientras que RE β lo hace en el hueso trabecular¹⁵.

En osteoclastos de modelos animales se han hallado RA^{30,31} tanto *in vivo* como *in vitro*, no así en OC humanos *in vivo*^{9,11}, lo que llevó a pensar que la acción de los A sobre los OC se realizaba de forma indirecta a través de los OB³². No obstante, recientes estudios *in vitro* han demostrado que pueden actuar directamente sobre los OC para promover su apoptosis³³⁻³⁵. La mayoría^{15,36,37}, pero no todos los estudios³⁸⁻⁴⁰, detectan RE en OC. Además en otros tipos celulares relacionados con el hueso también se han encontrado receptores esteroideos en células del estroma óseo (RA^{22,41}, RE α ^{22,42,43}, RE β ^{22,43,44}), en megacariocitos (RA, RE)^{37,41} y en células endoteliales del compartimento óseo (RA, RE)^{9,37,41}.

Para aclarar el papel de los distintos tipos de receptores esteroideos en la homeostasis ósea se procedió al desarrollo de ratones transgénicos en los que se inactivaba de forma específica el gen de cada receptor y

se estudiaba posteriormente su fenotipo óseo (ratones *knockout*) (KO). De este modo surgieron distintos tipos de roedores: ArKO (inactivación del gen de *cyp19*-aromatasa)^{45,46}, BERKO (inactivación del gen de RE β)⁴⁷⁻⁴⁹, ERKO (inactivación del gen de RE α)^{49,50}, DERKO (inactivación del gen de ambos RE)⁵¹⁻⁵⁵ y ANDRKO (inactivación del gen de RA)^{56,57}. Aunque el significado exacto de los datos de estos ratones mutantes no está suficientemente esclarecido, existen varias hipótesis de interpretación.

Hueso trabecular. Era comúnmente aceptado que tanto los E como los A, tras ser aromatizados a E, actuaban sobre el hueso trabecular únicamente a través de RE. En ratones transgénicos hembra RE α desempeña un papel estimulador, mientras que RE β es inhibidor, como lo demuestra el hecho de que las hembras BERKO posean mayor cantidad de hueso trabecular que el fenotipo de hembra silvestre. RE β puede participar en la pérdida ósea relacionada con la edad en hembras, estimulando la resorción tanto endocortical como de hueso trabecular o inhibiendo el efecto estimulador de RE α en la formación ósea. De este modo, la delección de RE β puede aumentar la sensibilidad del hueso a RE α y, por lo tanto incrementar la acción de los E a pesar de la disminución de sus niveles séricos relacionada con la edad. En ratones macho la acción se produce a través de RE α , no teniendo ningún papel RE β . En los últimos años se ha descubierto también un modo de acción directo de los A a través del RA, al menos en roedores, tanto femeninos como masculinos, en los que ejerce una función protectora sobre el hueso trabecular.

Hueso cortical. Crecimiento longitudinal. En roedores en período de crecimiento tanto los A como los E parecen estimular el crecimiento longitudinal del hueso vía RE α . En ratones hembra RE β ejerce un efecto inhibitorio, si bien en machos no parece mediar ninguna acción. De este modo, bajas concentraciones de E (como las que existen en varones) son estimuladoras, mientras que altas concentraciones (como en hembras) son inhibitorias del crecimiento longitudinal. El resultado de este proceso es una mayor longitud de los huesos

en varones al final de la pubertad. El hecho de que los A únicamente actúen sobre el hueso trabecular a través de su aromatización a E lo demuestra el que el fenotipo óseo de los varones con deficiencia estrogénica (por mutación en el gen de la aromatasa) o resistencia estrogénica (por mutación del gen del RE α) se caracterice por ausencia de estirón puberal y retraso en el cierre epifisario.

En el momento actual permanece sin definir el papel del RA en este tipo de crecimiento y en el cierre epifisario tanto en humanos como en animales.

Crecimiento radial. Los A estimulan el crecimiento radial, mientras que los E disminuyen la aposición de hueso perióstico. RE β puede ser responsable, al menos en parte, del dimorfismo sexual esquelético, ya que las hembras BERKO poseen una mayor anchura de hueso cortical que el fenotipo de hembra silvestre. Estos cambios pueden ser el resultado del antagonismo mediado por RE β a la formación de hueso perióstico estimulada por RE α . No se ha demostrado que RE β tenga esta misma función limitante sobre el crecimiento radial en varones, ya que los ratones macho ERKO, DERKO, ArKO y ANDRKO experimentan una disminución del crecimiento radial, mientras que los ratones BERKO no.

En varones la acción de los andrógenos sobre el crecimiento radial se realizaría a través de RA y de RE α , si bien la importancia relativa de ambas vías y su interacción permanecen sin definir. Los datos disponibles son controvertidos, puesto que si bien la mayor parte de los estudios indican que RA es el mediador fundamental de la expansión perióstica (ratas Tmf [ratas macho feminizadas con testículos resistentes a los A] y ratones ANDRKO); otros sugieren que RE α también es un importante estimulador, ya que los inhibidores de la aromatasa en presencia de RA y niveles androgénicos normales detienen el crecimiento perióstico en ratas. Una posible explicación, todavía pendiente de ser confirmada, sería que al crecimiento del hueso perióstico contribuye fundamentalmente RA y con menor intensidad RE α . Esta hipótesis explicaría por qué la expansión perióstica puberal se detiene antes en la mujer que en el varón y por

qué vuelve a reactivarse en mujeres posmenopáusicas.

MEDIADORES MOLECULARES DE LA ACCIÓN DE LOS ESTEROIDES SEXUALES EN CÉLULAS ÓSEAS

Los primeros estudios apuntaban al papel del déficit estrogénico en el incremento de la producción de las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6, TNF α , factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (M-CSF) y prostaglandina-E₂ (PGE₂). Estas citocinas incrementan la resorción ósea, principalmente por aumentar el *pool* de preosteoclastos en médula ósea⁵⁸. Los E también estimulan la producción de TGF β ⁵⁹, un inhibidor de la resorción ósea, cuyo principal reservorio en el organismo es el hueso, que actúa directamente en osteoclastos para disminuir su actividad y la tasa de apoptosis.

