

# ACTUALIZACIONES EN OSTEOLÓGÍA

## Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral

VOL. 15, Nº 1 - enero / abril 2019

Indizada en EBSCO, Latindex, LILACS, SciELO, Scopus & Embase y SIC Data Bases



**A.A.O.M.M.**

(Asociación Argentina de Osteología  
y Metabolismo Mineral)

ISSN 1669-8975 (Print);  
ISSN 1669-8983 (Online)  
Revista Cuatrimestral  
Rosario, Santa Fe, Argentina  
[www.osteologia.org.ar](http://www.osteologia.org.ar)

# Gadofe<sup>®</sup>

VITAMINA D<sub>3</sub>  
Colecalciferol 100.000 UI



- Mejora la absorción de calcio y fósforo favoreciendo la mineralización ósea<sup>1</sup>
- Aumenta la resistencia ósea y promueve la reparación de microfracturas<sup>1</sup>
- Previene la osteomalacia y el raquitismo<sup>1</sup>
- Favorece la cantidad y calidad ósea<sup>1</sup>
- Apto para diabéticos<sup>2</sup>
- Libre de gluten<sup>2</sup>



Para más información sobre GADOFEROL<sup>®</sup>, visite [www.gador.com.ar](http://www.gador.com.ar)



#### Presentación:

Frasco monodosis de 2 ml conteniendo 2,5 mg de Colecalciferol (Vitamina D<sub>3</sub> 100.000 UI)

1. Mansur JL, Calcio y vitamina D: acciones moleculares e implicancias para la salud. En Uauy R, Carmuega E y Belizán J (Eds.). El papel del calcio y la vitamina D en la salud ósea y más allá [Internet]. Buenos Aires: CESNI; 2012 [citado: 10 dic 2015]. p. 107-126. Disponible en: <http://files.cloudpiet.net/c-esni/biblioteca/El-papel-del-Calcio-y-la-vitamina%20D.pdf>  
2. Datos en archivos Gador.





# DOMECQ & LAFAGE

Laboratorios Clínicos

Nuestra Prioridad es el paciente



Más de 60 años en el área de la salud en la Argentina, centrado en el bienestar, en la seguridad del paciente y en la asistencia a la comunidad médica.



Cantidad de **PACIENTES** atendidos por día

**1.000**



Cantidad de **PRÁCTICAS** informadas mensualmente

**190.000**



Tiempo de **RESPUESTA** para rutina ambulatoria

**24 hs.**



Tiempo de **RESPUESTA** para urgencias en el Hosp. Alemán

**1 hora**

## Sedes

**Hospital Alemán**  
Av. Pueyrredón 1640  
Tel.: 4827.7000

**Recoleta**  
Paraná 1395  
Tel.: 4811.5566

**Villa Devoto**  
Av. Segurola 2127  
Tel.: 4566.5734

**Villa Urquiza**  
La Pampa 5017  
Tel.: 4523.6936

**Villa del Parque**  
Helguera 2880  
Tel.: 4822.1008

**Ramos Mejía**  
Alsina 520  
Tel.: 4654.7120

**Martínez**  
Pje. Lamarca 383  
Tel.: 4793.3191

[www.labdl.com.ar](http://www.labdl.com.ar)

# ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral



*María Linzoain*  
*"Amanecer en el estanque", 2009*  
*acrílico sobre lienzo, 150 x 200 cm.*  
*Colección Zurbarán*

**VOL. 15, Nº 1**

**enero /abril 2019**

**ISSN 1669-8975 (Print); ISSN 1669-8983 (Online)**

**[www.osteologia.org.ar](http://www.osteologia.org.ar)**

**Rosario, Santa Fe, Argentina**

**Indizada en EBSCO, Latindex, LILACS, SciELO, Scopus & Embase y SIIC Data Bases**



# ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Publicación de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

VOL. 15, Nº 1

enero / abril 2019

ISSN 1669-8975 (Print); ISSN 1669-8983 (Online)

[www.osteologia.org.ar](http://www.osteologia.org.ar)

Rosario, Santa Fe, Argentina

Aparición: cuatrimestral

## Editores responsables:

**Virginia Massheimer:** Cátedra Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670, Bahía Blanca (B8000ICN), Argentina. Investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina.

