

LEPTINA Y HUESO: MECANISMOS MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN LEPTINA-OSTEOBLASTO

J.M. QUESADA GÓMEZ

UNIDAD DE METABOLISMO MINERAL. HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA. CÓRDOBA. ESPAÑA.

La leptina es una hormona polipeptídica de 116 aminoácidos y 14 kD, producida principalmente por las células del tejido adiposo blanco. Además de su conocido papel anorexígeno vía sistema nervioso central (SNC), y sobre el adipocito regulando el balance energético, la leptina tiene receptores distribuidos por múltiples tejidos y células del organismo, donde modula diversos ejes endocrinos, actúa sobre el desarrollo sexual, la reproducción, función gastrointestinal, activación simpática, modula la hematopoyesis, la inmunidad y estimula el desarrollo de células pulmonares, y la angiogénesis. Estas acciones pleiotrópicas de la leptina se producen sobre tejidos periféricos directamente o a través de un mecanismo central, involucrando un sistema de señalización mediante el sistema nervioso simpático.

También se han descrito acciones de la leptina sobre el hueso, donde la leptina también ejerce sus acciones mediante dos mecanismos alternativos: uno periférico, directo, estimulante de la formación y crecimiento óseo que inhibe la resorción ósea y otro central, indirecto a nivel hipotalámico, que inhibe la formación ósea y probablemente también la resorción ósea.

PALABRAS CLAVE: resorción ósea, formación ósea, células estromales de la médula ósea (MSC), osteoblastos, adipocitos, condroblastos, ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$ (RANK-L), osteoprotegerina, factor de crecimiento insulínico (IGF-I), densidad mineral ósea, neuropéptido Y, bloqueadores beta.

Leptin is a polypeptidic hormone having 116 amino acids and 14 kD, mainly produced by the white adipose tissue cells. Besides its known anorexigenic role via the SNC and on the adipocyte, regulating the energetic balance, leptin has receptors distributed through multiple tissues and cells of the organism, where it modulates different endocrine axes, acts on sexual development, reproduction, gastrointestinal function, sympathetic activation, modulates hematopoiesis, immunity and stimulates the development of pulmonary cells, and angiogenesis. These pleiotropic actions of leptin are produced on peripheral tissues directly or through a central mechanism, involving a signalling system through the sympathetic nervous system. Actions of leptin have also been described on the bone, where leptin also exerts its actions by two alternative mechanisms: one peripheral, direct, stimulant of bone formation and growth and inhibiting bone resorption and another central, indirect on the hypothalamic level that inhibits bone formation and probably also bone resorption.

KEY WORDS: bone resorption, bone formation, bone marrow stromal cells (MSC), osteoblasts, adipocytes, chondroblasts, receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$ ligand (RANK-L), osteoprotegerin, insulin growth factor (IGF-I), bone mineral density, neuropeptide Y, β blockers.

«Deberíamos simplificar todas las cosas lo más posible, pero no más».

Albert Einstein.

El Mundo como yo lo veo, 1949.

La delgadez, independientemente de su causa, constituye un factor de riesgo de osteoporosis¹, mientras que la obesidad ejerce efectos protectores del esqueleto y constituye la condición excepcional donde la obesidad ejerce un papel protector sobre el organismo²⁻⁶. Esta acción protectora se relaciona con la masa grasa, de hecho en las mujeres se ha descrito una correlación positiva entre ella y la densidad mineral ósea (DMO)⁷⁻⁹. Tras la menopausia, un mayor índice de masa corporal se asocia con una menor pérdida de masa ósea^{10,11}, mientras que la disminución de la

masa grasa aumenta el riesgo de fracturas en los ancianos¹².

Este importante papel protector de la masa grasa sobre la masa ósea no depende tan sólo del estrés del sobrepeso sobre el hueso, potente y conocido estímulo osteogénico, sino más bien de otros factores hormonales⁹. Un importante y potente factor de mantenimiento de la masa ósea tras la menopausia lo constituye la aromatización de andrógenos a estrógenos, y la síntesis de estrógenos por el tejido adiposo, lo que unido a la disminución de la proteína transportadora de hormonas sexuales (SHBG) representa una gran fuente de estrógenos tras la menopausia¹³.

La insulina tiene efectos mitogénicos sobre los osteoblastos, por lo que se pensó que podría contribuir a la mayor DMO en pacientes obesas¹⁴; sin embargo, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y niveles circulantes de insulina, se ha encontrado masa ósea alta, baja y normal¹⁵.

Recientemente, se ha concedido una gran atención a la leptina como posible factor mediador de la osteogénesis aumentada en los obesos.