Sin embargo, la regulación estrogénica de la resorción ósea fue reevaluada tras el descubrimiento del sistema RANKL osteoprotegerina (OPG)⁶⁰. La línea celular estroma-osteoblasto secreta OPG, que neutraliza el efecto de RANKL. Los E incrementan OPG⁶¹ y disminuyen M-CSF⁶² y RANK⁶³. Parte de este efecto en el sistema de señalización puede ser indirecto por medio de intermediarios estimulados por E. Así, IL-1 y TNF α incrementan RANKL, OPG y M-CSF, mientras que PGE₂ incrementa RANKL y disminuye OPG. Aún no se ha demostrado que los E regulen directamente RANKL o RANK. Por tanto, parece probable que los E inhiben la resorción ósea induciendo cambios pequeños pero acumulativos en múltiples factores E dependientes.

Se conoce menos acerca de los mecanismos moleculares de acción de los andrógenos sobre las células óseas. Existen tres factores reguladores de la acción androgénica expresados localmente en el hueso, dos de los cuales ya se han mencionado previamente al hablar de los E: TGF β , IGF e IL-6.

Teóricamente los A preservan el hueso mediante la inducción de TGF β e IGF y la inhibición de IL-6. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los A

aumentan la expresión y/o la actividad de TGF β . De hecho, la orquectomía disminuye el contenido de TGF β del hueso^{64,65}, mientras que el tratamiento con T lo aumenta. Se desconoce si este efecto tiene lugar a través de RE o RA. IGF1 e IGFBP estimulan la proliferación y diferenciación de OB. Los A regulan la expresión y/o la actividad de IGF directamente regulando IGF o indirectamente regulando IGFBP⁶⁶. La DHT y la T suprimen la producción de IL-6 en cultivos de OB y de células estromales^{42,67}. Más aún, los A inhiben la expresión de las subunidades gp80 y gp130 del receptor de la IL-6⁶⁸.

Otras vías paracrinas a través de las cuales los A pueden también regular el metabolismo óseo son la inhibición de la producción de PGE₂ inducida por PTH e IL-2⁶⁹, el aumento de la producción de IL-1 β ⁷⁰, el aumento del efecto mitogénico del factor de crecimiento fibroblástico en cultivos de OB⁷¹ y efecto sobre la OPG⁷². Tanto en células osteoblasticas *in vitro* como en varones ancianos *in vivo*, los A disminuyen⁷³ y los E incrementan⁶¹ la producción de OPG, lo que puede explicar en parte por qué la acción antirresortiva de la T es menor que la de los E. Quedan pendientes de investigar los efectos *in vivo* que tienen los esteroides sexuales sobre la OPG y su importancia fisiológica en la regulación de la homeostasis ósea.

Finalmente, Kousteni et al⁷⁴ han demostrado que los efectos antiapoptóticos de E y T en osteoblastos y osteocitos pueden ser mediados por señalización rápida, no genómica y no dependiente del sexo a través del dominio de unión a ligando de RE α , RE β o RA. Esta acción, como veremos más adelante es distinta de las acciones clásicas de estos receptores, las cuales son dependientes del sexo, genómicas y transcripcionales.

Interacción con fuerzas biomecánicas

Frost⁷⁵ ha insistido en el papel que las tensiones biomecánicas, especialmente las inducidas por contracción muscular, desempeñan en el nivel de masa ósea. Las tensiones son detectadas por un mecanotato interno del esqueleto que inicia cambios en el remodelado óseo para ajustar la masa ósea y su distribución a un nivel ade-

cuado al ambiente de fuerzas biomecánicas. Bajos niveles de tensión mantenidos crónicamente conducirán a un modelo de «desuso» en el remodelado óseo. En dicho modelo se halla incrementado el *turnover* en todas las superficies óseas, pero en las superficies endosteales, aquellas en contacto con la médula ósea, se reabsorbe más hueso del que se forma. Este desbalance en el remodelado de la superficie endosteal inducido por la inactividad es mediado por un factor liberado por la médula ósea, llamado Rho. Los cambios histomorfométricos inducidos tanto en el déficit de E como en el modelo de «desuso» son muy similares. En ambos, la pérdida de hueso se halla confinada a la superficie endosteal y no implica a las superficies intracortical y periosteal⁷⁶. Frost formuló la hipótesis de que el déficit de E altera el funcionamiento del mecanotato, disminuyendo la sensibilidad a las señales de tensión.

Las teorías de Frost se han visto confirmadas por varios estudios experimentales. Existe la evidencia de que «el mecanotato» son, al menos en parte, los osteocitos, que contienen Res⁷⁷. Rho comprende una cascada de citocinas derivadas de la médula ósea que incluye las citocinas proinflamatorias y el sistema regulador OPG/RANKL/RANK. Estas citocinas regulan la diferenciación de osteoclastos y osteoblastos desde precursores celulares⁶¹, y dichos precursores celulares en la médula ósea responden a E. Por tanto, es plausible que las citocinas de la médula ósea medien los efectos de los E y de las tensiones biomecánicas. También se ha demostrado experimentalmente la interacción entre las fuerzas mecánicas y los E, puesto que el efecto de las tensiones mecánicas puede ser bloqueado por tratamiento con los antagonistas de RE ICI 182,780 o tamoxifeno⁷⁸.

Recientes estudios *in vitro* sugieren que los esteroides sexuales y las cargas mecánicas ejercen sus efectos a través de vías similares. De hecho, se ha demostrado que RE α media en ambos sexos la proliferación de los osteoblastos inducida por la carga mecánica^{79,80}. La importancia de esta interacción entre E sexuales y carga mecánica *in vivo* no se encuentra suficientemente esclarecida en la actualidad.

Efectos no genómicos y no dependientes del sexo de los esteroides sexuales

Las hormonas sexuales también actúan por medio de efectos no genómicos, que implican acciones a nivel de la membrana celular o del citoplasma⁸¹. Kousteni et al⁸² demostraron que E y A actúan de una forma rápida, no genómica para activar la vía ERK1/2 que aumenta la supervivencia de OB en presencia de agentes apoptóticos como el etopósido. De este modo se comprobó que tanto 17 β -E2 como 5 α -DHT eran igualmente eficaces bloqueando el proceso apoptótico y que ambos podían ejercer su acción a través de RA y RE indistintamente. Estos hallazgos sugieren que un mecanismo sexo-inespecífico en ambos receptores puede ser activado por E o A con consecuencias aparentemente idénticas. Usando los E como paradigma, los autores muestran que la actividad antiapoptótica de RE es preservada cuando el receptor se halla en el citoplasma o en la membrana de la célula, pero se pierde si se halla en el núcleo. Mientras la acción antiapoptótica de RE no requiere la unión al ADN, su acción sobre la regulación de la transcripción precisa de la activación del dominio de unión a ligando (LBD) del RE para unirse al ADN. Finalmente, los autores demuestran que los efectos antiapoptóticos de los E pueden disociarse de sus efectos transcripcionales empleando el nuevo ligando sintético del RE llamado estren, que modula sólo su actividad antiapoptótica.