**Fernando Saravi:** Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Servicio de Densitometría, Fundación Escuela de Medicina Nuclear, Mendoza. Instituto Balseiro, Comisión Nacional de Energía Atómica, Universidad Nacional de Cuyo, San Carlos de Bariloche, Río Negro. Argentina.

## Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral

PROPIETARIO: Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral

DOMICILIO LEGAL: 9 de julio 1324, (2000) Rosario, Santa Fe, Argentina

[www.aaomm.org.ar](http://www.aaomm.org.ar) / [info@aaomm.org.ar](mailto:info@aaomm.org.ar)

## Perfil de la revista

Actualizaciones en Osteología es el órgano científico de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Actualizaciones en Osteología acepta para su publicación trabajos redactados en español o en inglés, que aborden aspectos clínicos o experimentales dentro de la osteología y el metabolismo mineral que puedan considerarse de utilidad e interés para nuestra comunidad científica. Dichos trabajos habrán de ser inéditos, cumplir los requisitos de uniformidad para el envío demanuscritos y estar comprendidos en algunas de las secciones de la revista (Actualizaciones, Artículos Originales, Comunicaciones Breves, Casuísticas, Editoriales, Cartas al Editor). Los artículos son revisados por pares, expertos nacionales e internacionales.

Los artículos publicados en Actualizaciones en Osteología son indizados en EBSCO (EBSCO Host Research Databases), Latindex (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), LILACS (Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud), base de datos corporativa del Sistema BIREME (Centro Latinoamericano y del Caribe de Información en Ciencias de la Salud), SciELO (Scientific Electronic Library Online), Scopus & Embase (Elsevier Bibliographic Databases) y SIIC Data Bases (Sociedad Iberoamericana de Información Científica).

Actualizaciones en Osteología es una revista de Acceso Abierto (Open Access). Todo el contenido es de acceso libre y gratuito. Los usuarios pueden leer, descargar, copiar, distribuir, imprimir, buscar o enlazar los textos completos de los artículos de esta revista sin permiso previo del editor o del autor, siempre que no se pretenda su utilización para uso comercial. Para el correcto ejercicio de este derecho por parte de los usuarios, es condición necesaria que los derechos de propiedad intelectual sean reconocidos. Para ello, cualquier reproducción de los contenidos de cualquier artículo de la revista debe ser debidamente referenciada, indicando la autoría y la fuente bibliográfica. Por otra parte, para la reproducción escrita del material de la revista se deberá solicitar la autorización pertinente. El contenido y las opiniones expresadas en los trabajos publicados en la revista son de entera responsabilidad del(los) autor(es).

## Scope

*Actualizaciones en Osteología is the official scientific journal of the Argentinean Association of Osteology and Mineral Metabolism (AAOMM). Actualizaciones en Osteología publishes manuscripts written in Spanish or English describing clinical and experimental aspects within osteology and mineral metabolism. The articles should be original, meet the uniform requirements for manuscript submission and be comprised in one of the sections of the journal (Original Articles, Review Articles, Short Communications, Case Reports, Editorials, Letters to the Editor). Articles are peer-reviewed by national and international experts in the field.*

*The articles published in Actualizaciones en Osteología are indexed in EBSCO (EBSCO Host Research Databases), Latindex (Regional Information System for Scientific Journals Online of Latin America, the Caribbean, Spain and Portugal), LILACS (Latin American Literature in Health Sciences), BIREME (Latin American and Caribbean Center on Health Sciences), SciELO (Scientific Electronic Library Online), Scopus & Embase (Elsevier Bibliographic Databases) and SIIC data Bases (Iberoamerican Society Scientific Information).*

*Actualizaciones en Osteología is an Open Access journal. All its content is available free of charge. Users can read, download, copy, distribute, print, search or link the complete article texts from this journal without requiring permission from the editor or author, as long as it is not for commercial use. Users should recognize the intellectual property rights. For this, any reproduction of the contents of any article published in the journal should be properly referenced, indicating the authors and bibliographic source.*

*On the other hand, authorization should be requested for written reproduction of the journal material. The content and opinions expressed in the manuscripts published by the journal are the sole responsibility of the author(s).*

# ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Publicación de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

## EDITORES RESPONSABLES

### Virginia Massheimer

Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR, CONICET-UNS). Universidad Nacional del Sur. Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Bahía Blanca. Argentina.

