

Volumen 9 · Número 1 · Enero-Marzo 2017

# Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

[www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com](http://www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com)



# 2º Curso de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas para Médicos Residentes

MADRID, JUEVES 15 DE JUNIO 2017 \*

HOSPITAL UNIVERSITARIO INFANTA LEONOR  
Gran Vía del Este, 80 - 28031 Madrid



Introducción y formación básica en el área de las enfermedades metabólicas óseas. Tanto la osteoporosis como otras enfermedades metabólicas óseas requieren de un manejo multidisciplinar con lo que este curso tiene como objetivo dar a conocer aspectos básicos de la epidemiología, diagnóstico, manejo clínico y farmacológico de estas enfermedades

## PROGRAMA

9-9:15	BIENVENIDA/ENTREGA DE LA DOCUMENTACIÓN	13-13:30	Hiperparatiroidismo primario, hiperparatiroidismo normocalcémico, hipoparatiroidismo postquirúrgico e idiopático <i>Dr. Guillermo Martínez Díaz-Guerra</i>
9:15-9:30	INAGURACIÓN DEL CURSO		
	<b>BLOQUE 1: FISIOPATOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS</b>		
9:30-10	Nuevos datos de la fisiopatología de la osteoporosis (el remodelado óseo a nivel celular y molecular. El sistema rankl. La vía Wnt-catenina) <i>Dr. Guillermo Martínez Díaz-Guerra</i>	13:30-15	COMIDA
10-10:30	Epidemiología de la osteoporosis en España <i>Dr. Ricardo Larrainzar</i>		<b>BLOQUE 4: FORMAS DE PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA OSTEOPOROSIS</b>
	<b>BLOQUE 2: FACTORES DE RIESGO Y DIAGNÓSTICO DE LA OSTEOPOROSIS</b>	15-15:30	FRACTURA OSTEOPORÓTICA
10:30-11	Pruebas complementarias en el abordaje inicial. (Escala de riesgo. Cuándo solicitar y cómo interpretar una densitometría. Análisis para estudio de secundarias. Marcadores remodelado óseo. Otras exploraciones) <i>Dr. M<sup>a</sup> Jesús Moro</i>	15-15:30	Fractura no vertebral (húmero, radio y cadera) <i>Dr. Ricardo Larrainzar</i>
11-11:30	CAFÉ	15.30-16	Fractura vertebral <i>Dr. Elena Martínez</i>
	<b>BLOQUE 3: ENFERMEDADES METABÓLICAS ÓSEAS DE MAYOR PREVALENCIA</b>		<b>BLOQUE 5: TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO Y FARMACOLÓGICO DE LA OSTEOPOROSIS. GUÍA CLÍNICA DE LA SEIOMM</b>
11:30-12	Osteoporosis (postmenopáusica, del varón, corticoidea osteoporosis secundaria) <i>Dr. José Luis Pérez Castrillón</i>	16-16:30	Tratamiento de la osteoporosis. Guía clínica SEIOMM <i>Dr. Javier del Pino</i>
12.-12:30	Enfermedad de Paget <i>Dr. Javier del Pino</i>	16.30-17	Efectos adversos de los tratamientos <i>Dr. Elena Martínez</i>
12:30-13	Efectos sobre el metabolismo óseo de la cirugía bariátrica. Osteomalacia. Osteodistrofia renal <i>Dr. José Luis Pérez Castrillón</i>	17-17:30	Tratamiento del dolor en la osteoporosis (analgésicos, vertebroplastia y cifoplastia, bloqueos anestésicos) <i>Dr. Alejandro Ortega</i>
		17.30-18	CAFÉ
		18-19	Osteotriaval: taller casos clínicos. <i>Dr. M<sup>a</sup> Jesús Moro</i>

### PONENTES

#### Dr. Jose Luis Pérez Castrillón

Medicina Interna. Hospital Rio Hortega. Valladolid

#### Dr. Javier Del Pino

Reumatología. Hospital Clínico. Salamanca

#### Dr. Alejandro Ortega

Anestesiología. Unidad del dolor. Asepeyo, Coslada. Madrid

#### Dr. Guillermo Martínez Díaz-Guerra

Endocrinología. Hospital 12 de Octubre. Madrid

#### Dr. Ricardo Larrainzar

Traumatología. Hospital Infanta Leonor-Virgen de la Torre Madrid

#### Dra. Elena Martínez

Rehabilitación. Hospital Ramón y Cajal. Madrid

#### Dr. M<sup>a</sup> Jesús Moro

Medicina Interna. Hospital Infanta Leonor-Virgen de La Torre Madrid

INSCRIPCIÓN GRATUITA  
AFORO LIMITADO A 40 PLAZAS

Preinscripción en el siguiente enlace:

<https://goo.gl/forms/WUbbEjDorTAXGLOC3>

Para más información:

seiommm@seiommm.org - Móvil: 625 680 737

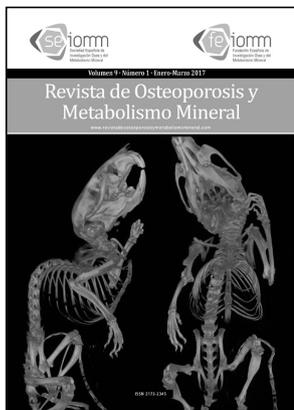
### INSCRIPCIÓN

Fecha límite de inscripción: 20 de mayo. El día 31 de mayo se comunicará los aceptados por correo electrónico.

La inscripción será por orden de registro, priorizando a los socios de la SEIOMM y, en caso sobrepasarse el número de preinscripciones, se seleccionaran dos por servicio o centro de trabajo.

La inscripción es gratuita e incluye sesiones de trabajo, cafés y comida de trabajo. Los traslados no se incluyen.

\* Pendientes de fijar las fechas de celebración en otras sedes de Barcelona, Sevilla y Santiago de Compostela



**Nuestra portada**  
Esqueleto de un ratón explorado mediante microTAC

**Autores:**  
José Sainz-Aja,  
Diego Ferreño y  
José A. Riancho  
(LADICIM y Departamento de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander)

*Director*

**Manuel Sosa Henríquez**

*Redactora*

**M<sup>a</sup> Jesús Gómez de Tejada Romero**

**Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)**

*Presidente*

**Josep Blanch Rubió**

*Vicepresidenta*

**M<sup>a</sup> Jesús Moro Álvarez**

*Secretario*

**Enrique Casado Burgos**

*Tesorero*

**José Ramón Caeiro Rey**

*Vocales*

**Guillermo Martínez Díaz-Guerra**

**Mercedes Giner García**

*Presidente Electo*

**Manuel Naves Díaz**

Velázquez, 94 (1<sup>a</sup> planta)  
28006 Madrid

Telf: +34-625 680 737

Fax: +34-917 817 020

e-mail: [seiommm@seiommm.org](mailto:seiommm@seiommm.org)

<http://www.seiommm.org>

*Edición*



Avda. Reina Victoria, 47 (6<sup>o</sup> D)  
28003 Madrid

Telf. +34-915 538 297

e-mail: [correo@ibanezyplaza.com](mailto:correo@ibanezyplaza.com)

<http://www.ibanezyplaza.com>

*Maquetación*

**Concha García García**

*Traducción inglés*

**David Shea**

ISSN: 2173-2345

Envío de originales:

[romm@ibanezyplaza.com](mailto:romm@ibanezyplaza.com)

## SUMARIO

Vol. 9 - Nº 1 - Enero-Marzo 2017

### 3 EDITORIAL

**Efectos divergentes del factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF y el fragmento N-terminal de la proteína relacionada con la parathormona, PTHrP en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano**  
Plotkin LI

### 5 ORIGINALES

**El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el fragmento N-terminal de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) regulan la proliferación de células madre mesenquimales humanas**  
Bravo B, Fernández de Castro L, Buendía I, Santos X, Gortázar A

**13 Efecto de la enzima antioxidante catalasa en la calcificación vascular y desmineralización ósea**  
Martínez Arias L, Panizo García S, Carrillo López N, Barrio Vázquez S, Quirós González I, Román García P, Mora Valenciano I, Miguel Fernández D, Añón Álvarez E, Fernández Martín JL, Ruiz Torres MP, Cannata Andía JB, Naves Díaz M

**20 Influencia de la obesidad sobre la microarquitectura y las propiedades biomecánicas en pacientes con fractura de cadera**  
Giner M, Montoya MJ, Miranda C, Vázquez MA, Miranda MJ, Pérez-Cano R

**28 Identificación de variantes genéticas asociadas con la densidad mineral ósea (DMO) en el gen *FLJ42280***  
Roca-Ayats N, Cozar Morillo M, Gerousi M, Czwan E, Urreiziti R, Martínez-Gil N, García-Giralt N, Mellibovsky L, Nogués X, Díez-Pérez A, Balcells S, Grinberg D

**35 NOTA CLÍNICA**  
**Paniculitis mesentérica asociada al uso de bifosfonatos: ¿son estos más proinflamatorios de lo que sabemos?**  
Torregrosa Suau O, Guilló Quiles E, Mora Rufete A

**38 REVISIÓN**  
**Osteoporosis en enfermedades reumáticas e inducidas por glucocorticoides**  
Maldonado G, Messina O, Moreno M, Ríos C

**Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral** ha sido aceptada para su inclusión en "Emerging Sources Citation Index", la nueva edición de *Web of Sciences* que funciona desde noviembre de 2015. Por ello, los artículos publicados en nuestra revista serán indexados en *Web of Sciences* desde el mismo momento de su publicación.

Indexada en las siguientes bases de datos: Scielo, Web of Sciences, IBECs, SIIC Data Bases, embase, Redalyc, Emerging Sources Citation Index, Open J-Gate, DOAJ, Free Medical Journal, Google Academic, Medes, Electronic Journals Library AZB, e-Revistas, WorldCat, Latindex, EBSCOhost, MedicLatina, Dialnet, SafetyLit, Mosby's, Encare, Academic Keys.

## Comité Editorial

### Teresita Bellido, PhD

Department of Medicine, Division of Endocrinology. Indiana University School of Medicine. Indianapolis, Indiana. Estados Unidos

### Ernesto Canalis, MD, PhD

Director, Center for Skeletal Research. Professor of Orthopedic Surgery and Medicine New England Musculoskeletal Institute University of Connecticut Health Center. Farmington, CT. Estados Unidos

### Dr. Oswaldo Daniel Messina

Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Hospital Cosme Argerich. Buenos Aires. Argentina

### Patricia Clark Peralta, MD, PhD

Facultad de Medicina, UNAM. Unidad Clínica Epidemiológica. Hospital Infantil Federico Gómez. México DF. México

### Dr. Carlos Mautalen

Profesor Consultor Titular de la Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Director de "Mautalen, Salud e Investigación". Buenos Aires. Argentina.

### Lilian I Plotkin, PhD

Anatomy and Cell Biology. Indiana University School of Medicine. Indianapolis, Indiana. Estados Unidos

### Dr. Manuel Díaz Curiel

Universidad Autónoma de Madrid. Unidad de Metabolismo Óseo. Hospital Fundación Jiménez Díaz. Instituto de Investigación FJD. Fundación Hispana de Osteoporosis y Metabolismo Mineral (FHOEMO). Madrid. España

### Dr. Adolfo Díez Pérez

Universidad de Barcelona. Servicio de Medicina Interna. Instituto Municipal de Investigación Médica. (IMIM). Hospital del Mar. Barcelona. España

### Dr. Josep Blanch Rubió

Servicio de Reumatología. Hospital del Mar, Barcelona. Instituto Municipal de Investigaciones Médicas de Barcelona. Parque de Investigación Biomédica de Barcelona. España

### Dr. Manuel Sosa Henríquez (Director)

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral. Hospital Universitario Insular. Servicio de Medicina Interna. Unidad Metabólica Ósea. Las Palmas de Gran Canaria. España

### Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero (Redactora)

Universidad de Sevilla. Departamento de Medicina. Sevilla. España

## Comité de Expertos

Pilar Aguado Acín

María José Américo García

Miguel Arias Paciencia

Chesús Beltrán Audera

Pere Benito Ruiz

Santiago Benito Urbina

Miguel Bernard Pineda

Josep Blanch i Rubió

José Antonio Blázquez Cabrera

José Ramón Caeiro Rey

Javier Calvo Catalá

M<sup>a</sup> Jesús Cancelo Hidalgo

Jorge Cannata Andía

Antonio Cano Sánchez

Cristina Carbonell Abella

Pedro Carpintero Benítez

Enrique Casado Burgos

Santos Castañeda Sanz

Jesús Delgado Calle

Bernardino Díaz López

Casimira Domínguez Cabrera

Fernando Escobar Jiménez

José Filgueira Rubio

Jordi Fiter Areste

Juan José García Borrás

Juan Alberto García Vadillo

Eduardo Girona Quesada

Carlos Gómez Alonso

Milagros González Béjar

Jesús González Macías

Emilio González Reimers

Jenaro Graña Gil

Silvana di Gregorio

Daniel Grinberg Vaisman

Nuria Guañabens Gay

Roberto Güerri Fernández

Federico Hawkins Carranza

Diego Hernández Hernández

José Luis Hernández Hernández

Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Esteban Jódar Gimeno

Pau Lluç Mezquida

M<sup>a</sup> Luisa Mariñoso Barba

Guillermo Martínez Díaz-Guerra

María Elena Martínez Rodríguez

Leonardo Mellibovsky Saldier

Manuel Mesa Ramos

Ana Monegal Brancos

Josefa Montoya García

María Jesús Moro Álvarez

Manuel Muñoz Torres

Laura Navarro Casado

Manuel Naves García

José Luis Neyro Bilbao

Xavier Nogués Solán

Joan Miquel Nolla Solé

José Antonio Olmos Martínez

Norberto Ortego Centeno

Santiago Palacios Gil-Antuñano

Esteban Pérez Alonso

Ramón Pérez Cano

José Luis Pérez Castrillón

Pilar Peris Bernal

Concepción de la Piedra Gordo

José Manuel Quesada Gómez

Enrique Raya Alvarez

Rebeca Reyes García

José Antonio Riancho Moral

Luis de Río Barquero

Luis Rodríguez Arboleya

Arancha Rodríguez de Gortázar

Alonso-Villalobos

Minerva Rodríguez García

Antonia Rodríguez Hernández

Manuel Rodríguez Pérez

Inmaculada Ros Villamajó

Rafael Sánchez Borrego

Oscar Torregrosa Suau

Antonio Torrijos Eslava

Carmen Valdés y Llorca

Carmen Valero Díaz de Lamadrid

### METODOLOGÍA Y DISEÑO DE DATOS

Pedro Saavedra Santana

José María Limiñana Cañal

## SUMMARY Vol. 9 - Nº 1 - January-March 2017

### 3 EDITORIAL

**Divergent effects of vascular endothelial growth factor, VEGF and the N-terminal fragment of the parathormone-related protein, PTHrP on human adipose derived from mesenchymal stem cells**  
Plotkin LI

### 5 ORIGINAL ARTICLES

**Vascular endothelial growth factor (VEGF) and the N-terminal portion of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) regulate the proliferation of human mesenchymal stem cells**  
Bravo B, Fernández de Castro L, Buendía I, Santos X, Gortázar A

**13 Effects of the catalase antioxidant enzyme in vascular calcification and bone demineralization**

Martínez Arias L, Panizo García S, Carrillo López N, Barrio Vázquez S, Quirós González I, Román García P, Mora Valenciano I, Miguel Fernández D, Añón Álvarez E, Fernández Martín JL, Ruiz Torres MP, Cannata Andía JB, Naves Díaz M

**20 Influence of obesity on microarchitecture and biomechanical properties in patients with hip fracture**  
Giner M, Montoya MJ, Miranda C, Vázquez MA, Miranda MJ, Pérez-Cano R

**28 Identification of genetic variants associated with bone mineral density (BMD) in the *FLJ42280* gene**  
Roca-Ayats N, Cozar Morillo M, Gerousi M, Czwan E, Urreiziti R, Martínez-Gil N, García-Giralt N, Mellibovsky L, Nogués X, Díez-Pérez A, Balcells S, Grinberg D

### 35 CLINICAL NOTE

**Mesenteric panniculitis associated with the use of bisphosphonates: are these more proinflammatory than we know?**  
Torregrosa Suau O, Guilló Quiles E, Mora Rufete A

### 38 REVIEW

**Osteoporosis in rheumatic diseases and glucocorticoid induced**  
Maldonado G, Messina O, Moreno M, Ríos C

# Efectos divergentes del factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF y el fragmento N-terminal de la proteína relacionada con la parathormona, PTHrP en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000100001>

## Plotkin LI

Departamento de Anatomía y Biología Celular, Facultad de Medicina de Indiana. Centro Médico de la Administración de Veteranos Roudebush. Centro de Indiana para la Salud Musculoesquelética, Indianapolis, IN (Estados Unidos)

Correo electrónico: [lplotkin@iupui.edu](mailto:lplotkin@iupui.edu)

La posibilidad de obtener células madre de tejidos de adultos es altamente atractiva, ya que potencialmente pueden generar una gran variedad de células diferenciadas y ser utilizadas en la regeneración de tejidos. El estudio de células madre obtenidas de organismos adultos comenzó hace alrededor de 50 años, cuando fueron descritas las células madre hematopoyéticas, que dan origen a todas las células sanguíneas<sup>1</sup>. Más tarde, investigadores describieron las células madre de linaje mesenquimal, con capacidad de diferenciarse en células adipocíticas, osteoblásticas y condrocíticas. Las células madre mesenquimales fueron descubiertas originalmente en la médula ósea, pero más tarde se encontró que se hallan en otros tejidos adultos, incluyendo el tejido adiposo periférico. Como lo demuestran en su manuscrito Bravo y cols.<sup>2</sup>, las células mesenquimales se caracterizan por la expresión de marcadores de superficie, incluyendo CD90, y la ausencia de otros, como CD45 y CD34.

Las ventajas del tejido adiposo como fuente de células madre son su abundancia en adultos y el hecho de que puede ser obtenido de forma mínimamente invasiva, usando procedimientos tales como la liposucción. Una vez que el tejido adiposo es obtenido y tratado enzimáticamente para eliminar las proteínas extracelulares, las células madre pueden separarse de adipocitos maduros por centrifugación, aprovechando la baja densidad de los adipocitos que flotan en el medio de aislamiento. Las células en el fondo del tubo de centrifugación, denominadas fracción estromal vascular, contienen las denominadas ASC (por *adipocyte stem cell* o células madre adipocíticas). Se ha demostrado que en el medio adecuado, las ASC se pueden diferenciar en adipocitos, osteoblastos/osteocitos y condrocitos o incluso en células de glía y neuronales<sup>1</sup>.

El efecto beneficioso de la hormona paratiroidea (PTH) en hueso es largamente reconocido<sup>3,4</sup>. Cuando la hormona es administrada de forma

intermitente es capaz de activar el receptor de parathormona 1 (PTH1R), desencadenando un aumento en el número de osteoblastos, lo que lleva al aumento de la formación de hueso y de la masa ósea. Su administración en humanos es el único tratamiento anabólico aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*). La proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) es un análogo de la PTH capaz de activar PTH1R a través de su región N-terminal<sup>5</sup>. De forma similar a la PTH, estudios clínicos han demostrado que fragmentos que contienen la región N-terminal de la PTHrP aumentan la masa ósea en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una citoquina producida por células que forman parte de los vasos sanguíneos directamente o están asociadas a estos<sup>6</sup>. El VEGF también es producido por osteoblastos y participa en el desarrollo del hueso endocondral e intramembranoso y en la reparación ósea.

El grupo de investigadores que llevó a cabo este trabajo<sup>2</sup> previamente demostró el rol de los receptores para PTH y VEGF en la respuesta de los osteocitos a impulsos mecánicos<sup>7,8</sup>. Estos estudios establecieron la participación de PTH1R y el receptor 2 de VEGF en el efecto anti-apoptótico de la estimulación mecánica ejercida por flujo de fluido. En el presente trabajo de Bravo y cols.<sup>2</sup> se muestra que las ASCs responden de forma diferente al VEGF y la PTHrP(1-36). Tratamiento con medios pro-diferenciadores llevan a la producción de fosfatasa alcalina y a la acumulación de mineral, junto con la expresión de osteoprotegerina y Runx2 en las ASCs. A diferencia del efecto similar que los receptores para la PTH y el VEGF ejercen en la viabilidad de osteocitos sometidos a estimulación mecánica, la PTHrP(1-36) y el VEGF no tienen el mismo efecto en la proliferación de ASCs. En particular, el VEGF estimula la proliferación de células no diferenciadas, mientras que la PTHrP(1-36) carece de efecto en medio de crecimiento. Por otro lado, la

PTHrP(1-36), pero no el VEGF, estimula la proliferación de ASCs mantenidas en medio complementado con ácido ascórbico y  $\beta$ -glicerofosfato para inducir la diferenciación de las células hacia el linaje osteoblástico. Los autores sugieren que el VEGF sería más efectivo en aumentar el número de células que se mantienen indiferenciadas en la proximidad de los vasos sanguíneos y, en particular, en presencia de células endoteliales. Por otro lado, PTHrP actúa estimulando la proliferación de células comprometidas al linaje osteoblástico en la cercanía de células más maduras. Estos estudios sugieren la posibilidad de tratamientos combinando los 2 agentes para aumentar la cantidad de células en cultivos de ASCs que pueden ser utilizadas para favorecer la regeneración ósea, por ejemplo, en individuos con fracturas que no pueden soldar espontáneamente.

### **Bibliografía**

1. Lo Furno D, Mannino G, Cardile V, Parenti R, Giuffrida R. Potential therapeutic applications of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2016 Sep 22. [Epub ahead of print].
2. Bravo B, Fernández de Castro L, Buendía I, Santos X, Gortázar A. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el fragmento N-terminal de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) regulan la proliferación de células madres mesenquimales humanas. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2017;9(1):5-12.
3. Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone.* 2007;40:1434-46.
4. Bellido T, Saini V, Divieti Pajevic P. Effects of PTH on osteocyte function. *Bone.* 2013;54:250-7.
5. Esbrit P, Herrera S, Portal-Nunez S, Nogues X, Diez-Perez A. Parathyroid Hormone-Related Protein Analogs as Osteoporosis Therapies. *Calcif Tissue Int.* 2016;98:359-69.
6. Hu K, Olsen BR. Vascular endothelial growth factor control mechanisms in skeletal growth and repair. *Dev Dyn.* 2016 Oct 17.[Epub ahead of print].
7. de Castro LF, Maycas M, Bravo B, Esbrit P, Gortazar A. VEGF Receptor 2 (VEGFR2) activation is essential for osteocyte survival induced by mechanotransduction. *J Cell Physiol.* 2015;230:278-85.
8. Maycas M, Ardura JA, de Castro LF, Bravo B, Gortazar AR, Esbrit P. Role of the parathyroid hormone type 1 receptor (PTH1R) as a mechanosensor in osteocyte survival. *J Bone Miner Res.* 2015;30:1231-44.

**Bravo B<sup>1</sup>, Fernández de Castro L<sup>1</sup>, Buendía I<sup>1</sup>, Santos X<sup>2</sup>, Gortázar A<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Facultad de Medicina. Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA). Universidad CEU San Pablo. Madrid (España)

<sup>2</sup> Fundación HM Hospitales. Madrid (España)

# El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el fragmento N-terminal de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) regulan la proliferación de células madre mesenquimales humanas

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000100002>

Correspondencia: Arancha Gortázar - Facultad de Medicina - Universidad CEU San Pablo - Avda. Montepríncipe, s/n - 28668 Boadilla del Monte - Madrid (España)

Correo electrónico: [argortazar@ceu.es](mailto:argortazar@ceu.es)

Fecha de recepción: 16/09/2016

Fecha de aceptación: 20/12/2016

*Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM recibida para asistir al 36º Congreso de la ASBMR (Houston, 2014).*

## Resumen

El tejido adiposo contiene un gran número de células madre mesenquimales (*Adipose Stem Cells*, ASCs) que residen en su estroma vascular. Aunque existe controversia acerca de la capacidad de generar tejido óseo de estas células *in vivo*, *in vitro* constituyen un buen modelo de diferenciación osteogénica debido a su semejanza fenotípica con las células estromales de la médula ósea (*Bone Marrow Stromal Cells*, BMSCs) en cultivo. La diferenciación de las poblaciones osteoprogenitoras de la médula ósea está intensamente regulada por factores locales, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP), que modulan la proliferación de estas poblaciones en distintos estadios de diferenciación. Tanto el VEGF como el fragmento N-terminal de la PTHrP ejercen efectos osteogénicos. En este estudio hipotetizamos que sus efectos sobre la proliferación celular de los osteoprogenitores son dependientes del estadio de diferenciación osteoblástica. Tras confirmar su capacidad de diferenciación *in vitro* por expresión génica de Runx2 y acumulación de calcio, se analizó la respuesta proliferativa a estímulos con VEGF o PTHrP(1-36) de ASCs sometidas o no a inducción osteogénica. VEGF pero no PTHrP(1-36) estimuló la capacidad proliferativa de las ASCs no inducidas mientras que PTHrP(1-36), pero no VEGF, estimuló la proliferación de las ASCs inducidas, corroborando el papel diferencial de estos factores de crecimiento en distintos estadios de diferenciación.

**Palabras clave:** células madre mesenquimales adiposas (ASCs), PTHrP, VEGF, diferenciación osteogénica.

# Vascular endothelial growth factor (VEGF) and the N-terminal portion of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) regulate the proliferation of human mesenchymal stem cells

## Summary

Adipose tissue contains a large number of mesenchymal stem cells (ASCs) residing in their vascular stroma. Although there is controversy regarding the ability to generate bone tissue from these cells *in vivo*, the *in vitro* cells offer a good model of osteogenic differentiation due to its phenotypic similarity with the bone marrow stromal cells (BMSCs) in culture. The differentiation of osteo-progenitor populations of bone marrow is intensely regulated by local factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and parathyroid hormone-related protein (PTHrP), which modulate these populations' proliferation in different stages of differentiation. Both the VEGF and the N-terminal fragment of the PTHrP exert osteogenic effects. In this study, we posited that its effects on proliferation of osteo-progenitors are stage dependent of osteoblastic differentiation. After confirming its capacity to *in vitro* differentiation by Runx2 gene expression and accumulation of calcium, the proliferative response to stimuli was analyzed with VEGF or PTHrP (1-36) of ASCs submitted or not to osteogenic induction. VEGF, but not PTHrP (1-36), stimulated the proliferative capacity of uninduced ASCs, whereas BMSCs, but not VEGF, stimulated the proliferation of induced ASCs, corroborating the differential role of this growth in different stages of differentiation.

**Key words:** *adipose mesenchymal stem cells (ASCs), PTHrP, VEGF, osteogenic differentiation.*

## Introducción

En los años 60, Friedenstein describió por primera vez las células estromales de la médula ósea (*Bone Marrow Stromal Cells*, BMSCs) como células fibroblásticas con adherencia al plástico y capacidad de diferenciación tri-lineal, generando osteoblastos, condroblastos y adipocitos. Una fracción de estas células demostró además capacidad clonogénica cuando éstas se cultivaron en muy baja densidad (*Colony Forming Units-Fibroblast*, CFU-F)<sup>1</sup>. Más adelante se observó que esta multipotencialidad es sólo inherente a una pequeña parte de esta población celular heterogénea, correspondiente a las células madre esqueléticas (*Skeletal Stem Cells*, SSCs, por debajo del 0,1% de las BMSCs y alrededor del 12% de las CFU-F), que, además, son las únicas capaces de generar el estroma necesario para la generación de nichos hematopoyéticos en la médula ósea<sup>2,3</sup>.

El tejido adiposo contiene un gran número de células adherentes, con capacidad de formar CFU-F y muchas otras características que las hacen similares a las BMSCs. En comparación con las BMSCs, este tejido es de fácil acceso, como lipoaspirados descartados en operaciones de liposucción, y el aislamiento de células estromales es relativamente sencillo<sup>4,5</sup>. De forma similar a las SSCs entre las BMSCs, la fracción estromal vascular del tejido adiposo (SVF) es una población heterogénea de células entre las que se encuentran las ASCs, que presumiblemente se encuentran asociadas de forma similar a las SSCs a la microvasculatura de la grasa<sup>6</sup>, en consonancia con otros tejidos en los que las células madres adultas se encuentran asociadas a la microvasculatura en

forma de pericitos<sup>7</sup>. Aunque diversos autores afirman que las ASCs poseen la capacidad inherente de diferenciarse a células de estirpe ósea, hasta la fecha ningún grupo de investigación ha demostrado que esto sea posible, salvo después de transdiferenciar estas células tras un tratamiento intensivo con BMPs, que ha demostrado ser un potente osteoinductor de diversos tipos celulares<sup>8</sup>. Pese a no haberse demostrado la utilidad clínica de las ASCs para la regeneración ósea, estas células pueden ser un modelo conveniente para estudiar la diferenciación osteoblástica *in vitro*, gracias a su fácil acceso y a su respuesta similar a la de las BMSCs a factores de diferenciación tri-lineal *in vitro*<sup>9</sup>.

En presencia de ácido ascórbico, dexametasona y  $\beta$  glicerol-fosfato las ASC expresan marcadores de diferenciación osteoblástica *in vitro*. Es el caso del sistema formado por la osteoprotegerina (OPG) y el ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL), proteínas implicadas en el remodelado óseo. RANKL es una proteína de la familia del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que se expresa en la membrana de los osteoblastos, y que a su vez puede ser secretada por éstas<sup>10</sup>. Se une al receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B (RANK) que está presente en precursores osteoclasticos activando su diferenciación y maduración a osteoclastos<sup>11</sup>. OPG es un receptor señuelo secretado por los osteoblastos que se une a RANKL, impidiendo que éste se una a RANK, bloqueando por tanto la activación de los osteoclastos. Por otro lado, Runx2 es un factor de transcripción clave en la diferenciación de células osteoblásticas<sup>12</sup>.

El factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF, es una molécula clave en la regulación de la proliferación de las células endoteliales. Promueve la proliferación, migración y supervivencia de estas células, así como su permeabilidad vascular<sup>13</sup>. La expresión de VEGF y sus receptores en BMSCs ha sido demostrada por diversos estudios en cultivos celulares<sup>13,14</sup>. Además, *in vitro*, se ha mostrado el papel del receptor VEGFR2 como clave en la diferenciación y supervivencia osteoblástica<sup>15</sup>. VEGF induce la diferenciación en cultivos celulares de preosteoblastos<sup>14</sup> y estimula su migración y proliferación<sup>13,14</sup>. Así, el VEGF parece estar implicado en las etapas tempranas de diferenciación ósea, tanto en la esquelotogénesis –siendo un importante factor en la formación ósea endocondral e intramembranosa– como en homeostasis adulta, promoviendo la diferenciación osteoblástica y reduciendo la diferenciación adipogénica de las BMSCs<sup>16,17</sup>.