Estos estudios sugieren un nuevo mecanismo de acción similar para E y A en la biología de los OB, tanto en varones como en mujeres, y son prometedores, pero surgen varias preguntas de naturaleza técnica y biológica al respecto. Desde el punto de vista biológico: ¿cuál es el significado del papel de E y A sobre la supervivencia de los OB *in vivo*?, ¿son las acciones biológicas de E y A aquí mencionadas representativas de lo que sucede *in vivo*? Desde el punto de vista técnico surgen otras cuestiones. Los hallazgos del estudio sugieren que E2 y 5 α -DHT suprimen la apoptosis en OB y que dicha supresión es revertida de modo no específico tanto por el antagonista del RE ICI 182,780 como por el antagonista del RA flutamida (F). Estos hallazgos son sorprendentes en vista de la

fuerte selectividad por el receptor característica tanto de ICI como de F. Otro hallazgo muestra que los efectos antiapoptóticos, tanto de E2 como de 5 α -DHT en células HeLa pueden ser mediados tanto por RE como por RA. Estos descubrimientos desafían nuestros conceptos tradicionales acerca de la selectividad, especificidad y acción de los esteroides sexuales y nos inducen a buscar nuevos mecanismos de acción.

¿Cuáles son las señales intermediarias disparadas por E y A para iniciar la respuesta antiapoptótica en osteoblastos? El grupo de Manolagas ha hallado, tanto *in vitro* como *in vivo*, datos que sugieren que el efecto no genómico de las hormonas sexuales implica una regulación mediada por cinasas de los factores de transcripción comunes. Así, los efectos no genómicos de los esteroides sexuales influyen en la actividad de Elk-1, la proteína- β que se une al enhancer CCAAT (C/EBP β), y proteínas reguladas por cAMP, o c-Jun/c-Fos por una acción extranuclear del RE o RA, llevando todo ello a la activación de la vía Src/Shc/ERK o a la regulación a la baja de la cinasa N-terminal de C-Jun respectivamente. Un hallazgo interesante es que el ligando sintético estren, que reproduce los efectos no genómicos de las hormonas sexuales sin afectar a la transcripción clásica, incrementa la densidad mineral ósea (DMO) en ratones hembra ovariectomizadas y en ratones macho orquidectomizados, sin afectar a los órganos reproductivos (útero y vesículas seminales). Tales ligandos se deben investigar como potenciales alternativas terapéuticas en la sustitución hormonal para el tratamiento de la osteoporosis, tanto en mujeres como en varones.

FUNCIÓN DE LAS HORMONAS SEXUALES EN EL CRECIMIENTO Y LA MADURACIÓN DEL ESQUELETO

Antes de la pubertad niveles basales de GH/IGF-I mantienen un lento, pero continuo, crecimiento óseo. La pubertad es desencadenada por un incremento en la secreción hipotalámica de GnRH, lo que estimula la síntesis de gonadotropinas y,

por tanto, incrementa la secreción gonadal de hormonas sexuales⁸³. A su vez, los E y A estimulan la secreción pulsátil de GH y secundariamente de IGF-I en ambos sexos actuando a través de RE α , como lo demuestran las bajas concentraciones séricas de IGF-I existentes en ratones ERKO de ambos sexos. Los A ejercen este papel tras ser aromatizados a E a nivel central. De hecho, los inhibidores de la aromataza⁸⁴ causan una disminución de los niveles de IGF1, mientras que el antiestrógeno ICI 182,780, que no atraviesa la barrera hematoencefálica, no modifica sus concentraciones en ratas masculinas⁸⁵.

El incremento de GH, IGF-I y E actúa de modo coordinado para proporcionar apoyo al brote de crecimiento puberal. Sin embargo, es la elevación de los niveles séricos de E la responsable última de este crecimiento. Los varones con mutaciones homocigotas en RE α o en genes de la aromataza no realizan un rápido crecimiento durante la adolescencia a pesar de niveles normales o incrementados de T⁸⁶. Por otra parte, el incremento continuo de los niveles de E durante la pubertad es la causa del cierre epifisario en ambos sexos. Como los niveles estrogénicos son más altos en las mujeres, el cierre epifisario ocurre antes en ellas, por lo que los varones alcanzarán una mayor longitud ósea. Por tanto, los estrógenos por una parte inician la fase de crecimiento puberal, y por otra la finalizan por medio de la inducción del cierre epifisario. Esto unido a la acción de los esteroides sexuales sobre el crecimiento radial del hueso, comentada anteriormente, genera después de la pubertad un dimorfismo sexual esquelético que conlleva una mayor longitud ósea, perímetro externo, perímetro interno y volumen cortical en varones que en mujeres.

Las hormonas sexuales también parecen incrementar la masa ósea durante la maduración del esqueleto independientemente de los efectos ejercidos sobre el eje GH-IGF-I. La masa ósea es un 25% mayor en varones pospúberes que en mujeres pospúberes, en relación probablemente con los niveles de T sérica, ya que el incremento en los niveles de GH e IGF-I es similar o incluso mayor en chicas que en chicos. Así, los cambios inducidos por los A en el crecimiento y la composición corporal también pueden tener un gran im-

pacto sobre el esqueleto. En ratas macho orquectomizadas se detecta una disminución de la masa muscular y un aumento de la masa grasa^{87,88}. Esta pérdida muscular podría causar una reducción del estrés mecánico sobre el hueso. Por tanto, la disminución del crecimiento radial y longitudinal que acontece tras practicar una gonadectomía podría suponer una adaptación del hueso en crecimiento a los cambios inducidos por la orquectomía en las fuerzas mecánicas, más que en la acción directa de los esteroides sexuales sobre el hueso. Al contrario, el aumento del crecimiento esquelético en respuesta a los A podría reflejar un aumento de la carga mecánica.

En línea con las afirmaciones anteriores se han encontrado varios puntos de unión entre los adipocitos y el hueso, existiendo evidencias de que algunas adipocitocinas (como la leptina) son las mediadoras de esta unión vía sistema nervioso central (fundamentalmente a través del núcleo paraventricular)⁸⁹.