### Fernando Saravi

Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Servicio de Densitometría, Fundación Escuela de Medicina Nuclear, Mendoza. Instituto Balseiro, Comisión Nacional de Energía Atómica, Universidad Nacional de Cuyo, San Carlos de Bariloche, Río Negro. Argentina.

## EDITORAS ASOCIADAS

### Silvina Mastaglia

Laboratorio de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEN). CONICET-UBA, Buenos Aires. Argentina.

### Gabriela Picotto

Bioquímica y Biología Molecular, INICSA (CONICET-UNC), Córdoba. Argentina.

### Lilian I. Plotkin

Department of Anatomy & Cell Biology. Indiana University School of Medicine. Indianapolis. USA.

### María Josefina Pozzo

Servicio de Endocrinología, Hospital Alemán. Buenos Aires. Argentina.

## EDITOR ASOCIADO SENIOR

### Julio Ariel Sánchez

Director Centro de Endocrinología. Rosario, Argentina. Ex-director Actualizaciones en Osteología 2005-2012.

## SECRETARIA DE REDACCIÓN

### Patricia Mandalunis

Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Odontología, UBA. Buenos Aires. Argentina.

## COORDINACIÓN EDITORIAL

### Mariana Rapoport

asistente-editorial@osteologia.org.ar

## CORRECCIÓN DE TEXTOS

### Prof. María Isabel Siracusa

---

## CUERPO EDITORIAL

### Alicia Bagur

MAUTALEN, Salud e Investigación. Buenos Aires. Argentina.

### Ricardo A. Battaglini

Harvard School of Dental Medicine. Mineralized Tissue Biology Department. The Forsyth Institute. USA.

### Teresita Bellido

Dept. of Anatomy & Cell Biology. Division of Endocrinology, Dept. of Internal Medicine Indiana University School of Medicine. Indianapolis. USA.

### Lucas R. M. Brun

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina. Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Rosario. Argentina.

### David Burr

Professor of Anatomy and Cell Biology. Indiana University School of Medicine. USA.

### Marilia Buzalaf

Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru-SP. Brazil.

### Jorge B. Cannata Andía

Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral. Hospital Universitario Central de Asturias. España.

### Haraldo Claus Hermberg

Servicio de Endocrinología, Hospital Alemán. Buenos Aires, Argentina.

### Gustavo Duque

Division of Geriatric Medicine, Department of Medicine & Director, Musculoskeletal Ageing Research Program. Sydney Medical School Nepean, University of Sydney. Australia.

### Adriana Dusso

Laboratorio de Nefrología Experimental. IRB Lleida (Instituto de Investigaciones Biomédicas de Lleida). Facultad de Medicina. Universidad de Lleida. Lleida. España.

### Pedro Esbrit

Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo. Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) - Fundación Jiménez Díaz. Madrid. España.





**José Luis Ferretti**

Centro de Estudios de Metabolismo Fosfocálcico (CEM-FoC). Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina.

**Ana María Galich**

Sección Osteopatías Metabólicas del Servicio de Endocrinología. Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.

**Diana González**

MAUTALEN, Salud e Investigación. Buenos Aires, Argentina.

**María Luisa Gonzalez Casaus**

Laboratorio de Nefrología y Metabolismo Mineral. Hospital Central de Defensa de Madrid. España.

**Arancha R. Gortázar**

Instituto de Medicina Molecular Aplicada. Facultad de Medicina. Universidad CEU San Pablo, Madrid, España.

**Nuria Guañabens**

Servicio de Reumatología del Hospital Clinic de Barcelona. España.

**Suzanne Jan de Beur**

Johns Hopkins University School of Medicine. Division of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism. Johns Hopkins Bayview Medical Center. USA.

**Patricia Jaurez Camacho**

Unidad Biomédica. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. México.

**Carlos Mautalen**

MAUTALEN, Salud e Investigación. Buenos Aires, Argentina.

**Michael McClung**

Oregon Osteoporosis Center, Portland, OR, USA.

**José Luis Millán**

Sanford-Burnham Medical Research Institute. La Jolla, CA, USA.