La leptina es una hormona polipeptídica de 116 aminoácidos y 14 kD, producida principalmente por las células del tejido adiposo blanco, descubierta en 1994¹⁶, y que ha despertado el interés de muchos investigadores por su gran cantidad de interesantes acciones, en ocasiones antagónicas, en el organismo. Inicialmente, se describió que estaba relacionada con el gen de la obesidad e involucrada con la saciedad y el balance energético y se la propuso como factor anti-obesidad mediante un papel que ligaba el adipocito con el hipotálamo¹⁶. La leptina es una hormona decisiva en la regulación de la ingesta, así como del peso corporal tanto en animales como en seres humanos, de hecho en numerosos estudios se encuentra una correlación positiva entre leptina y masa grasa¹⁷. A través de esa vía se vislumbró la posibilidad de que esta hormona pudiera tener un papel destacado en el metabolismo óseo.

La leptina, además de su conocido efecto anorexígeno vía sistema nervioso central (SNC), y sobre el adipocito regulando el balance energético^{18,19} tiene receptores en otros tejidos periféricos como gónadas,

Correspondencia: J.M. Quesada.
Unidad de Metabolismo Mineral.
Hospital Universitario Reina Sofía.
Avda. Menéndez Pidal s/n
14004 Córdoba.

adrenales, páncreas, vasos sanguíneos, tejido hematopoyético, células inmunes, musculares y óseas¹⁹, donde modula diversos ejes endocrinos, actúa en el desarrollo sexual, la reproducción, función gastrointestinal, activación simpática, ejerce como factor de crecimiento sobre precursores de la hematopoyesis e inmunidad estimulando el desarrollo de células pulmonares y la angiogénesis por su acción sobre las células endoteliales vasculares y más recientemente sobre el hueso²⁰⁻²².

Este conjunto de acciones pleiotrópicas de la leptina son debidas a su capacidad de actuar directamente sobre los tejidos periféricos o vía mecanismo central, involucrando un sistema de señalización mediante el sistema nervioso simpático (SNS)^{20,21}. Sobre la masa ósea, la leptina también parece ejercer sus acciones mediante dos mecanismos alternativos^{23,24}: uno periférico, directo, estimulante de la formación, y crecimiento óseo²⁵ y otro central, indirecto a nivel hipotalámico que suprime la formación ósea^{26,27}; muy recientemente, se ha descrito que el mecanismo hipotalámico indirecto de acción ósea de la leptina inhibe también la resorción ósea (fig. 1).

Por lo tanto, aunque en el momento actual no está bien definido si la leptina debe considerarse un factor anti-osteogénico o un factor anabolizante para la formación

ósea, tal vez para un entendimiento más exacto del papel de la leptina sobre el metabolismo mineral, éste debería considerarse dentro del amplio contexto del papel regulador de la leptina como reguladora de crecimiento, fertilidad y gasto energético²⁸.

EVIDENCIA DE EFECTO PERIFÉRICO DIRECTO Y POSITIVO DE LA LEPTINA SOBRE EL REMODELADO ÓSEO

Las células estromales de la médula ósea (MSC) tienen una gran plasticidad para diferenciar en osteoblastos, adipocitos, mioblastos y condroblastos²⁹.

Recientemente se ha demostrado *in vitro* que las MSC poseen tanto la forma larga como corta del receptor de la leptina, la cual es capaz de activar los mecanismos de señalización adecuados para la diferenciación a osteoblastos e inhibición de diferenciación hacia adipocitos, y además estimula el desarrollo de precursores hematopoyéticos²⁹⁻³¹.

Las isoformas del receptor de la leptina persisten en osteoblastos maduros³¹⁻³³ donde induce la proliferación y diferenciación de los mismos con síntesis de proteí-

nas de la matriz ósea tales como el colágeno tipo I, osteocalcina etc.^{30,31,34}; Además, la leptina inhibe la apoptosis de los osteoblastos³⁴, e incrementa la mineralización^{35,36}. Todo ello en su conjunto promueve un importante incremento en la formación ósea, lo cual apoya el concepto de la leptina como agente anabólico óseo directo. Además de las acciones sobre los osteoblastos, hay evidencias consistentes de que la leptina regula directamente el desarrollo osteoclástico y modula la resorción ósea. La leptina, incluso a bajas concentraciones ($\geq 10^{-11}$), inhibe la expresión del ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$ (RANK-L), además induce la producción de osteoprotegerina (OPG), (señuelo del RANK-L en su unión con el RANK en las células mononucleares precursoras de los osteoclastos) tanto en osteoclastos como en sus precursores estromales^{35,37,38}. En consecuencia, la leptina inhibe la osteoclastogénesis^{37,38}. Además la leptina inhibe en monocitos y linfocitos la expresión del antagonista del receptor de la interleucina 1^{39,40}, lo que reduce el reclutamiento de osteoclastos en determinados estímulos como la deficiencia estrogénica.

Estos datos *in vitro* fueron confirmados por estudios de intervención *ex vivo*, que evaluaban los efectos de la acción de la administración periférica de leptina. Su administración a ratones ob/ob deficitarios en la hormona producía un efecto estimulador sobre el hueso⁴¹, con un gran incremento en la formación de hueso cortical⁴². De hecho, la administración subcutánea de leptina a ratas era suficiente para prevenir más de la mitad de la pérdida de hueso y las alteraciones estructurales inducidas por la deficiencia estrogénica³⁷, o inducidas por desuso en el modelo de suspensión de los ratones por la cola⁴³; la leptina en ratones adultos y sexualmente maduros aumentaba la resistencia mecánica en un 27%⁴¹.