La pubertad en varones con respecto a mujeres se caracteriza no sólo por un mayor crecimiento longitudinal, sino también por una mayor ganancia de masa muscular⁹⁰. El aumento de masa muscular incrementa las fuerzas biomecánicas que actúan sobre el hueso⁹¹. Es por tanto tentador especular, basándonos en la teoría de Frost anteriormente expuesta, que los cambios en la composición corporal (aumento de masa muscular, disminución de grasa) contribuirían a conseguir un mayor tamaño óseo en varones. De hecho, en varones con hipogonadismo (HG) el tratamiento con T provoca cambios en la composición corporal, pero las implicaciones esqueléticas que esto pueda tener todavía deben ser estudiadas⁹².

EFFECTOS DE LOS ANDRÓGENOS EN EL ESQUELETO HUMANO

En 1940 Albright y Reifstein fueron los primeros en hacer referencia a sus propiedades antiosteoporóticas y anabólicas⁹³, si bien la mayor parte de los esfuerzos de investigación realizados desde entonces se han enfocado fundamentalmente hacia el campo de los E, dado el gran problema de

salud pública que supone la osteoporosis en la mujer.

EFFECTOS DE LOS ANDRÓGENOS EN EL ESQUELETO FEMENINO

El papel de los A en la homeostasis del esqueleto femenino no está bien establecido.

En las mujeres las concentraciones de A varían considerablemente; si bien la concentración de T es siempre menor que en varones, las concentraciones de otros A más débiles como la dehidroepiandrosteronasulfato (DHEA-S) y la androstenediona son iguales⁹⁴. Los A, de este modo, podrían contribuir a las diferencias clínicamente significativas que existen en la DMO entre las distintas mujeres.

Los A podrían estimular el desarrollo esquelético durante la pubertad, según se deriva del hallazgo de una mayor DMO en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (PCOS). Esto ha sido confirmado mediante pQCT, reflejando, por tanto, cambios auténticos en la composición del tejido óseo y no sólo cambios en el tamaño del hueso. Se desconoce todavía si esta acción estimuladora de los A ocurre a través del RA o a través de su aromatización a E. Las mujeres obesas con PCOS tienen mayor DMO que las delgadas, lo cual sugiere que la aromatización de los A en el tejido adiposo desempeña un papel importante. Permanece sin esclarecer la importancia que otras alteraciones metabólicas presentes en PCOS (disminución de niveles de SHBG, hiperinsulinismo) podrían tener en la homeostasis ósea de estas mujeres. Por último, las diferencias en la composición corporal podrían ser determinantes clínicamente importantes de la integridad esquelética, como lo sugieren el hallazgo de diferencias en la DMO dependientes de la localización esquelética en estas mujeres⁹⁵.

Un punto de especial interés consiste en el estudio de los efectos que sobre el hueso ejercen los distintos tratamientos empleados en el hirsutismo, particularmente los agonistas de GnRH y los antagonistas de RA, solos o en combinación. El antagonista de RA flutamida no induce cambios en la densidad de la columna vertebral lumbar⁹⁶, mientras que sí dis-

minuye la DMO cuando se administran conjuntamente espironolactona y linestrol⁹⁷. La supresión de los niveles de esteroides sexuales usando análogos de GnRH induce una disminución de la densidad ósea semejante a la que acontece en mujeres posmenopáusicas⁹⁸. Sorprendentemente, la espironolactona (pero no la flutamida) mantiene la DMO en mujeres hirsutas en tratamiento con análogos de GnRH, como se demostró en un estudio de 6 meses de duración⁹⁹. El mecanismo por el que se produce este efecto protector es desconocido y está en contraposición con el resto de estudios en los que la misma asociación ocasiona disminución de DMO.

En mujeres posmenopáusicas está menos estudiado el efecto de los A sobre el hueso. En la menopausia se produce un descenso del 70% en el nivel de A séricos (especialmente DHEA-S)^{94,100}, pero la importancia que esto pueda tener en la pérdida de masa ósea y en el riesgo de fracturas no está demostrada mediante estudios prospectivos. En estudios transversales no se ha encontrado una relación consistente entre los niveles séricos de DHEA-S y la DMO^{101,102}. En la actualidad no está claro si el modo de acción de estos A adrenales sobre el esqueleto femenino es a través del RA o de su aromatización a E. Por último, haremos una breve referencia al papel potencial que la terapia sustitutiva con T puede tener en estas mujeres^{103,104}. La combinación de dosis bajas de T y E da lugar a un aumento adicional de DMO si se compara con la administración aislada de E^{104,105}. Sin embargo, mientras no se compruebe la seguridad de este tratamiento combinado a largo plazo, no puede ser recomendado de forma sistemática.

EFFECTOS DE LOS ANDRÓGENOS EN EL ESQUELETO MASCULINO

En esta sección se revisarán los efectos esqueléticos de la castración, el HP y la resistencia androgénica.

La castración quirúrgica y química (agonistas de GnRH) induce una disminución de los niveles de esteroides sexuales en el varón, que se sigue de una rápida pérdida de hueso. Se produce una disminución de

la DMO en columna vertebral lumbar de un 5-10% en el primer año tras la castración, continuando posteriormente la pérdida ósea de forma lineal. Recientemente se ha comprobado que también ocurre una disminución de DMO clínicamente significativa, aunque de menor intensidad, en cadera y radio. Además, la deficiencia de A produce cambios en la composición corporal, que también pueden contribuir de forma independiente a un aumento en el riesgo de fracturas. Todo esto sugiere que el mecanismo de pérdida ósea en varones con deficiencia androgénica es similar al que ocurre en situaciones de insuficiencia gonadal en mujeres y animales, es decir, se produce un desbalance a favor de la resorción ósea, lo que ocasiona una pérdida de hueso, especialmente trabecular. Falta todavía por confirmar histomorfométricamente el aumento en el *turnover* óseo de estos varones, pero se ha comprobado que la supresión del *turnover* preserva la DMO (los bifosfonatos previenen la pérdida ósea en pacientes con cáncer de próstata sometidos a castración química).