**Armando Negri**

Instituto de Investigaciones Metabólicas. Buenos Aires, Argentina.

**Beatriz Oliveri**

MAUTALEN, Salud e Investigación. Laboratorio Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas, INIGEM. Investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina.

Investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina.

**Luisa Carmen Plantalech**

Sección Osteopatías Metabólicas. Servicio de Endocrinología y Metabolismo. Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.

**Hans L Porias Cuéllar**

Nuevo Sanatorio Durango. México.

**Rodolfo Puche**

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina.

**Alfredo Rigalli**

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Rosario, Argentina.

**Emilio Roldán**

Departamento de Investigaciones Musculo esqueléticas, Instituto de Neurobiología (IDNEU). Dirección Científica, Gador SA. Buenos Aires, Argentina.

**Ana Russo de Boland**

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina.

**Helena Salerni**

División Endocrinología del Hospital Durand. Buenos Aires, Argentina.

**Eduardo Slatopolsky**

Renal Division. Department of Internal Medicine. Washington University School of Medicine. St. Louis, Missouri, USA.

**Nori Tolosa de Talamoni**

Laboratorio de Metabolismo Fosfocálcico y Vitamina D "Dr. Fernando Cañas". Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina.

**José R. Zanchetta**

Instituto de Investigaciones Metabólicas (IDIM), Buenos Aires, Argentina.

---

## AUTORIDADES DE AAOMM COMISIÓN DIRECTIVA 2018-2019

**Presidente**

Dra. Susana Zeni

**Vicepresidente**

Dr. Lucas Brun

**Secretaria**

Dra. Graciela Brito

**Tesorera**

Dra. Mariana Seijo

**Vocales**

Dra. Carola Bozal

Dr. Adrián Campelo

Dra. Silvana Di Gregorio

Dra. Sara Feldman

Dra. Gabriela Picotto

Dra. Gloria Rovai

Dr. Fernando Saravi

Dra. Ana Wittich

**ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA**

Vol 15, Nº 1, mayo / agosto 2019

**ÍNDICE****DESPEDIDA Y AGRADECIMIENTO A LA DRA. ALICIA BAGUR**

Virginia Massheimer

7

**EDITORIAL / Editorial**

---

**No a las “vacaciones terapéuticas” de denosumab***No to “therapeutic holidays” for denosumab*

Núria Guañabens

8

**ARTÍCULO ORIGINAL / Originals**

---

**Utilidad del 18F-Colina PET/TC en hiperparatiroidismo primario persistente o recurrente: experiencia inicial***18 F- Choline PET-CT in persistent or recurrent primary hyperparathyroidism: initial experience***Carlos Collaud, Martina Musumeci, Ana Mollerach, Irene Arma, Isabel Hume, Constanza Cianciarelli, Eliana Vázquez, Ana María Galich, María Diehl, Rodolfo Guelman, Ariela Kitaidgrosky, Mirena Buttazzoni, Pablo Biedak, Mariela Schonfeld, Marcelo Figari, Víctor Jager**

11

**ACTUALIZACIONES / Review**

---

**On the synthesis of vitamin D in the darkness***Sobre la síntesis de vitamina d en la oscuridad*

Rodolfo C. Puche

20

**Inmunopatología de la brucelosis osteoarticular***Immunopathology of osteoarticular brucellosis*

María Victoria Delpino

34





<b>Servicio de enlace para pacientes con fracturas por osteoporosis</b> <i>Osteoporotic fracture liaison service</i> <b>Vivian Marcela Morán, María Diehl, Luisa Carmen Plantalech</b>	<b>44</b>
--	-----------

#### **REPORTE DE CASOS / Case Report**

---

<b>Fracturas vertebrales múltiples post suspensión de Denosumab.</b> <b>Revisión del tema a partir de dos casos clínicos</b> <i>Discontinuation of denosumab and multiple vertebral fractures.</i> <i>Report of two cases and review of the literature</i> <b>Mirena Buttazzoni, Ana María Galich</b>	<b>57</b>
---	-----------

<b>INSTRUCCIONES PARA AUTORES / Authors guidelines</b>	<b>65</b>
--	-----------

---

## DESPEDIDA Y AGRADECIMIENTO A LA DRA. ALICIA BAGUR

Tengo el privilegio, en nombre del Cuerpo Editorial de *Actualizaciones en Osteología*, de despedir a la Dra. Alicia Bagur.