Por tanto, los resultados *ex vivo*, avalaban que la leptina estimulaba la formación y disminuía la resorción ósea^{37,41,42,44}.

Además, la leptina tiene receptores en condrocitos, en los que induce tanto la proliferación como la diferenciación^{35,36,45,46}, estos efectos podrían ser directos o podrían estar mediados por el sistema del factor de crecimiento insulínico (IGF), me-

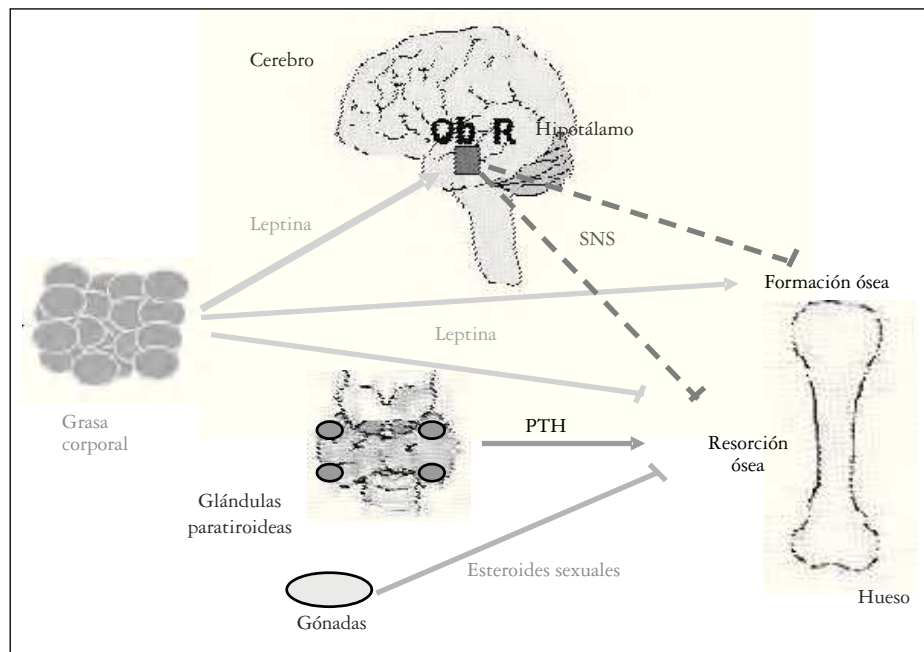


Fig. 1. La leptina ejerce sus acciones sobre hueso mediante dos mecanismos: uno periférico, directo estimulante de la formación y crecimiento óseo, y otro central, indirecto a nivel hipotalámico que suprime la formación y puede que frene la resorción ósea^{26,27}. PTH: hormona paratiroides.

dante la regulación de la expresión del receptor de IGF-I. Además, la leptina es un potente estimulador de la secreción de la hormona de crecimiento tanto a nivel central hipofisario⁴⁷, como por los linfocitos⁴⁸. Por otra parte, Gat-Yablonski et al.⁴⁹ han descrito que la leptina es capaz de estimular el crecimiento del hueso, independientemente del sistema IGF; el tratamiento con leptina corrige la deficiencia de crecimiento inducida por ayuno, pese a la gran reducción de niveles séricos del IGF-I⁴⁹.

Estos efectos sobre el esqueleto han posibilitado que se proponga que el aumento de la leptina ha sido un importante factor intermediario del aumento de estatura observado en las generaciones a la largo del siglo pasado^{25,50}.

La mayoría de los estudios de que disponemos *ex vivo* en seres humanos son estudios transversales, podríamos resumirlos como no concluyentes. De hecho, algunos autores han publicado una asociación positiva entre niveles séricos de leptina y DMO⁵¹⁻⁵⁶ o contenido mineral óseo⁵⁷, pero otros autores no encontraron dicha asociación⁵⁸⁻⁶⁰, o incluso esta asociación era negativa^{61,62}. Además, cuando se ajusta por la grasa corporal esa asociación incluso desaparece en algunos estudios^{53,55-57}.

Por otra parte, los marcadores de remodelado óseo, en algunos estudios no mostraban relación^{52,58} o mostraba una relación negativa entre los marcadores de resorción y la leptina⁵¹, incluso tras ajustar con la grasa corporal⁶³.

Se han llevado a cabo pocos estudios de intervención en seres humanos, pero en un ensayo corto muy interesante realizado en mujeres con amenorrea hipotalámica el tratamiento durante tres meses con el análogo r-metHu Leptina provocó una elevación significativa de los marcadores óseos de remodelado osteocalcina y fosfatasa alcalina, pero no de los N-telopéptidos urinarios⁶⁴.