El HG se define como una concentración de T baja de forma mantenida. Los varones con HG presentan una DMO menor que los varones normales (particularmente en áreas de hueso trabecular, por ejemplo, la columna vertebral). Algunos estudios sugieren que la resorción ósea, y en menor medida la formación, están aumentadas, si bien otros trabajos aportan datos histomorfométricos de baja formación ósea^{106,107}. Se ha detectado mediante resonancia magnética nuclear (RMN) un deterioro de la arquitectura del hueso trabecular de la porción distal de la tibia en estos varones¹⁰⁸. Varios experimentos demuestran un metabolismo del calcio y de la 1,25(OH)₂ VitD₃ normal, lo cual sugiere que el HG puede afectar la homeostasis ósea, independientemente del calcio y de la vitamina D. Experimentos realizados con el modelo de rata orquidectomizada apoyan esta teoría. Si bien existen estudios casos/controles que demuestran una prevalencia mayor de la esperada de HG en varones con fractura de columna vertebral o de cadera^{109,110}, faltan estudios prospectivos que establezcan la existencia de una relación causa-efecto entre ambas variables.

El HG masculino puede deberse a una gran variedad de enfermedades, que a su vez pueden tener cierto efecto deletéreo sobre el esqueleto. No obstante, diferentes estudios han hallado la misma disminución de DMO en todas las etiologías causantes de HG, sugiriendo la posibilidad de que el HG *per se* y no la enfermedad primaria que lo origina sea la responsable de la pérdida ósea¹¹¹. En todas las formas de HG estudiadas (pubertad retrasada, HG hipogonadotropo, HG por hiperprolactinemia, Sd. de Klinefelter [SK]) se comprueba una disminución de DMO en columna vertebral, radio y fémur. En pacientes con HG hipogonadotropo el análisis del *turnover* óseo ha producido resultados contradictorios, con datos histomorfométricos de osteoporosis de bajo recambio en algunos pacientes¹¹², pero niveles elevados de marcadores de formación y resorción ósea en otros¹¹³. En el HG por hiperprolactinemia la corrección del HG aumenta de forma significativa la densidad cortical ósea, independientemente de los niveles de prolactina, sugiriendo que es la deficiencia androgénica y no el exceso de prolactina lo que altera la homeostasis ósea en estos pacientes¹¹⁴.

Recientemente, el papel de los E en el desarrollo y mantenimiento del esqueleto en ambos sexos ha recibido especial atención. El HG debe considerarse como una combinación de varios grados de deficiencia androgénica y estrogénica, que dañarían el hueso de forma diferente. Más aún, el grado de deficiencia estrogénica en el HG masculino puede estar en relación con la capacidad de aromatización de los A, de manera que los pacientes con niveles androgénicos muy bajos tienen además una capacidad limitada para su aromatización. Los varones con síndrome de insensibilidad completa a los A (cASI) tienen menor DMO en columna vertebral y cadera si se comparan con controles. Estos hallazgos sugieren que los A pueden actuar directamente a través del RA. Marcus et al¹¹⁵ afirman que el nivel de E es un importante determinante de la DMO en estos pacientes, ya que se ha comprobado que aumentan la DMO en columna vertebral y cadera^{116,117}. Finalmente, la resistencia androgénica en humanos no se ha asociado con alteraciones en el crecimiento longitudinal, lo que llama la atención sobre la im-

portancia de los E en este tipo de crecimiento y en el cierre epifisario en varones.

CONCLUSIONES

Se están comenzando a investigar las bases autocrinas y paracrinas de la acción de los esteroides sexuales sobre el hueso, siendo necesarios nuevos estudios para definir la implicación de diversas citocinas en este proceso.

En cuanto al efecto que sobre el hueso tiene la interacción de los esteroides sexuales con las fuerzas biomecánicas, están surgiendo nuevas hipótesis acerca de que los cambios inducidos en la composición corporal por los esteroides sexuales serían en parte responsables del dimorfismo sexual esquelético tras la pubertad.

Recientemente se ha demostrado la existencia de RA en casi todas las células óseas y en el cartílago de crecimiento, lo que abre la posibilidad de que los A puedan actuar sobre el hueso no sólo a través de su aromatización a E y su interacción con RE, sino de forma directa utilizando su propio receptor. La activación de RA estimula el crecimiento del hueso trabecular y el crecimiento radial del hueso cortical. Por otra parte, RE α favorece el crecimiento tanto cortical como trabecular, mientras que RE β ejerce un papel inhibitorio en mujeres, no desempeñando aparentemente ninguna función en varones, lo que podría explicar en parte el dimorfismo sexual del esqueleto adulto.

En vista del papel esencial del RE α , algunos SERM (moduladores selectivos de RE α) con la apropiada selectividad de tejido podrían ser útiles en el tratamiento de varones ancianos con osteoporosis; y viceversa, moduladores selectivos de RA podrían ser igualmente interesantes en el campo de la enfermedad metabólica ósea femenina. Nuevas tecnologías genéticas y proteómicas combinadas con la disponibilidad de un completo set de ratones transgénicos *knockout* podrían proporcionar nuevas informaciones al respecto a corto plazo. El descubrimiento de que tanto E₂ como 5 α -DHT suprimen la apoptosis de OB y que dicha supresión es revertida de modo no específico tanto por el antagonista del RE, ICI, como por el antagonista del RA, flutamida, desafían nuestros conceptos tra-