La proteína relacionada con la parathormona (PTH), PTHrP, es una citoquina pleiotrópica con importantes funciones en el tejido óseo<sup>15</sup>. Es considerada un modulador del remodelado óseo y un estimulador de la formación de hueso que promueve la diferenciación osteoblástica y su supervivencia<sup>15</sup>, siendo por tanto un importante factor de maduración. El procesamiento postraduccional del gen de la PTHrP, genera diferentes fragmentos, entre los que destaca un fragmento N-terminal, PTHrP(1-36), que presenta gran homología con la PTH y que actúa a través del receptor 1 común para PTH/PTHrP, PTH1R<sup>12</sup>. La expresión de PTHrP en el linaje osteoblástico disminuye a medida que ésta se va diferenciando<sup>20</sup>, pero el PTH1R juega un papel fundamental en los osteoblastos maduros y osteocitos, disminuyendo su apoptosis y aumentando su número en osteoblastos del periostio *in vivo*<sup>18,19</sup>. Estudios previos indican que la PTHrP podría incrementar la proliferación de osteoblastos inmaduros a través de la regulación de Ciclina D1 (promotor) y p27 (inhibidor), ambos reguladores del ciclo celular<sup>12</sup>.

En este trabajo hipotetizamos que los efectos de VEGF y PTHrP sobre la proliferación celular de los osteoprogenitores son dependientes del estadio de diferenciación osteoblástica. Así, las poblaciones más indiferenciadas serían más sensibles a VEGF mientras que los progenitores ya comprometidos hacia la diferenciación osteoblástica responderían mejor a PTHrP(1-36). Para ello se utilizaron ASCs humanas procedentes de lipoaspirados como modelo *in vitro* de diferenciación osteogénica. Tras confirmar su capacidad de diferenciación *in vitro* por expresión génica de Runx2 y acumulación de calcio, se analizó la respuesta proliferativa a estímulos con VEGF o PTHrP(1-36) de ASCs sometidas o no a inducción osteogénica. VEGF, pero no PTHrP(1-36), indujo la capacidad proliferativa de las ASCs indiferenciadas, mientras que PTHrP(1-36), pero no VEGF, indujo la proliferación de las ASCs previamente tratadas con medio de diferenciación osteogénica, confirmando el papel diferencial de estos factores de crecimiento en distintos estadios de diferenciación.

## Materiales y métodos

### Aislamiento, cultivo primario y estudio funcional de ASCs

El tejido adiposo subcutáneo abdominal se obtuvo durante la cirugía de pacientes sanos mediante la técnica de liposucción. Seis mujeres se incluyeron en este estudio con una edad promedio de 40 años (rango 25-60 años). Todos los donantes dieron su consentimiento informado, de acuerdo con el protocolo clínico apropiado. Los pacientes fueron operados en el Departamento de Cirugía Plástica de HM Hospitales (Madrid, España), y la recogida de muestra de tejido fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional/Comité Ético de Investigación Clínica de HM Hospitales (Madrid, España). El tejido adiposo fue digerido en 0,075% de solución colagenasa tipo I (Invitrogen, Life Technologies, Nueva York, EE.UU.) durante 30 minutos a 37°C, siguiendo el protocolo descrito anteriormente<sup>4</sup>. A continuación, las células se sembraron en superficie plástica (Corning, Nueva York, EE.UU.) durante 24 horas en Medio de Crecimiento DMAX (Invitrogen, Life Technologies, Nueva York, EE.UU.) con 10% de FBS (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EE.UU.) y suplementado con antibióticos: penicilina (100 IU/ml) y estreptomina (100 mg/ml) (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EE.UU.). Las células no adherentes se retiraron, y se añadió medio fresco para el cultivo primario de la fracción de células adherentes durante 7 días. El medio de cultivo se reemplazó cada 3 días. En ese momento, las ASC fueron funcionalmente fenotipadas por citometría de flujo y se analizó su potencial de diferenciación osteogénica.

### Citometría de flujo

Para el análisis de citometría de flujo, las ASC se resuspendieron en PBS (tampón fosfato salino) a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2% y se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón conjugados (FITC o PE) con anti- CD90, CD29, CD34, CD45, CD106 CD44, CD144, CD31 y KDR (BioLegend, San Diego, California, EE.UU.) durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se analizaron mediante Accuri's C6 Flow System citómetro a 488 nm y 15 mW. La dispersión frontal (FSC), dispersión lateral (SSC) y el marcador fluorescente específico (LGFL) a 488 nm y 540 nm se obtuvieron de forma automática para cada célula. Los datos se recogieron digitalmente sobre un rango dinámico de 16 millones de canales de datos digitales. La amplificación y análisis logarítmico de fluorescencia se realizó utilizando BD Accuri™ Software de Análisis C6.

### Ensayos de diferenciación osteogénica

Se utilizó el medio de diferenciación osteogénica de linaje celular para evaluar el potencial de diferenciación osteogénica de ASC. Para dicha diferenciación las ASC se cultivaron durante 14 días en presencia de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) con 10% FBS, 10<sup>-8</sup> M de dexametasona, 0,5 mg/ml de ácido ascórbico y 0,1 M de β glicerol-fosfato (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EE.UU.). El medio se reemplazó cada 3 días, y al finalizar el periodo de 14 días se realizó la tinción histoquímica

rojo de alizarina para revelar y cuantificar el número de células por campo microscópico rodeadas por matriz extracelular mineralizada teñida con rojo de alizarina. Así mismo se realizó una comprobación de la diferenciación osteoblástica mediante ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), que consistió en la identificación de los depósitos teñidos de rojo que indican actividad fosfatasa alcalina mediante el kit 86R de Sigma Aldrich. ASCs de seis pacientes diferentes se utilizaron en cada ensayo.

### Estudios de proliferación celular

Se estudió la respuesta relacionada con la proliferación de las ASCs a factores como el VEGF (160 pM) y la PTHrP(1-36) (100 nM) en los cultivos durante 24 horas, tanto en medio de crecimiento como en medio de diferenciación osteogénica. Para la medición de la proliferación de estos ensayos se utilizó el equipo de medición *xCelligent System* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) que, a tiempo real, midió la proliferación celular. El sistema *xCelligent* proporcionó medidas de proliferación a tiempo real y final a través de la lectura de unas placas de cultivo dotadas de electrodos que detectaron los cambios de morfología de las células, proporcionando un parámetro llamado *Cell Index* extrapolable a la proliferación celular.

### Extracción de ARN total y PCR cuantitativa a tiempo real

Las ASCs, tanto en condiciones basales como las diferenciadas a osteoblastos, fueron sometidas a extracción de ARN total de un homogeneizado celular con un método estándar con tiocianato de guanidilo-fenol-cloroformo (Tri-Reagent®, MCR; Cincinnati, Ohio, EE.UU.). La pureza y cuantificación del ARN total extraído se determinó mediante espectrofotometría  $A_{260}/A_{280}$  (*Nanodrop 2000/2000c Spectrophotometer*, Thermo Scientific). La síntesis de ADNc se realizó utilizando oligonucleótidos aleatorios y una transcriptasa inversa

(*High capacity RNA to cDNA Kit*, Applied Biosystem; Foster City, California, EE.UU.). El análisis de la expresión génica por RT-PCR a tiempo real se realizó con ADNc resultante utilizando una polimerasa activada por calor, TaqDNA (*Taqman gene expression master mix*, Applied Biosystem; Foster City, California, EE.UU.) y cebadores específicos humanos para RUNX2, (Hs00231692 m1) OPG (TNFRSF1 Hs 00171068), VEGF-A (Hs 00173626 m1) y VEGFR2 (Hs 00176676 m1) (Applied Biosystem; Foster City, California, EE.UU.). Tras una incubación inicial de 10 minutos a 25°C y otra de 2 horas a 37°C, las muestras se sometieron a ciclos a 4°C. Los resultados se expresaron como niveles de expresión de cada gen (una vez normalizados frente a los ARN de 18s como gen constitutivo) en cada condición experimental, respecto a su control correspondiente:  $2^{-\Delta Ct}$ , donde Ct representa el ciclo umbral de PCR en el cual el programa detecta por primera vez un incremento apreciable de fluorescencia sobre la señal basal. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. ( $\Delta Ct = Ct$  (Gen de interés) – Ct (control endógeno 18S)).

### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media +/- Desviación Estándar (DE). La comparación no paramétrica entre las medias de dos muestras se realizó por la prueba de Mann Whitney. Se utilizó ANOVA no paramétrica para comparar varias muestras (Kruskal-Wallis). Todos los valores con  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.

### Resultados

En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización de las ASCs procedentes del cultivo primario de los lipoaspirados. El análisis fenotípico de ASC por citometría de flujo reveló que 99,6% eran CD90<sup>+</sup>, 91,6% CD44<sup>+</sup>, 90,4% CD29<sup>+</sup>, 4,2% CD34<sup>+</sup>, 2,2% CD45<sup>+</sup>. Además, se analizaron los marcadores CD106, CD155, KDR y CD31, todos ellos de expresión negativa para ASCs (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización por citometría de flujo de las ASCs aisladas de tejido adiposo obtenido por lipoaspirado

Marcador superficie	Expresión esperada	% medio de expresión obtenido
CD 90	(+) para célula mesenquimal	94,6%
CD 44	(+) para célula mesenquimal	91,6%
CD 29	(+) para célula mesenquimal	90,4%
CD 45	(-) para célula mesenquimal	2,2%
CD 34	(-) para célula mesenquimal	4,2%
CD 106	(+) para célula endotelial	7,6%
	(-) para célula mesenquimal	
CD 144	(+) para célula endotelial	0,6%
KDR	(+) para célula endotelial	0,5%
CD 31	(+) para célula endotelial	0,2%

Para evaluar el potencial de diferenciación osteogénica de ASC, se las sometió a diferenciación osteoblástica *in vitro*. Como se muestra en la Figura 1A, la actividad ALP reveló que las ASCs en medio de diferenciación osteogénica habían sufrido dicha diferenciación. La tinción citoquímica rojo de alizarina (Figura 1B) también reveló el resultado positivo de la diferenciación osteogénica.

Se evaluó la expresión génica de algunos de los marcadores de diferenciación osteogénica como OPG y Runx2<sup>12,13,24</sup>. Se observó que la expresión de estos dos marcadores analizados aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) tras 14 días de cultivo con el medio de diferenciación osteogénica (Figura 2A-B).

Se evaluó la expresión génica del sistema VEGFA y su receptor inducido por la diferenciación osteogénica. Tal y como se puede observar en la figura 3, tras 7 días de diferenciación las células disminuyen significativamente la expresión del VEGF y de su receptor tipo 2.

Los ensayos de proliferación celular con medios suplementados con PTHrP y VEGF mos-

traron resultados diferentes. Se realizó un estudio de proliferación de las ASCs en respuesta a VEGF (160 pM) durante 24 horas en condiciones basales (medio de crecimiento) o con medio de diferenciación osteogénica.

Como se observa en la figura 4, el VEGF, aumentó de manera significativa la proliferación de las ASCs en medio de crecimiento, pero no tuvo efectos significativos sobre la proliferación de las células cultivadas en medio de diferenciación osteogénica ( $p < 0,05$ ). Los resultados indicaron que VEGF, aumentó la proliferación de las ASCs, pero siempre que éstas no hubieran iniciado su proceso de diferenciación. En respuesta a PTHrP(1-36) (100 nM) durante 24 horas, las ASCs no alteraron significativamente su índice de proliferación (Figura 4A). Cuando se realizó el ensayo de proliferación anteriormente descrito en medio de diferenciación osteogénica, se observó que éste cambiaba el fenotipo de las ASC, y alteraba su capacidad de respuesta ante estos factores. De forma que en este caso PTHrP incrementó el índice de proliferación en células ya comprometidas a la diferenciación osteoblástica (Figura 4B).

Figura 1. Respuesta del cultivo primario de ASC a los medios específicos de diferenciación de linaje celular. (A) Detección de la actividad fosfatasa alcalina (ALP) y (B) detección de la diferenciación osteogénica de 14 días mediante la tinción con rojo de alizarina para detectar mineralización

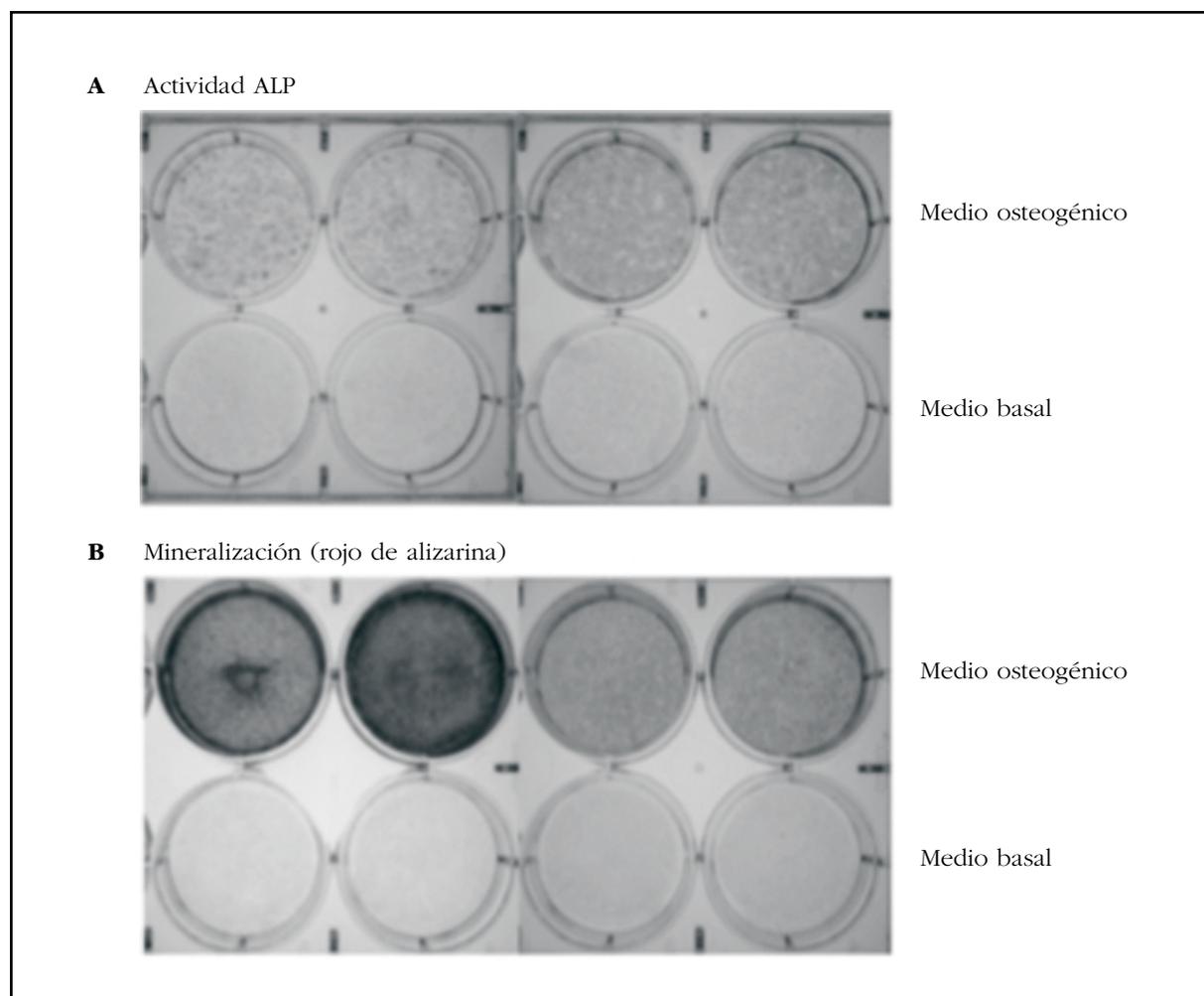
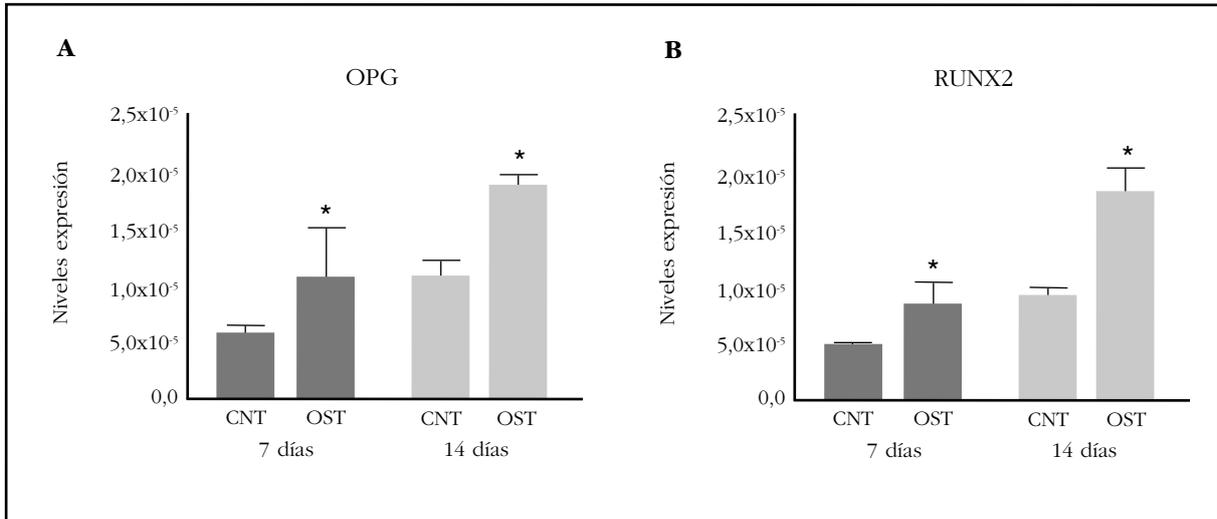
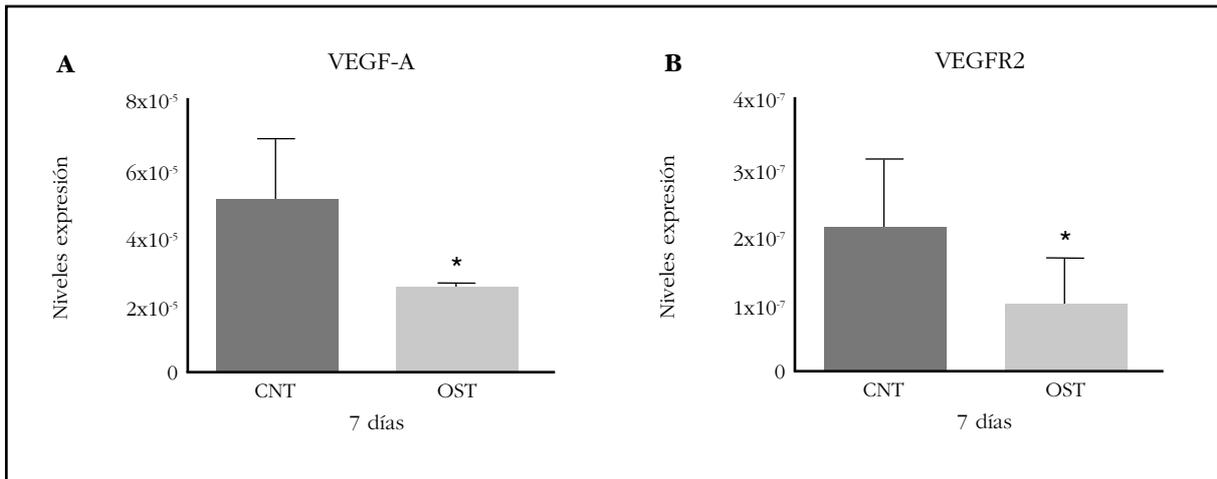


Figura 2. Cambios en la expresión génica (analizada por PCR a tiempo real) de factores de diferenciación ósea: (A) OPG, (B) Runx2, a distintos tiempos de diferenciación osteoblástica



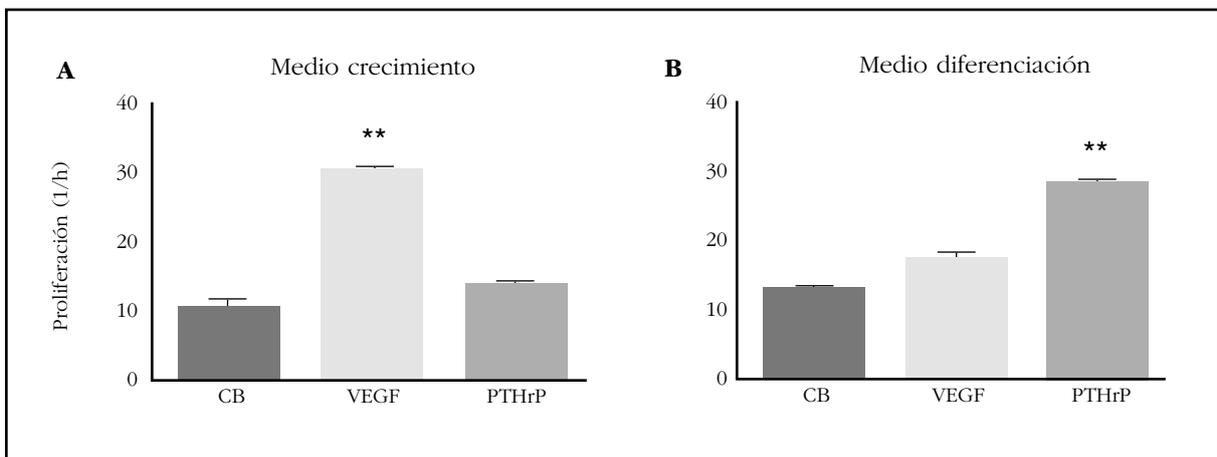
(\*) p<0,05 vs. valor basal correspondiente.

Figura 3. Cambios en la expresión génica tras 7 días de diferenciación (analizada por PCR a tiempo real) de factores de angiogénesis: (A) VEGF-A y (B) VEGFR2



(\*) p<0,05 vs. valor basal correspondiente.

Figura 4. Índice de proliferación celular (10<sup>3</sup>) en cultivos de ASCs sometidos a estímulos con 160 pM de VEGF<sub>165</sub> y 100 nM de PTHrP durante 24 horas. (A) Proliferación en medio de crecimiento. (B) Proliferación en medio de diferenciación osteogénica



(\*\*) p<0,05 vs. valor basal correspondiente.

## Discusión

En el presente estudio, ASCs de mujeres sanas, se expusieron a tratamientos cortos con PTHrP y VEGF en distintas condiciones de diferenciación y su capacidad proliferativa fue analizada. Nuestros resultados indican que las poblaciones más indiferenciadas serían más sensibles a VEGF mientras que los progenitores ya comprometidos hacia la diferenciación osteoblástica responden mejor a PTHrP(1-36), al mostrar una mayor expresión del receptor 1 de la PTH/PTHrP (PTH1R). Se utilizaron ASCs humanas procedentes de lipoaspirados como modelo *in vitro* de diferenciación osteogénica. Durante este estudio la caracterización de las ASCs se llevó a cabo mediante un estudio de los marcadores de superficie celular. Los datos obtenidos fueron los esperados según estudios previos<sup>21,22</sup>. Así mismo se estudió la capacidad de diferenciación osteoblástica de las ASCs. Dicha diferenciación se verificó por la actividad ALP de estas células tras 14 días en medio de diferenciación osteogénica. Del mismo modo, la tinción histoquímica de rojo de alizarina se utilizó para verificar dicha diferenciación complementando así el análisis de actividad ALP. Además, se evaluó la expresión génica de algunos marcadores como OPG y Runx2<sup>16,23</sup>. Runx2 es esencial para la diferenciación osteoblástica, conduce a las ASCs hacia el linaje osteoblástico e inhibe su diferenciación hacia linaje adipogénico o condrogénico<sup>23</sup>. Además, Runx2 se ha descrito como un factor que mantiene a los osteoblastos en estado inmaduro sin diferenciarse a osteocitos<sup>23</sup>. Así mismo, estudios previos consideran a OPG como un marcador de diferenciación osteogénica temprana en células mesenquimales humanas<sup>24</sup>. Según lo esperado, nuestros datos muestran que la diferenciación osteogénica induce un aumento en la expresión de estos dos marcadores, OPG y Runx2, respecto al estado indiferenciado.

También se evaluó la expresión génica del sistema VEGFA y su receptor VEGFR2 en condiciones de diferenciación osteogénica. Tras siete días en presencia del medio de diferenciación osteogénica se observó una disminución en la expresión del VEGF y de su receptor tipo 2. En este estudio hipotetizamos que los efectos de VEGF y PTHrP sobre la proliferación celular de los osteoprogenitores son dependientes del estadio de diferenciación osteoblástica. Así, las poblaciones más indiferenciadas serían más sensibles a VEGF por su proximidad al nicho endotelial *in vivo*, mientras que los progenitores ya comprometidos hacia la diferenciación osteoblástica responderían mejor a PTHrP(1-36) al mostrar el receptor PTH1R un rol más importante en osteoblastos maduros y osteocitos. Tras confirmar su capacidad de diferenciación *in vitro* por expresión génica de Runx2 y mineralización, se analizó la respuesta proliferativa a estímulos con VEGF o PTHrP(1-36) de ASCs sometidas o no a inducción osteogénica. VEGF, pero no PTHrP(1-36), favoreció la capacidad proliferativa de las ASCs no inducidas, mientras que PTHrP(1-36), pero no VEGF, favoreció la prolifera-

ción de las ASCs previamente diferenciadas, confirmando el papel diferencial de estos factores de crecimiento en distintos estadios de diferenciación. Estudios previos indican que el VEGF secretado es crítico en la diferenciación de las BMSCs a osteoblastos, frenando su diferenciación a otros linajes celulares como el adipogénico<sup>16,17</sup>. Así mismo, Alonso y cols.<sup>15</sup> han mostrado como VEGF y PTHrP modulan la diferenciación y supervivencia de los osteoblastos. Nuestros resultados del estudio de proliferación de las ASCs en respuesta a VEGF durante 24 horas en medio de crecimiento o con medio de diferenciación osteogénica muestran un aumento en la proliferación de las ASCs crecidas en medio normal, pero sin efectos significativos sobre la proliferación de las células cultivadas en medio de diferenciación osteogénica, apoyando la noción de que VEGF ejerce un papel preponderante sobre la regulación de la proliferación en etapas tempranas de la diferenciación, aunque estudios previos apuntan también a una implicación de VEGF en la supervivencia de los osteoblastos<sup>15</sup>.

Tras 24 horas de tratamiento con PTHrP(1-36), las ASCs indiferenciadas no vieron alterado su índice de proliferación. Sin embargo, en presencia de medio de diferenciación osteogénica, PTHrP(1-36) aumentó significativamente la proliferación, apuntando a la implicación de este factor en la proliferación de BMSCs comprometidas a la diferenciación osteogénica *in vivo*.

De esta forma podríamos concluir que, si bien estudios previos han mostrado que VEGF y PTHrP modulan la diferenciación y supervivencia de los osteoblastos<sup>15</sup>, estos factores podrían regular la proliferación de los osteoprogenitores en función de su compromiso o no hacia la diferenciación osteoblástica, estando VEGF más implicado en la proliferación de progenitores más indiferenciados y próximos al nicho perivascular, mientras que la PTHrP(1-36) estimularía células más comprometidas hacia la osteoblastogénesis.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses en relación con este trabajo.

## Bibliografía

1. Friedenstein AY, Lalykina KS. Lymphoid cell populations are competent systems for induced osteogenesis. *Calcif Tissue Res.* 1970;Suppl:105-6.
2. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008;2(4):313-9.
3. Swords BJ, Yoshizawa S, Mishra PJ, Cherman N, Kuznetsov SA, Merlino G, et al. Molecular profile of clonal strains of human skeletal stem/progenitor cells with different potencies. *Stem Cell Res.* 2015;14:297-306.
4. Van Harmelen V, Röhrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism.* 2004;53:632-7.
5. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaut L, Casteilla L. From heterogeneity to plasti-

- city in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res.* 2006;312:727-36.
6. Su X, Lyu Y, Wang W, Zhang Y, Li D, Wei S, et al. Fascia Origin of Adipose Cells. *Stem Cells.* 2016; 34:1407-19.
  7. Nakagomi T, Kubo S, Nakano-Doi A, Sakuma R, Lu S, Narita A, et al. Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells. *Stem Cells.* 2015;33:1962-74.
  8. Bianco P, Robey PG. Skeletal stem cells. *Development.* 2015;142:1023-7.
  9. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007;100: 1249-60.
  10. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001;142:5050-5.
  11. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol.* 2004;22:560-7.
  12. Esbrit P, Herrera S, Portal-Núñez S, Nogués X, Díez-Pérez A. Parathyroid Hormone-Related Protein Analogs as Osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2016;98: 359-69.
  13. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9:669-76.
  14. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2000;141: 1667-74.
  15. Alonso V, Gortázar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Alvarez Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol.* 2008;217:717-27.
  16. Liu Y, Olsen BR. Distinct VEGF functions during bone development and homeostasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014;62:363-8.
  17. Liu Y, Berendsen AD, Jia S, Lotinun S, Baron R, Ferrara N, et al. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest.* 2012;122:3101-13.
  18. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1999;104:439-46.
  19. Jilka RL, O'Brien CA, Ali AA, Roberson PK, Weinstein RS, Manolagas SC. Intermittent PTH stimulates periosteal bone formation by actions on post-mitotic preosteoblasts. *Bone.* 2009;44:275-86.
  20. Suda N, Gillespie MT, Traianedes K, Zhou H, Ho PW, Hards DK, et al. Expression of parathyroid hormone-related protein in cells of osteoblast lineage. *J Cell Physiol.* 1996;166:94-104.
  21. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* 2003;5:362-9.
  22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells; The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315-7.
  23. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006;99(5):1233-9.
  24. Song SJ, Jeon O, Yang HS, Han DK, Kim BS. Effects of culture conditions on osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17:1113-9.

Martínez Arias L<sup>1</sup>, Panizo García S<sup>1</sup>, Carrillo López N<sup>1</sup>, Barrio Vázquez S<sup>1</sup>, Quirós González I<sup>3</sup>, Román García P<sup>3</sup>, Mora Valenciano I<sup>4</sup>, Miguel Fernández D<sup>2</sup>, Añón Álvarez E<sup>2</sup>, Fernández Martín JL<sup>1</sup>, Ruiz Torres MP<sup>4</sup>, Cannata Andía JB<sup>1,5</sup>, Naves Díaz M<sup>1</sup>

1 Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica - REDinREN del ISCIII - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

2 Laboratorio de Medicina - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

3 Universidad/Instituto Sanger - Cambridge (Reino Unido)

4 Departamento de Biología de Sistemas - Universidad de Alcalá de Henares - REDinREN del ISCIII - Alcalá de Henares - Madrid (España)

5 Departamento de Medicina - Universidad de Oviedo - Oviedo (España)

## Efecto de la enzima antioxidante catalasa en la calcificación vascular y desmineralización ósea

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000100003>

Correspondencia: Manuel Naves Díaz - Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica - REDinREN del ISCIII - Hospital Universitario Central de Asturias - Edificio FINBA, 1ª planta - Avenida de Roma, s/n - 33011 Oviedo (España)

Correo electrónico: [manuel@hca.es](mailto:manuel@hca.es)

Fecha de recepción: 23/05/2016

Fecha de aceptación: 12/07/2016

*Trabajo premiado con una beca de Investigación de Biología Molecular Ósea FEIOMM 2012.*

### Resumen

**Objetivos:** Evaluar el papel de la enzima antioxidante catalasa sobre el proceso de calcificación vascular asociada a insuficiencia renal crónica (IRC) y su efecto sobre la masa ósea.