No obstante, en mujeres posmenopáusicas con fracturas vertebrales los niveles séricos de leptina estaban disminuidos de modo significativo⁵³. Este trabajo fue confirmado el pasado año por Schett et al.⁶⁵, que evaluaron la asociación potencial entre niveles séricos de leptina y riesgo de fracturas periféricas y vertebrales clínicas, demostrando que niveles de leptina en el

tercil alto disminuyen el riesgo de sufrir una fractura no traumática.

Se ha propuesto que la leptina protege de la fractura aumentando la calidad ósea⁶⁶: aumentando la resistencia como sucede en los ratones³⁵, o mediante un aumento del compartimento cortical del hueso como ha propuesto Matkovic⁶⁷, con un resultado neto sobre el momento de inercia y la resistencia ósea. La leptina también podría mejorar la calidad ósea disminuyendo el recambio óseo^{51,63,65}, predictor independiente del riesgo de fractura⁶⁸.

El conjunto de estos datos tomados colectivamente confirmaban el pensamiento colectivo de la contribución de la leptina como factor hormonal intermediario positivo de las relaciones entre masa grasa y masa ósea.

Sin embargo, al tiempo que se daban a conocer estos datos de la acción periférica de la leptina Ducy et al.⁶⁹ describieron una novedosa, sorprendente, e intrigante acción negativa de la leptina sobre el hueso a través de un efecto hipotalámico central.

EVIDENCIA DE EFECTO CENTRAL DE LA LEPTINA. REGULACIÓN NEGATIVA DEL METABOLISMO ÓSEO

El grupo de Karsenty^{69,70}, sugirió que la leptina ejerce un efecto negativo sobre la formación ósea, al observar que los ratones deficientes en leptina (ob/ob) y los ratones con receptor mutado, e inactivo para la leptina (db/db), tenían una aposición mineral más elevada y una masa ósea trabecular un 40% más elevada que los ratones normales, pese a su hipogonadismo e hipercortisolismo constitucional.

La señalización defectuosa de la leptina y no el sobrepeso parecía ser la causa de la formación elevada de hueso, puesto que el ratón transgénico «sin grasa» A-ZIP/F1 con un nivel bajo de leptina debido a su lipodistrofia también presentaba un fenotipo de elevada masa ósea^{69,71}; mientras que el ratón deficiente en el receptor-4 de melanocortina, aunque obeso, no presenta modificaciones importantes en la masa ósea^{72,73}. Además, en ratones ob/ob el incremento de masa ósea podría revertirse

mediante la expresión transgénica de leptina⁷⁴.

Una vez secretada por los adipocitos, la leptina debe traspasar la barrera hematoencefálica, llegar al sistema nervioso central y ejercer su acción uniéndose a un receptor hipotalámico. Así la infusión intracerebro-ventricular (ICV) de leptina aún a dosis bajas tanto en ratones ob/ob, db/db, como en normales disminuye la masa ósea^{69,70}, sin que se produzca un incremento en la leptina circulante, lo que nos indica que la leptina controla la formación ósea a través de un mecanismo hipotalámico⁷⁵.

IDENTIFICACIÓN DE LAS NEURONAS HIPOTALÁMICAS RESPONSABLES DE LA FUNCIÓN ANTIOSTEOGÉNICA DE LA LEPTINA

La leptina activa varios núcleos neuronales hipotalámicos muy ricos en receptores de leptina, donde posee la forma de receptores largos del receptor de leptina (OB-Rb), como el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH) o núcleo arcuato (ARC)⁷⁶. Para identificar los que controlan la formación ósea se utilizaron las técnicas de ablación farmacológica que hace varias décadas se emplearon para identificar los centros del hambre y de la saciedad⁷⁷.

La destrucción farmacológica con glutamato monosódico de las neuronas anoréxicas del ARC no afectan la masa ósea, sin embargo la destrucción del VMH con tioglucosa de oro (GTG) convierte a los ratones en moderadamente obesos, pero incrementan la masa ósea de un modo semejante a los ratones ob/ob⁷³, mientras que la infusión cerebroventricular de leptina a los ratones ob/ob tratados con GTG que destruye el VMH, produce disminución de su peso corporal pero no modifica su masa ósea.

Estos datos indican con claridad que la acción antiosteogénica hipotalámica de la leptina está fundamentalmente mediada por las neuronas del núcleo ventromedial⁷³.

No obstante, estos datos no excluyen la existencia de otras vías neuronales involucradas en el control de la masa ósea, así Balock ha demostrado que la delección del

receptor específico del neuropéptido Y-2 del núcleo arcuato hipotalámico produce un aumento de masa ósea⁷⁸, lo cual indica que esos receptores regulan la formación ósea modificando la función autonómica.

Paradójicamente los ratones deficientes en neuropéptido Y tienen masa ósea normal, lo cual contrasta con los resultados del ratón deficiente en el receptor NPY2⁷⁹ e indica que otro miembro de esta familia de neuropéptidos sería el ligando del receptor NPY2; por otra parte el ratón deficiente en NPY4 tenía una masa ósea normal, mientras que el ratón doble *knockout* de receptores NPY2 y NPY4 tiene un mayor incremento de volumen óseo que el ratón deficiente sólo en el receptor NPY2^{80,81}.