dicionales acerca de la selectividad y especificidad de la acción de los esteroides sexuales sobre el hueso. En la misma línea, Kousteni et al proporcionan nuevos e interesantes datos que demuestran que las hormonas sexuales protegen a los OB por medio de un nuevo mecanismo de naturaleza no genómica y no dependiente del sexo. Por tanto, respondiendo a la pregunta que plantea el título de esta revisión podemos concluir que, a la vista de los datos disponibles en el momento actual, el efecto de los esteroides sexuales sobre el hueso es independiente del sexo. El hallazgo de un mecanismo sexo-inespecífico para el funcionamiento de RA y RE por el que éstos pueden ser activados tanto por E como por A con consecuencias aparentemente idénticas abre una importante vía de investigación en el futuro con implicaciones terapéuticas sumamente interesantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Jones M, et al. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:184-8.
2. Labrie F, Belanger A, Cusan L, Gómez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2396-402.
3. Sasano H, Uzuki M, Sawai T, Nagura H, Matsunaga G, Kashimoto O, et al. Aromatase in human bone tissue. *J Bone Miner Res* 1997;12:1416-23.
4. Turgeon C, Gingras S, Carriere MC, Blais Y, Labrie F, Simard J. Regulation of sex steroid formation by interleukin-4 and interleukin-6 in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1998;65:151-62.
5. Eyre LJ, Bland R, Bujalska IJ, Sheppard MC, Stewart PM, Hewison M. Characterization of aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression in rat osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 1998;13:996-1004.
6. Chang CS, Kokontis J, Liao ST. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 1988;240:324-6.
7. Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J, Higgs HN, Larson RE, et al. The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol* 1988;2:1265-75.
8. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5925-30.
9. Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE. The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3493.
10. Ben-Hur H, Thole HH, Mashiah A, Insler V, Berman V, Shezen E, et al. Estrogen, progesterone, testosterone receptors in human fetal cartilaginous tissue: immunohistochemical studies. *Calcif Tissue Int* 1997;60:520-6.
11. Noble B, Routledge J, Stevens H, Hughes I, Jacobson W. Androgen receptors in bone-forming tissue. *Horm Res* 1999;51:31-6.
12. Nilsson O, Chrysis D, Pajulo O, Boman A, Holst M, Rubinstein J, et al. Expression of ER α , ER β , and AR in the human pubertal growth plate. Program of the 84th Annual Meeting of The Endocrine Society, (Abstract P2-507) San Francisco, CA, 2002; p. 439.
13. Van der Eerden BC, van Til NP, Brinkmann AO, Lowik CW, Wit JM, Karperien M. Gender differences in expression of androgen receptor in tibial growth plate and metaphyseal bone of the rat. *Bone* 2002;30:891-6.
14. Carrascosa A, Audi L, Ferrández MA, Ballabriga A. Biological effects of androgens and identification of specific dihydrotestosterone-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:134-40.
15. Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors α and β are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2309-14.
16. Nasatzky E, Schwartz Z, Soskolne WA, Brooks BP, Dean DD, Boyan BD, et al. Evidence for receptors specific for 17 β estradiol and testosterone in chondrocyte cultures. *Connect Tissue Res* 1994;30:277-94.
17. Nilsson LO, Boman A, Saventhal L, Grigelioniene G, Ritzen EM, Wroblewski J, et al. Demonstration of estrogen receptor β immunoreactivity in human growth plate cartilage. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:370-3.
18. Nilsson O, Abad V, Chrysis D, Ritzen ME, Savendahl L, Baron J. Estrogen receptor α and β are expressed throughout postnatal development in the rat and rabbit growth plate. *J Endocrinol* 2002;173:407-14.
19. Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, et al. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:854-7.
20. Saito H, Yanaiharu T. Steroid formation in osteoblast-like cells. *J Int Med Res* 1998;26:1-12.
21. Nakano Y, Morimoto I, Ishida O, Fujihira T, Mizokami A, Tanimoto A, et al. The receptor, metabolism and effects of androgen in osteoblastic MC 3T3-E1 cells. *Bone Miner* 1994;26:245-59.
22. Gruber R, Czerwenka K, Wolf F, Ho GM, Willheim M, Peterlik M. Expression of the vitamin D receptor of estrogen and thyroid hormone receptor α and β -isoforms, and of the androgen receptor in cultures of native mouse bone marrow and of stromal/osteoblastic cells. *Bone* 1999;24:465.
23. Kasperk C, Helmboldt A, Borsok I, Heuthe S, Cloos O, Nieyard F, et al. Skeletal site-dependent expression of the androgen receptor in human osteoblastic cell populations. *Calcif Tissue Int* 1997;61:464-73.
24. Zhuang YH, Blauer M, Pekki A, Tuohimaa P. Subcellular localization of androgen receptor in rat prostate, seminal vesicle and human osteosarcoma MG-63 cells. *J Steroid Biochem* 1992;41:693-6.
25. Wren KM, Zhang X, Chang C, Keenan E, Orwoll ES. Transcriptional up-regulation of the human androgen receptor by androgen in bone cells. *Endocrinology* 1997;138:2291-300.
26. Wren KM, Keenan E, Zhang X, Orwoll ES. Homologous androgen receptor up-regulation in osteoblastic cells may be associated with enhanced functional androgen responsiveness. *Endocrinology* 1999;140:3114-24.
27. Takeuchi M, Kkushi H, Tohkin M. Androgens directly stimulate mineralization and increase androgen receptors in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:905-11.
28. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988;241:84-6.
29. Kaplan FS, Fallon MD, Boden SD, Schmidt R, Senior M, Haddad JG. Estrogen receptors in bone in a patient with polyostotic fibrous dysplasia (McCune-Albright syndrome). *N Engl J Med* 1988;319:421-5.
30. Mizuno Y, Hosoi T, Inoue S, Ikegami A, Kaneki M, Akedo Y, et al. Immunocytochemical identification of androgen receptor in mouse osteoclast-like multinucleated cells. *Calcif Tissue Int* 1994;54:325-6.
31. Van Der Eerden BC, Van De Ven J, Lowik CW, Wit JM, Karperien M. Sex steroid metabolism in the tibial growth plate of the rat. *Endocrinology* 2002;143:4048-55.
32. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. The effects of androgen deficiency of murine bone remodeling and bone mineral density are mediated via cells of the osteoblastic lineage. *Endocrinology* 1997;138:4013-21.
33. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001;104:719-30.
34. Kousteni S, Chen JR, Bellido T, Han L, Ali AA, O'Brien CA, et al. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science* 2002;298:843-6.
35. Chen JRK, Bellido T, Han L, Di Gregorio GB, Jilka RL, Manolagas SC. Gender-inde-