**Material y métodos:** Se utilizaron ratones C57/BL6J salvajes (WT) y transgénicos (TG), que sobreexpresan la enzima catalasa, a los que se les indujo IRC. Se utilizaron como control ratones WT y TG con intervención simulada. Transcurridas 16 semanas los animales se sacrificaron, obteniendo suero para analizar marcadores bioquímicos, el trozo residual de riñón, la aorta y las tibias. Se utilizó igualmente un modelo *in vitro* de cultivo primario de células de músculo liso vascular (CMLV) procedentes de aorta de ratón WT y TG sometidas durante 8 días a un medio calcificante con 3 mM de fósforo y 2 mM de calcio.

**Resultados:** Solo en animales WT con IRC se observó un incremento significativo en la expresión génica de Runx2 y del depósito renal de calcio y un deterioro de la estructura ósea a nivel trabecular. Este efecto no se observó en ratones TG con IRC.

Solo en las CMLV de ratones WT, la adición de medio calcificante produjo un aumento del contenido en calcio, de la expresión proteica de Runx2 y de las especies reactivas de oxígeno mitocondriales con una menor expresión proteica de la enzima catalasa.

**Conclusiones:** La sobreexpresión de la enzima catalasa redujo el proceso de calcificación tanto *in vivo* como *in vitro*, mostrando *in vivo* que ese descenso se acompañó de una mejora en los parámetros óseos estudiados.

**Palabras clave:** calcificación vascular, hueso, antioxidantes, estrés oxidativo, catalasa,  $\mu$ CT, insuficiencia renal crónica..

# Effects of the catalase antioxidant enzyme in vascular calcification and bone demineralization

## Summary

**Objetives:** Assess the role of the catalase antioxidant enzyme in the vascular calcification process associated with chronic renal failure (CRF) and its effect on bone mass.

**Material and methods:** Wild type C57/BL6J mice (WT) and transgenic mice (TG) were used, that overexpress the catalase enzyme, to which CRF was induced. Control WT and TG mice were used in simulated intervention. After 16 weeks, the mice were sacrificed, with serum samples taken for biochemical markers as well as residual pieces of kidney, aorta and tibias. An *in vitro* model of primary culture of smooth vascular muscle cells (SVMC) taken from the WT and TG aorta which underwent eight days of 3 mM phosphorus and 2 mM calcium calcifying medium.

**Results:** A significant increase in Runx2 gene expression, calcium renal deposit and bone structure deterioration at trabecular level was only detected in WT mice with CRF. This was not observed in TG mice with CRF.

Only in the case of WT mice SVMC, did added calcification medium raise calcium levels, proteic Runx2 expression and the reactive oxygen species of mitochondria with low catalase enzyme.

**Conclusions:** Calcifying catalase over-expression was observed in both *in vivo* and *in vitro*, with *in vivo* showing that this reduction was accompanied by an improvement in bone parameters under study.

**Key words:** vascular calcification, bone, antioxidants, oxidative stress, catalase,  $\mu$ CT, chronic renal failure.

## Introducción

La enfermedad cardiovascular representa en la actualidad la principal causa de mortalidad en el mundo desarrollado. Se prevé que siga en aumento en las próximas décadas como consecuencia del envejecimiento poblacional. Uno de los factores que contribuye al riesgo cardiovascular es el estrés oxidativo<sup>1</sup>. Diferentes estímulos implicados en el desarrollo de enfermedad cardiovascular como activación de macrófagos, hiperglicemia, la oxidación de LDL colesterol e incluso la angiotensina II ejercen sus efectos nocivos, al menos parcialmente, a través de la síntesis local de especies reactivas de oxígeno<sup>2,5</sup>.

Por otro lado, existen evidencias de una relación positiva entre estrés oxidativo y calcificaciones vasculares<sup>6</sup>. Las células de músculo liso vascular (CMLV) sometidas a estrés oxidativo incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina y la deposición de calcio, indicando su transdiferenciación hacia células capaces de mineralizar (tipo osteoblasto/condrocito)<sup>7</sup>. En cultivo primario de CMLV de aorta de ratón, el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno o glucosa oxidasa promueve la calcificación y la sobreexpresión de Runx2 (Cbf $\alpha$ 1), factor de transcripción óseo relacionado con la diferenciación osteogénica, mediada por AKT<sup>8</sup>. Curiosamente, estos mismos estímulos producen el efecto contrario en células precursoras de osteoblastos, demostrando la importancia del peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en el proceso de diferenciación de las células de estirpe mesenquimal<sup>9</sup>.

Las principales enzimas antioxidantes implicadas en la eliminación catalítica de peróxido de hidrógeno son la catalasa, las glutatión peroxidasa y la tioredoxina peroxidasa. De todas ellas, la catalasa es la enzima más eficiente en la eliminación de peróxido de hidrógeno.

Uno de los factores que inciden en el envejecimiento es la acumulación progresiva de daño oxidativo. Este daño puede estar debido a la exposición al estrés oxidativo intracelular normal o, en situaciones patológicas, a un aumento de dicho estrés debido a inflamación u otras causas que puede, de hecho, provocar un envejecimiento acelerado. Por todo ello, nuestro objetivo ha sido evaluar el papel que ejerce la sobreexpresión de catalasa sobre el proceso de calcificación vascular asociada a enfermedad renal moderada y su efecto sobre la masa ósea<sup>10</sup>. Para ello se utilizó un modelo murino transgénico, que sobreexpresa la enzima catalasa, sometido a una insuficiencia renal crónica.

## Material y métodos

### Modelo experimental *in vivo*

**Establecimiento de insuficiencia renal crónica (IRC)**  
Se utilizaron cepas de ratones C57/BL6J salvajes (WT) y cepas de ratones C57/BL6J transgénicos (TG) que sobreexpresan la enzima antioxidante catalasa. Para inducir IRC, se sometieron a ratones de 3 meses de edad a una primera intervención, que consistió en la apertura lateral del animal en el lado derecho donde se cauterizaron los dos polos del riñón. La anestesia utilizada fue isoflurano (1-2%) por vía inhalatoria. Transcurrida una semana de la primera operación, se sometió al animal a una segunda intervención, que consistió en la apertura del lado izquierdo y extirpación total del riñón. Transcurridas 16 semanas de la última operación, los animales se sacrificaron por exanguinación, previa anestesia con CO<sub>2</sub>. En el momento del sacrificio se obtuvo el suero de los animales para analizar marcadores bioquímicos generales y del metabolismo óseo: urea, calcio, fósforo, producto Ca-P, PTHi y FGF23. Se extrajo igualmente el trozo de riñón sobrante, la aorta y las tibias.

La tibia izquierda, que se conservó en etanol de 70%, se analizó mediante microtomografía computarizada ( $\mu$ CT) con un equipo SkyScan 1174, Bruker  $\mu$ CT (Kontich, Bélgica). El análisis morfométrico 2D y 3D fue realizado mediante el software CTAn. La región de interés (ROI) fue delimitada manualmente en cada muestra. Para la región trabecular se seleccionaron 150 cortes y se usaron niveles de umbral en la escala de grises entre 78 y 250. Los análisis morfométricos se basaron en los *plung-ins* internos de CTAn en 2D y 3D. Los parámetros morfométricos medidos fueron el volumen óseo trabecular (BV/TV, %), la separación entre trabéculas (Tb.Sp,  $\mu$ m), número de trabéculas (Tb.N, mm<sup>-1</sup>) y la porosidad trabecular (Tb.Po,  $\mu$ m).

Todos los estudios fueron aprobados y autorizados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo.

### Modelo experimental *in vitro*

Se emplearon cultivos primarios de CMLV procedentes de aorta de ratón C57/BLJ6 WT y TG. Para ello, las aortas de los animales se trocearon y se pusieron a crecer los explantes en placas de cultivo recubiertas con fibronectina para favorecer la adhesión.

Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 60-70% se sustituyó por medio DMEM-F12 suplementado con albúmina bovina al 0,1% (medio control) y por medio calcificante constituido por medio control suplementado con fósforo y calcio a concentraciones de 3 mM y 2 mM, respectivamente. Las células fueron incubadas en estas condiciones durante 8 días.

La actividad basal de catalasa se midió en CMLV procedentes de ratones WT y TG mediante la utilización del kit comercial "catalase assay kit" (Cayman Chemical, 707002), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial.

Los niveles de especies reactivas de oxígeno en las CMLV de ratones WT y TG cultivadas con medio control y calcificante se midieron con un fluorocromo específico de mitocondrias, dihidro-rodamina 123 (DHR 123).

Las proteínas de los cultivos celulares se extrajeron con un tampón con composición Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, deoxicolato sódico 0,5%, EDTA 1,0 mM y SDS 0,1% con inhibidor de proteasas. Se sonicó la muestra en frío 10 minutos para evitar la disgregación de las proteínas y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se recogieron las proteínas del sobrenadante, se cuantificaron mediante el método Bio-Rad DC. y se conservaron a -80°C.

Se utilizaron 20  $\mu$ g de proteínas que se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida de 0,75 mm de grosor en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), empleando para su identificación marcadores de peso molecular conocido (Rainbow™ Molecular Weight Markers, GE Healthcare, Reino Unido). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond™ 0,45  $\mu$ m

PVDF, GE Healthcare, Reino Unido). La transferencia se realizó en frío durante una hora a 100 v. Una vez finalizada la misma, se bloqueó la membrana durante una hora con leche al 5% en un tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente, las membranas se mantuvieron toda la noche con el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de catalasa en dilución 1:5.000 en BSA, Runx2 1:500 en BSA frente a gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en dilución 1:5.000 en BSA, todos de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, EE.UU.). Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces en intervalos de 10 minutos cada uno con una solución de lavado compuesta de PBS y Tween-20 (Sigma-Aldrich), y posteriormente se incubó con el anticuerpo frente a cabra o frente a conejo. La membrana se lavó con la solución de lavado descrita anteriormente y se detectó la proteína mediante el kit comercial Clarity™ Western ECL Substrate (BIO-RAD, EE.UU.). La cuantificación relativa de la intensidad de las bandas obtenidas en el Western Blot se realizó con el programa informático Image Lab™ Software y el escáner Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ (ambos de BIO-RAD, EE.UU.).

### Técnicas comunes a emplear

#### qRT-PCR

El análisis mediante qRT-PCR se realizó con el ADNc obtenido de las diferentes condiciones experimentales usando el kit High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) y la extracción fenólica de ARN. Para la normalización de los resultados se utilizó la expresión de genes constitutivos (ARNr Runx2 y GAPDH) y el método de cuantificación relativa utilizado fue el  $\Delta\Delta$ CT.

#### Estudio de la calcificación vascular

Previo adición de HCl 0,6 N durante 24 horas para extraer el calcio celular o del tejido, el contenido en calcio se cuantificó mediante el método de orto-cresolftaleína complexona. Los niveles de calcio se relativizaron frente al contenido total de proteína.

#### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el programa SPSS 17.0. La comparación de los grupos de tratamiento se realizó por medio de chi-cuadrado en el caso de variables categóricas y por medio de la t de Student para las variables numéricas.

## Resultados

### a) Estudios *in vivo*:

#### Marcadores bioquímicos

La IRC en los ratones WT y TG mostró aumentos en los niveles de urea, producto Ca-P, PTHi y FGF23. En el caso del FGF23 el aumento fue muy superior (10 veces) en los ratones WT con IRC con respecto a su control Sham. El incremento de FGF23 en los ratones TG con IRC fue de 2 veces respecto a su control Sham (Tabla 1).

Tabla 1. Valores bioquímicos de los ratones WT y TG con y sin IRC

	WT Sham (n=7)	WT IRC (n=9)	TG Sham (n=10)	TG IRC (n=10)
Urea (mg/dL)	47±3	83±13*	41±4	94±19*
Producto Ca-P (mg <sup>2</sup> /dL <sup>2</sup> )	69±7	81±12*	60±14	74±13*
PTHi (pg/mL)	316 (0,834)	3.941 (3.649-4.499)*	338 (35-1.836)	3.411 (1.204-3.868)*
FGF23 (pg/mL)	111 (102-125)	1.103 (773-1.143)*	224 (204-268)	437 (153-988)
Calcio aorta (µg/mg)	92±7	95±6	82±11	93±5
Calcio riñón (µg/mg)	3,0 (1,9-4,0)	562,8 (200,2-636,3)*	0 (0-3,3)	20,7 (3,7-123,8)*

WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico; IRC: insuficiencia renal crónica. \*p<0,05 con respecto a su respectivo Sham.

#### Efecto de la IRC moderada sobre la calcificación vascular y los cambios a nivel óseo

A pesar de que la cepa de ratones C57/BL6J empleada para los estudios de calcificación no permitió la obtención de calcificaciones vasculares en las aortas (Tabla 1), se observó un incremento significativo en la expresión génica de Runx2, marcador de diferenciación osteoblástica, solo en el grupo de animales WT con IRC (Figura 1). Este aumento no se observó en los animales TG con IRC. El efecto de la IRC sobre el proceso de calcificación se estudió en otro tejido blando como es el riñón, observándose un aumento del contenido en calcio en los ratones con IRC mayor en los ratones WT que en los ratones TG (Tabla 1).

Los cambios a nivel vascular también se observaron a nivel óseo. En los animales WT con IRC se vio un deterioro de la estructura ósea con respecto a su grupo control Sham, con una disminu-

ción estadísticamente significativa del volumen óseo trabecular (Figura 2A) y del número de trabéculas (Figura 2C), y un aumento de la separación trabecular (Figura 2B) y de la porosidad trabecular (Figura 2D). El grupo de ratones TG con IRC no presentó diferencias con respecto a su grupo control Sham a nivel trabecular.

#### b) Estudios *in vitro*:

##### Efecto de la sobreexpresión de catalasa en la depuración de peróxido de hidrógeno y en la expresión de Runx2 en CMLV

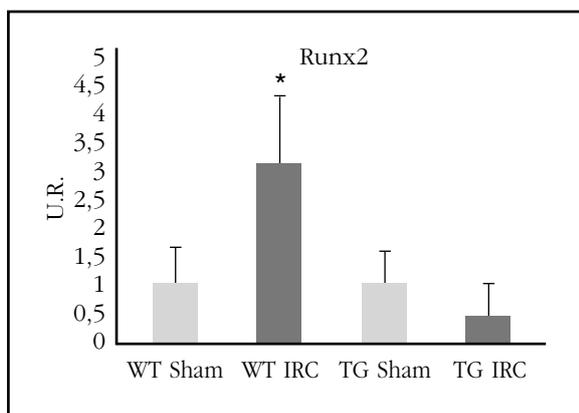
Las CMLV procedentes de los ratones TG presentaron una mayor actividad y expresión proteica de la enzima catalasa a nivel basal que las de los ratones WT (Figura 3 A y B).

Cuando se le añadió medio calcificante a las CMLV de ratones WT se produjo un aumento del contenido en calcio. Este efecto no se observó en las CMLV de los ratones TG (Figura 4A). De forma paralela, se estudió la expresión proteica de Runx2 en CMLV de ratones WT y TG con medio calcificante durante 8 días y se observó un aumento en la expresión de Runx2 en las CMLV de ratones WT que no se observó en las CMLV de los ratones TG (Figura 4B).

##### Estudio de los niveles de marcadores de estrés oxidativo y los niveles proteicos de catalasa

Se observó un aumento de los niveles de fluorescencia de la sonda DHR123 en las CMLV de ratones WT cultivadas con medio calcificante, lo que indica un aumento de las especies reactivas de oxígeno mitocondriales. No se observó este efecto en las CMLV de ratones TG, sino que se produjo una disminución de las especies reactivas de oxígeno (Figura 5). También se observó una menor expresión proteica de la enzima catalasa al cultivar las CMLV de ratones WT durante 8 días con medio calcificante con respecto a las procedentes de ratones TG (Figura 6).

Figura 1. Niveles de expresión génica de Runx2 (unidades relativas) en aorta en los distintos grupos. WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico; IRC: insuficiencia renal crónica



\*p<0,05 respecto a su respectivo Sham.

Figura 2. Cambios a nivel óseo; WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico; IRC: insuficiencia renal crónica. A) Volumen óseo trabecular (BV/TV) en los distintos grupos. \*p<0,05 respecto a su respectivo Sham. B) Separación trabecular (Tb.Sp) en los distintos grupos. \*p<0,001 respecto a su respectivo Sham. C) Número de trabéculas (Tb.N) en los distintos grupos. \*p<0,05 respecto a su respectivo Sham. D) Porosidad trabecular (Tb.Po) en los distintos grupos. \*p<0,05 respecto a su respectivo Sham

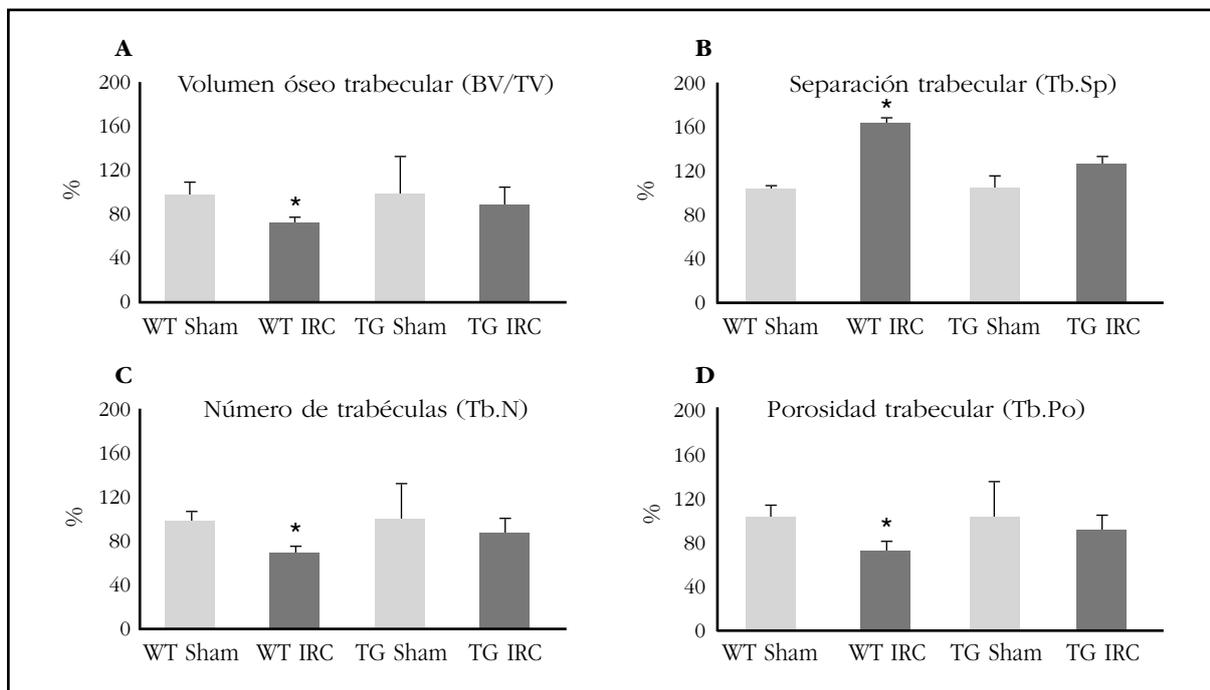


Figura 3. A) Actividad basal de la enzima catalasa en CMLV de ratones WT y TG. B) Expresión proteica en unidades relativas de la enzima catalasa en CMLV de ratones WT y TG mediante Western Blot; WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico. \*p<0,001 respecto al grupo WT

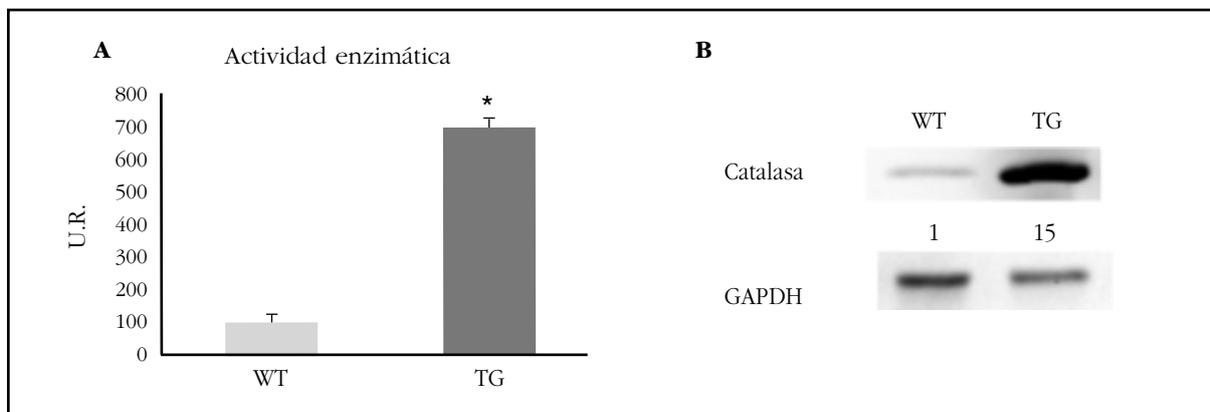


Figura 4. Efecto de la adición de medio calcificante (Ca y P) en CMLV de ratones WT y TG sobre: A) El contenido en calcio durante 8 días. B) La expresión proteica de Runx2 durante 8 días (se muestran los valores de la cuantificación deansitométrica vs. GAPDH) mediante Western Blot. WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico. \*p<0,05 vs. control

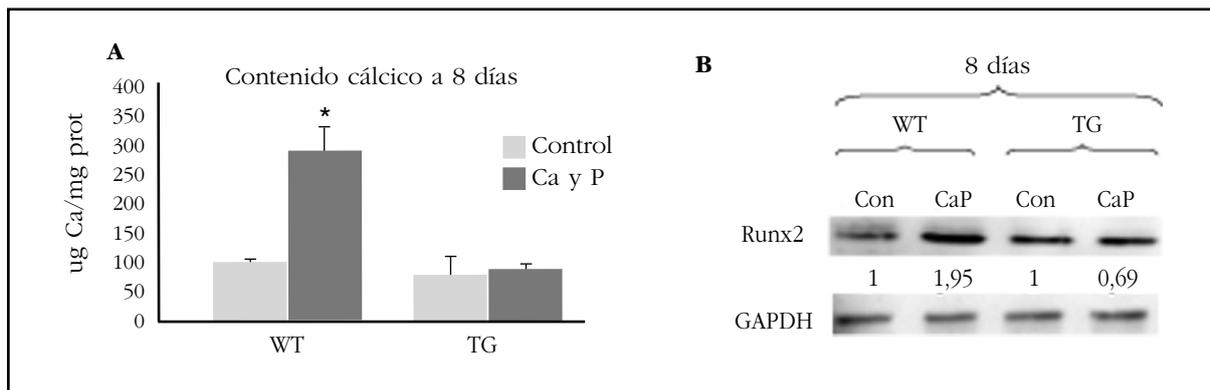


Figura 5. Efecto de la adición de medio calcificante (Ca y P) sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno mitocondriales en CMLV de ratones WT y TG. U.R.: unidades relativas de fluorescencia de la sonda DHR123. WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico. \* $p < 0,05$  respecto al control

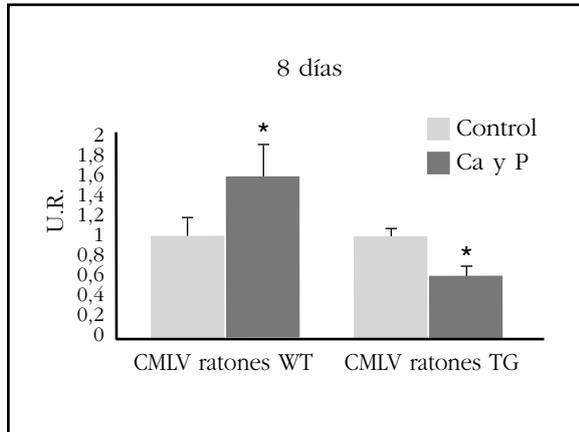
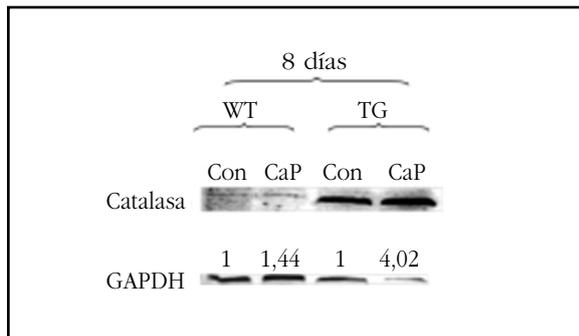


Figura 6. Efecto de la adición de medio calcificante (Ca y P) en CMLV de ratones WT y TG sobre la expresión proteica (unidades relativas) de catalasa a los 8 días de cultivo mediante Western Blot. WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico



## Discusión

En este trabajo hemos podido confirmar que la sobreexpresión de la enzima antioxidante catalasa en un modelo murino protege del proceso de calcificación vascular y del deterioro óseo. En las CMLV de estos mismos ratones se observó un descenso en los niveles de especies reactivas de oxígeno, pero también de proteínas osteogénicas como Runx2.

A nivel bioquímico, resultó particularmente notorio el aumento de FGF23 en los animales WT con IRC respecto al grupo Sham (10 veces), efecto menos marcado en los TG con IRC cuyo aumento fue de 2 veces respecto a su grupo control (Sham). Algunos autores han postulado el papel de FGF23 como inductor del proceso de calcificación<sup>11,12</sup>, e incluso se ha asociado sus altos niveles con mortalidad en enfermos renales<sup>13</sup>. Por otro lado, FGF23 inhibe la expresión génica de Cyp27b1 que codifica la 1-alfa hidroxilasa renal suprimiendo la síntesis de calcitriol a partir de su precursor 25 hidroxivitamina D<sub>3</sub><sup>14</sup>. Pero, además, FGF23 activa la expresión génica de Cyp24 que codifica la 24 hidroxilasa la enzima que hidroliza

e inactiva el calcitriol<sup>15</sup>. Todo ello contribuye al descenso de la síntesis de calcitriol, pero también a su degradación con el resultado de un descenso de los niveles de vitamina D, factor que podría inducir la calcificación vascular como ha sido demostrado en estudios epidemiológicos<sup>16,17</sup>.

El contenido en calcio en aorta en los ratones TG con IRC fue similar al de los ratones WT con IRC. Si bien este hecho puede parecer paradójico y contradictorio al resto de resultados observados, el grupo de Giachelli y cols. ha confirmado la ausencia de calcificación en la aorta en la misma cepa de ratones utilizada para la generación del transgénico<sup>18</sup>. No obstante, el efecto protector de la sobreexpresión de catalasa evitando el acúmulo de calcio se observó en otro tejido blando como el riñón.

Por otro lado, los niveles elevados de FGF23 se han asociado con supresión de la diferenciación osteoblástica y de la mineralización de la matriz ósea *in vitro*<sup>19</sup>. Esto tal vez podría explicar el efecto negativo de la IRC sobre el deterioro óseo en los ratones WT y en mucho menor grado en los ratones TG. Recientes estudios de nuestro grupo, han demostrado un deterioro óseo en un modelo de ratas con IRC y niveles elevados de fósforo, FGF23 y PTH. En este mismo trabajo, estudios de silenciamiento del gen han confirmado que solo FGF23 tiene un efecto directo activando Dkk1<sup>20</sup>, inhibidor de la vía de Wnt que participa en la inactivación de la vía. De este modo, niveles elevados de FGF23, como los observados en nuestro modelo experimental en ratones WT con IRC, podrían haber contribuido al descenso en la densidad mineral ósea a través de una inactivación de la vía de Wnt.

El incremento de las especies reactivas de oxígeno contribuye al aumento de proteínas osteogénicas, siendo un estímulo para el inicio del proceso de calcificación<sup>7,8</sup>. Este efecto ha sido observado en las CMLV de ratones WT sometidas a estímulos calcificantes. Sin embargo, en las CMLV de ratones TG, sometidas a un estímulo calcificante, no solo no aumentó la expresión de especies reactivas de oxígeno sino que disminuyó, al igual que ocurrió con la expresión proteica de Runx2, proteína osteogénica y marcador temprano del proceso de calcificación. De hecho, se ha señalado la importancia del peróxido de hidrógeno como un segundo mensajero implicado en la señalización intracelular regulada por estrés oxidativo<sup>21</sup>. Un descenso del peróxido de hidrógeno por la sobreexpresión de catalasa contribuiría a un menor estrés oxidativo y un descenso del proceso de calcificación vascular a través de una inhibición de Runx2.

A la vista de los resultados obtenidos, se hace necesario conocer los mecanismos por los que la disminución del estrés oxidativo confiere una ventaja tanto a nivel vascular como óseo. La disminución del proceso inflamatorio, el mantenimiento de los niveles proteicos de klotho renal, principal molécula implicada en el envejecimiento, o la regulación de la vía de Wnt podrían ayudar a explicar este diferente comportamiento, por lo que se hace necesario seguir profundizando en este campo.

En resumen, la sobreexpresión de la enzima catalasa redujo el proceso de calcificación tanto *in vivo* como *in vitro*, mostrando *in vivo* que ese descenso se acompañó de una mejora en los parámetros óseos estudiados.

**Declaración de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida por la beca FEIOMM 2012 para promover la investigación en el área de BIOLOGÍA MOLECULAR ÓSEA. Este trabajo ha sido también parcialmente financiado con ayuda del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Fondo Europeo de Desarrollo Regional PI11/00667 y PI13/00014, Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028), Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo, Red de Investigación Renal-RedInRen del ISCIII (RD06/0016/1013, RD12/0021/1023 y RD16/0009), por la Sociedad Asturiana Fomento Investigaciones Metabólicas.