En varios modelos de ratones mutantes se ha demostrado que las funciones antiosteogénicas de la leptina no involucran mecanismos de la MSH o la CART (*cocaine- and amphetamine- regulated transcript*), las cuales son críticas en la acción anoréxigena de la leptina⁷³.

EL SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO LIGA EL CEREBRO Y EL HUESO

Experimentos realizados mediante la técnica de parabiosis sugerían que el mediador neuronal de la acción antiosteogénica de la leptina era un factor humoral, o más probablemente un mediador neuronal⁷³.

Los ratones *ob/ob* deficientes en leptina tienen un bajo tono simpático⁸², la leptina a través del núcleo VMH aumenta la actividad del SNS, incrementando la secreción de catecolaminas⁸³, lo cual apoyaba la hipótesis de que el SNS podría ser el mediador de las acciones antiosteogénicas de la leptina⁸⁴.

Para evaluar esa hipótesis se estudiaron ratones deficientes en dopamina β hidroxilasa, que no pueden sintetizar adrenalina ni noradrenalina, los cuales, pese a tener concentraciones séricas elevadas de corticosterona y dopamina, tenían una elevada masa ósea debido a la formación aumentada⁷³; en estos ratones la inyección ICV de leptina inducía pérdida de peso, pero no se producía la acción antiosteogénica de la leptina.

Todo ello indica claramente que a) el SNS no resulta esencial para la acción de la leptina sobre el peso corporal y b) que la acción antiosteogénica de la leptina es mediada (al menos parcialmente) por el SNS⁷³.

Apoyando estos hallazgos, se detectaron terminaciones nerviosas productoras de catecolaminas, demostrándose la expresión de receptores β₂-adrenérgicos ubicados en la superficie de los osteoblastos y no de otro tipo. Los osteoblastos de cultivos primarios producen AMPc en respuesta al tratamiento con agonistas β-adrenérgicos, lo que avala la funcionalidad de estos receptores⁷³.

La demostración de que la modulación del SNS afecta a la masa ósea se produjo restaurando la actividad simpática en ratones *ob/ob* inyectando isoproterenol, un agonista β-adrenérgico no selectivo, lo que disminuía la masa ósea, sin modificar el peso corporal; resultados similares se observaron en ratones normales⁷³.

El propranolol, un bloqueador beta no selectivo, aumenta la masa ósea en ratones normales sin modificar el peso, y protege de la pérdida de masa ósea en ratas ovariectomizadas. Por otra parte, la infusión ICV de leptina en ratones tratados con propranolol produce una importante pérdida de peso, sin disminuir la masa ósea.

A la luz de los datos hasta aquí expuestos de la investigación sobre los mecanismos de las acciones centrales hipotalámicas de la leptina, se puede concluir que inhibe la formación ósea mediante el SNS⁷³; además, recientemente se ha publicado que la leptina podría inhibir mediante un mecanismo central indirecto la resorción ósea⁸⁴. (figs. 1 y 2).

Teniendo en cuenta la necesidad de fármacos anabolizantes para el tratamiento de la osteoporosis, fruto de esta investigación fue la hipótesis del empleo de bloqueadores beta para el tratamiento de la osteoporosis, dado que parecen incrementar la masa ósea^{26,27,85}.

Los primeros estudios confirmaron los posibles efectos favorables de los bloqueadores beta sobre el incremento de masa ósea y la disminución del riesgo de fractura^{86,87}, pero las publicaciones más recientes no asocian los bloqueadores beta con cambios de marcadores de remodela-

do que indiquen modificaciones en el metabolismo mineral, y justifican su empleo para aumentar la DMO y/o disminuir el riesgo de fractura⁸⁸, ni se asocian con modificaciones significativas de la DMO, ni del riesgo de fractura, (*hazards ratios* para cualquier fractura: 0,92 [0,81, 1,05], para fractura de muñeca 0,74 [0,54, 1,01] y para la fractura de cadera 0,76 [0,58, 0,99]⁸⁹).

En cualquier caso, hacen falta ensayos clínicos prospectivos que evalúen el efecto de los bloqueadores beta en el tratamiento de la osteoporosis.

El conocimiento de la modulación del SNS de la osteogénesis puede tener trascendencia en patologías como la distrofia simpática refleja, una enfermedad caracterizada por una *up regulation* del SNS en una zona localizada del hueso, acompañada de osteopenia local, y que tiene como uno de los tratamientos más eficaces los bloqueadores beta⁹⁰.

En resumen, las acciones periféricas y centrales de la leptina pueden tener una gran repercusión en el metabolismo óseo, hasta el punto de que su manipulación farmacológica puede tener importantes implicaciones terapéuticas en el tratamiento de la osteoporosis en un futuro próximo.