- pendent induction of murine osteoclast apoptosis in vitro by either estrogens or non-aromatizable androgens. *J Bone Miner Res* 2001; 16 (Suppl):S159.
36. Fiorelli G, Gori F, Petilli M, Tanini A, Benvenuti S, Serio M, et al. Functional estrogen receptors in a human preosteoclastic cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2672-6.
 37. Braidman IP, Hainey L, Batra G, Selby PL, Saunders PT, Hoyland JA. Localization of estrogen receptor Beta protein expression in adult human bone. *J Bone Miner Res* 2001; 16:214-20.
 38. Kusec V, Viridi AS, Prince R, Triffitt JT. Localization of estrogen receptor alfa in human and rabbit skeletal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2421-8.
 39. Collier FM, Huang WH, Holloway WR, Hodges JM, Gillespie MT, Daniels LL, et al. Osteoclasts from human giant cell tumors of bone lack estrogen receptors. *Endocrinology* 1998;139:1258-67.
 40. Windahl SH, Norgard M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Andersson G. Cellular distribution of estrogen receptor Beta in neonatal rat bone. *Bone* 2000;26:117-21.
 41. Mantalaris A, Panoskaltis N, Sakai Y, Bourne P, Chang C, Messing EM, et al. Localization of androgen receptor expression in human bone marrow. *J Pathol* 2001;193:361-6.
 42. Oreffo RO, Kusec V, Viridi AS, Flanagan AM, Grano M, Zamboni-Zallone A, et al. Expression of estrogen receptor alpha in cells of the osteoclastic lineage. *Histochem Cell Biol* 1999;111:125-33.
 43. Lim SK, Won YJ, Lee HC, Huh KB, Park YS. A PCR analysis of ER alfa and ER beta mRNA abundance in rats and the effect of ovariectomy. *J Bone Miner Res* 1999;14:1189-96.
 44. Bonnelye E, Aubin JE. Differential expression of estrogen receptor-related alpha and estrogen receptors alpha and Beta in osteoblasts in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 2002;17:1392.
 45. Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the CYP19 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6965-70.
 46. Nemoto Y, Toda K, Ono M, Fujikawa-Adachi K, Saibara T, Onishi S, et al. Altered expression of fatty acid-metabolizing enzymes in aromatase-deficient mice. *J Clin Invest* 2000;105:1819-25.
 47. Ke HZ, Brown TA, Chidsey-Frink KL, Crawford DD, Simmons HA, Peterson DN, et al. Estrogen is efficacious in preventing ovariectomy-induced cancellous and cortical bone loss in estrogen receptor beta knockout mice. *J Bone Miner Res* 15 (Suppl 1):5161 (Abstract).
 48. Kregel JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor Beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15677-82.
 49. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effects of single and compound knockouts of estrogen receptors alfa and beta on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000;127:4277-91.
 50. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11162-6.
 51. Vidal O, Lindberg MK, Hollberg K, Baylink DJ, Andersson G, Lubahn DB, et al. Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5474-9.
 52. Lindberg MK, Weihua Z, Andersson N, Moverare S, Gao H, Vidal O, et al. Estrogen receptor specificity for the effects of estrogen in ovariectomized mice. *Endocrinology* 2002;174:167-78.
 53. Sims NA, Clement-Lacroix P, Minet D, Dupont S, Krust A, Resche-Rigon M, et al. Estrogen receptor alfa is the major receptor regulating bone response to estradiol in gonadectomized female mice and testosterone plays a role in intact male and female. *J Bone Miner Res* 2001;16(Suppl 1):S431.
 54. Sims NA, Dupont S, Krust A, Clement-Lacroix P, Minet D, Resche-Rigon M, et al. Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-Beta in bone remodeling in females but not in males. *Bone* 2002;30:18-25.
 55. Sims NA, Clement-Lacroix P, Minet D, Gailard-Kelly M, Resche-Rigon M, Baron R. A functional androgen receptor is not sufficient to allow estradiol to protect bone after gonadectomy in estradiol receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2003;111:1319-27.
 56. Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Kawaguchi H, Kato S. Both androgen and estrogen signalings contribute to the maintenance of bone mass in males: analyses of male androgen receptor deficient mice. *J Bone Miner Res* 2002;17(Suppl 1):S365.
 57. Sato T, Kawano H, Kato S. Study of androgen action in bone by analysis of androgen receptor deficient mice. *J Bone Miner Res* 2002;20:326-30.
 58. Pacifici R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996;11:1043-51.
 59. Ouster MJ, Cortese C, Keeting PE, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL, et al. Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 β -estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology* 1991;129:3313-20.
 60. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2-12.
 61. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999;140:4376-0.
 62. Kimble RB, Srivastava S, Ross FP, Matsu-yoshi A, Pacifici R. Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *J Biol Chem* 1996;271:28890-7.
 63. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7829-34.
 64. Kasperk CH, Fitzsimmons R, Strong D, Mohan S, Jennings J, Wergedal J, et al. Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1322-9.
 65. Bodine PV, Riggs BL, Spelsberg TC. Regulation of c-fos expression and TGF-Beta production by gonadal and adrenal androgens in normal human osteoblastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;52:149-58.
 66. Bellido T, Jilka R, Boyce B, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple S, et al. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest* 1995;95:2886-95.
 67. Hofbauer LC, Ten RM, Khosla S. The anti-androgen hydroxyflutamide and androgens inhibit interleukin-6 production by an androgen-responsive human osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 1999;14:1330-7.
 68. Lin SC, Yamate T, Taguchi Y, Borba VZ, Girasole G, O'Brien CA, et al. Regulation of the gp80 and gp130 subunits of the IL-6 receptor by sex steroids in the murine bone marrow. *J Clin Invest* 1997;100:1980-90.
 69. Pilbeam CC, Raisz LG. Effects of androgens on parathyroid hormone and interleukin-1-stimulated prostaglandin production in cultured neonatal mouse calvariae. *J Bone* 1990; 5:1183-8.
 70. Pivrotto LA, Cissel DS, Keeting PE. Sex hormones mediate interleukin-1 Beta production by human osteoblastic HOBT cells. *Mol Cell Endocrinol* 1995;111:67-74.
 71. Kasperk C, Fitzsimmons R, Strong D, Mohan S, Jennings J, Wergedal J, et al. Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1322-29.
 72. Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D, Khosla S. Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. *Eur J Endocrinol* 2002;147:269-73.
 73. Hofbauer LC, Hicok K, Chen D, Khosla S. Regulation of osteoprotegerin gene expression and protein production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic cells (Abstract). Program of the 83rd Annual Me-