### Bibliografía

1. Stocker R, Keaney JJ. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381-478.
2. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest.* 1996;98:2572-9.
3. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, et al. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/Protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1999;274:22699-704.
4. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, et al. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res.* 2001;88:1291-8.
5. Zmijewski JW, Moellering DR, Le Goffe C, Landar A, Ramachandran A, Darley-Usmar VM. Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:2852-61.
6. Sutra T, Morena M, Bargnoux AS, Caporiccio B, Canaud B, Cristol JP. Superoxide production: a procalcifying cell signalling event in osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells exposed to calcification media. *Free Radic Res.* 2008;42:789-97.
7. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:509-19.
8. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signalling. *J Biol Chem.* 2008;283:15319-27.
9. Wang L, Zhang YG, Wang XM, Ma LF, Zhang YM. Narginin products human adipose-derived mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteogenic differentiation. *Chem Biol Interact.* 2015;242:255-61.
10. Roman-García P, Carrillo-López N, Fernández-Martin JL, Naves-Díaz M, Ruiz-Torres MP, Cannata-Andía JB. High phosphorus diet induces vascular calcification, a related decrease in bone mass and changes in the aortic gene expression. *Bone.* 2010;46:121-8.
11. Fang Y, Ginsberg C, Sugatani T, Monier-Faugere MC, Malluche H, Hruska KA. Early chronic kidney disease-mineral bone disorder stimulates vascular calcification. *Kidney Int.* 2014;85:142-50.
12. Jimbo R, Kawakami-Mori F, Mu S, Hirohama D, Majtan B, Shimizu Y, et al. Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency. *Kidney Int.* 2014;85:1103-11.
13. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2008;359:584-92.
14. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2004;19:429-35.
15. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, et al. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1305-15.
16. Dobnig H, Pilz S, Schrnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med.* 2008;168:1340-9.
17. Naves-Díaz M, Cabezas-Rodríguez I, Barrio-Vázquez S, Fernández E, Díaz-López JB, Cannata-Andía JB. Low calcidiol levels and risk of progression of aortic calcification. *Osteoporos Int.* 2012;23:1177-82.
18. Lau WL, Linnes M, Chu EY, Foster BL, Bartley BA, Somerman MJ, et al. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28:62-9.
19. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, Tanne K, et al. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res.* 2008;23:939-48.
20. Carrillo-López N, Panizo S, Alonso-Montes C, Román-García P, Rodríguez I, Martínez-Salgado C, et al. Direct inhibition of osteoblastic Wnt pathway by fibroblast growth factor 23 contributes to bone loss in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2016;90:77-89.
21. Cozzolino M, Brenna I, Ciceri P, Volpi E, Cusi D, Brancaccio D. Vascular calcification in chronic kidney disease: a changing scenario. *J Nephrol.* 2011;24(Suppl 18):S3-S10.

Giner M<sup>1,2</sup>, Montoya MJ<sup>3</sup>, Miranda C<sup>1</sup>, Vázquez MA<sup>3</sup>, Miranda MJ<sup>1</sup>, Pérez-Cano R<sup>1,3</sup>

1 Unidad de Osteoporosis - Servicio Medicina Interna - Hospital Universitario Virgen Macarena - Sevilla (España)

2 Departamento de Citología Normal y Patológica - Facultad de Medicina - Universidad de Sevilla - Sevilla (España)

3 Departamento de Medicina - Facultad de Medicina - Universidad de Sevilla - Sevilla (España)

# Influencia de la obesidad sobre la microarquitectura y las propiedades biomecánicas en pacientes con fractura de cadera

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000100004>

Correspondencia: Mercedes Giner - Avda. Dr. Fedriani, s/n - 41009 Sevilla (España)

Correo electrónico: merce\_giner@yahoo.es

Fecha de recepción: 18/07/2016

Fecha de aceptación: 15/10/2016

*Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM recibida para asistir al 37º Congreso de la ASBMR (Seattle, 2015).*

## Resumen

**Introducción:** La obesidad y la osteoporosis (OP) son dos patologías muy prevalentes en nuestra sociedad actual. El efecto de la obesidad sobre la calidad ósea se encuentra en debate en la actualidad.

**Objetivo:** Valorar el efecto del peso corporal sobre la microestructura y las propiedades biomecánicas de hueso trabecular procedente de biopsias de extremidad proximal de fémur de pacientes con fractura de cadera por fragilidad.

**Material y método:** Estudio transversal de 16 pacientes con fractura de cadera. 2 grupos según su IMC: (A) sujetos normopeso y (B) con obesidad. Recogimos biopsias de hueso trabecular de cabeza femoral. Valoramos determinaciones bioquímicas (PTH, 25(OH) vitamina D e IGF-1), marcadores de remodelado óseo (PINP,CTX), masa ósea (DMO cuello y cadera total), microestructura ósea y estudio biomecánico ( $\mu$ Ct). El análisis estadístico: t-Student (SPSS 22.0) significación  $p < 0,05$ .

**Resultados:** Todos los pacientes presentaron DMO de cadera en rango osteoporótico. El grupo de obesos presentó niveles superiores de PTH e inferiores de IGF-1, vitamina D y PINP. No encontramos diferencias en los parámetros relacionados con el metabolismo óseo.

El grupo de obesos presentó mejores índices microestructurales alcanzando la significación: mayor volumen óseo (BV/TV:  $36,6 \pm 12,7$  vs.  $19,4 \pm 11,4\%$ , BS/TV:  $5,5 \pm 1,1$  vs.  $3,9 \pm 1,3\%$ ), mayor número de trabéculas (Tb.N:  $1,6 \pm 0,4$  vs.  $1,01 \pm 0,4$ ), mayor anchura de trabéculas (Tb.Th:  $0,22 \pm 0,003$  vs.  $0,17 \pm 0,05$ ) y menor separación trabecular (Tb.Sp:  $0,51 \pm 0,12$  vs.  $0,66 \pm 0,16$ ). Los parámetros biomecánicos confirman una mayor resistencia del hueso trabecular en pacientes obesos.

**Conclusión:** La obesidad puede ser un factor protector de la calidad ósea en la región femoral y tiene menos efecto sobre la densidad mineral ósea.

**Palabras clave:** osteoporosis, obesidad, microestructura hueso trabecular, biomecánica, densidad mineral ósea, marcadores remodelado óseo.

## Influence of obesity on microarchitecture and biomechanical properties in patients with hip fracture

### Summary

**Introduction:** Obesity and osteoporosis (OP) are two very prevalent diseases in our society today. The effect of obesity on bone quality is currently a subject under discussion.

**Objective:** To assess the effect of body weight on the microstructure and biomechanical properties of trabecular bone biopsies from the proximal end of the femur in patients with hip fracture fragility.

**Material and methods:** Cross-sectional study of 16 patients with hip fracture. The 2 groups are divided according to their BMI: (A) normal weight individuals and (B) those with obesity. We collected biopsies of cancellous bone from the femoral head and assessed biochemical determinations (PTH, 25 (OH) vitamin D and IGF-1), bone remodeling markers (PINP, CTX), bone mass (BMD neck and total hip), bone microstructure and biomechanical study ( $\mu$ Ct). Statistical analysis: Student's t test (SPSS 22.0) significance  $p < 0.05$ .

**Results:** All patients had hip BMD in osteoporotic range. The obese group had higher levels of PTH and lower IGF-1, vitamin D and PINP. We found no differences in the parameters related to bone metabolism. The obese group showed better indices reaching microstructural significance: increased bone volume (BV/TV:  $36.6 \pm 12.7$  vs  $19.4 \pm 11.4\%$ , BS/TV:  $5.5 \pm 1.1$  vs  $3.9 \pm 1.3\%$ ), higher trabecular number (Tb.N:  $1.6 \pm 0.4$  vs  $1.01 \pm 0.4$ ), greater trabecular width (Tb.Th:  $0.22 \pm 0.003$  vs  $0.17 \pm 0.05$ ) and lower trabecular separation (Tb.Sp:  $0.51 \pm 0.12$  vs  $0.66 \pm 0.16$ ). Biomechanical parameters confirm greater strength of trabecular bone in obese patients.

**Conclusion:** Obesity may be a protective factor of bone quality in the femoral region and has less effect on bone mineral density.

**Key words:** osteoporosis, obesity, microstructure trabecular bone, biomechanics, bone mineral density, bone turnover markers.

### Introducción

La obesidad y la osteoporosis (OP) son patologías que vienen presentándose de forma epidémica durante las últimas décadas. Ambas son enfermedades de etiología multifactorial, de curso crónico y con una importante morbimortalidad relacionadas con las sociedades económicamente desarrolladas<sup>1,2</sup>. La relación entre ellas ha sido ampliamente investigada desde diferentes puntos de vista, incluyendo estudios epidemiológicos, clínicos y de investigación básica, y se han propuesto diferentes nexos de unión, tales como: 1) ambas están influidas por factores genéticos y ambientales, o la interacción entre ambos; 2) el envejecimiento se asocia con ellas, con alta incidencia de pérdida ósea y adiposidad en la médula ósea; 3) tanto remodelado óseo como obesidad son regulados por un complejo de adipocinas y hormonas; 4) la actividad física mejora las dos patologías; y 5) adipocitos y osteoblastos derivan de progenitores comunes<sup>3</sup>.

La obesidad está determinada por un desbalance en el que la ingesta calórica excede al consumo durante un periodo prolongado<sup>3,4</sup> y constituye un factor de riesgo de hipertensión, dislipemia, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular y algunas formas de tumores<sup>5</sup>. La osteoporosis es una enfermedad metabólica ósea caracterizada por un descenso en la resistencia ósea debido a una reducción en la cantidad y/o calidad ósea, que conduce a un mayor riesgo de fracturas espontáneas y traumáticas<sup>6</sup>.

Tradicionalmente, la obesidad se ha venido considerando como un factor protector de la pérdida ósea y de osteoporosis, por la relación positiva entre peso corporal, o índice de masa corporal (IMC), con la densidad mineral ósea (DMO), que es uno de los principales determinantes del riesgo de fractura osteoporó-

tica<sup>7</sup>. Este efecto beneficioso del peso corporal sobre la DMO se ha relacionado fundamentalmente con la mayor formación ósea, debido a la carga mecánica, además de la contribución de hormonas derivadas del tejido graso y su acción sobre el metabolismo óseo<sup>6,8</sup>. Se ha visto que la incidencia de fracturas de cadera está disminuida en sujetos con un elevado IMC<sup>9</sup>, y al contrario un bajo IMC (inferior a  $18 \text{ kg/m}^2$ ) se ha comprobado que es un factor de riesgo de fractura osteoporótica<sup>10</sup>. Sin embargo, evidencias más recientes, señalan que mientras el sobrepeso (IMC entre  $25\text{-}29 \text{ kg/m}^2$ ) protege frente a la OP, la obesidad (IMC  $>30$ ) interfiere con la salud ósea<sup>11</sup>. Así, se ha comprobado que las fracturas en los niños están asociadas con alteraciones en la composición corporal, tales como un incremento en la adiposidad y en la estructura ósea<sup>12</sup> y se ha descrito un riesgo de osteoporosis y fracturas no vertebrales en sujetos con más alta proporción de grasa corporal, independientemente del peso<sup>11</sup>. Esto ha llevado a sugerir que la relación entre el índice de masa corporal y la obesidad, por un lado, y el riesgo de fractura por fragilidad y la DMO por otra parte es compleja. Un meta-análisis publicado en 2014 demostró que más del 80% de las fracturas por osteoporosis (incluyendo la cadera) se encontraron en las mujeres con un IMC  $<30 \text{ kg/m}^2$ <sup>13</sup> y en mujeres obesas se ha visto que existe una mayor prevalencia de fracturas de húmero proximal y tobillo<sup>14,15</sup>.

En la obesidad también se han descrito alteraciones en los parámetros relacionados con el metabolismo óseo, tales como niveles insuficientes de vitamina D y elevados de PTH, junto con marcadores de remodelado óseo de formación y reabsorción<sup>16</sup>, lo cual apunta, una vez más, a un efecto negativo del tejido graso sobre el óseo. Además, el metabolismo

energético está estrechamente vinculado a la respuesta osteoblástica frente a la insulina regulando la homeostasis y remodelado óseo. En estadios de normoglucemia, la insulina estimula osteoblastogénesis y la producción de RANKL induciendo a un aumento del recambio óseo. Por otro lado, la liberación al medio de osteocalcina descarboxilada regula la producción de insulina de manera endocrina<sup>17</sup>.

El efecto de la obesidad sobre la calidad ósea también se encuentra en debate en la actualidad y son muy pocos los estudios que han valorado la microestructura y las propiedades del hueso en esta patología. Así se ha señalado en mujeres premenopáusicas con obesidad una relación inversa entre la masa grasa y el índice *Trabecular Bone Score* (TBS), valorado en columna lumbar, mientras que no había relación con el análisis estructural de la cadera (HSA)<sup>18</sup>. También se ha comunicado una reducción de hueso cortical, por una mayor porosidad, y sin embargo un aumento de la DMO trabecular volumétrica analizada por tomografía computarizada periférica<sup>19</sup> y una correlación negativa de las propiedades del hueso cortical, en los índices de resistencia (por microindentación), con el IMC y la masa grasa total<sup>20</sup>.

Nuestro objetivo es valorar el efecto del peso corporal sobre la microestructura y las propiedades biomecánicas de hueso trabecular procedente de biopsias de extremidad proximal de fémur de pacientes obesos frente a normopeso con fractura de cadera por fragilidad.

## Material y métodos

### 1. Diseño del estudio y sujetos

El presente trabajo es un estudio experimental, analítico y transversal de casos y controles. Fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Virgen Macarena y el consentimiento informado por escrito se obtuvo de todos los participantes. Todos los pacientes incluidos accedieron a donar sus muestras óseas para el estudio.

Los pacientes han sido incluidos de forma aleatoria. Ingresaban en la Unidad de Gestión Clínica de Traumatología del Hospital Universitario Virgen Macarena para ser intervenidos de artroplastia de cadera por fractura osteoporótica por fragilidad o por caída de altura inferior a la del individuo sin mecanismo de aceleración, todos ellos mayores de 65 años. Incluimos 16 pacientes divididos en dos grupos según IMC: 7 sujetos formaron el grupo A con IMC <25, y 9 el grupo B con IMC >30.

Excluimos a los pacientes que tomaban medicación con influencia sobre el metabolismo óseo (antirresortivos, osteoformadores, corticoides y anticonvulsivantes) y/o suplemento de vitamina D o calcio. A todos ellos se les realizó la historia clínica, determinaciones densitométricas, histomorfométricas y biomecánicas.

### 2. Datos clínicos

Se les realizó una historia clínica que incluía datos de filiación; fecha de nacimiento; medidas antropométricas: peso (kg); altura (cm) e índice de masa corporal (IMC) (peso en kg/altura en m<sup>2</sup>). Antecedentes de osteoporosis y fracturas previas.

### 3. Determinaciones bioquímicas

Las determinaciones bioquímicas, a partir de las muestras de suero, fueron realizadas en el Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla).

Los parámetros que se determinaron fueron: glucosa, hemoglobina glicosilada (HbA1c), calcio, fósforo, factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (IGF-I), fosfatasa alcalina total (FAT), telopéptido carboxilo-terminal del colágeno tipo I ( $\beta$ -CrossLaps) y propéptido amino-terminal del colágeno tipo I (P1NP) en autoanalizador ADVIA 2400 (Siemens). La vitamina D [25(OH)D<sub>3</sub>] y la PTH se determinaron mediante inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) en el equipo de Inmunoensayo CP ADVIA Centaur (Siemens).

### 4. Valoración de la masa ósea

Cuantificamos la densidad mineral ósea (DMO) de columna lumbar (L2-L4) y cadera (cadera total y cuello femoral) mediante Absorciometría Dual de Rayos X (DXA, Hologic-Discovery, Hologic Inc., Waltham, Massachusetts, EE.UU.). *In vivo* el CV fue 1,40% (columna L2-L4), 2,9% (cuello de femur) y 2,5% (cadera total).

### 5. Histomorfometría ósea y estudio biomecánico

El análisis microestructural de las biopsias se llevó a cabo mediante microtomografía computarizada (micro-TC) empleando el equipo comercial SkyScan 1172, 100 kV, 1.3 MPixels. Se realizó el escaneado de toda la muestra para reconstruir las imágenes y utilizarlas para el análisis cuantitativo y cualitativo de la microestructura ósea trabecular. Para el análisis de dicha microestructura se empleó el software proporcionado con el equipo de microtomografía (CTAn 1.7.0.5). Las variables cuantitativas que se determinaron fueron: fracción volumétrica ósea (BV/TV), superficie específica ósea (BS/BV), densidad de superficie ósea (BS/TV), grosor trabecular (Tb.Th), número trabecular (Tb.N), separación trabecular (Tb.Sp), grado de anisotropía (DA), relación entre estructuras en forma de platos y barras (como *structural model index*, SMI) y conectividad trabecular (como *trabecular pattern factor*, Tb.Pf).

Las muestras se sometieron a un test mecánico de compresión monoaxial hasta su rotura con el objetivo de evaluar las propiedades mecánicas elástico-plásticas de la biopsia (Microtest EM1/10/FR/m) a una velocidad de carga constante y empleando una célula de carga de 1 kN o de 10 kN, una vez obtenida la curva de fuerza-desplazamiento se determinó el módulo elástico de Young (E), la dureza (u), la tensión máxima soportada ( $\sigma$ ), la fuerza máxima alcanzada (F), la rigidez (S) y la energía necesaria para fracturar (U).

### 6. Análisis estadístico

Las variables fueron analizadas para la distribución de la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se realizó la prueba t de Student para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Para el manejo estadístico de resultados se ha utilizado el paquete SPSS versión 22.0 para Windows (IBM Corp., Armonk, Nueva York, EE.UU.). En todos los casos se consideró como nivel de significación  $p < 0,05$ .

Los datos son expresados como media  $\pm$  DS.

### Resultados

Las características antropométricas y la DMO de cadera, cuello de fémur y columna se muestran en la tabla 1. Ambos grupos fueron similares en cuanto a edad, peso y estilo de vida. Los valores de DMO, expresados de forma absoluta y la T-score de cadera, cuello de fémur y de columna son inferiores en el grupo de normopeso, obteniendo la mayor diferencia en la T-score de cadera de  $-2,87 \pm 0,84$  en sujetos con normopeso y  $-1,67 \pm 1,07$  en sujetos con obesidad aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

El FRAX® riesgo a 10 años de fractura mayor y de cadera fue menor en los pacientes obesos que en los pacientes con un IMC  $< 25$  Kg/m<sup>2</sup> aunque no fue estadísticamente significativo.

El análisis bioquímico, de parámetros relacionados con el metabolismo óseo, se muestra en la tabla 2. No observamos diferencias entre ambos grupos de estudio. Cabe destacar que los niveles de vitamina D se encontraron por debajo de 20 ng/mL en casi todos los pacientes estudiados independientemente del IMC del paciente.

Los índices microestructurales muestran diferencias en la microarquitectura del hueso esponjoso entre ambos grupos (Figura 1). El grupo de sujetos obesos presenta mayor BV/TV ( $p=0,015$ ), BS/TV ( $p=0,015$ ), Tb.Th ( $p=0,04$ ) y Tb.N ( $p=0,007$ ).

Además, tienen menor separación trabecular Tb.Sp ( $p=0,038$ ) y valores inferiores de Tb.Pf ( $p=0,015$ ) y SMI ( $p=0,012$ ). Indicando todo ello una mejor microestructura ósea en los sujetos osteoporóticos obesos frente a los con normopeso.

Los parámetros biomecánicos estudiados (Figura 2) confirman una mayor resistencia del hueso trabecular en pacientes obesos respecto a los sujetos con normopeso. El grupo obeso mostró una rigidez mayor, tanto en la rigidez debida a las características estructurales ( $p=0,029$ ), como a la debida a las propiedades del material de hueso: el módulo de Young ( $p=0,01$ ), la tensión máxima ( $p=0,036$ ) y la fuerza máxima alcanzada ( $p=0,034$ ). Además, la energía necesaria para fracturar al hueso osteoporótico obeso es el doble que en los sujetos con normopeso, aunque esta diferencia no llegó a alcanzar significación estadística.

### Discusión

El efecto de la obesidad sobre el tejido óseo todavía no está claro. Si bien es conocido que las mujeres obesas tienen reducido el volumen de hueso cortical e incrementado el volumen del hueso trabecular<sup>19</sup>, existen pocos datos sobre la repercusión en la microestructura y/o biomecánica del hueso de personas obesas.

Nuestros resultados señalan un efecto positivo del peso corporal sobre parámetros de microarquitectura y biomecánica en hueso trabecular. A pesar de que ambos grupos de estudio han presentado fractura de cadera, con valores de DMO semejantes, las características de calidad ósea son mejores en el grupo de personas obesas que en personas con normopeso.

Tabla 1. Características antropométricas, FRAX® y DMO (media  $\pm$  desviación estándar)

	Normopeso	Obesos	p
Género (♂/♀)	3/4	2/7	
Edad (años)	78 $\pm$ 9	79 $\pm$ 7	
Altura (cm)	157 $\pm$ 9	153 $\pm$ 8	
Peso (kg)	55,07 $\pm$ 9,7	81,53 $\pm$ 12,4	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,1 $\pm$ 2,4	33,8 $\pm$ 3,6	0,000
10 años de riesgo de fractura mayor (FRAX®)	16,5 $\pm$ 9,8	13,8 $\pm$ 12,0	
10 años de riesgo de fractura de cadera (FRAX®)	11,8 $\pm$ 8,3	7,6 $\pm$ 9,8	
DMO cuello fémur (gHA/cm <sup>2</sup> )	0,456 $\pm$ 0,16	0,52 $\pm$ 0,09	
DMO cadera (gHA/cm <sup>2</sup> )	0,589 $\pm$ 0,10	0,759 $\pm$ 0,17	
T-score cuello	-3,47 $\pm$ 1,36	-3,02 $\pm$ 0,64	
T-score cadera	-2,87 $\pm$ 0,84	-1,67 $\pm$ 1,07	
DMO columna (gHA/cm <sup>2</sup> )	0,81 $\pm$ 0,05	0,86 $\pm$ 0,85	
T-score columna	-2,57 $\pm$ 0,67	-2,17 $\pm$ 0,64	

Tabla 2. Valores bioquímicos (media  $\pm$  DE)

	Normopeso	Obesos
Glucosa (mg/dL)	98,33 $\pm$ 33,5	129,5 $\pm$ 32,5
HbA1c (%)	5,7 $\pm$ 1,4	6,0 $\pm$ 0,8
IGF-1 (ng/mL)	75,16 $\pm$ 42,7	42,37 $\pm$ 12,51
PTH (pg/mL)	46,5 $\pm$ 32,3	76,4 $\pm$ 46,7
$\beta$ -CrossLaps ( $\mu$ g/mL)	0,8 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,3
P1NP (ng/mL)	89,4 $\pm$ 57,5	54,1 $\pm$ 36,5
Calcio (mg/dL)	9,6 $\pm$ 0,5	9,1 $\pm$ 0,1
Fósforo (mg/dL)	3,6 $\pm$ 1,1	2,9 $\pm$ 0,4
Fosfatasa alcalina total (U/L)	229,8 $\pm$ 28,2	211,37 $\pm$ 67,5
25-hydroxivitamina D (ng/mL)	12,9 $\pm$ 9,1	9,3 $\pm$ 4,6

El estudio por micro-CT de las biopsias de hueso trabecular de la cabeza de fémur procedentes de los pacientes fracturados obesos, nos indica que presentan una mayor cantidad de hueso, en relación con el volumen corporal total, una mayor densidad ósea y mayor número de trabéculas, siendo además éstas más anchas. A la vez, también obtuvimos que las trabéculas tienen menor separación entre ellas. Todos estos valores microestructurales correlacionan con los valores obtenidos en los estudios de biomecánica en los que observamos como el hueso trabecular de los pacientes obesos presentan una mayor rigidez y un mayor modelo de Young que el grupo de sujetos con un IMC <25 kg/m<sup>2</sup>.

Consideramos que este efecto sobre la microarquitectura puede ser debido a dos hechos fundamentales: a factores hormonales y/o mecánicos. A nivel hormonal, el incremento de la aromatización de los estrógenos a andrógenos que se da en el tejido adiposo, produce una disminución de las hormonas sexuales unidas a globulina, una mayor transformación de las hormonas suprarrenales a estronas a nivel periférico e hiperinsulinemia, lo cual conlleva un efecto mitógeno en los osteoblastos<sup>21</sup>. Además, estos pacientes, al soportar mayor peso, tiene una mayor actividad mecánica sobre el hueso que también puede actuar de manera estimuladora para la osteogénesis<sup>19,21-23</sup>.

El efecto positivo del peso corporal sobre el tejido óseo también nos lleva a cuestionar si el tejido graso, muscular o ambos, en mayor o menor cuantía, son los responsables de estos resultados. Si es la mayor cantidad de tejido graso o el muscular la responsable de este efecto beneficioso esquelético no podemos asegurarlo, ya que no disponemos de datos sobre composición hormonal ni de niveles séricos de adipocinas y mioquinas en estos sujetos.

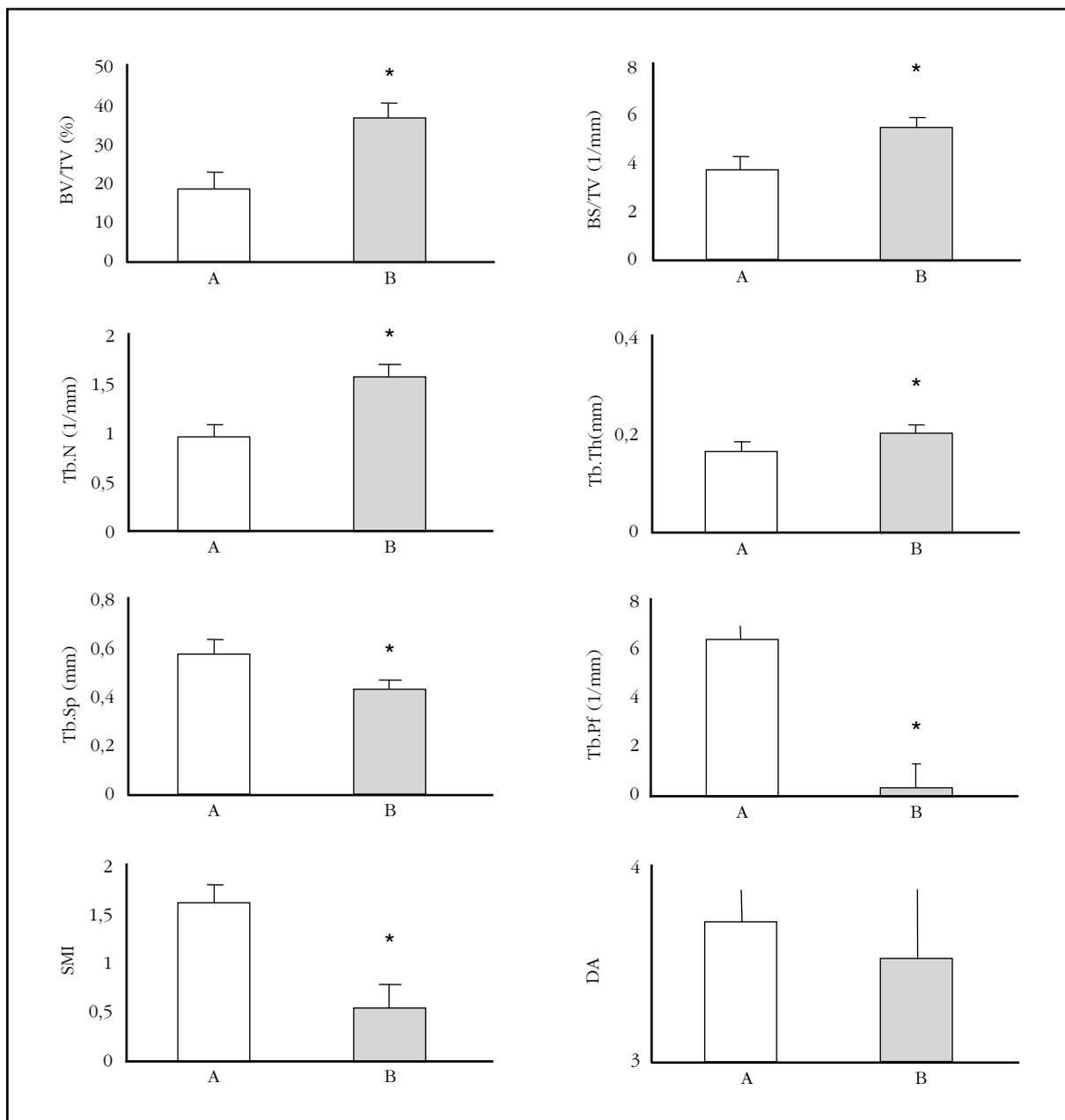
Nuestros resultados no concuerdan con los de otros autores que señalan una peor microestructu-

ra ósea de fémur en personas obesas<sup>24</sup>. Sin embargo, estos autores no presentan resultados de biopsias óseas sino que los valores microestructurales son evaluados por DXA. Recientemente Shen *et al.*, en un estudio similar, no han encontrado tales diferencias concluyendo que el tejido adiposo puede interferir en los valores obtenidos ya que por DXA, los tejidos blandos que rodean el hueso, pueden dar una lectura errónea en la medida del área ósea y por tanto de la cantidad de contenido mineral óseo<sup>25,26</sup>.

La obesidad se asocia a una mayor masa ósea y a un menor riesgo de fracturas de cadera. Sin embargo, otras fracturas como las de tobillo u húmero tienen una mayor incidencia en personas obesas<sup>27</sup>. En nuestro caso, la DMO fue comparable en ambos grupos de estudio, la probabilidad de fractura según FRAX<sup>®</sup> también fue semejante entre sujetos con normopeso y obesos, pero hemos de considerar que en todos nuestros pacientes ya estaba presente la fractura de cadera, no había una mayor incidencia de fracturas previas en las personas obesas respecto a las de normopeso.

Nuestros pacientes obesos presentan ligeros aumentos de los niveles de PTH y menores de vitamina D y P1NP. En mujeres sanas post-menopáusicas los valores de PTH correlacionan positivamente con el IMC<sup>19</sup> y están descritos bajos niveles de vitamina D. Estos menores niveles de vitamina D se han atribuido a una mayor absorción de dicha hormona por parte de los adipocitos<sup>28</sup> y a una menor exposición solar, debida a la menor movilidad que presentan los sujetos obesos<sup>29</sup>. Por otro lado, está descrito que los pacientes obesos tienden a tener una menor actividad del remodelado óseo; se desconoce si esto es debido al efecto de otras enfermedades asociada a la obesidad como la diabetes *mellitus* tipo 2, entre otras, y/o por efecto de las adipocinas y mioquinas sobre el remodelado<sup>21,29</sup>.

Figura 1. Comparación de los parámetros estructurales entre pacientes con normopeso (A) y obesos (B)



BV/TV: fracción volumétrica ósea; BS/BV: superficie específica ósea; BS/TV: densidad de superficie ósea; Tb.Th: grosor trabecular; Tb.N: número trabecular; Tb.Sp: separación trabecular; DA: grado de anisotropía; SMI: *Structural model index*; Tb.Pf: conectividad trabecular.

Los valores se expresan como media ± DE. \*valores estadísticamente significativos.