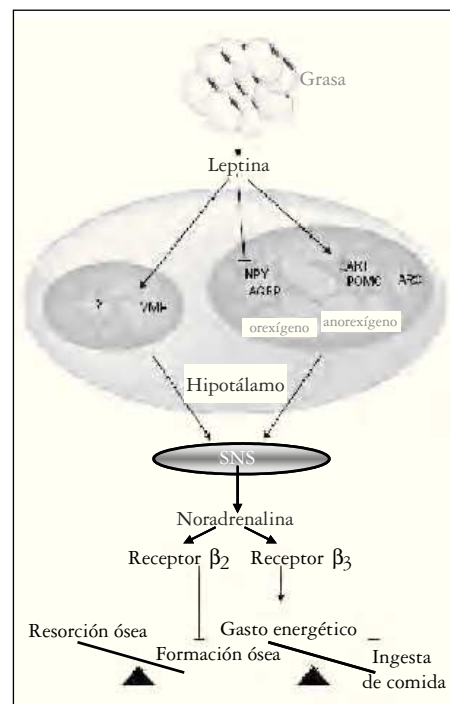


Fig. 2. Mecanismos de actuación hipotalámica de la leptina sobre hueso y metabolismo energético. Modificada de Cock TA et al²⁷. SNS: sistema nervioso simpático.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ravn P, Cizza G, Bjarnason NH, Thompson D, Daley M, Wasnich RD, et al. Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. *J Bone Miner Res.* 1999;14:1622-7.
2. Seeman E, Melton LJ, O'Fallon WM, Riggs BL. Risk factors for spinal osteoporosis in men. *Am J Med.* 1983;75:977-83.
3. Melton III LJ, Kan SH, Frye MA, Wahner HW, O'Fallon WM, Riggs BL. Epidemiology of vertebral fractures in women. *Am J Epidemiol.* 1989;129:1000-11.
4. Pocock N, Eisman J, Gwinn T, Sambrook P, Kelly P, Freund J, et al. Muscle strength, physical fitness, and weight but not age predict femoral neck bone mass. *J Bone Miner Res.* 1989; 4:441-8.
5. Slemenda CW, Hui SL, Longcope C, Wellman H, Johnston Jr CC. Predictors of bone mass in perimenopausal women. *Ann Intern Med.* 1990;112:96-101.
6. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of weight, and body mass index on bone mineral density in men and women. *J Bone Miner Res.* 1993;8:567-73.
7. Reid IR, Plank LD, Evans MC. Fat mass is an important determinant of whole body bone density in premenopausal women but not in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75:779-82.
8. Khosla S, Atkinson EJ, Riggs BL, Melton LJ. Relationship between body composition and bone mass in women. *J Bone Miner Res.* 1996; 11:857-63.
9. Hla MM, Davis JW, Ross PD, Wasnich RD, Yates AJ, Ravn P, et al. A multicenter study of the influence of fat and lean mass on bone mineral content: evidence for differences in their relative influence at major fracture sites. *Am J Clin Nutr.* 1996;64:354-60.
10. Tremollieres FA, Pouilles JM, Ribot C. Vertebral postmenopausal bone loss is reduced in overweight women: a longitudinal study in 155 early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77:683-6.
11. Revilla M, Villa LF, Sánchez-Atrio A, Hernández ER, Rico H. Influence of body mass index on the age-related slope of total and regional bone mineral content. *Calcif Tissue Int.* 1997;61:134-8.
12. Schott AM, Cormier C, Hans D, Favier F, Hausheer E, Dargent-Molina P, et al. How hip and whole-body bone mineral density predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *Osteoporosis Int.* 1998;8:247-54.
13. Grodin JM, Siiteri PK, McDonald PC. Source of estrogen production in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1973;36:207-14.
14. Reid IR, Evans Mc, Cooper GJ, Ames RW, Stapleton J. Circulating insulin levels are related to bone density in normal postmenopausal women. *Am J Physiol.* 1993;265:E655-9.
15. Thomas DM, Ng KW, Best JD. Insulin and bone. A clinical a scientific review. *Endocrinol Metab.* 1997;4:5-17.
16. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:472-81.
17. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N Engl J Med.* 1996;334:292-5.
18. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 2001;104:531-43.
19. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998;395:763-70.
20. Flier JS. Leptin expression and action: new experimental paradigms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:4242-5.
21. Flier JS. What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:1407-13.
22. Whipple T, Sharkey N, Demers L, Williams N. Leptin and the skeleton. *Clin Endocrinol.* 2002;57:701-11.
23. Thomas T. The complex effects of leptin on bone metabolism through multiple pathways. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4:295-300.