- eting of the Endocrine Society, Denver, CO, 2001; p. 254-5.
74. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity *Cell* 2001;104:1-20.
 75. Frost HM. The role of changes in mechanical usage set points in the pathogenesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1992;7:253-61.
 76. Frost HM. Perspective: on the estrogen-bone relationship and postmenopausal bone loss. *J Bone Miner Res* 1999;14:1473-7.
 77. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int* 1993;53:S102-S7.
 78. Damien E, Price JS, Lanyon LE. Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in males as well as females. *J Bone Miner Res* 2000;15:2169-77.
 79. Zaman G, Cheng MZ, Jessop HL, White R, Lanyon LE. Mechanical strain activates estrogen response elements in bone cells. *Bone* 2000;27:233-9.
 80. Jessop HL, Sjöberg M, Cheng MZ, Zaman J, Wheeler-Jones CPD, Lanyon LE. Mechanical strain and estrogen activate estrogen receptor alpha in bone cells. *J Bone Miner Res* 2001;16:1045-55.
 81. Wehling M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 1997;59:365-93.
 82. Kousteni S, Bellido T, Han L, Plotkin L, O'Brien CA, Bodenner DL, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen and androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001;104:1-20.
 83. Terrasawa E, Fernández DL. Neurobiological mechanism of the onset of puberty in primates. *Endocrinol Rew* 2001;22:111-51.
 84. Vanderschueren D, Boonen S, Ederveen AG, de Coster R, van Herck E, Moermans K, et al. Skeletal effects of estrogen deficiency as induced by an aromatase inhibitor in an aged male rat model. *Bone* 2000;27:611-7.
 85. Vandenput L, Swinnen JV, van Herck E, Verstuyf A, Boonen S, Bouillon R, et al. The estrogen receptor ligand ICI 182,780 does not impair the bone-sparing effects of testosterone in the young orchidectomized rat model. *Calcif Tissue Int* 2002;70:170-5.
 86. Grumbach MM. Estrogen, bone, growth and sex: a sea change in conventional wisdom. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:1439-55.
 87. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R. An aged rat model of partial androgen deficiency: prevention of both loss of bone and lean body mass by low-dose androgen replacement. *Endocrinology* 2000;141:1642-7.
 88. Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R, Vanderschueren D. Evidence from the aged orchidectomized male rat model that 17 beta-estradiol is more effective bone-sparing and anabolic agent than 5 alpha-dihydrotestosterone. *J Bone Miner Res* 2002;17:2080.
 89. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289:1501-4.
 90. Tanner JM. Normal growth and techniques of growth assessment. *Clin Endocrinol Metab* 1986;15:411-51.
 91. Frost HM. The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporosis and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone Miner* 1987;2:73-85.
 92. Bhasin S, Storer TW, Berman N, Yarasheski KE, Clevenger B, Phillips J, et al. Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:407-13.
 93. Albright F, Reifenstein EC. Metabolic bone disease: osteoporosis. In: Albright F, Reifenstein EC, editors. *The parathyroid glands and metabolic bone disease*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1948.
 94. Labrie F, Belanger A, Cusan L, Gómez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *Endocrinology* 1997;82:2396-402.
 95. Good C, Tulchinsky M, Mauger D, Demers LM, Legro R. Bone mineral density and body composition in lean women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1999;72:21-5.
 96. Bertelloni S, Baroncelli GI, Sorrentino MC, Costa S, Battini R, Saggese G. Androgen-receptor blockade does not impair bone mineral density in adolescent females. *Calcif Tissue Int* 1997;61:1-5.
 97. Prezelj J, Kocijancic A. Antiandrogen treatment with spironolactone and linestrenol decreases bone mineral density in eumenorrhoeic women with androgen excess. *Horm Metab Res*, 1994.
 98. Simberg N, Tiitinen A, Silfvast A, Viinikka L, Ylikorkala O. High bone density in hyperandrogenic women: effect of gonadotropin-releasing hormone agonist alone or in conjunction with estrogen-progestin replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:646-51.
 99. Moghetti P, Castello R, Zamberlan N, Rossini M, Gatti D, Negri C, et al. Spironolactone, but not flutamide, administration prevents bone loss in hyperandrogenic women treated with gonadotropin-releasing hormone agonist. *J Clin* 1999;84:1250-4.
 100. Gurnell EM, Chatterjee VK. Dehydroepiandrosterone replacement therapy. *Eur J Endocrinol* 2001;145:103-6.
 101. Barrett-Connor E, Kritiz-Silverstein D, Edelstein SL. A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and bone mineral density in older men and women. *Am J Epidemiol* 1993;137:201-6.
 102. Greendale GA, Edelstein S, Barrett-Connor E. Endogenous sex steroids and bone mineral density in older women and men: the Rancho Bernardo study. *J Bone Miner Res* 1997;12:1833-43.
 103. Rosenberg MJ, King TDN, Timmons MC. Estrogen-androgen for hormone replacement. *J Reprod Med* 1997;42:394-404.
 104. Davis S. Androgen replacement in women: a commentary. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1886.
 105. Tobias JH, Compston JE. Does estrogen stimulate osteoblast function in postmenopausal women? *Bone* 1999;24:121-4.
 106. Baran DT, Bergfeld MA, Teitelbaum SL, Avioli LV. Effect of testosterone therapy on bone formation in an osteoporotic hypogonadal male. *Calcif Tissue Res* 1978;26:103-6.
 107. Francis RM, Peacock M, Aaron JE, Selby PL, Taylor GA, Thompson J, et al. Osteoporosis in hypogonadal men: role of decrease plasma 1,25-dihydroxyvitamin D, calcium malabsorption, and low bone formation. *Bone* 1986;7:261-8.
 108. Benito M, Gomberg B, Wehrli FW, Weening RH, Zemel B, Wright AC, et al. Deterioration of trabecular architecture in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1497-502.
 109. Seeman E, Melton LJ, O'Fallon WM, Riggs BL. Risk factors for spinal osteoporosis in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;88:1497-502.
 110. Stanley HL, Schmitt BP, Poses RM, Deiss WP. Does hypogonadism contribute to the occurrence of a minimal trauma hip fracture in elderly men? *J Am Geriatr Soc* 1991;39:766-71.
 111. Leifke E, Konec H-C, Link TM, Behre HM, Peters PE, Nieschlag E. Effects of testosterone replacement therapy on cortical and trabecular bone mineral density, vertebral body area and paraespal muscle area in hypogonadal men. *Eur J Endocrinol* 1997;138:51-8.
 112. Finkelstein JS, Klubanski A, Neer RM, Doppelt SH, Rosenthal DI, Segre GV, et al. Increases in bone density during treatment of men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:776.
 113. Guo C-Y, Jones TH, Eastell R. Treatment of isolated hypogonadotropic hypogonadism effect on bone mineral and bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:658-65.
 114. Greenspan SL, Oppenheim DS, Klubanski A. Importance of gonadal steroids to bone mass in men with hyperprolactinemic hypogonadism. *Ann Intern Med* 1989;110:526-31.
 115. Marcus R, Leary D, Schneider DL, Shane E, Favus M, Quigley CA. The contribution of testosterone to skeletal development and maintenance: lessons from the androgen androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1032-7.
 116. Mizunuma H, Soda M, Okano H, Kagami I, Miyamoto S, Ohsawa M, et al. Changes in bone mineral density after orchidectomy and hormone replacement therapy in individuals with androgen insensitivity syndrome. *Hum Reprod* 1998;13:2816-8.
 117. Bertollini S, Baroncelli GI, Federico G, Cappa M, Lala R, Saggese G. Altered bone mineral density in patients with complete androgen insensitivity syndrome. *Horm Res* 1998;50:309-14.