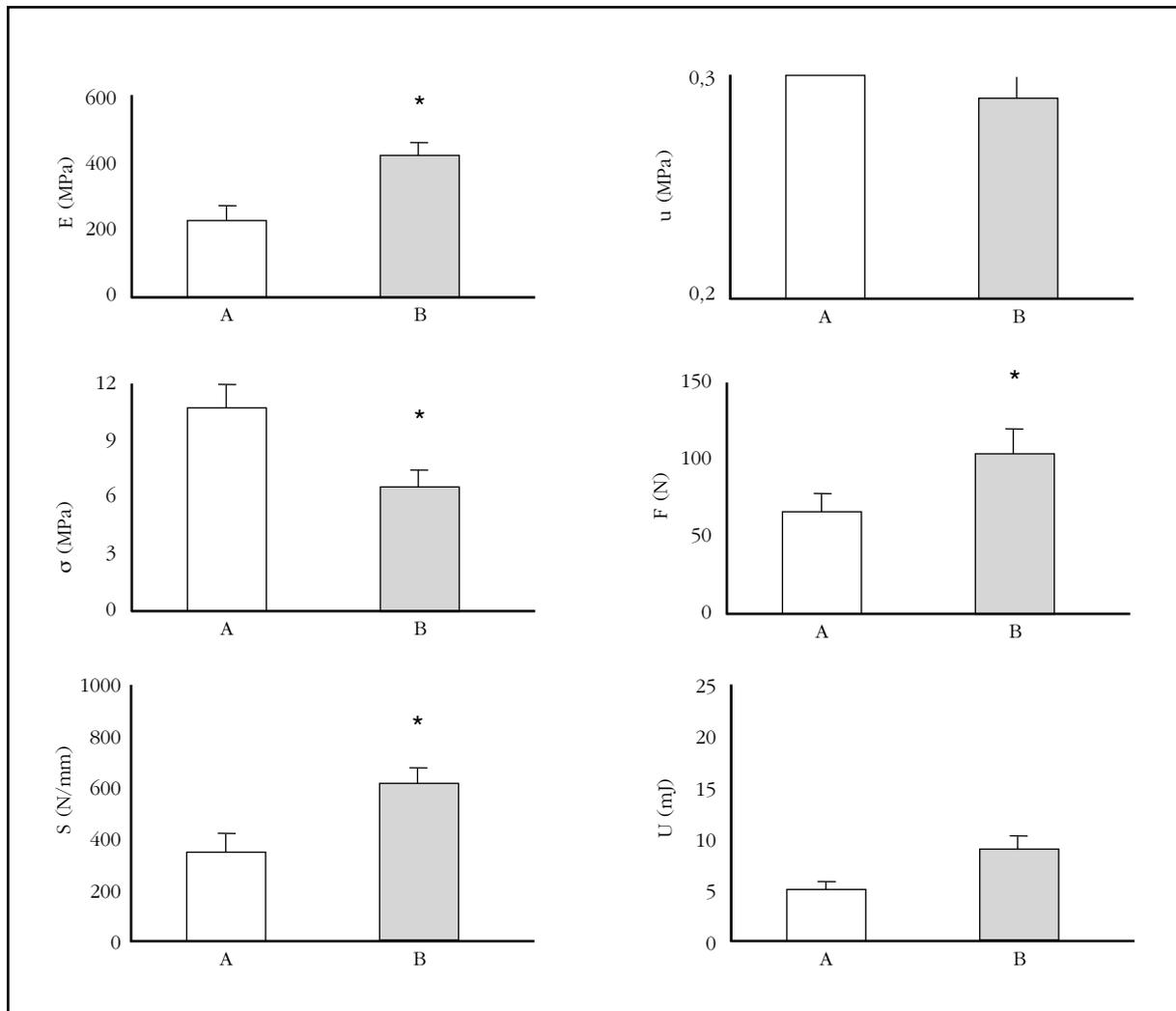
Nuestro estudio tiene varias limitaciones: la principal es el tamaño de la muestra, que es relativamente pequeño, pero los datos obtenidos de microestructura y biomecánica, que eran el objetivo de nuestro estudio, son bastante contundentes y con fuerza estadística. No disponemos de niveles séricos de adipocinas y hormonas derivadas del tejido graso para poder relacionarlos con los parámetros microestructurales y biomecánicos.

En conclusión, podemos decir que las mediciones de las biopsias de hueso trabecular procedentes de la cabeza del fémur, nos indican que los pacientes obesos presentan mejores propiedades biomecá-

nicas y mejor microarquitectura ósea que los pacientes con normopeso, mostrando un efecto beneficioso del peso corporal sobre la calidad del hueso.

**Agradecimientos:** Nuestro más profundo agradecimiento a todos los participantes en el estudio y para el personal de la Unidad de Gestión de Ortopedia y Traumatología del H.U.V. Macarena Ortopedia y Traumatología (España). Este estudio he estado financiado por el Proyecto de Investigación de Excelencia de la Junta de Andalucía (España) (CTS-5360/09) y por el ISCIII 2013-RED 12-0043 (RETICEF).

Figura 2. Comparación de los parámetros biomecánicos entre los dos grupos de estudio: sujetos normopeso (A) y obesos (B)



Los parámetros representados son: módulo elástico de Young (E); dureza (u); tensión máxima soportada ( $\sigma$ ); fuerza máxima alcanzada (F); rigidez (S); energía necesaria para fracturar (U).

Los valores se expresan como media  $\pm$  DE. \*valores estadísticamente significativos.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses en relación con este trabajo.

**Ética:** El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional (HUV Macarena, Sevilla, España) y el consentimiento informado se obtuvo de cada participante.

### Bibliografía

- Mitchell NS, Catenacci VA, Wyatt HR, Hill JO. Obesity: overview of an epidemic. *Psychiatr Clin North Am.* 2011;34(4):717-32.
- Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos.* 2013;8:136.
- Migliaccio S, Greco EA, Fornari R, Donini LM, Lenzi A. Is obesity in women protective against osteoporosis? *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2011;4:273-82.
- Rössner S. Obesity: the disease of the twenty-first century. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26(Suppl 4):S2-4.
- Sowers JR. Obesity as a cardiovascular risk factor. *Am J Med.* 2003;115 Suppl:37S-41S.
- Consensus development conference: prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1991;90(1):107-10.
- 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(9):1622-7.
- Colaianni G, Brunetti G, Faienza MF, Colucci S, Grano M. Osteoporosis and obesity: Role of Wnt pathway in human and murine models. *World J Orthop.* 2014;5(3):242-6.
- De Laet C, Kanis JA, Odén A, Johanson H, Johnell O, Delmas P, et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005;16(11):1330-8.
- Mafi Golchin M, Heidari L, Ghaderian SM, Akhavan-Niaki H. Osteoporosis: A Silent Disease with Complex Genetic Contribution. *J Genet Genomics.* 2016;43(2):49-61.

11. Zhao L-J, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Hamilton J, et al. Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2008;23(1):17-29.
12. Migliaccio S, Falcone S, Spera G. Bone modeling and remodeling: from biology to clinical application. *Aging Clin Exp Res.* 2004;16 (Suppl 3):20-2.
13. Yu EW, Thomas BJ, Brown JK, Finkelstein JS. Simulated increases in body fat and errors in bone mineral density measurements by DXA and QCT. *J Bone Miner Res.* 2012;27(1):119-24.
14. Compston JE, Flahive J, Hosmer DW, Watts NB, Siris ES, Silverman S, et al. Relationship of weight, height, and body mass index with fracture risk at different sites in postmenopausal women: the Global Longitudinal study of Osteoporosis in Women (GLOW). *J Bone Miner Res.* 2014;29(2):487-93.
15. Johansson H, Kanis JA, Odén A, McCloskey E, Chapurlat RD, Christiansen C, et al. A meta-analysis of the association of fracture risk and body mass index in women. *J Bone Miner Res.* 2014;29(1):223-33.
16. Schollenberger AE, Heinze JM, Meile T, Peter A, Königsrainer A, Bischoff SC. Markers of bone metabolism in obese individuals undergoing laparoscopic sleeve gastrectomy. *Obes Surg.* 2015;25(8):1439-45.
17. Lecka-Czernik B, Stechschulte LA. Bone and fat: a relationship of different shades. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:124-9.
18. Schorr M, Dichtel LE, Gerweck A V, Torriani M, Miller KK, Bredella MA. Body composition predictors of skeletal integrity in obesity. *Skeletal Radiol.* 2016;45(6):813-9.
19. Sukumar D, Schlüssel Y, Riedt CS, Gordon C, Stahl T, Shapses SA. Obesity alters cortical and trabecular bone density and geometry in women. *Osteoporos Int.* 2011;22(2):635-45.
20. Sundh D, Rudäng R, Zoulakis M, Nilsson AG, Darelid A, Lorentzon M. A. High amount of local adipose tissue is associated with high cortical porosity and low bone material strength in older women. *J Bone Miner Res.* 2016;31(4):749-57.
21. Palermo A, Tuccinardi D, Defeudis G, Watanabe M, D'Onofrio L, Lauria Pantano A, et al. BMI and BMD: The potential interplay between obesity and bone fragility. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(6). pii: E544.
22. Evans AL, Paggiosi MA, Eastell R, Walsh JS. Bone density, microstructure and strength in obese and normal weight men and women in younger and older adulthood. *J Bone Miner Res.* 2015;30(5):920-8.
23. Lecka-Czernik B, Stechschulte LA, Czernik PJ, Dowling AR. High bone mass in adult mice with diet-induced obesity results from a combination of initial increase in bone mass followed by attenuation in bone formation; implications for high bone mass and decreased bone quality in obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;410:35-41.
24. Shen J, Leslie WD, Nielson CM, Majumdar SR, Morin SN, Orwoll ES. Associations of body mass index with incident fractures and hip structural parameters in a large canadian cohort. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(2):476-84.
25. Yu EW, Thomas BJ, Brown JK, Finkelstein JS. Simulated increases in body fat and errors in bone mineral density measurements by DXA and QCT. *J Bone Miner Res.* 2012;27(1):119-24.
26. Nelson L, Gulenchyn KY, Atthey M, Webber CE. Is a fixed value for the least significant change appropriate? *J Clin Densitom.* 2010;13(1):18-23.
27. Prieto-Alhambra D, Premaor MO, Fina Avilés F, Hermosilla E, Martínez-Laguna D, Carbonell-Abella C, et al. The association between fracture and obesity is site-dependent: a population-based study in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2012;27(2):294-300.
28. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(3):690-3.
29. Mpalaris V, Anagnostis P, Goulis DG, Iakovou I. Complex association between body weight and fracture risk in postmenopausal women. *Obes Rev.* 2015;16(3):225-33.

**Roca-Ayats N<sup>1</sup>, Cozar Morillo M<sup>1</sup>, Gerousi M<sup>1</sup>, Czwan E<sup>2</sup>, Urreiziti R<sup>1</sup>, Martínez-Gil N<sup>1</sup>, García-Giralt N<sup>3</sup>, Mellibovsky L<sup>3</sup>, Nogués X<sup>3</sup>, Díez-Pérez A<sup>3</sup>, Balcells S<sup>1</sup>, Grinberg D<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Microbiología y Estadística - Facultad de Biología - Universidad de Barcelona - CIBERER (Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras) - IBUB (Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona) - Barcelona (España)

<sup>2</sup> Laboratorios Roche Diagnostics Deutschland GmbH - Mannheim (Alemania)

<sup>3</sup> Unidad de Investigación de Patología Ósea y Articular (URFOA) - IMIM (Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas) - Parque de Salud Mar - RETICEF (Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad) - Barcelona (España)

## Identificación de variantes genéticas asociadas con la densidad mineral ósea (DMO) en el gen *FLJ42280*

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000100005>

Correspondencia: Daniel Grinberg - Departamento de Genética, Microbiología y Estadística - Facultad de Biología - Avda. Diagonal, 643 - 08028 Barcelona (España)

Correo electrónico: [dgrinberg@ub.edu](mailto:dgrinberg@ub.edu)

Fecha de recepción: 15/10/2016

Fecha de aceptación: 15/12/2016

*Trabajo premiado con una beca de Investigación FEIOMM 2014.*

### Resumen

*FLJ42280* es un posible gen de susceptibilidad a la osteoporosis. Distintos estudios de GWAs han identificado 4 SNPs no-codificantes en este gen que se asocian a la densidad mineral ósea (DMO) y el riesgo de fractura.

Para descubrir la causa de la asociación entre estos SNPs y la osteoporosis, se realizó una búsqueda de variantes genéticas mediante resecuenciación de 28 kb que contienen el gen, en una selección truncada de mujeres con DMO muy baja (n=50) o muy alta (n=50) de la cohorte BARCOS (Barcelona Cohorte Osteoporosis, cohorte de mujeres postmenopáusicas de Barcelona). Las variantes encontradas se filtraron y se analizó su frecuencia en cada grupo. Se analizó el solapamiento de las variantes con elementos funcionales del proyecto ENCODE y también se calculó el desequilibrio de ligamiento entre los SNPs de la región. Finalmente, se hizo un análisis de eQTL de los 4 SNPs no-codificantes respecto a los niveles de expresión de genes cercanos a *FLJ42280* en linfoblastos.

Se seleccionaron 110 variantes. Las diferencias de sus frecuencias entre los dos grupos estuvieron por debajo del poder estadístico del diseño experimental. Sin embargo, 3 variantes solaparon con posibles *enhancers* y una solapó con un *enhancer* activo en osteoblastos (rs4613908). Se observó un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los 4 SNPs no-codificantes y el SNP rs4613908, que pertenecen a un bloque que abarca el gen casi por completo. Ninguno de los SNPs no-codificantes mostró asociación con los niveles de expresión de genes cercanos a *FLJ42280*.

En conclusión, el SNP rs4613908 podría estar implicado funcionalmente en la determinación de la DMO. Serán necesarios experimentos concretos para confirmarlo.

**Palabras clave:** *FLJ42280*, densidad mineral ósea, variantes genéticas, eQTLs, enhancers.

## Identification of genetic variants associated with bone mineral density (BMD) in the *FLJ42280* gene

### Summary

*FLJ42280* is a possible gene for susceptibility to osteoporosis. Different studies of GWAs have identified 4 non-coding SNPs in this gene associated with bone mineral density (BMD) and fracture risk.

In order to ascertain the cause of the association between these SNPs and osteoporosis, we searched for genetic variants by resequencing the 28-kb gene, in a truncated selection of women with very low (n=50) or very high BMD (N=50) of the BARCOS cohort (Barcelona Cohort Osteoporosis, cohort of postmenopausal women in Barcelona). The variants found were filtered and their frequency analyzed in each group.

The overlap of the variants with functional elements of the ENCODE project was calculated. Finally, an eQTL analysis of the 4 SNPs-coding was performed on the expression levels of *FLJ42280* neighbor genes in lymphoblasts.

In all, 110 variants were selected. The differences in their frequencies between the two groups were below the statistical power of the experimental design. However, three variants overlapped with possible enhancers and one overlapped with an active enhancer in osteoblasts (rs4613908). A strong linkage disequilibrium was observed between the 4 non-coding SNPs and the SNP rs4613908, which belong to a block spanning the gene almost completely. None of the non-coding SNPs showed association with the expression levels of *FLJ42280* neighbor genes.

In conclusion, the SNP rs4613908 could be involved functionally in determining BMD. Tangible experiments will be required to confirm this.

**Key words:** *FLJ42280*, bone mineral density, genetic variants, eQTLs, enhancers.

### Introducción

La osteoporosis es una enfermedad compleja caracterizada por baja masa ósea y deterioro de la microarquitectura del tejido óseo que conduce a un mayor riesgo de fractura. Por ejemplo, en EE.UU. se producen 1,5 millones de nuevos casos de fracturas cada año, lo que representa una enorme carga económica para los sistemas de atención de la salud. La osteoporosis se define clínicamente a través de la medición de la densidad mineral ósea (DMO), que sigue siendo el mejor predictor de fractura<sup>1,2</sup>. Estudios de heredabilidad utilizando gemelos o familias han demostrado que el 50-85% de la variación en la densidad mineral ósea está determinada genéticamente<sup>3</sup>. Las fracturas osteoporóticas también muestran heredabilidad independiente de la densidad mineral ósea<sup>4</sup>.

Los estudios de asociación en genoma completo (GWAs) han ampliado muchísimo la comprensión de la arquitectura genética de enfermedades comunes y complejas<sup>5</sup>. Esta aproximación genómica está proporcionando información clave sobre los mecanismos de la enfermedad, con perspectivas para el diseño de estrategias más eficaces de evaluación del riesgo de enfermedad y para el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas<sup>6</sup>. Sin embargo, las variantes genéticas que se identifican en los GWAs se encuentran con frecuencia en las zonas no-codificantes del genoma, cuya posible función es menos conocida y en muchos casos estas señales pueden estar en desequilibrio de ligamiento con variantes causales que no han sido genotipadas. El meta-análisis de GWAs para DMO y fractura osteoporótica de Estrada *et al.*<sup>7</sup> identificó hasta 56 *loci* genómicos asociados con la DMO, 14 de los cuales también estaban asociados con las fracturas osteoporóticas. Uno

de los SNPs cuya asociación con ambos fenotipos mostró una significación más sólida (rs4727338) se encuentra en una región intrónica del gen *FLJ42280*, señalándolo como un *locus* de susceptibilidad para la osteoporosis (Figura 1). Otros trabajos de GWA demostraron que otros SNPs intrónicos del mismo gen (rs7781370, rs10429035 y rs4729260) también se asociaban con la DMO<sup>8,9</sup>. *FLJ42280* es un gen muy poco estudiado, cuya relación con la biología del hueso se desconoce.

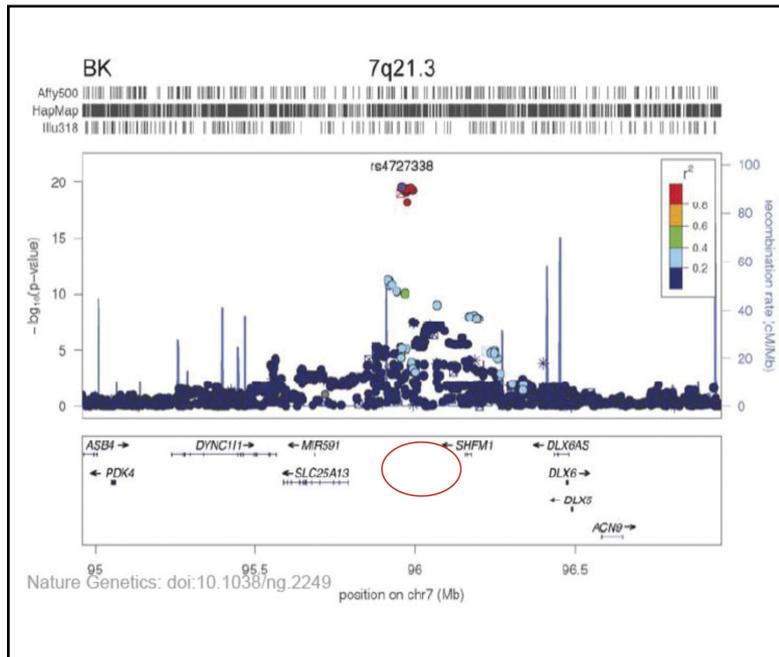
En este contexto, el objetivo de este trabajo fue dar sentido a esta asociación mediante la determinación de cuál es la variante causal. ¿Es rs4727338 el SNP causal o hay otro SNP en desequilibrio de ligamiento con él que sea el verdadero SNP funcional? Para ello, hemos explorado la variabilidad genética de la región genómica donde se encuentra el gen *FLJ42280* y hemos abordado la funcionalidad de estas variantes por enfoques diferentes. En primer lugar, por resecuenciación de la región en mujeres con DMO extremadamente alta o extremadamente baja para buscar variantes con una distribución desequilibrada entre los dos grupos; en segundo lugar, estudio bioinformático de la superposición de las variantes halladas con señales funcionales definidas en el proyecto ENCODE (*The Encyclopedia of DNA Elements*) y finalmente evaluación del posible papel como eQTLs de algunas de las variantes halladas.

### Material y métodos

#### Selección de la muestra de estudio

La muestra de este estudio está formada por 100 mujeres de la cohorte BARCOS<sup>10</sup>. Esta cohorte está compuesta por unas 1.500 mujeres postmenopáu-

Figura 1. Región genómica 7q21.3 con las señales de asociación a DMO de los SNPs testados por Estrada *et al.*<sup>7</sup>. La coordenada entre la posición genómica del SNP rs4727338 (eje x) y el  $-\log_{10}$  del valor de  $p$  (eje y) de su asociación con la DMO (eje y) está marcada con un cuadro de línea roja. Dicho SNP muestra la mayor significación en esta región. Los puntos de colores son las coordenadas del resto de SNPs estudiados en la región. Cada color indica un grado distinto de desequilibrio de ligamiento entre cada SNP y el SNP rs4727338. El gen *FLJ42280* no está mostrado porque, en el momento en que se realizó el meta-análisis de GWAs, este gen todavía no estaba anotado en el genoma. Su localización entre *SLC25A13* y *SHFM1* se indica con un óvalo rojo. Esta figura es una modificación de la que se presenta en Estrada *et al.*<sup>7</sup>



sicas españolas monitorizadas en el Hospital del Mar de Barcelona. Las mujeres diagnosticadas de osteomalacia, de enfermedad de Paget, de algún trastorno metabólico o endocrino, o que estuvieran siguiendo una terapia de sustitución hormonal o tratadas con fármacos que pudieran afectar la masa ósea, fueron excluidas de la cohorte. Las mujeres con una menopausia temprana (antes de los 40 años) también fueron excluidas. La información recogida para cada muestra fue la DMO, la edad, la edad de menarquía, la edad de menopausia, los años desde la menopausia, el peso y la estatura. De cada paciente se obtuvieron muestras de sangre y consentimientos informados escritos, según las regulaciones del Comité Ético de Investigación Clínica del Parque de Salud Mar. La DMO ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) fue medida en el cuello del fémur y en la columna lumbar. Se utilizó un densitómetro de rayos X de energía dual para realizar las medidas.

Se seleccionaron dos grupos de 50 muestras con valores de DMO extremos, según el valor del  $Z$ -score. Concretamente, los grupos consistieron en las 50 muestras con el  $Z$ -score más alto (rango: de 2,98 a 0,73) y las 50 muestras con el  $Z$ -score más bajo (rango: de -2,41 a -4,26) de la cohorte BARCOS.

### Preparación de las muestras genómicas

El ADN de cada mujer se extrajo a partir de muestras de sangre periférica. La concentración y la calidad de las muestras de ADN (*ratios* 260/280 y 260/230) se midieron por espectrofotometría en un aparato NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products). Para determinar la integridad del ADN, se analizaron 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente, las muestras se normalizaron a una concentración de 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

### Long-Range PCR (LR-PCR)

Se dividió una región genómica de 28 kb (que contiene el gen *FLJ42280* [22 kb] junto con 3,8 kb de región flanqueante a 5' y 2 kb de región flanqueante a 3') en 7 fragmentos solapantes (Figura 2). Los tamaños y las coordenadas de estos 7 fragmentos y los pares de cebadores utilizados para amplificarlos, se muestran en la tabla 1. Los fragmentos, de entre 2 y 5 kb, se amplificaron mediante LR-PCR. Cada reacción de LR-PCR incluyó: 100 ng de ADN genómico, 5  $\mu\text{l}$  de tampón *Ex Taq* "Magnesium +" (20 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ; Takara) x10, mezcla de dNTPs (a 2,5 mM cada uno), *Ex Taq* polimerasa (5 U/ $\mu\text{l}$ ) y cebadores (20  $\mu\text{M}$ ), en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ .

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700 (Applied Biosystems). Cada fragmento requirió unas condiciones de tiempo de elongación y temperatura de hibridación distintas. El número total de amplificones fue de 700 (100 muestras x 7 fragmentos). Se comprobó la cantidad y calidad de todos los amplificones mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v en tampón TBE x1.

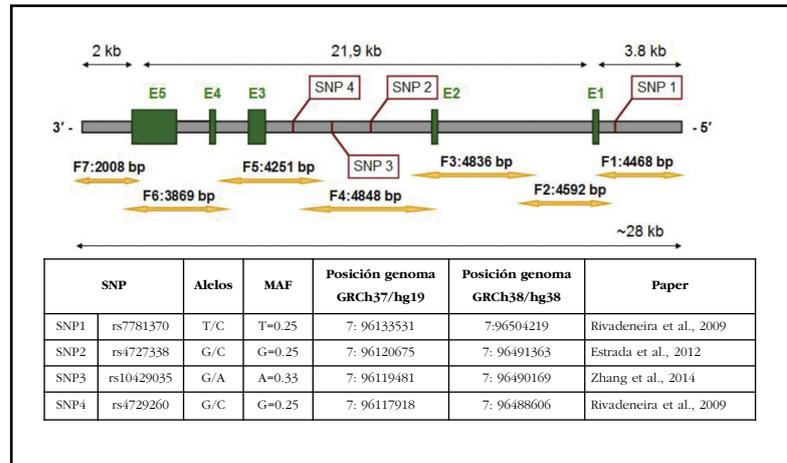
### Purificación y cuantificación de las muestras

Para eliminar los restos de los reactivos de la PCR, los productos de PCR se purificaron utilizando placas de filtro de 96 pocillos con un tamaño de poro adecuado (Pall Corporation). Se aplicó el vacío (Vacuum Manifold, Merck Millipore) y el ADN retenido en el filtro se resuspendió en 35  $\mu\text{l}$  de agua milliQ. A continuación, los productos de PCR se cuantificaron mediante Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent and Kit (Life Technologies), según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se construyó una curva estándar de concentraciones mediante medidas de emisión de fluorescencia a 520 nm después de haber excitado el ADN a 480 nm. La curva se utilizó posteriormente para calcular la concentración del ADN de las muestras.

**Normalización de las concentraciones de las muestras y pooling**

Las muestras en las placas se normalizaron a una concentración de 5 ng/μl y, a continuación, se mezcló en un solo tubo 5 μl de cada muestra de una placa (un tubo por placa) mediante el The epMotion® 5075 Liquid Handling Workstation (Eppendorf). Así, se obtuvieron 14 tubos con 250 μl cada uno, dos para cada fragmento de PCR (DMO alta y DMO baja). Los 14 pools se concentraron hasta 5 veces utilizando el Genevac EZ-2 evaporator (Genevac SP Scientific) y se cuantificó cada tubo mediante Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies). Finalmente, los fragmentos de PCR se mezclaron equimolarmente en dos tubos, uno para la DMO alta y otro para la DMO baja.

Figura 2. En la región genómica de *FLJ42280* estudios previos de GWA han identificado 4 SNPs que muestran asociación con la DMO, cuyos detalles se muestran en la tabla incluida en la figura. Para conocer mejor la variabilidad de este *locus*, la región se subdividió en 7 fragmentos solapantes (flechas amarillas) para su resecuenciación en mujeres con muy alta o muy baja DMO



**Secuenciación masiva en paralelo**

La secuenciación masiva de las muestras se llevó a cabo en el Servicio de Genómica de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona, utilizando el GS 454 Junior System (Roche). Brevemente, se fragmentó el ADN por nebulización, se prepararon dos librerías marcadas con adaptadores (secuencias de 10 nucleótidos) distintos, una para cada grupo, que se mezclaron en un solo tubo. Seguidamente, se amplificó la mezcla por PCR de emulsión y la librería final se cargó en una placa *picotiter* donde se llevó a cabo la pirosecuenciación. Se realizaron 4 carreras de secuenciación, correspondientes a 140 Mb de datos finales (35 Mb/carrera). Este volumen de datos proporciona una cobertura teórica de 40x para cada muestra inicial.

**Procesamiento de los datos de secuenciación y selección de variantes**

Las lecturas obtenidas de la secuenciación fueron preprocesadas en base a su calidad y se alinearon contra el genoma de referencia (GRCh37) utilizando el programa GS Mapper (Roche). Las lecturas se indexaron y filtraron utilizando SAMtools. Se detectaron las variantes presentes en los dos grupos mediante GATK utilizando parámetros de filtrado estándar<sup>11</sup>. Las variantes encontradas se priorizaron según los siguientes criterios: se seleccionaron las variantes con una cobertura de al menos 1.000 lecturas, presentes en un 1% de las lecturas y con un *strand bias* bajo. El número de lecturas de las variantes que pasaron los filtros fue normalizado por la cobertura y las variantes fueron clasificadas entre comunes (con una frecuencia mayor al 5%) y raras o de baja frecuencia (con una frecuencia menor al 5%).

**Análisis funcional y estadístico de las variantes**

Se compararon las frecuencias de cada variante entre los dos grupos mediante un test exacto de

Fisher, aplicando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. El análisis funcional de las variantes consistió en mirar si estaban descritas en bases de datos como dbSNP y 1000 Genomas y, en caso afirmativo, buscar su MAF en la población europea e ibérica. Además, para las variantes exónicas se observó qué cambio de aminoácido suponían y su severidad predicha por SIFT, PolyPhen y Provean. Para las variantes intrónicas, se analizó la región que contiene la variante: lugares de hipersensibilidad a la DNasa, unión de factores de transcripción, metilación del ADN, modificaciones de histonas, regiones reguladoras, etc. Todos estos datos fueron obtenidos de bases de datos y repositorios como Ensembl, UCSC Genome Browser, ENCODE, BioMart, MatInspector. También se utilizó HaploReg para buscar anotaciones de regulación. Finalmente, todas las variantes encontradas fueron analizadas con el *Variant Effect Predictor* de Ensembl y UCSC y con el *SNP function prediction* del Instituto Nacional de Ciencias de la Salud Ambiental (*National Institute of Environmental Health Sciences*) de los EE.UU.

**Análisis del desequilibrio de ligamiento**

Para calcular el desequilibrio de ligamiento entre todas las variantes de la región genómica de *FLJ42280* se utilizaron los genotipos de los SNPs presentes en la región y los haplotipos de los individuos de HapMap fase 3. Para calcular tal desequilibrio y generar un gráfico se utilizó el software HaploView.

**Análisis de eQTLs**

Los SNPs que dieron significativos en los distintos GWAs y el SNP rs4613908 fueron evaluados como posibles eQTLs mediante dos aproximaciones: utilizando el portal del proyecto GTEx y utilizando los genotipos de esos SNPs en individuos de HapMap y los niveles de expresión de genes en *cis* en los

Tabla 1. Amplicones utilizados para secuenciar la región *FLJ42280*

Frag	Primers	Tamaño (pb)	Coordenadas genómicas
1	<b>1F</b> TTGACCTGAATACTGCCGC <b>1R</b> GCCAAATGAATGTGGACAAG	4.468	7:96136619-96132152
2	<b>2F</b> CACTGCTGGGTCTTAGATTGG <b>2R</b> GCATGTGTGCATGATGTTGG	4.592	7:96132302-96127711
3	<b>3F</b> TGCAAGTTTCCCTCAATTCATC <b>3R</b> TCCCTCTCATCTGTGCAACAC	4.836	7:96127863-96123028
4	<b>4F</b> TTAGGTGAGTAGAAAGCAATGGC <b>4R</b> CTGGGTGGCTATAGACCTGAATAG	4.848	7:96123158-96118311
5	<b>5F</b> GCGGCACTGTGAGAGTACATC <b>5R</b> CCTGGTGAAATGGGAACA	4.251	7:96118477-96114227
6	<b>6F</b> CTGACACTTTGGCAGCACC <b>6R</b> GGGATTGTTGAAGCTGACCC	3.869	7:96114348-96110480
7	<b>7F</b> CAACCATCACAAACCCATAGAC <b>7R</b> CCTGAGCAAGTCTCGTAAGTG	2.008	7:96110702-96108695

mismos individuos. Concretamente, se obtuvieron los genotipos de los SNPs de 210 individuos no emparentados de la fase 1 y 2 de HapMap y los niveles de expresión de los genes *SHFM1*, *SLC25A13* y *DLX5* de una línea celular linfoblastoide de los mismos individuos obtenidos.