24. Khosla S. Endocrinology. Leptin: central or peripheral to the regulation of bone metabolism? *Endocrinology.* 2002;143:4161-4.
25. Reid ID, Comish J. Direct actions on bone remodelling. *Calcif Tissue Int.* 2004;74:313-6.
26. Takeda S. Central control of bone remodelling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328: 697-9.
27. Cock TA, Auwerx J. Leptin: cutting the fat off the bone. *Lancet.* 2003; 362:1572-4.
28. Hamrick M W. Leptin, bone mass, and the thrifty phenotype. *J Bone Miner Res.* 2004;19: 1607-11.
29. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, Mc farlane C, Ng A, et al. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:15564-8.
30. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology.* 1999;140:1630-8.
31. Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, et al. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res.* 2001;16:1426-33.
32. Enjuanes A, Supervia A, Nogues X, Diez-Pérez A. Leptin receptor (OB-R) gene expresión in human primary osteoblast confirmation. *J Bone Miner Res.* 2002; 17:1135.
33. Reseland JE, Gordeladze JO. Role of leptin in bone growth: central player or peripheral supporter? *FEBS lett.* 2002; 528: 40-2.
34. Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem.* 2002;85:825-36.
35. Cornish J, Callon KE, Bava U, Lin C, Naot D, Hill BL, et al. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *J Endocrinol.* 2002;175:405-15.
36. Iwaniec UT, Shearon CC, Heaney RP, Cullen DM, Yee JA. Leptin increases number of mineralized bone nodules in vitro. *Bone.* 1988; 23 Supl:S212.
37. Burguera B, Hofbauer L, Thomas T, Gori F, Lassam J, Laasko K, et al. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology.* 2001;142:3546-53.
38. Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, et al. Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res.* 2002;17:200-9.
39. Gabay C, Dreyer M, Pellegrinelli N, Chicheportiche R, Meier CA. Leptin directly induces the secretion of interleukin 1 receptor antagonist in human monocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:783-9.
40. Meier CA, Bobbioni E, Gabay C, Assimacopoulos-Jeannet F, Golay A, Dayer JM. IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin? *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87: 1184-8.
41. Steppan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke H, Swick AG. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regul Pept.* 2000;92:73-8.
42. Liu C, Grossman A, Bain S, Strachan M, Puerner D, Bailey C, et al. Leptine stimulates cortical bone formation in obese (ob/ob) mice. *J Bone Miner Res.* 1997;12 Supl 1:S115.
43. Martin A, de Vittoris R, David V, Moraes R, Begeot M, Lafage-Proust MH, et al. Leptin modulates both resorption and formation while preventing disuse-induced bone loss in tail-suspended female rats. *Endocrinology.* 2005;146: 3652-9.
44. Goldstone AP, Howard JK, Lord GM, Ghatei MA, Gardiner JV, Wang ZL, et al. Leptin prevents the fall in plasma osteocalcin during starvation in male mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;295:475-81. 87:4942-4945.
45. Maor G, Rochwerger M, Segev Y, Phillip M. Leptin acts as a growth factor on the chondrocytes of skeletal growth centers. *J Bone Miner Res.* 2002;17:1034-43.
46. Nakajima R, Inada H, Koike T, Yamano T. Effects of leptin to cultured growth plate chondrocytes. *Horm Res.* 2003;60:91-8.
47. Chan JL, Mantzoros C S. Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa. *Lancet.* 2005;366:74-85.
48. Dixit VD, Mielenz M, Taub DD, Parvizi N. Leptin induces growth hormone secretion from peripheral blood mononuclear cells via a protein kinase C- and nitric oxide-dependent mechanism. *Endocrinology.* 2003;144:5595-603.