## Resultados

### Variantes halladas y pistas sobre su función

La región genómica de *FLJ42280* (28 kb) se secuenció masivamente en dos *pools* de DNA correspondientes a las 50 mujeres con mayor DMO y las 50 mujeres con menor DMO de la cohorte BARCOS (ver detalles en Material y Métodos), a una alta profundidad (alrededor 3.600x por grupo). Se comparó el número y la frecuencia de las variantes que se encontraron en cada grupo. Se identificó un total de 110 variantes, de las cuales 18 eran nuevas y 59 fueron variantes raras o de baja frecuencia (Tabla 2). Se observó que el número de variantes de baja frecuencia entre los dos grupos extremos era equilibrado. Así mismo, se observó que las diferencias de frecuencia de todas las variantes estaban por debajo de la potencia estadística del diseño, aunque 9 mostraron una tendencia.

Para cada variante, se analizó su superposición con elementos funcionales anotados en el genoma por el proyecto ENCODE. Cuatro de las variantes solaparon con posibles secuencias potenciadoras de la transcripción (o *enhancers*) de osteoblastos y de ellas una [SNP rs4613908; MAF(CEU)=0,39] solapó con un enhancer activo en osteoblastos (Figura 3).

### Análisis de desequilibrio de ligamiento

También se estudió el desequilibrio de ligamiento entre todas las variantes comunes en esta región. Se creó un gráfico de desequilibrio de ligamiento (LD)

utilizando HaploView e información de haplotipos del proyecto HapMap (Figura 4) y se observó que hay un gran bloque de LD que incluye casi todo el gen (a excepción de la región 3' UTR) y que por la parte *upstream* del gen se extiende 5 kb más allá de la región resecuenciada. También se constató que los SNPs rs4613908 y rs4727338 (meta-análisis de GWAs de Estrada *et al.*) presentan una gran desequilibrio de ligamiento entre ellos.

### Análisis de eQTLs

Para completar el análisis funcional, se realizó un análisis de eQTLs. Disponiendo de los genotipos de los cuatro SNPs asociados a la DMO, y del SNP rs4613908 de 210 individuos del proyecto HapMap y de los niveles de expresión génica de un *array* genómico en líneas linfoblastoides de estos mismos individuos, se determinó si los diferentes alelos o genotipos de los SNPs correlacionaban con los niveles de expresión génica de los genes situados en la región genómica de *FLJ42280*. Ninguno de los SNPs mostró influencia sobre los niveles de expresión de los genes *SHFM1*, *SLC25A13* o *DLX5* (en el *array* no hay información de niveles de expresión de *FLJ42280*). También se accedió a la base de datos GTEx para recabar información de eQTL para los mismos SNPs y el resultado fue negativo para todos ellos. Finalmente, se realizaron búsquedas de anotaciones de regulación en HaploReg. Este último análisis confirmó que la secuencia que rodea el SNP rs4613908 está altamente conservada entre los mamíferos y que en varios tipos celulares, incluyendo los osteoblastos primarios, contiene marcas de cromatina típicas de secuencias potenciadoras (H3K4me1, H3K27ac). Por otra parte, HaploReg destacó la alteración de motivos reguladores de este SNP y de rs10429035, pero no mostró ningún efecto de estos SNPs sobre la expresión génica.

Tabla 2. Número y localización de variantes de un solo nucleótido halladas en este estudio

	Crudo	Filtrado	Codificante	Región reguladora*	Putativo enhancer de osteoblasto	Enhancer activo en osteoblasto
Variantes comunes	96	51	0	12	3	1
LFV	24.243	59	1	16	1	0
Total	24.339	110	1	28	4	1

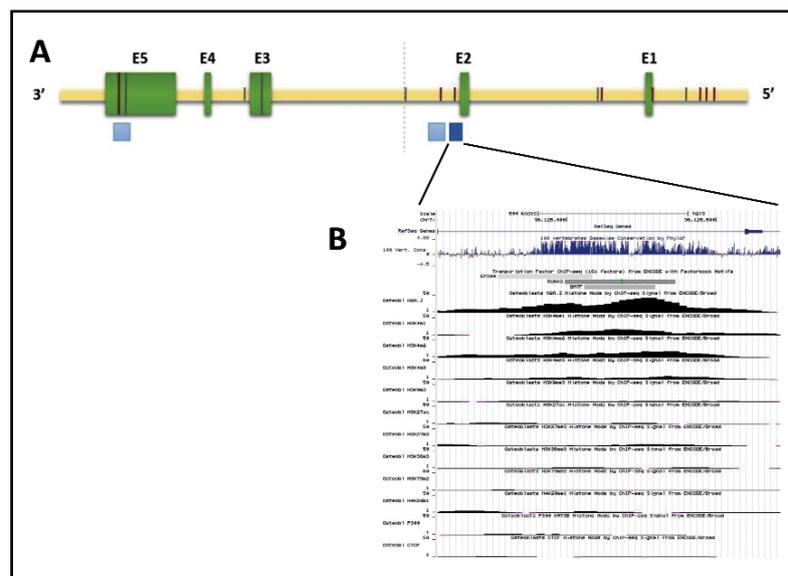
\*incluye regiones flanqueantes, 5'UTR, 3'UTR e intrones; LFV: variante de baja frecuencia (MAF<5%).

**Discusión**

Se ha realizado un barrido exhaustivo de una región genómica (28 kb) en 7q21.3 que contiene varias señales muy fuertes de asociación entre 4 SNPs y la densidad mineral ósea<sup>79</sup>. Se ha querido conocer todas las variantes puntuales presentes en regiones codificantes (exones del gen *FLJ42280*) y no codificantes (intrones, 3'UTR, 5'UTR y flancos del gen) y evaluar el potencial funcional de estas variantes para pronosticar cuáles de ellas podrían ser las responsables de la asociación con la DMO. Se ha observado que la variante rs4613908 solapa con un potenciador génico (*enhancer*) activo en osteoblastos contenido en una secuencia con elevada conservación evolutiva. Dicho SNP (con sus dos variantes alélicas) podría estar afectando a la DMO por el hecho de alterar este potenciador génico. Queda por determinar cuál es el gen diana del mencionado potenciador.

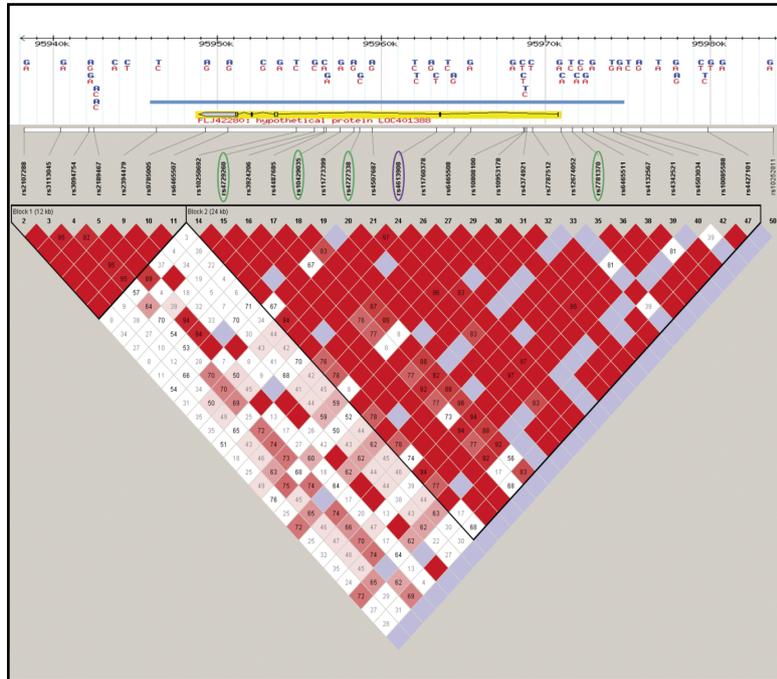
Hasta la fecha, no nos constan otros trabajos de otros autores que hayan abordado la base funcional de la asociación con DMO de los SNPs situados en regiones no codificantes del gen *FLJ42280*. De hecho, este gen ha sido anotado recientemente en el genoma humano, de modo que cuando se detectó la asociación de los SNPs de la región, el gen todavía no constaba en el mapa de 7q21.3 y los SNPs quedaban entre los genes *SLC25A13* y *SHFM1* (Figura 1). Por ello, Estrada *et al.*<sup>7</sup> propusieron que la funcionalidad de la asociación podría estar relacionada con *SLC25A13*. Actualmente, *FLJ42280* sigue siendo un gen anotado, con muy pocos datos experimentales que lo confirmen. Es pues muy probable que la función de los SNPs asociados a la DMO esté relacionada con otros genes. En este sentido, el gen *SHFM1* se ha asociado a algunos casos hereditarios de malformación de mano hendida-pie hendido (*Split hand and foot malformation 1*; OMIM #183600) y el gen *DLX5*, situado a continuación, es de hecho el gen res-

ponsable de dicha enfermedad, dado que existen pacientes con mutaciones puntuales en *DLX5* que cosegregan con la enfermedad<sup>12</sup>. Se han descrito una serie de potenciadores que afectan a la expresión de *DLX5* en distintos tejidos y estadios del desarrollo y que se distribuyen a lo largo de varios cientos de kilobases. Estudios realizados en ratones y pez cebra han caracterizado estos potenciadores y han mostrado que funcionan durante el desarrollo<sup>13,14</sup>. Algunos de ellos muestran especificidad de tejido y correlacionan con determinados fenotipos presentes en pacientes con malformación de mano hendida-pie hendido portadores de varias anomalías cromosómicas (deleciones o translocaciones) que afectan a los potenciadores mencionados. Al colocar estos potenciadores de *DLX5* sobre el mapa de la región 7q21.3, hemos visto con sorpresa que el SNP rs4613908, que acabamos de comentar como buen candidato funcional, se



ponsable de dicha enfermedad, dado que existen pacientes con mutaciones puntuales en *DLX5* que cosegregan con la enfermedad<sup>12</sup>. Se han descrito una serie de potenciadores que afectan a la expresión de *DLX5* en distintos tejidos y estadios del desarrollo y que se distribuyen a lo largo de varios cientos de kilobases. Estudios realizados en ratones y pez cebra han caracterizado estos potenciadores y han mostrado que funcionan durante el desarrollo<sup>13,14</sup>. Algunos de ellos muestran especificidad de tejido y correlacionan con determinados fenotipos presentes en pacientes con malformación de mano hendida-pie hendido portadores de varias anomalías cromosómicas (deleciones o translocaciones) que afectan a los potenciadores mencionados. Al colocar estos potenciadores de *DLX5* sobre el mapa de la región 7q21.3, hemos visto con sorpresa que el SNP rs4613908, que acabamos de comentar como buen candidato funcional, se

Figura 4. Gráfico del desequilibrio de ligamiento presente en la región genómica de *FLJ42280*. Se observa un bloque grande (24 kb) que incluye gran parte del gen excepto su región 3'UTR. Los 4 SNPs que se han asociado a DMO en los distintos GWAs están señalados con óvalos verdes. El SNP que solapa con el potenciador activo en osteoblastos está señalado con un óvalo morado. La línea horizontal azul indica la región genómica resecuenciada en este estudio



encuentra en uno de estos potenciadores (eDLX#18), situado a unas 500 kb de *DLX5*. El potenciador eDLX#18 se ha descrito como activo en los arcos branquiales en estadios embrionarios<sup>13</sup>.

Existen evidencias de que *DLX5* está involucrado en la determinación de la DMO<sup>15</sup>, lo que nos hace proponer la hipótesis de que el potenciador eDLX#18 también es activo como un potenciador para *DLX5* en osteoblastos de adultos y que nuestro SNP de interés es un eQTL en osteoblastos. Será muy necesario comprobar esta hipótesis mediante análisis de expresión de *DLX5* en osteoblastos primarios y genotipación de rs4613908 de los mismos.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses en relación con este trabajo.

**Agradecimientos:** Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la ayuda económica brindada por una beca FEIOMM de 2014.

## Bibliografía

- Johnell O, Kanis JA, Oden A, Johansson H, De Laet C, Delmas P, et al. Predictive Value of BMD for Hip and Other Fractures. *J Bone Miner Res.* 2005;20:1185-94.
- Kanis JA, Oden A, Johnell O, Johansson H, De Laet C, Brown J, et al. The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporos Int.* 2007;18:1033-46.
- Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. Genetics of Osteoporosis. *Endocr Rev.* 2002;23:303-26.
- Deng HW, Chen WM, Recker S, Stegman MR, Li JL, Davies KM, et al. Genetic determination of Colles' fracture and differential bone mass in women with and without Colles' fracture. *J Bone Miner Res.* 2000;15:1243-52.
- Hardy J, Singleton A. Genomewide Association Studies and Human Disease. *N Engl J Med.* 2009;360:1759-68.
- Manolio TA. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *N Engl J Med.* 2010;363:166-76.
- Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani E, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet.* 2012;44:491-501.
- Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldórsson BV, Hsu YH, Richards JB, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2009;41:1199-206.
- Zhang LL, Choi HJ, Estrada K, Leo PJ, Li J, Pei YF, et al. Multistage genome-wide association meta-analyses identified two new loci for bone mineral density. *Hum Mol Genet.* 2014;23:1923-33.
- Bustamante M, Nogués X, Enjuanes A, Elosua R, García-Giralt N, Pérez-Edo L, et al. COL1A1, ESRI, VDR and TGFBI polymorphisms and haplotypes in relation to BMD in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2007;18:235-43.
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet.* 2011;43:491-8.
- Shamseldin HE, Faden MA, Alashram W, Alkuraya FS. Identification of a novel *DLX5* mutation in a family with autosomal recessive split hand and foot malformation. *J Med Genet.* 2012;49:16-20.
- Birnbaum RY, Everman DB, Murphy KK, Gurrieri F, Schwartz CE, Ahituv N. Functional characterization of tissue-specific enhancers in the *DLX5/6* locus. *Hum Mol Genet.* 2012;21:4930-8.
- Rasmussen MB, Kreiborg S, Jensen P, Bak M, Mang Y, Lodahl M, et al. Phenotypic subregions within the split-hand/foot malformation 1 locus. *Hum Genet.* 2016;135:345-57.
- Ulsamer A, Ortuño MJ, Ruiz S, Susperregui AR, Osses N, Rosa JL, et al. BMP-2 Induces Osterix Expression through Up-regulation of *DLX5* and Its Phosphorylation by p38. *J Biol Chem.* 2008;283:3816-26.

**Torregrosa Suau O<sup>1</sup>, Guilló Quiles E<sup>2</sup>, Mora Rufete A<sup>3</sup>**

1 Unidad de Metabolismo Óseo. Servicio de Medicina Interna

2 Medicina Familiar y Comunitaria. Departamento de Salud Elche

3 Servicio de Medicina Interna

Hospital General Universitario de Elche. Elche. Alicante (España)

## Paniculitis mesentérica asociada al uso de bifosfonatos: ¿son estos más proinflamatorios de lo que sabemos?

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000100006>

Correspondencia: Óscar Torregrosa Suau - Hospital General Universitario de Elche - Camino de la Almazara, s/n - 03203 Elche - Alicante (España)

Correo electrónico: [oscartorregrosa@msn.com](mailto:oscartorregrosa@msn.com)

Fecha de recepción: 07/11/2016

Fecha de aceptación: 13/12/2016

### Resumen

La paniculitis mesentérica se caracteriza por una inflamación crónica inespecífica del tejido adiposo del mesenterio intestinal, y su etiología es desconocida. Se ha relacionado con malignidad, vasculitis, enfermedades reumáticas y con determinados fármacos. Presentamos un caso de paniculitis mesentérica asociada a la toma de bifosfonatos, no descrita previamente en la literatura, apoyando así el concepto de sus potenciales efectos secundarios proinflamatorios.

**Palabras clave:** *paniculitis mesentérica, bifosfonatos, proinflamatorio.*

## Mesenteric panniculitis associated with the use of bisphosphonates: are these more proinflammatory than we know?

### Summary

Mesenteric panniculitis is characterized by chronic inflammation of the adipose tissue of the intestinal mesentery, and its etiology is unknown. It has been associated with malignancy, vasculitis, rheumatic diseases and the use of certain drugs. We present a case of panniculitis associated with bisphosphonate use, not previously described in the literature, thus suggesting its potential secondary proinflammatory effects.

**Key words:** *mesenteric panniculitis, bisphosphonates, proinflammatory.*

## Introducción

La paniculitis mesentérica es un trastorno poco frecuente caracterizado por una inflamación crónica inespecífica del tejido adiposo del mesenterio intestinal de etiología desconocida<sup>1</sup>. Puede desarrollarse de forma independiente o en asociación con otras alteraciones, lo cual ha sido objeto de muchas discusiones. Ha sido relacionada con diversas condiciones, como vasculitis, enfermedades granulomatosas, enfermedades reumáticas, enfermedades malignas y pancreatitis<sup>2</sup>, tabaquismo y el uso de determinados fármacos (betabloqueantes, metildopa, sulfamidas, salicilatos y anticonceptivos orales).

Actualmente se reconoce que esta entidad presenta varios estadios evolutivos. También se clasifica en distintos tipos en función de las características radiológicas: tipo I (42%), engrosamiento difuso del mesenterio desde raíz a los bordes del intestino delgado; tipo II (32%), masa nodular aislada en raíz mesentérica; tipo III (20%), el mesenterio contiene múltiples nódulos de tamaño variable<sup>3</sup>. Los criterios diagnósticos anatomopatológicos incluyen: presencia de gran cantidad de macrófagos espumosos en la fase inicial de lipodistrofia mesentérica; infiltrado de células plasmáticas, células gigantes de cuerpo extraño, y macrófagos espumosos en la paniculitis mesentérica; y en el estadio final destaca el depósito de colágeno y la fibrosis en los tejidos<sup>4</sup>.

A pesar de que se han reconocido distintos factores que pueden desencadenar la enfermedad, su etiología en determinados casos sigue siendo incierta. Una vez diagnosticada, no existe un tratamiento específico. Se recomiendan los corticoides, aunque se han descrito casos de remisión espontánea. La resección quirúrgica se deja para casos en los que hay obstrucción intestinal por inflamación y cicatrización secundaria. También se han descrito respuestas a antibióticos, la radioterapia y la ciclofosfamida.

## Presentación del Caso

Presentamos el caso de una mujer de 67 años, sin hábitos tóxicos, sin antecedentes médicos de interés salvo cervicartrosis y espondilolisis en tratamiento rehabilitador, y una osteoporosis postmenopáusica para la que sigue un tratamiento con bifosfonatos (BF) desde hace 3 años, que desarrolló una paniculitis mesentérica que no se justificó por otras causas.

Nuestra paciente, tras 3 años de tratamiento con risedronato, comienza con dolor abdominal difuso de forma global, sin relación con las comidas y con episodios de exacerbaciones frecuentes durante un periodo de tiempo de unos 2-3 meses.

En una de las exacerbaciones la paciente ingresa y se le realiza, entre otras pruebas, una Tomografía Axial Computarizada (TAC) abdominal en el que se pone de manifiesto la paniculitis mesentérica (Figura 1).

Tras descartar razonablemente otras etiologías clínicas de la paniculitis mesentérica (Tabla 1)<sup>5</sup>, se suspenden los BF que tomaba y se reevalúa a los 6 meses con un nuevo TAC abdominal de control, en el que se observa una resolución completa de las lesiones inflamatorias abdominales que presentaba en el TAC previo (Figura 2).

## Discusión

No existen casos similares descritos en la literatura, ni hemos encontrado en los ensayos clínicos de referencia de bifosfonatos: FIT, VERT, BONE, HORIZON<sup>6-9</sup>, casos de paniculitis mesentérica, aunque sí se ha asociado su uso más clásicamente a otros procesos inflamatorios. Se han descrito casos de efectos secundarios oculares de este grupo de fármacos la mayoría inflamatorios como uveítis, escleritis y conjuntivitis<sup>10</sup>. La conjuntivitis es el efecto adverso ocular más frecuente, aunque su incidencia real es muy baja. En general, responde rápidamente a tratamiento tópico, incluso si mantenemos el fármaco, aunque es más prudente suspenderlo, al menos de forma temporal. Otra complicación, menos frecuente pero potencialmente más grave, es la uveítis. Su incidencia es muy baja, entre 2 y 5 casos cada 10.000 pacientes tratados. En general, su localización es anterior, aunque hay descrito algún caso aislado de uveítis posterior. Su aparición es muy variable, con una mediana de días tras el inicio del fármaco de 70 días (entre 1 y 146) y su incidencia es mayor en pacientes tratados con BF intravenosos.

También se ha observado un aumento en la predisposición a sufrir uveítis en pacientes con enfermedades asociadas, como las espondiloartropatías, el síndrome de Behçet, la granulomatosis de Wegener o la sarcoidosis y/o que sigan tratamiento con determinados fármacos, en los que el BP actuaría de factor precipitante<sup>11</sup>.

Los bifosfonatos son potentes inhibidores de los osteoclastos ejerciendo una fuerte interacción con estas células, produciendo una marcada disminución de la reabsorción ósea<sup>12</sup>.

Con la administración de bifosfonatos se han descrito diversos efectos adversos, que parecen corresponder a "efectos de clase". Dichos efectos pueden variar de unos bifosfonatos a otros dependiendo, entre otros factores, de la vía de administración. Entre estos efectos secundarios destacan las alteraciones del tracto digestivo superior como esofagitis, úlceras gástricas e incluso hemorragias, el dolor músculo esquelético, manifestaciones de tipo gripal, fibrilación auricular, insuficiencia renal, hipocalcemia, osteonecrosis del maxilar, fracturas atípicas de fémur y efectos adversos oculares como conjuntivitis, uveítis, iritis, episcleritis, escleritis o queratitis<sup>13</sup>. No se ha encontrado en la literatura asociación con alteraciones del tejido adiposo tipo paniculitis mesentérica.

## Conclusiones

La paniculitis mesentérica sigue siendo hoy en día una entidad nosológica en muchos casos incidental y controvertida. El análisis retrospectivo de muchas series ha identificado posibles factores de riesgo y multitud de agentes etiológicos. Serían necesarios más estudios y más casos descritos como el nuestro para poder asociar con más firmeza el uso de los BF con zonas de inflamación del tejido adiposo del mesenterio. Si bien sí que han demostrado su efecto "proinflamatorio" en otros órganos, sobre todo a nivel ocular, como hemos desarrollado anteriormente.

Figura 1. Corte de TAC abdominal donde se observa área de paniculitis en raíz de mesenterio



Figura 2. Corte de TAC abdominal 6 meses después. No se observan áreas de paniculitis mesentérica



Tabla 1. Diagnóstico diferencial de la paniculitis mesentérica

Tumores carcinoides	Linfomas
Reacción a cáncer adyacente o absceso crónico	Lipomas
Amiloidosis	Liposarcoma
Tumores desmoides	Carcinomatosis peritoneal
Enfermedades infecciosas (tuberculosis e histoplasmosis)	Fibrosis peritoneal
Mesotelioma peritoneal	Histoplasmosis
Linfosarcomas	Sarcoma retroperitoneal
Inflamación crónica por cuerpo extraño	Linfangioma
Enfermedad de Whipple	

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

### Bibliografía

- Ruiz Tovar J, Alonso Hernández N, Sanjuanbenito A, Martínez E. Paniculitis mesentérica: presentación de 10 casos. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007;99:240-7.
- Daskalogiannaki M, Voloudaki A, Prassopoulos P, Magkanas M, Stefanaki K, Apostolaki E, et al. Evaluation of mesenteric panniculitis: prevalence and associated diseases. *Am J Roentgenol.* 2000;174:427-31.
- Colomer E, Blanes A, Carbonell C, Biot A, Villar H, Tomas A. Paniculitis Mesentérica con afectación retroperitoneal resuelta tras tratamiento con pulsos de ciclofosfamida endovenosa. *An Med Intern.* 2003; 20:31-3.
- Delgado Plasencia L, Rodríguez Ballester L, López-Tomassetti Fernández EM, Hernández Morales A, Carillo Pallares A, Hernández Siverio N. Mesenteric panniculitis: experience in our center. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007;99:291-7.
- Viscido G, Napolitano D, Rivoira G, Parodi M, Barotto M, Picón H, et al. Paniculitis mesentérica asociada con absceso intraabdominal. *Rev Chilena de Cirugía.* 2008(3):452-6.
- Harris S, Watts N, Genant H. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 1999;282:1344-52.
- Black D, Thompson D, Bauer D, Ensrud K, Musliner MC, Hochberg MC, et al. Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: the Fracture Intervention Trial. FIT Research Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:4118-24.
- Chesnut III CH, Skag A, Christiansen C, Recker R, Stakkestad JA, Hioseth A, et al. Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2004;19:1241-9.
- Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007;356:1809-22.
- Cano Parra J, Díaz-Llopis M. Uveitis Inducida por fármacos. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2005;80:1-12.
- Arbolea L, Alperi M, Alonso A. Efectos adversos de bifosfonatos. *Reumatol Clin.* 2011;07:189-97.
- Jaimes M, Chaves Netto HD, Olate S, Chaves MMGA, Barbosa AJR. Bifosfonatos y osteonecrosis de los maxilares. Consideraciones sobre su tratamiento. *Int J Morphol.* 2008;26(3):681-8.
- González-Macías J, del Pino-Montes J, Olmos JM, Nogués X. Guías de práctica clínica en la osteoporosis posmenopáusica, glucocorticoidea y del varón. Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral. (3ª versión actualizada 2014). *Rev Clin Esp.* 2015;215:515-26.

**Maldonado G<sup>1</sup>, Messina O<sup>2</sup>, Moreno M<sup>3</sup>, Ríos C<sup>4</sup>**

1 Universidad de Especialidades Espíritu Santo - Samborondón (Ecuador)

2 Hospital Cosme Argerich - Buenos Aires (Argentina)

3 Hospital Luis Vernaza. Guayaquil (Ecuador)

4 Centro de Reumatología y Rehabilitación - Guayaquil (Ecuador)

# Osteoporosis en enfermedades reumáticas e inducidas por glucocorticoides

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000100007>

Correspondencia: Génesis Maldonado Vélez - Universidad de Especialidades Espíritu Santo km 2.5 - Vía la Puntilla - Samborondón (Ecuador)

Correo electrónico: [genesismaldonadovelez92@gmail.com](mailto:genesismaldonadovelez92@gmail.com)

## Resumen

La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por disminución de la densidad mineral ósea con alteraciones de la microarquitectura del hueso y aumento del riesgo de fractura. Se ha demostrado que depende de procesos fisiológicos y secundarios a otras patologías como son las enfermedades reumáticas, e incluso asociado al uso de glucocorticoides siendo esta la causa más frecuente de osteoporosis asociada a fármacos, y que a su vez representa una problemática de gran magnitud en la actualidad. Debido a esto, se presenta esta revisión con el fin de recalcar la importancia clínica de la osteoporosis en las enfermedades reumáticas e inducidas por glucocorticoides.

**Palabras clave:** *osteoporosis, enfermedades reumáticas, glucocorticoides.*

## Osteoporosis in rheumatic diseases and glucocorticoid induced

### Summary

Osteoporosis is a systemic skeletal disease characterized by low bone mineral density, changes in bone microarchitecture and increased risk of fracture. It has been shown that depends on physiological processes and secondary to other pathologies and associated with the use of glucocorticoids, the latest being the most common cause of osteoporosis associated to drugs, this may be represent a great magnitude public health issue. This review is presented in order to emphasize the clinical importance of osteoporosis in rheumatic diseases and glucocorticoid-induced osteoporosis.

**Key words:** *osteoporosis, rheumatic diseases, glucocorticoids.*

## Introducción

La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por disminución de la densidad mineral ósea con alteraciones de la microarquitectura del hueso y aumento del riesgo de fractura. Es de origen multifactorial, participando en su etiología factores genéticos y ambientales.

Se clasifica como primaria cuando depende de procesos fisiológicos, como es el caso de la menopausia y envejecimiento normal, y secundaria cuando está condicionada por otras patologías o en relación a medicamentos, como es el caso de las osteoporosis secundarias a enfermedades reumáticas y la osteoporosis inducida por glucocorticoides (OIG).

El amplio uso de los glucocorticoides en la actualidad ha provocado que la OIG sea la causa más frecuente de osteoporosis inducida por fármacos, constituyendo así un problema de gran magnitud a nivel mundial. Se ha estimado que aproximadamente el 0,5% de la población general y el 1,7% de las mujeres mayores de 55 años reciben glucocorticoides orales y, a pesar de que existen métodos diagnósticos y medidas adecuadas para prevenir la OIG, menos del 14% recibe algún tipo de tratamiento para evitar la pérdida de masa ósea debido a los glucocorticoides<sup>1-3</sup>.

En pacientes con enfermedades reumáticas como la artritis reumatoide (AR), el lupus eritematoso sistémico (LES), la espondilitis anquilosante (EA), la polimialgia reumática, y las vasculitis, entre otras, la osteoporosis es una comorbilidad

asociada. Esto puede ser debido al uso de glucocorticoides por largos periodos de tiempo como parte de la terapia habitual de estas patologías, o también puede estar asociado a la actividad inflamatoria de la enfermedad y su impacto sobre el hueso; en cualquier caso, estos pacientes son más propensos a sufrir fracturas por fragilidad, lo que conlleva una disminución de la calidad de vida<sup>3,4</sup>.

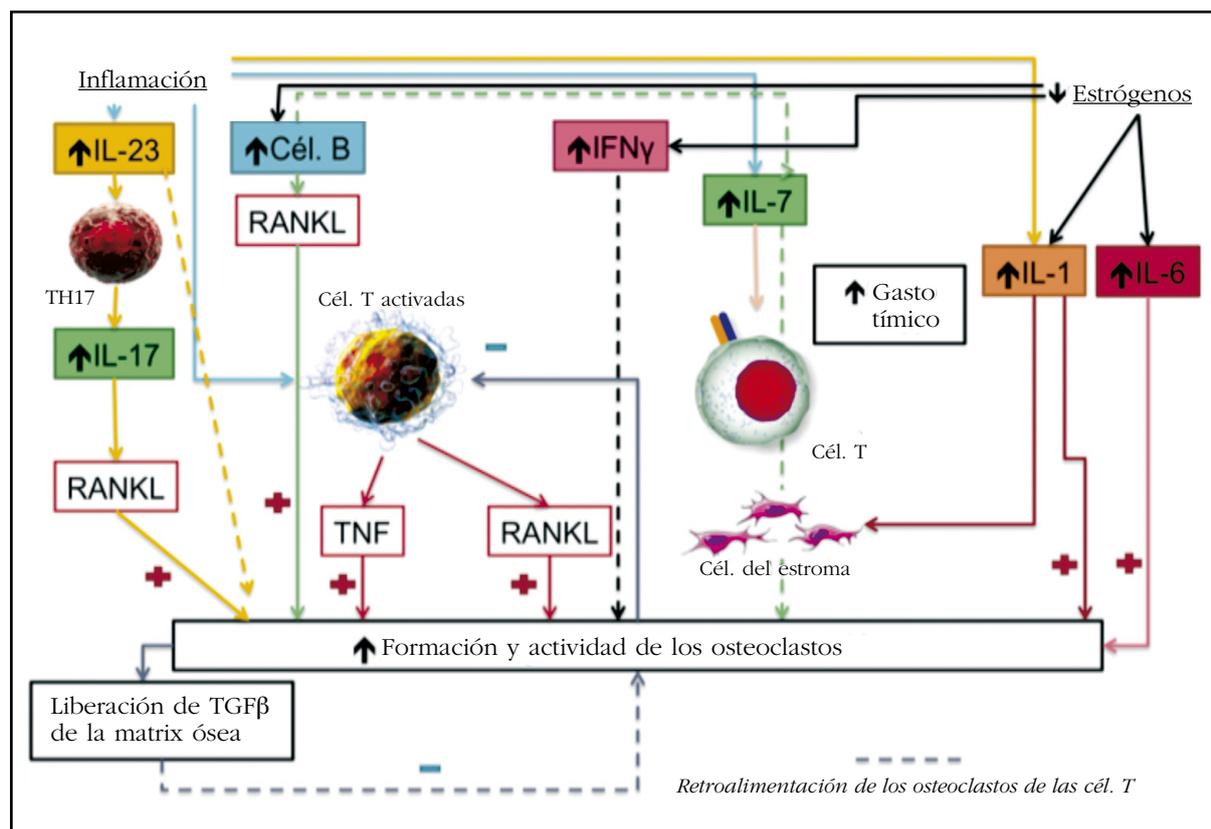
La relevancia clínica de la osteoporosis en las enfermedades reumáticas está subestimada. Los estudios han demostrado que los pacientes con AR que reciben glucocorticoides orales, y que se sometieron a una densitometría ósea de control, presentaron osteopenia/osteoporosis en un 23% de los casos, y de ellos el 42% recibió al menos un medicamento para reducir la pérdida de hueso<sup>3</sup>.

Esto demuestra una apreciación insuficiente del problema clínico y una falta de consenso sobre la detección y el tratamiento de osteoporosis en las enfermedades reumáticas.

## Efectos de la inflamación en el recambio óseo

Los determinantes de la inflamación sobre el hueso son las citoquinas proinflamatorias. Así, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), las interleuquinas (IL) 1 y 6 (IL-1 e IL-6) favorecen la resorción ósea, al promover directa o indirectamente la osteoclastogénesis. La IL-17 aumenta la expresión del ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B (RANK-L), que a su vez es parte fundamental del proceso de resorción ósea (Figura 1).

Figura 1. Regulación y formación de los osteoclastos



El TNF actúa en las vías de señalización proinflamatorias dentro de las articulaciones, influyendo en el recambio óseo, al mismo tiempo que parece estar involucrado en el desarrollo de erosiones óseas y la progresión de la osteoporosis. Además, se ha demostrado que el TNF promueve la formación de células preosteoclasticas que expresan el receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B (RANK), promueve la sobreexpresión de RANK-L respecto de la osteoprotegerina (OPG) e inhibe la maduración y función de los osteoblastos, debido a que aumenta la expresión de los fibroblastos sinoviales<sup>5</sup>.

La relación entre las citoquinas proinflamatorias y la resorción está bien establecida; sin embargo, no existe evidencia suficiente acerca de la relación entre las citoquinas y la formación de hueso. Se conoce que las IL-4, IL-12, IL-8 y el interferón promueven la formación ósea debido al aumento de la relación OPG/RANKL, inhibiendo así la osteoclastogénesis<sup>6</sup>.

Por otro lado, el osteoblasto produce citoquinas; en su estado inmaduro promueve la formación de RANK-L y en su estado maduro la producción de OPG, dejando en evidencia que el proceso de maduración de los osteoblastos es fundamental para equilibrar la relación entre el proceso inflamatorio y la masa ósea<sup>6</sup>.

Rifas y Weitzmann descubrieron una citoquina y la llamaron factor de secreción osteoclastogénica activador de células T (SOFAT), y demostraron que induce la producción osteoblástica de IL-6 y la formación de osteoclastos en ausencia de osteoblastos o RANKL, y que es insensible a los efectos de la OPG; esto demuestra que SOFAT es un potente inductor de la producción de IL-6, jugando un papel fundamental en la respuesta inflamatoria local, y puede exacerbar indirectamente la destrucción ósea en la artritis reumatoide mediante múltiples procesos mediados por la IL-6<sup>7</sup>.

Los procesos inflamatorios agudos y crónicos en las enfermedades reumáticas generan daño óseo debido a que la inflamación incrementa el número y la actividad de los osteoclastos y, al mismo tiempo, la activación de las células T. Durante procesos infecciosos aumenta la producción de RANKL, que, a su vez, estimula la osteoclastogénesis. Se ha demostrado que la aplicación de OPG puede revertir este efecto en patologías como la AR y la periodontitis<sup>8</sup>.

### Osteoporosis en enfermedades reumáticas específicas

Se conoce que los sujetos con antecedentes de enfermedades autoinmunes crónicas tienen un mayor riesgo de desarrollar osteoporosis por diferentes causas, como pueden ser alteraciones específicas que inciden en el metabolismo óseo, con inducción de pérdida y en ocasiones por inhibición de formación, o por cumplir factores de riesgo clásicos, como son: sexo (predominio en mujeres), poca actividad física, enfermedad de base, tabaquismo, bajo índice de masa corporal (IMC), déficit de vitamina D, etc. (Tabla 1).

El Foro Multidisciplinar en el Manejo del Paciente con Alto Riesgo de Fractura Osteoporótica (ARF) ha sugerido clasificar los factores de riesgo de la siguiente manera<sup>9</sup>:

- **Claves:** edad superior a los 70 años, antecedentes de fractura previa por fragilidad (vertebral o de cadera), ingesta de glucocorticoides (7,5 mg/día durante 3 meses o más) y DMO (T-score  $\leq$ 3).

- **Importantes:** antecedentes maternos de fractura de cadera, IMC  $\leq$ 20, caídas frecuentes en personas de edad avanzada, mediciones bajas en actividad y función física.

- **Moderados:** niveles de 25(OH)-vitamina D  $\leq$ 30 ng/dl, algunos factores nocivos relacionados con el estilo de vida (tabaquismo, ingesta excesiva de alcohol, sedentarismo o consumo excesivo de café).

### Artritis Reumatoide (AR)

La AR es una enfermedad inflamatoria autoinmune de origen desconocido que es más frecuente en mujeres jóvenes, entre la tercera y quinta décadas de la vida<sup>4</sup>. Es una enfermedad deformante e invalidante que afecta directamente la articulación provocando, erosiones óseas, que terminan por lesionar la articulación y como resultado se produce deformidad articular.

La osteoporosis es una complicación habitual de la AR, y se clasifica de la siguiente manera<sup>10</sup>:

- **Juxtaarticular:** temprana y secundaria a factores locales.

- **Generalizada:** tardía y de origen multicausal (reposo, drogas, actividad de la enfermedad, grado de alteración funcional y deterioro de la masa muscular).

La frecuencia de osteoporosis en la AR es variable; un estudio realizado por Sinigaglia y cols. reportó una incidencia de osteoporosis del 10-56% en pacientes con AR<sup>3</sup>. Forblad agregó que este rango dependerá de la población estudiada, y recalzó la importancia del daño articular en la AR y la osteoporosis generalizada<sup>11</sup>.

Los pacientes con AR tienen mayor riesgo de sufrir fracturas en comparación con la población general. Un estudio retrospectivo con 30.262 pacientes demostró que tienen mayor riesgo de fractura de cadera (RR=2,0) y de columna (RR=2,4) vs. el grupo control, y el riesgo aumentó debido al uso prolongado de corticoides (RR=3,4)<sup>12</sup>.

El alto riesgo de fractura en pacientes con AR también se ha asociado a factores específicos de la enfermedad<sup>13</sup> (Tabla 2).

El uso de corticoides es un predictor independiente de la disminución de masa ósea a nivel lumbar y femoral. Un régimen de esteroides a dosis bajas (5 mg de prednisona) se asocia con un aumento del 50% en el riesgo de osteoporosis<sup>14</sup>. Esto demuestra que el tratamiento con corticoides orales de más de 5 mg de prednisona es capaz de reducir la masa ósea con un rápido aumento en el riesgo de fractura durante el período de tratamiento<sup>15,16</sup>. Teniendo en cuenta este factor de riesgo el comité del *American College of Rheumatology* (ACR) recomienda el cribado de osteoporosis mediante la DMO e instaurar tratamiento en pacientes con valores de T-score  $\leq$ 1,0, de preferencia

con bifosfonatos y suplementos de calcio y vitamina D. Se debe monitorizar a estos pacientes anualmente y el tratamiento debe continuar mientras recibe glucocorticoides<sup>17</sup>.

Estudios longitudinales y transversales han demostrado que los fármacos modificadores de la enfermedad (DMARDs), como el metrotexate, no tienen efectos adversos sobre la masa ósea<sup>18</sup>. La terapia con anti-TNF (infiximab) ha demostrado efectos positivos frente a la masa ósea<sup>19</sup>; se cree que el efecto protector óseo no solo se debe a la disminución de la actividad de la enfermedad, sino también al papel que juega la citoquina TNF en la osteoclastogénesis<sup>20,21</sup>. En cuanto al tocilizumab (inhibidor de la IL-6), su papel es fundamental, ya que la IL-6 interviene en el proceso inflamatorio y osteoclastogénico<sup>13</sup>.

El estudio CAMERA II, analizó a pacientes con AR temprana que estaban bajo un tratamiento con metrotexate y 10 mg de prednisona y se les añadió 500 mg de calcio, 400 UI de vitamina D y alendronato/risendronato durante dos años; mediante DMO se demostró un aumento de masa ósea en columna lumbar del 2,6% durante el primer año de tratamiento profiláctico sin importar el uso de glucocorticoides, demostrando que la adición de 10 mg de prednisona diarios en un tratamiento basado en metrotexate no conduce a la pérdida ósea en los pacientes con AR temprana<sup>22</sup>.

Es evidente que la calidad de vida de estos pacientes se ve afectada. Un estudio realizado por Riggs y Melton demostró que una fractura de cadera tiene un rango de mortalidad del 10-20% en los 6 meses subsiguientes, el 50% de estos pacientes no podrán caminar sin ayuda de objetos externos como bastones, andadores, etc., y el 25% de ellos necesitarán ayuda domiciliar durante largos períodos<sup>23</sup>.

### Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

El LES es una enfermedad autoinmune de origen desconocido que se presenta con mayor frecuen-

Tabla 1. Perfil de alto riesgo de fractura (ARF). Grupo de Reumatología

<b>Factores asociados a ARF</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Edad &gt;70 años</li> <li>✓ Fractura por fragilidad previa (síntomática o asintomática)</li> <li>✓ DMO baja (T-score &lt;3)</li> <li>✓ Antecedente materno de fractura de cadera</li> <li>✓ Toma de corticoides ≤7,5 mg/día durante más de 3 meses</li> <li>✓ Bajo peso (IMC &lt;19 kg/m<sup>2</sup>)</li> </ul>
<b>Situaciones especiales y comunes en pacientes reumatológicos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Enfermedad inflamatoria crónica con actividad persistente</li> <li>✓ Polimialgia reumática y/o arteritis de células gigantes</li> <li>✓ Trasplante (distinguiendo entre el pre-trasplante y post-trasplante)</li> <li>✓ Utilización frecuente de tratamientos que inducen osteoporosis</li> </ul>
<b>ARF en pacientes con enfermedades reumatológicas</b>
<p><b>Osteoporosis inducida por glucocorticoides</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Dosis diaria de corticoides superiores a 15 mg</li> <li>✓ Tiempo de tratamiento superior al año</li> </ul> <p><b>Artritis reumatoide:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mujer postmenopáusica (especialmente con más de 65 años)</li> <li>✓ DMO similar al riesgo de osteoporosis postmenopáusica</li> <li>✓ Tratada con corticoides a dosis superiores a 15 mg/día</li> <li>✓ Índice de discapacidad alto</li> <li>✓ Enfermedad extendida</li> <li>✓ Poca actividad física</li> </ul> <p><b>Espondilitis anquilosante:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Pacientes con una enfermedad de más de 10 años de evolución</li> <li>✓ Varón &gt;30 años, tratado con corticoides</li> <li>✓ Acusada pérdida de DMO en los primeros 5 años, con una enfermedad extendida</li> <li>✓ Episodios de lumbalgia en los últimos 6 meses</li> <li>✓ Enfermedad inflamatoria intestinal asociada</li> </ul> <p><b>Lupus eritematoso sistémico:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mujer postmenopáusica, con una enfermedad de larga evolución</li> <li>✓ Inicio después de los 30 años</li> <li>✓ Poca expuesta al sol</li> <li>✓ Utiliza filtros solares</li> <li>✓ DMO baja en cadera</li> </ul> <p><b>Esclerosis sistémica:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Edad &gt;50 años</li> <li>✓ Mujer</li> <li>✓ Menopausia precoz</li> <li>✓ Índice de masa corporal &lt;25</li> <li>✓ Uso de corticoides sistémicos</li> </ul> <p><b>Polimialgia reumática/arteritis de células gigantes:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Edad &gt;60 años</li> <li>✓ Limitación funcional (poca actividad física)</li> <li>✓ Uso de corticoides sistémicos (dosis acumulada elevada)</li> <li>✓ Disminución de la fuerza</li> <li>✓ DMO reducida</li> </ul>

cia en mujeres jóvenes<sup>4</sup>. La osteoporosis es también una enfermedad asociada, y probablemente causada por los tratamientos que generan un efecto negativo sobre el hueso o por disfunción ovárica inducida por algunos inmunosupresores<sup>24</sup>.

La pérdida de masa ósea en LES podría ser el resultado de varios mecanismos, aquellos que dependen de la propia enfermedad y los que están relacionados con el tratamiento (Tabla 3).

Tabla 2. Perfil de alto riesgo de fractura (ARF). Artritis Reumatoide

<b>Muy relevantes</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Edad &gt;70 años</li> <li>✓ DMO baja (T-score &lt;3)</li> <li>✓ La existencia previa de al menos 2 fracturas vertebrales o fractura de cadera</li> </ul>
<b>Relevantes</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Más de 2-3 caídas al año</li> <li>✓ Uso de corticoides orales a dosis de 7,5 mg/día durante al menos 3 meses</li> <li>✓ IMC &lt;19 kg/m</li> <li>✓ Antecedentes familiares de fractura de cadera</li> <li>✓ Consumo de tabaco &gt;10 cigarrillos/día</li> </ul>

Tabla 3. Posibles mecanismos de pérdida de masa ósea en el LES

Dependientes de la enfermedad	Dependientes del tratamiento
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Movilidad reducida</li> <li>✓ Insuficiencia renal</li> <li>✓ Factores endocrinos</li> <li>✓ Amenorrea</li> <li>✓ La menopausia prematura</li> <li>✓ Bajos niveles plasmáticos de andrógenos</li> <li>✓ Hiperprolactinemia</li> <li>✓ Inducción de citoquinas de resorción ósea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Corticoides a largo plazo</li> <li>✓ Medicamentos inmunosupresores               <ul style="list-style-type: none"> <li>Azatioprina</li> <li>Ciclofosfamida</li> <li>Ciclosporina</li> </ul> </li> <li>✓ Anticoagulación crónica</li> <li>✓ Falta de exposición solar</li> </ul>

El mecanismo responsable de la pérdida de masa ósea en los pacientes con LES que reciben corticoides es el aumento marcado de resorción ósea y el déficit de maduración del osteoblasto, así como la mineralización ósea. La DMO comienza a descender a partir del tercer mes de uso de glucocorticoides y avanza rápidamente hasta los seis meses; a partir de este período, la curva descendiende de forma gradual<sup>25</sup>.

Un estudio realizado por Houssiau y cols. en mujeres pre-menopáusicas con diagnóstico definitivo de LES, demostró que los pacientes que no habían recibido corticoides tenían una DMO de cadera más baja en comparación con los controles sanos, lo que indica que la enfermedad por sí sola es un factor de pérdida de hueso<sup>26</sup>.

Una revisión sistemática realizada por Wang y cols. demostró que los pacientes con LES tienen niveles inferiores de DMO que la población en general, y que no solo ocurre en un lugar específico, sino que existe pérdida de masa ósea en todos los lugares estudiados (cuello de fémur, columna lumbar y cadera). Además se demostró un incremento del riesgo de fractura (RR=1,97)<sup>27</sup>.

Jacobs y cols., en un estudio prospectivo de 6 años de seguimiento en pacientes con LES, demostraron una asociación entre la pérdida de DMO en columna lumbar y el uso de corticoides a altas dosis. Además se demostró una pérdida de masa ósea con el uso de inmunosupresores y antimaláricos de base<sup>28</sup>.

En cuanto a la asociación entre los niveles séricos inferiores de vitamina D en estos pacien-

tes y la pérdida de masa ósea, se cree que la deficiencia se debe a la exposición solar reducida por la fotosensibilidad de estos pacientes, además del uso de corticoides y la insuficiencia renal<sup>29</sup>. El mecanismo por el cual estos pacientes tienen una menor absorción de calcio radica en una disminución de la transformación de 25(OH)-vitamina D a 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamina D (calcitriol). Esta asociación ha sido demostrada en estudios transversales<sup>29-31</sup>, de ahí la importancia de la determinación de los niveles de 25(OH)-vitamina D en pacientes con LES.

Los pacientes con LES y compromiso neurológico (epilepsia, accidentes cerebrovasculares, etc.) comprenden el grupo de mayor riesgo de fracturas; esto es debido a que son más propensos a las caídas y a los efectos adversos de los antiepilepticos<sup>32</sup>.

### Espondilitis Anquilosante (EA)

La EA forma parte del grupo de las espondiloartritis seronegativas (SpA), un grupo de trastornos articulares inflamatorios que incluye, además, la artritis psoriásica, la enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis reactiva. La EA es la forma típica de las SpA con síntomas relacionados con artritis, entesitis, sacroilitis, entre otros. La localización de la enfermedad primaria se cree que es la entesis, es decir, la zona en la que los tendones y los ligamentos se insertan en el hueso<sup>4</sup>.

El compromiso axial genera un impacto negativo óseo y aumenta el riesgo de fractura vertebral debido a la inflamación continua, que da como resultado una disminución de la masa ósea y la anquilosis progresiva, junto con la proliferación ósea<sup>33</sup>.

La osteoporosis puede ocurrir debido a la inactividad física, la disminución de la movilidad de la columna relacionada con el dolor, la rigidez y la anquilosis, además de la participación subclínica de la enfermedad intestinal<sup>34</sup>.

La prevalencia de la osteoporosis en la EA es de aproximadamente un 14-27% en columna vertebral y un 4-14% en cadera<sup>35,36</sup>. Mediante la utilización de las definiciones visuales y morfométricas del tamaño vertebral, la prevalencia de fracturas en este grupo de pacientes es del 10-30%<sup>37,38</sup>.

Prieto y cols. demostraron una fuerte asociación entre la EA y las fracturas vertebrales. Estos pacientes tienen 5 veces más riesgo de fractura en comparación con un grupo control; además, observaron que los primeros 2,5 años de evolu-

ción de la enfermedad son críticos debido a que el pico de riesgo de fractura aumenta, y se cree que es secundario al estado inflamatorio<sup>33</sup>. Estos datos son similares a los expuestos por Van der Wijden y cols., lo que sugiere que las fracturas en la EA están asociadas a exacerbaciones de la enfermedad. Además, demostraron que las fracturas vertebrales fueron más frecuentes en hombres<sup>39</sup>.

Es importante recalcar que este grupo de pacientes tiene un riesgo elevado de sufrir fracturas vertebrales; sin embargo, no tienen mayor riesgo de fracturas no-vertebrales.

### Artritis Psoriásica (APs)

La APs también forma parte de las espondiloartropatías seronegativas. Los estudios sobre la afectación ósea en estos pacientes son escasos, probablemente porque la frecuencia de la enfermedad es menor que la de la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico; sin embargo, se ha demostrado que existe una relación entre los marcadores inflamatorios (TNF, IL-6, interferón-gamma o IFN- $\gamma$ ) y la pérdida de masa ósea<sup>40</sup>.

Keller y cols. demostró que el grupo de pacientes con APs severa tienen valores de pérdida de masa ósea inferiores a aquellos pacientes con APs leve-moderada, dejando en evidencia que el factor inflamatorio juega un papel fundamental en la resorción ósea<sup>40</sup>.

Dreier y cols. analizaron 7.939 pacientes con psoriasis. La prevalencia de osteoporosis fue significativamente mayor frente al grupo control y más frecuente en mujeres. Sin embargo, se observó que en el grupo de hombres la osteoporosis fue el resultado de la enfermedad sistémica (APs), mientras que en las mujeres se demostró que era a causa de una deficiencia de estrógenos. Además se destacó que las mujeres son diagnosticadas antes que los hombres debido a que, por lo general, las mujeres son referidas a una evaluación ósea de manera rutinaria<sup>41</sup>.

### Osteoartritis (OA)

La osteoartritis es una enfermedad degenerativa que se presenta habitualmente por encima de los 45 años y cuyo origen es multifactorial, siendo la enfermedad articular más frecuente<sup>4</sup>.

La artrosis, junto con la osteoporosis, representan las dos etiologías que afectan la estructura ósea y articular en la población anciana y a su vez son la primera causa de deterioro de la calidad de vida<sup>42</sup>.

Yoshimura y cols. realizaron un estudio de seguimiento de 10 años en pacientes con artrosis lumbar y osteoporosis. La incidencia acumulada de artrosis lumbar en 10 años dentro del rango de edad de 40-79 años fue del 25,8% en hombres y el 45,2% en mujeres. A su vez, existió una relación significativa entre la presencia de osteoporosis lumbar y la incidencia de artrosis lumbar<sup>42</sup>.

La relación inversa de la artrosis y osteoporosis ha sido debatido durante años. Zhang y cols. comprobaron las estructuras mecánicas y micros-

tructurales del hueso trabecular subcondral de mujeres postmenopáusicas con artrosis y osteoporosis, mediante la determinación del volumen óseo fraccional y la densidad mineral ósea. El grupo de pacientes con artrosis demostró tener mayor volumen óseo fraccional frente al grupo de pacientes con osteoporosis. Sin embargo, la relación con la densidad ósea no fue significativa<sup>43</sup>.

En cuanto a la producción de fracturas, en estos pacientes se cree que el factor causal son las caídas. Un estudio longitudinal mundial de osteoporosis determinó que aproximadamente el 40% de la población estudiada presentó artrosis, y la relación directa con las fracturas no fue significativa después del ajuste por caídas incidentales. Sin embargo, el riesgo relativo ajustado para la osteoartritis como predictor de caídas fue de 1,24 (IC del 95%, 1,22 - 1,26;  $p < 0,0001$ ). Además, las mujeres postmenopáusicas con artrosis tenían un 25% más riesgo de caída que el grupo de mujeres sin presencia de ella<sup>33</sup>.

### Osteoporosis inducida por glucocorticoides (OIG)

La OIG es la causa más común de osteoporosis secundaria. Se ha demostrado que el tratamiento prolongado con 2,5-5 mg diarios de prednisolona eleva el riesgo de fractura vertebral y de cadera<sup>16,44</sup>.

La OIG afecta con mayor frecuencia las áreas de hueso trabecular (columna lumbar y fémur proximal). Las fracturas pueden ocurrir en aproximadamente el 30-50% de los pacientes que reciben corticoides de manera prolongada<sup>44</sup>.

En la tabla 4 se describen algunos factores de riesgo para la OIG.

### Fisiopatología

Los glucocorticoides tienen un efecto directo e indirecto sobre el metabolismo al bloquear las acciones de la vitamina D y la absorción de calcio, lo que conlleva a una disminución del calcio sérico y un aumento de los niveles de parathormona (PTH)<sup>32</sup>. Sin embargo, la elevación de la PTH no explica en su totalidad la pérdida ósea por exposición a glucocorticoides<sup>45</sup>.

Durante el período inicial de tratamiento con corticoides aumenta la resorción ósea, lo que genera una disminución brusca de la densidad ósea y aumenta el riesgo de fractura<sup>45</sup>.

El mecanismo específico por el cual los corticoides inducen la resorción ósea es por la activación del receptor RANKL y el factor estimulante de macrófagos (M-CSF); estos dos componentes son parte fundamental de la osteoclastogénesis junto con la disminución del receptor de OPG<sup>46</sup>.

En cuanto a la formación ósea, esta se ve afectada debido a la inhibición de las células precursoras de osteoblastos y a un aumento de la apoptosis osteoblástica<sup>45</sup>. Además, se produce una inhibición de la función de los osteoblastos maduros y una supresión de los factores de crecimiento (IGF1) en las células óseas, junto con un aumento de la apoptosis de los osteocitos<sup>47,48</sup> (Tabla 5).

Tabla 4. Factores de riesgo para osteoporosis inducida por glucocorticoides

<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Historia personal de fractura</li> <li>✓ Historia de fractura en pariente de primer grado</li> <li>✓ Fumador actual</li> <li>✓ Bajo peso (&lt;57 kg)</li> <li>✓ Edad avanzada</li> <li>✓ Menopausia temprana</li> <li>✓ Baja ingesta de calcio</li> <li>✓ Actividad física inadecuada</li> <li>✓ Alcoholismo</li> <li>✓ Caídas recientes</li> <li>✓ Demencia</li> <li>✓ Déficit visual</li> <li>✓ Pobre estado de salud: enfermedad crónica</li> <li>✓ Niveles de densidad ósea disminuidos</li> </ul>
---

Tabla 5. Osteoporosis por glucocorticoides: efectos sobre el hueso

<b>Osteoblastos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Osteoblastogénesis disminuida</li> <li>✓ Aumento de apoptosis</li> <li>✓ Disminución continua y temprana de:               <ul style="list-style-type: none"> <li>Osteoblastos trabeculares</li> <li>Capacidad sintética</li> <li>Formación ósea</li> </ul> </li> </ul>
<b>Osteocitos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Aumento de apoptosis</li> <li>✓ Circulación canalicular disminuida</li> <li>✓ Disminución en la calidad ósea</li> <li>✓ Osteonecrosis</li> </ul>
<b>Osteoclastos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Osteoclastogénesis aumentada</li> <li>✓ Aumento transitorio y temprano de:               <ul style="list-style-type: none"> <li>Supervivencia de los osteoclastos</li> <li>Osteoclastos trabeculares</li> <li>Resorción ósea</li> </ul> </li> </ul>

Tabla 6. Evaluación de osteoporosis secundarias

<p><b>Evaluación inicial</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Historia detallada para determinación de posibles factores de riesgo</li> <li>✓ Evaluación de estado nutricional</li> <li>✓ DMO</li> <li>✓ Radiografía de columna lumbar y torácica (si hay pérdida de estatura &gt;1,5 in (≈3,8 cm))</li> <li>✓ Biometría hemática</li> <li>✓ Calcio, fósforo, 25(OH)-vitamina D, albúmina y creatinina sérica</li> <li>✓ FSH, LH y prolactina</li> <li>✓ Marcadores de resorción y formación ósea</li> </ul>
--

### Evaluación

Los pacientes con osteoporosis deben ser investigados de acuerdo a las posibles causas que desencadenan la pérdida de masa ósea (Tabla 6). Durante el examen físico es importante medir la altura del paciente y comparar con mediciones anteriores, con el fin de evaluar posibles fracturas vertebrales asintomáticas.

### Calcio

El calcio y la vitamina D son elementos nutricionales considerados esenciales en cualquier opción terapéutica para la osteoporosis.

Se ha demostrado que el uso de carbonato de calcio a una dosis de 1.000 mg/día, no previene la pérdida de masa ósea ni disminuye el riesgo de fractura en pacientes que iniciaran tratamiento

### Tratamiento

Es común encontrar en estos pacientes niveles subóptimos de vitamina D y calcio. Debido a esto, se debe implementar un tratamiento de corrección de estos niveles.

En los pacientes que inician tratamiento con glucocorticoides durante más de 3 meses a dosis >5 mg/día, es necesario instaurar tratamiento preventivo de pérdida de masa ósea, y en aquellos pacientes que ya están siendo tratados se debe realizar una densitometría ósea, con el fin de valorar la reducción de masa ósea y el posible riesgo de fractura<sup>17,49</sup>.

Debido al incremento de uso de corticoides y la prevalencia de osteoporosis secundaria, varias sociedades internacionales han descrito guías de tratamiento; sin embargo, no existe un consenso mundial al respecto<sup>50-53</sup>. En el 2010 el ACR (*American College of Rheumatology*) publicó unas guías para el manejo de la OIG de acuerdo al FRAX® (Figuras 2 y 3)<sup>54</sup>.

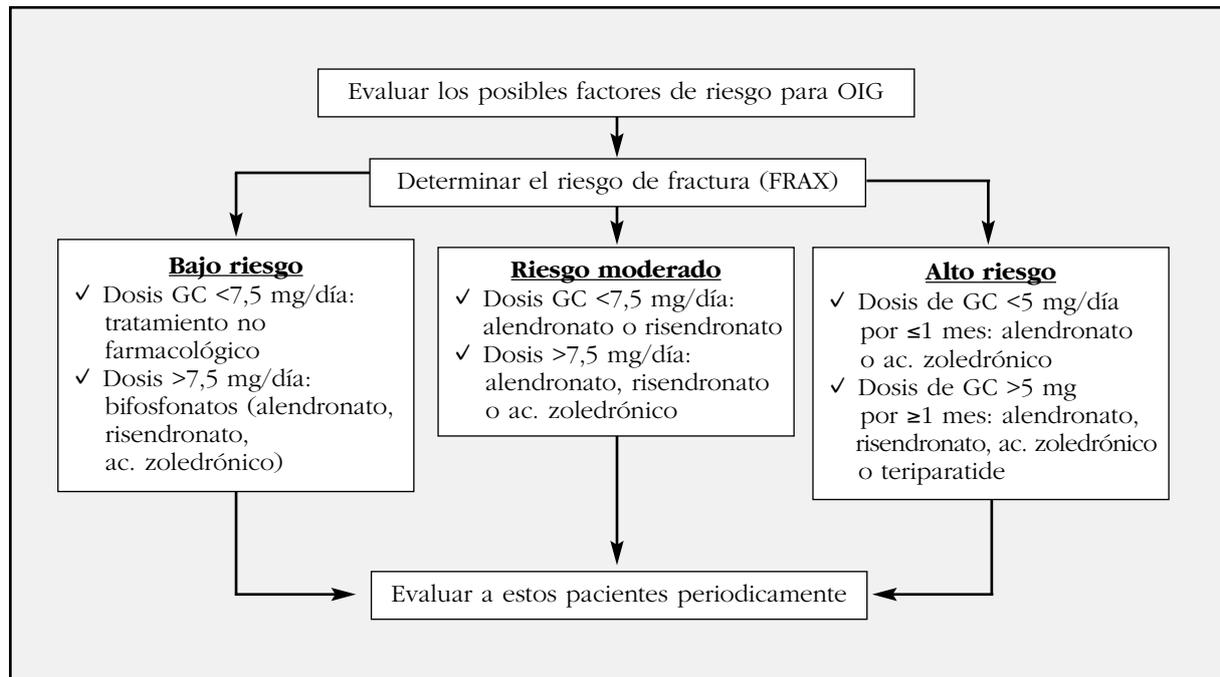
### Tratamiento no farmacológico

El manejo y prevención de la OIG en cuanto al tratamiento no farmacológico, es similar al de osteoporosis primaria, y consiste en eliminar los factores de riesgo modificables<sup>55</sup>:

- Tabaquismo.
- Consumo de alcohol (≥3 unidades/día).
- Sedentarismo (consumo de energía ≤1.682 kcal/día).
- Dieta elevada en sodio (principalmente en presencia de hipercalcemia).
- Índice de masa corporal disminuido.