49. Gat-Yablonski G, Ben-Ari T, Shtaf B, Potievsky O, Moran O, Eshet R, et al. Leptin reverses the inhibitory effect of caloric restriction on longitudinal growth. *Endocrinology*. 2004;145:343-50.
50. Reid ID. Has improved nutrition contributed to the hip fracture epidemic? *Mol Cell Endocrinol*. 1996;123:123-5.
51. Thomas T, Burguera B, Melton LJ III, Atkinson EJ, Riggs BL, Khosla S. Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women. *Bone*. 2001;29:114-20.
52. Goulding A, Taylor RW. Plasma leptin values in relation to bone mass and density and to dynamic biochemical markers of bone resorption and formation in post-menopausal women. *Calcif Tissue Int*. 1998;63:456-8.
53. Yamauchi M, Sugimoto T, Yamaguchi T, Nakaoka D, Kanzawa M, Yano S, et al. Plasma leptin concentrations are associated with bone mineral density and the presence of vertebral fractures in postmenopausal women. *Clin Endocrinol*. 2001;55:341-7.
54. Ruhl CE, Everhart JE. Relationship of serum leptin concentration with bone mineral density in the United States population. *J Bone Miner Res*. 2002;17:1896-903.
55. Blain H, Vuillemin A, Guillemin F, Durant R, Hanesse B, de Talancé N, et al. Serum leptin level is a predictor of bone mineral density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:1030-5.
56. Zoico E, Zamboni M, Adami S, Vettor R, Mazzali G, Tosoni P, et al. Relationship between leptin levels and bone mineral density in the elderly. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59:97-103.
57. Pasco JA, Henry MJ, Kotowicz MA, Collier GR, Ball MJ, Ugoni AM, et al. Serum leptin levels are associated with bone mass in nonobese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1884-7.
58. Rauch F, Blum WF, Klein K, Allolio B, Schonau E. Does leptin have an effect on bone in adult women? *Calcif Tissue Int*. 1998;63:453-5.
59. Odabasi E, Ozata M, Turan M, Bingol N, Yonem A, Cakir B, et al. Plasma leptin concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *Eur J Endocrinol*. 2000;142:170-3.
60. Martini G, Valenti R, Giovani S, Franci B, Campagna S, Nuti R. Influence of insulin-like growth factor-1 and leptin on bone mass in healthy postmenopausal women. *Bone*. 2001;28:113-7.
61. Ushiroyama T, Ikeda A, Hosotani T, Higashiyama T, Ueki M. Inverse correlation between serum leptin concentration and vertebral bone density in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol*. 2003;17:31-6.
62. Blum M, Harris SS, Must A, Naumova EN, Phillips SM, Rand WM, et al. Leptin, body composition and bone mineral density in premenopausal women. *Calcif Tissue Int*. 2003;73:27-32. 1997;12 Suppl 1:S115.
63. Roux C, Arabi A, Porcher R, Garnero P. Serum leptin as a determinant of bone resorption in healthy postmenopausal women. *Bone*. 2003;33:847-52.
64. Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, et al. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med*. 2004;351:987-97.
65. Schett G, Kiechl S, Bonora E, Redlich K, Wollszczuk W, Oberhollenzer F, et al. Serum leptin level and the risk of nontraumatic fracture. *Am J Med*. 2004;117:952-6.
66. Thomas T. Leptin and fragility fracture: evidence for a protective effect in humans. *Am J Med*. 2004;117:966-8.
67. Matkovic V, Ilich JZ, Skugor M, Badenhop NE, Goel P, Clairmont A, et al. Leptin is inversely related to age at menarche in human females. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:3239-45.
68. Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, Marcelli C, Grandjean H, Muller C, et al. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: The EPIDOS prospective study. *J Bone Miner Res*. 1996;11:1531-8.
69. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: A central control of bone mass. *Cell*. 2000;100:197-207.
70. Karsenty G. The central regulation of bone remodeling. *Trends Endocrinol Metabol*. 2000;11:437-9.
71. Ebihara K, Ogawa Y, Masuzaki H, Shintani M, Miyanaga F, Aizawa-Abe M, et al. Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes. *Diabetes*. 2001;50:1440-8.
72. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*. 1997;88:131-41.
73. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002;111:305-17.
74. Eleftheriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Ae Kim C, et al. Serum leptin level is a regulator of bone mass. *PNAS*. 2004;101:3258-63.
75. Ducy P, Schinke P, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 2000;289:1501-4.
76. Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, Flier JS. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci*. 1998;1:445-50.
77. Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*. 1999;22:221-32.
78. Baldock PA, Sainsbury A, Couzens M, Enriquez RF, Thomas GP, Gardiner EM, et al. Hypothalamic Y2 receptors regulate bone formation. *J Clin Invest*. 2002;109:915-21.
79. Eleftheriou F, Takeda S, Liu X, Armstrong D, Karsenty G. Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass. *Endocrinology*. 2003;144:3842-7.
80. Sainsbury A, Baldock PA, Schwarzer C, Ueno N, Enriquez RF, Couzens M, et al. Synergistic effects of Y2 and Y4 receptors on adiposity and bone mass revealed in double knockout mice. *Mol Cell Biol*. 2003;23:5225-33.
81. Baldock PA, Sainsbury A, Allison S, Lin EJ, Couzens M, Boey D, et al. Hypothalamic control of bone formation: distinct actions of leptin and Y2 receptor pathways. *J Bone Miner Res*. 2005;20:1851-7.
82. Young JB, Landsberg L. Diminished sympathetic nervous system activity in genetically obese (ob/ob) mouse. *Am J Physiol*. 1983;245:E148-54.
83. Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Tsuji T, Hayase M, et al. Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: leptin-induced increase in catecholamine secretion. *Diabetes*. 1999;48:1787-93.
84. Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*. 2005;434:514-20.
85. Takeda S, Eleftheriou F, Karsenty G. Common endocrine control of body weight, reproduction and bone mass. *Annu Rev Nutr*. 2003;23:4003-411.
86. Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA*. 2004;292:1326-32.
87. Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seeman E, Nicholson GC. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: geelong osteoporosis study. *J Bone Miner Res*. 2004;19:19-24.
88. Reid IR, Lucas J, Wattie D, Horne A, Bollam M, Gamble GD, et al. Effects of a beta-blocker on bone turnover in normal postmenopausal women: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:5212-6.
89. Reid IR, Gamble GD, Grey AB, Black DM, Ensrud KE, Browner WS, et al. beta-blocker use, BMD, and fractures in the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*. 2005;20:613-8.
90. Schwartzman RJ. New treatments for reflex sympathetic dystrophy. *N Engl J Med*. 2000;343:654-6.