Los pacientes con edad avanzada, requieren de ayuda especial para evitar caídas, las cuales son el principal factor de riesgo para fracturas.

Figura 2. Manejo de pacientes de ambos sexos >50 años que están iniciando o recibiendo terapia con glucocorticoides (GC)



prolongado con corticoides, principalmente en mujeres post-menopáusicas. Debido a esto no está indicado para prevención primaria<sup>56</sup>; sin embargo, como prevención secundaria se ha evidenciado que existe un mantenimiento de los niveles de DMO en columna lumbar en mujeres post-menopáusicas con el uso de 500 mg/día de carbonato de calcio acompañado de 0,25 µg/día de calcitriol<sup>55</sup>.

### Vitamina D

Las formas activas de la vitamina D (alfa-calcidol y calcitriol) y las no activas (colecalfiferol y ergocalciferol) previenen la pérdida de masa ósea en usuarios crónicos de glucocorticoides<sup>55</sup>.

El uso de calciferoles previene la reducción de masa ósea, pero no reducen la incidencia de fracturas<sup>57</sup>. En contraste con las formas no activas, el uso de alfacalcidol a una dosis de 0,25-1,0 µm/día más 500 mg/día de calcio previene la reducción de masa ósea y disminuye el riesgo de fractura (vertebral y no vertebral)<sup>58</sup>.

La combinación de calcio y alfa-calcidol ha sido la única que ha demostrado una reducción significativa de riesgo de fractura vertebral; sin embargo, no muestra efecto en cuanto a fracturas no vertebrales<sup>58</sup>.

Estudios aleatorizados han demostrado que una dosis de 700-800 UI de vitamina D reduce el riesgo de fractura de cadera y fracturas no vertebrales en pacientes de edad avanzada<sup>59</sup>. Para adultos mayores de 50 años, la *National Osteoporosis Foundation* recomienda 800-1.000 UI de vitamina D por día. No obstante, algunos expertos recomiendan 1.000-2.000 UI diarias, siendo 4.000 UI/día el límite de seguridad<sup>60</sup>.

### Bifosfonatos

El uso de bifosfonatos ha demostrado un efecto positivo en la pérdida de masa ósea en pacientes que han sido tratados con glucocorticoides durante períodos prolongados<sup>55</sup>.

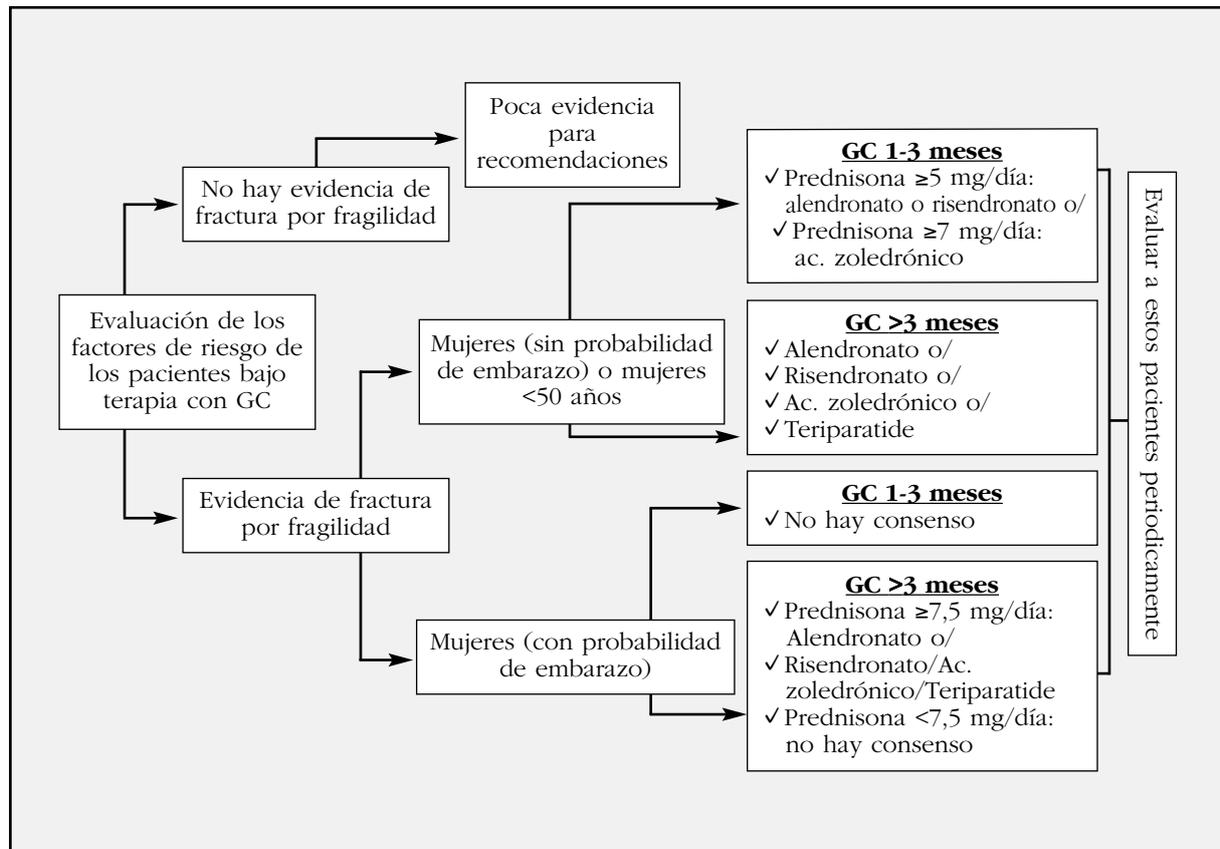
En estudios controlados de 3-5 años de observación, se ha demostrado que los bifosfonatos reducen las fracturas vertebrales y no vertebrales incluyendo la de cadera<sup>61</sup>. En un metaanálisis realizado por Kanis y cols. se evidenció que existe una reducción significativa de fracturas no vertebrales en comparación con el grupo control<sup>62</sup>.

Se recomienda el uso de bifosfonatos durante los primeros dos años de la OIG, pero no existe suficiente evidencia para un tratamiento a largo plazo<sup>61</sup>.

Los bifosfonatos han sido durante los últimos años los fármacos de elección más utilizados para el tratamiento de la osteoporosis. Los bifosfonatos aprobados para el tratamiento de osteoporosis inducida por glucocorticoides son: etidronato, alendronato, risendronato y ácido zoledrónico. Dentro de las contraindicaciones a la terapia se incluyen la hipersensibilidad o la hipocalcemia; además, deben ser manejados bajo vigilancia en aquellos pacientes con una función glomerular deficiente (≤30 ml/min de tasa de filtrado glomerular para risendronato o ibandronato y ≤35 ml/min para alendronato y zoledronato)<sup>63</sup>.

El uso de alendronato 5-10 mg/día durante 48 semanas, ha demostrado incrementar la masa ósea<sup>64,65</sup>. Un estudio realizado por Adachi y cols. demostró un aumento de densidad mineral ósea de columna lumbar en un 2,8% (5 mg/día) y 3,9% (10 mg/día) en pacientes con terapia prolongada de glucocorticoides<sup>66</sup>. Risendronato a dosis de 5 mg/día incrementa la masa ósea y también reduce el riesgo de fractura<sup>67</sup>.

Figura 3. Manejo de pacientes de ambos sexos <50 años que están iniciando o recibiendo terapia con glucocorticoides (GC)



El ácido zoledrónico está aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento y prevención de osteoporosis en hombres y mujeres postmenopáusicas, así como de la osteoporosis inducida por glucocorticoides. La dosis adecuada de ácido zoledrónico es de 5 mg vía intravenosa en infusión una vez al año, la cual ha demostrado reducir el riesgo de fractura de columna, fractura no vertebrales y cadera en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis<sup>68</sup>.

### Teriparatida

Teriparatida es un análogo de la PTH obtenido mediante la técnica recombinante de ADN (PTH-1-34). Este agente análogo aumenta la función osteoblástica y disminuye la apoptosis de los osteocitos<sup>55</sup>.

El uso de teriparatida a dosis de 20 mg/día subcutáneo debe ser considerado como tratamiento para la OIG, debido a que aumenta significativamente la densidad mineral ósea en este grupo de pacientes, además de reducir las fracturas vertebrales. Sin embargo, no tiene efecto en fracturas no vertebrales<sup>69</sup>.

Debido al alto costo de teriparatida, se recomienda su uso cuando fallan los bifosfonatos<sup>69</sup>, es decir, cuando a pesar de recibir tratamiento con bifosfonatos la masa ósea sigue disminuyendo; frente a fracturas en presencia de bifosfonatos; o si están contraindicados<sup>55</sup>.

### Denosumab

Denosumab es un anticuerpo frente a RANKL, que es utilizado para el tratamiento de la osteoporosis primaria. Sin embargo, el estudio realizado por Dore y cols. en pacientes con artritis reumatoide bajo tratamiento con GC, demostró un aumento de la densidad mineral ósea y una reducción de la resorción, en comparación con el placebo<sup>70</sup>.

Debido a que denosumab no es filtrado por los riñones, puede ser una opción terapéutica para los pacientes con disfunción renal que no toleren los bifosfonatos<sup>70</sup>.

El uso de denosumab para el tratamiento de osteoporosis inducida por GC no ha sido aprobado aún, encontrándose su estudio en fase III<sup>71</sup>. Se necesita mayor evidencia para poder demostrar su utilidad en la OIG<sup>61</sup>.

### Odanacatib

Odanacatib es un inhibidor de la proteasa catépsina-K la cual induce la degradación ósea mediante los osteoclastos<sup>72</sup>. Un estudio en fase II realizado por Bone y cols., que utilizaron odanacatib 50 mg una vez por semana, demostró un aumento de densidad mineral ósea en columna lumbar (5,5% vs. 0,2% en grupo control) y cadera 5,5% (3,2% vs. 0,9% en grupo control)<sup>73</sup>. Sin embargo, no existen suficientes estudios controlados para determinar el uso adecuado de este fármaco en OIG, además de no haber sido aprobado por la FDA hasta el momento.

### Inhibidores de la Esclerostina

El mecanismo responsable de la inhibición de formación ósea en pacientes con terapia prolongada con glucocorticoides, es la reducción de la vida media y actividad de los osteoclastos. Se ha demostrado que los glucocorticoides alteran la formación de células óseas mediante la reducción de la proliferación de osteoblastos y supresión de factores de crecimiento<sup>69</sup>. Debido a esto, los nuevos enfoques terapéuticos se basan en mantener la viabilidad de los osteoblastos y osteocitos en presencia de los glucocorticoides.

La esclerostina (Sost) es una proteína producida por los osteocitos y su función principal es inhibir la maduración del osteoblasto<sup>74-76</sup>. Un estudio realizado por Yao y cols. demostró un aumento de la expresión de los genes de la esclerostina en pacientes expuestos a una terapia con GC durante 28 días<sup>77</sup>.

Se han desarrollado unos anticuerpos monoclonales a la esclerostina (Scl-Ab) actualmente conocidos como romosozumab (AMG 785), blosozumab y BPS804, que inhiben la actividad de la esclerostina y así estimular la formación ósea<sup>76,78</sup>.

Yao y cols. utilizaron Scl-Ab en modelos de ratones que estaban expuestos a 4 mg/kg/día de metilprednolona, y en ellos se evidenciaron volúmenes óseos de hueso trabecular (Tb-BV/TV) en columna lumbar y cuello de fémur más bajos, menos masa cortical en tercio medio del fémur y menor resistencia ósea cortical, comparado con el grupo placebo. Además, los modelos que recibieron 25 mg/kg de Scl-Ab tuvieron un incremento del 60-125% de Tb-BV/TV y un aumento de la resistencia vertebral del 30-70%<sup>79</sup>.

Los estudios realizados hasta al momento han demostrado que los inhibidores de la esclerostina pueden ser una opción terapéutica futura para el manejo de pacientes con osteoporosis severa<sup>80</sup>.

### Conclusión

La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por disminución de la densidad mineral ósea con alteraciones de la microarquitectura del hueso y aumento del riesgo de fractura.

Los glucocorticoides son la primera causa de osteoporosis secundaria, siendo este un factor independiente de morbilidad y mortalidad en estos pacientes, debido a que la pérdida progresiva de masa ósea y aumento del riesgo de fractura se inicia poco después del inicio del tratamiento con glucocorticoides.

Es importante identificar, y si es posible corregir, los factores de riesgo y comorbilidades en este grupo de pacientes, iniciar medidas de prevención y consejos de promoción de la salud como cambio de hábitos, y dar suplementos de calcio y vitamina D, además del tratamiento específico.

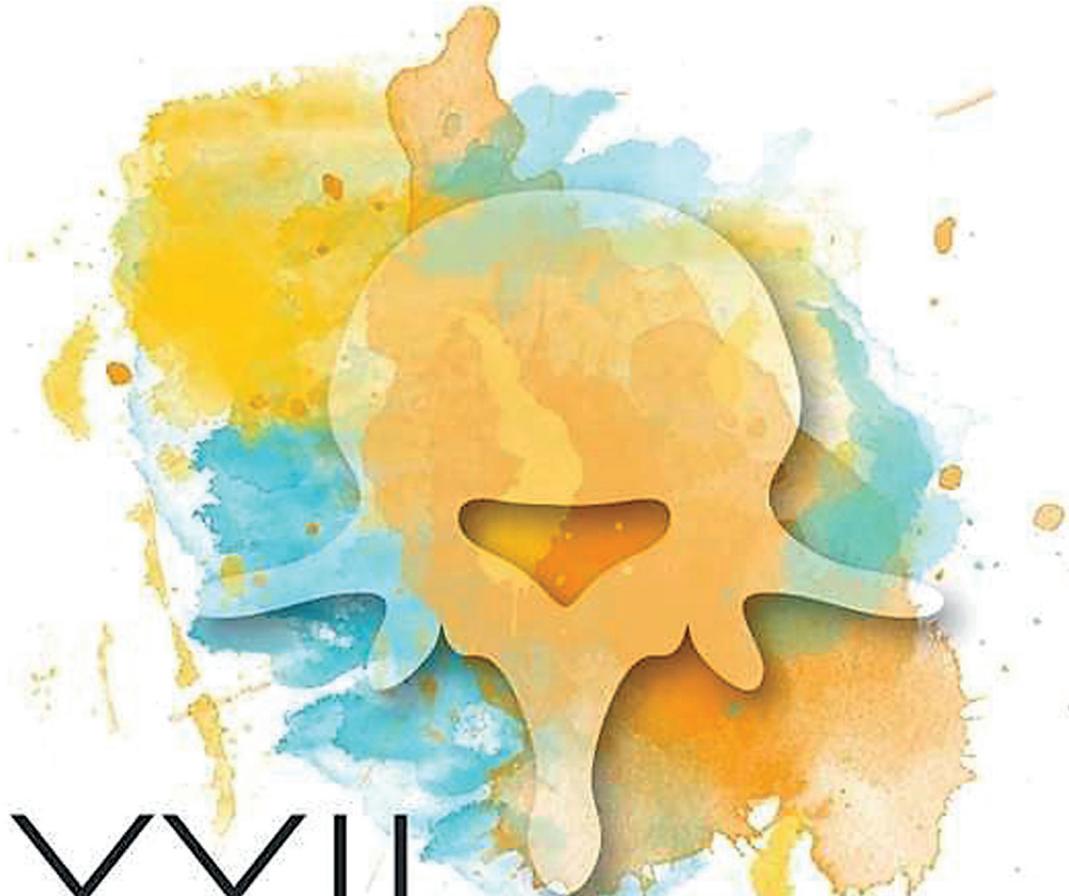
**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

### Bibliografía

1. Khosla S, Luftkin E, Hodgson S, Fitzpatrick L, Melton LJ 3rd. Epidemiology and clinical features of osteoporosis in young individuals. *Bone*. 1994;15(5):551-5.
2. Walsh L, Wong C, Pringle M, Tattersfield A. Use of oral corticosteroids in the community and the prevention of secondary osteoporosis: a cross sectional study. *BMJ*. 1996;313:344-6.
3. Sinigaglia L. Epidemiology of osteoporosis in rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am*. 2006;631-58.
4. Firestein G, Budd R, Gabriel S, McInnes I, O'Dell J. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 9th ed. Elsevier; 2013. 2292 p.
5. Baker-LePain J, Nakamura M, Lane N. Effects of Inflammation on bone: an update. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(4):389-95.
6. Walsh N, Crotti T, Goldring S, Gravallesse EM. Rheumatic diseases: the effect of inflammation on bone. *Immunol Rev*. 2005;208:228-51.
7. Rifas L, Weitzmann M. A novel T cell cytokine, secreted osteoclastogenic factor of activated T cells, induces osteoclast formation in a RANKL-independent manner. *Arthritis Rheum*. 2009;60:3324-35.
8. Kong Y, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 1999;402:304-9.
9. Jódar Gimeno E. Conclusiones consensuadas del I Foro Multidisciplinar en el Manejo del Paciente con Alto Riesgo de Fractura (ARF) Osteoporótica. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2010;2(2):79-86.
10. Moon SJ, Ahn IE, Kwok SK, Park KS, Min JK, Park SH, et al. Periarticular osteoporosis is a prominent feature in early rheumatoid arthritis: estimation using shaft to periarticular bone mineral density ratio. *Korean Med Sci*. 2013;28:287-94.
11. Forsblad D, Larsen A, Waltbrand E, Kvist G, Mellstrom D, Saxne T, et al. Radiographic joint destruction in postmenopausal rheumatoid arthritis is strongly associated with generalised osteoporosis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:617-623.
12. Van Staa T, Geusens P, Bijlsma J, Leufkens H, Cooper C. Clinical assessment of the long-term risk of fracture in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(10):3104-12.
13. Edwards CJ, Williams E. The role of interleukin-6 in rheumatoid arthritis-associated osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2010;21(8):1287-93.
14. Sinigaglia L, Nevertti A, Mela Q. A multicenter cross-sectional study on bone mineral density in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2000;27:2528-9.
15. Stafford L, Bleasel J, Giles A. Androgen deficiency and bone mineral density in men with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2000;27:2786-90.
16. Van Staa T, Leufkens H, Cooper C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2002;13:777-87.
17. Deal C. Recent recommendations on steroid-induced osteoporosis: more targeted but more complicated. *Clevel Clin J Med*. 2013;80(2):117-25.
18. Di Munno O, Mazzantini M, Sinigaglia L, Bianchi G, Minisola G, Muratore M, et al. Effect of low-dose methotrexate on bone density in women with rheumatoid arthritis: results from a multicenter cross-sectional study. *J Rheumatol*. 2004;31:1305-9.
19. Serio B, Paolino S, Sulli A, Ferretti V, Cutolo M. Bone metabolism changes during anti-TNF-alpha therapy in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1069:420-7.
20. Marotte H, Pallot-Prades B, Grange L, Gaudin P, Alexandre C, Miossec P. A 1-year case-control study in patients with rheumatoid arthritis indicates prevention of loss of bone mineral density in both responders and non-responders to infliximab. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(3):R61.
21. Lange U, Teichmann J, Muller-Ladner U, Strunk J. Increase in bone mineral density of patients with rheumatoid arthritis.

- tis treated with anti-TNF-alpha antibody: a prospective open-label pilot study. *Rheumatol*. 2005;44:1546-8.
22. Van der Goes M, Jacobs G, Jurgens M, Bakker MF, van der Veen MJ, van der Werf JH, et al. Are changes in bone mineral density different between groups of early rheumatoid arthritis patients treated according to a tight control strategy with or without prednisone if osteoporosis prophylaxis is applied? *Osteoporos Int*. 2013;24:1429-36.
  23. Riggs B, Melton LJ 3rd. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone*. 1995;115:505S-11S.
  24. Mok C, Mak A, Ma K. Bone mineral density in postmenopausal Chinese patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus*. 2005;14:106-12.
  25. Lai CC, Chen WS, Chang DM, Tsao YP, Wu TH, Chou CT, et al. Increased serum fibroblast growth factor-23 and decreased bone turnover in patients with systemic lupus erythematosus under treatment with cyclosporine and steroid but not steroid only. *Osteoporos Int*. 2015;26(2):601-10.
  26. Houssiau F, Lefebvre C, Depresseux G, Lambert M, Devogelaer JP, Nagant de Deuxchaisnes C. Trabecular and cortical bone loss in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*. 1996;35:244-7.
  27. Wang X, Yan S, Liu C, Xu Y, Wan L, Wang Y, et al. Fracture risk and bone mineral density levels in patients with systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2016;4:1413-23.
  28. Jacobs J, Korswagen LA, Schilder AM, Van Tuyl LH, Dijkmans BAC, Lems WF, et al. Six-year follow-up study of bone mineral density in patients with systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int*. 2013;24(6):1827-33.
  29. Bultink E, Lems W, Kostense P, Dijkmans BA, Voskuyl AE. Prevalence and risk factors for low bone mineral density and vertebral fractures in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2005;54:2044-50.
  30. Toloza S, Cole D, Gladman D, Ibanez D, Urowitz M. Vitamin D insufficiency in a large female SLE cohort. *Lupus*. 2010;19:13-9.
  31. Ruiz-Irastorza G, Egrubide M, Olivares N, Martinez-Berriotxo A, Aguirre C. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology*. 2008;47:920-3.
  32. Mazziotti G, Canalis E, Giustina A. Drug-induced osteoporosis: mechanisms and clinical implications. *Am J Med*. 2010;123:877-84.
  33. Prieto-Alhambra D, Nogues X, Javaid K, Wyman A, Arden NK, Azagra R, et al. An increased rate of falling leads to a rise in fracture risk in postmenopausal women with self-reported osteoarthritis: a prospective multinational cohort study (GLOW). *Ann Rheum Dis*. 2013;72:911-7.
  34. Ralston S, Urquhart G, Brezski M, Sturrock RD. Prevalence of vertebral compression fractures due to osteoporosis in ankylosing spondylitis. *BMJ*. 1990;300:563-5.
  35. Lange U, Kluge A, Strunk J, Teichmann J, Bachmann G. Ankylosing spondylitis and bone mineral density. What is the ideal tool for measurement? *Rheumatol Int*. 2005;26(2):115-20.
  36. Cooper C, Carbone L, Michet C, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Fracture risk in patients with ankylosing spondylitis: a population based study. *J Rheumatol*. 1994;21:1877-82.
  37. Mullaji A, Upadhyay S, Ho E. Bone mineral density in ankylosing spondylitis. DEXA comparison of control subjects with mild and advanced cases. *J Bone Jt Sur Br*. 1994;76:660-5.
  38. Toussiot R, Michel F, Wendling D. Bone density, ultrasound measurements and body composition in early ankylosing spondylitis. *Rheumatol*. 2001;40:882-8.
  39. van der Weijden M, van der Horst-Bruinsma I, van Denderen J, Dijkmans B, Heymans M, Lems W. High frequency of vertebral fractures in early spondylarthropathies. *Osteoporos Int*. 2012;23:1683-90.
  40. Keller J, Kang J, Lin H. Association between osteoporosis and psoriasis: results from the Longitudinal Health Insurance Database in Taiwan. *Osteoporos Int*. 2013;24:1835-41.
  41. Dreier J, Weirzman D, Cohen A. Psoriasis and osteoporosis: a sex-specific association? *J Invest Dermatol*. 2009;129:1643-9.
  42. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, Kinoshita H, Yoshida M, et al. Epidemiology of lumbar osteoporosis and osteoarthritis and their causal relationship-is osteoarthritis a predictor for osteoporosis or vice versa?: the Miyama study. *Osteoporos Int*. 2009;20(6):999-1008.
  43. Zhang ZM, Li ZC, Jiang LS, Jiang SD, Dai LY. Micro-CT and mechanical evaluation of subchondral trabecular bone structure between postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2010;21(8):1383-90.
  44. Pereira RM, Carvalho JF, Paula AP, Zerbini C, Domiciano DS, Gonçalves H, et al. Guidelines for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rev Bras Reum*. 2012;52(4):569-93.
  45. Mirza F, Canalis E. Secondary osteoporosis: Pathophysiology and management. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(3):R131-51.
  46. Hofbauer L, Gori F, Riggs B, Lacey D, Dunstan C, Spelsberg T, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*. 1999;140:4382-9.
  47. Dallas S, Prideaux M, Bonewald L. The osteocyte: an endocrine cell... and more. *Endocr Rev*. 2013;34:658-90.
  48. Delany A, Durant D, Canalis E. Glucocorticoid suppression of IGF I transcription in osteoblasts. *Mol Endocrinol*. 2001;15(10):1781-9.
  49. Weinstein R. Glucocorticoid-Induced Bone Disease. *New Eng J Med*. 2011;365:62-70.
  50. American College of Rheumatology. Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: 2001 update. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Arthritis Rheum*. 2001;44:1496-503.
  51. Adler R, Hochberg M. Suggested guidelines for evaluation and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis for the Department of Veterans Affairs. *Arch Intern Med*. 2003;163(21):2619-24.
  52. Devogelaer J, Goemaere S, Boonen S, Body J, Kaufman J, Reginster JY, et al. Evidence-based guidelines for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *Osteoporos Int*. 2006;17(1):8-19.
  53. Messina O, Somma L, Tamborena M, Castelli G, Riopedre A, Lancioni G, et al. Guías para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la osteoporosis inducida por glucocorticoides en el adulto. *Actual Osteol*. 2016;12(2):107-25.
  54. Grossman J, Gordon R, Ranganath V, Deal C, Caplan L, Chen W, et al. American College of Rheumatology 2010 recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis Care Res*. 2010;62(11):1515-26.
  55. Rodrigues Pereira R, Freire de Carvalho J, Paula A, Zerbini C, Domiciano D, Gonçalves H, et al. Guidelines for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rev Bras Reum*. 2012;52(4):569-93.
  56. Sambrook P, Birmingham J, Kelly P, Kempler S, Nguyen T, Pocock N, et al. Prevention of corticosteroid osteoporosis. A comparison of calcium, calcitriol and calcitonin. *N Eng J Med*. 1993;328(24):1747-52.
  57. Richey F, Ethgen O, Bruyere O, Reginster J. Efficacy of alfacalcidol and calcitriol in primary and corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis of their effects on bone mineral density and fracture rate. *Osteoporos Int*. 2004;14(5):301-10.
  58. Ringe JD, Dorst A, Faber H, Schacht E, Rahlfs V. Superiority of alfacalcidol over plain vitamin D in the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatol Int*. 2004;24(2):63-70.
  59. Bischoff-Ferrari H, Willett W, Wong JB, Giovannucci E, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of

- randomized controlled trials. *JAMA*. 2005;293:2257-64.
60. Ross A, Manson J, Abrams S, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):53-8
  61. Lems W, Saag K. Bisphosphonates and glucocorticoid-induced osteoporosis: cons. *Endocrine*. 2015;49(3):628-34.
  62. Kanis JA, Stevenson M, McCloskey EV, Davis S, Lloyd-Jones M. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a systematic review and cost-utility analysis. *Health Technol Assess*. 2007;11(7):1-231.
  63. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorders (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl*. 2009;76(113):S1-130.
  64. Saag K, Emkey R, Schnitzer T, Brown J, Hawkins F, Goemacre S, et al. Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med*. 1998;339(5):292-9.
  65. de Nijs R, Jacobs J, Lems W, Laan R, Algra A, Huisman A, et al. Alendronate or alfacalcidol in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med*. 2006;355(7):675-84.
  66. Adachi JD, Saag KG, Delmas PD, Liberman UA, Emkey RD, Seeman E, et al. Two-year effects of alendronate on bone mineral density and vertebral fracture in patients receiving glucocorticoids: a randomized, double-blind, placebo-controlled extension trial. *Arthritis Rheum*. 2001;44(1):202-11.
  67. Cohen S, Levy R, Keller M, Boling E, Emkey R, Greenwald M, et al. Risedronate therapy prevents corticosteroid-induced bone loss: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum*. 1999;42(11):2309-18.
  68. Watts N, Bilezikian J, Camacho P, Greenspan S, Harris S, Hodgson S, et al. American Association Of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for clinical practice for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis: executive summary of recommendations. *Endocr Pr*. 2010;16(6):1016-9.
  69. Saag K, Shane E, Boonen S, Mariñ F, Donley D, Taylor K, et al. Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med*. 2007;357(20):2028-39.
  70. Dore RK, Cohen SB, Lane NE, Palmer W, Shergy W, Zhou L, et al. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in patients with rheumatoid arthritis receiving concurrent glucocorticoids or bisphosphonates. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(5):872-5.
  71. Whittier X, Saag K. Glucocorticoid-induced Osteoporosis. *Rheum Dis Clin N Am*. 2016;42(1):177-89.
  72. Boonen S, Rosenberg F, Claessens F, Vanderschueren D, Papapoulos S. Inhibition of cathepsin K for treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2012;10(1):73-9.
  73. Bone H, McClung MR, Roux C, Recker RR, Eisman JA, Verbruggen N, et al. Odanacatib, a cathepsin K inhibitor for osteoporosis: a two-year study in post-menopausal women with low bone density. *J Bone Miner Res*. 2010;25:937-47.
  74. Paszty C, Turner C, Robinson M. Sclerostin: a gem from the genome leads to bone-building antibodies. *J Bone Min Res*. 2010;25(9):1897-904.
  75. van Bezooijen R, Roelen B, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med*. 2004;199(6):805-14.
  76. Li X, Warmington K, Niu Q, Asuncion F, Barrero M, Grisanti M, et al. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody increases bone formation, bone mass and bone strength in aged male rats. *J Bone Min Res*. 2010;25(12):2647-56.
  77. Yao W, Cheng Z, Busse C, Pham A, Nakamura M, Lane N. Glucocorticoid excess in mice results in early activation of osteoclastogenesis and adipogenesis and prolonged suppression of osteogenesis: a longitudinal study of gene expression in bone tissue from glucocorticoid-treated mice. *Arthritis Rheum*. 2008;58(6):1674-86.
  78. McClung M, Grauer A, Boonen S, Bolognese M, Brown J, Diez-Perez A, et al. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *New Eng J Med*. 2014;370(5):412-20.
  79. Yao W, Dai W, Jiang L, Lay EY, Zhong Z, Ritchie R, et al. Sclerostin-antibody treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis maintained bone mass and strength. *Osteoporos Int*. 2016;27:283-94.
  80. Appelman-Dijkstra N, Papapoulos S. Sclerostin inhibition in the management of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*. 2016;98:370-80.

A watercolor-style illustration of a human skull, rendered in shades of yellow, orange, and light blue. The skull is centered in the upper half of the page, with a soft, painterly texture. Below the skull, the text 'XXII Congreso de la SEIOMM' is written in a large, black, sans-serif font. Underneath that, the dates 'Elche, 25-27 de octubre 2017' are written in a smaller, teal-colored font.

XXII Congreso de la SEIOMM  
Elche, 25-27 de octubre 2017