Un año pasó desde aquella reunión en el café del Hospital Italiano donde generosamente aceptaste sumarte a este desafío de dirigir nuestra revista. Digo nuestra porque *Actualizaciones en Osteología* es la Revista de todos los socios AAOMM que con mucho orgullo trabajamos para posicionarla en un lugar de prestigio nacional e internacional.

Un año complejo, difícil en lo económico, pero que no menoscabó tu compromiso y dedicación a la tarea editorial. Fueron varias las vicisitudes que tuvimos que enfrentar: cambio de imprenta, cambio de diagramador, duplicación de los costos de impresión, situaciones adversas que verdaderamente desalientan estas tareas que se realizan en forma honoraria y resignando tiempo de la vida personal.

Sin embargo, esas características de tu personalidad no nos sorprenden ya que a lo largo de los años has demostrado un compromiso indiscutible con nuestra Asociación, participando en distintas actividades, entre ellas la de mayor jerarquía como es haber presidido nuestra entidad durante los años 2000-2001. Desde tu lugar como editora responsable trabajaste denodadamente detrás del gran reto que implica mantener el nivel científico de la revista. Tu entusiasmo y dinamismo quedará grabado en la historia de *Actualizaciones en Osteología*.

No quiero despedirme sin destacar una de tus virtudes más importantes, Alicia, que es tu *excelente calidad humana*, indispensable para un fructífero trabajo en equipo. Respetuosa, cálida, dispuesta a consensuar, y si fuera necesario a confrontar, las diferentes visiones de una misma tarea, siempre en un ambiente de cordialidad y tolerancia. Fue un placer trabajar juntas, una tarea que ciertamente hemos disfrutado mucho.

Comparto una reflexión de la Madre Teresa de Calcuta: "*Sabemos muy bien que lo que estamos haciendo no es más que una gota en el océano. Pero si esa gota no estuviera allí, al océano le faltaría algo*".

Dra. Virginia Massheimer  
Editora responsable  
Actualizaciones en Osteología



## EDITORIAL / *Editorial*

# NO A LAS “VACACIONES TERAPÉUTICAS” DE DENOSUMAB

Núria Guañabens\*

Servicio de Reumatología. Hospital Clínic de Barcelona, España.

Desde hace años estamos acostumbrados a realizar discontinuación del tratamiento o “vacaciones terapéuticas” en el abordaje farmacológico de la osteoporosis. Racionalizándolo, ¿en qué otra enfermedad se realiza esta acción? Si lo pensamos, solo en la osteoporosis. Ello sería inaudito en otras enfermedades crónicas como la diabetes, la cardiopatía isquémica, etc. Esta actitud terapéutica se basa en que en las últimas décadas hemos utilizado los bifosfonatos como primera línea de tratamiento, y sabemos que permiten este abordaje debido a que se depositan en el tejido óseo durante años, con una liberación progresiva a partir de la resorción osteoclástica.<sup>1</sup> De hecho, se pueden encontrar trazas de alendronato en orina de pacientes que lo han suspendido casi 2 años antes.<sup>2</sup> Pero ello no ocurre con otros fármacos con indicación en la osteoporosis, entre los que se incluye denosumab. Este anticuerpo monoclonal anti-RANKL, cuya administración ha aumentado de forma progresiva en los últimos años, es un fármaco eficaz en la reducción del riesgo de fractura vertebral, no vertebral y de cadera.<sup>3</sup>

Es importante recordar que el mecanismo de acción antirresortiva de denosumab es distinto del de los bifosfonatos y que su efecto es reversible. Así, ya hace 8 años se describió que la ganancia de densidad mineral ósea (DMO) obtenida durante el tratamiento con denosumab se perdía rápidamente tras su discontinuación y al año se situaba en valores basales tanto en columna lumbar como en fémur. Esta reducción de DMO se asociaba a un pronunciado y rápido aumento de los marcadores del recambio óseo, en concreto del telopéptido carboxiterminal del colágeno I (sCTX) y del propéptido aminoterminal del procolágeno I (PINP) ya a los 3 y 6 meses (9 y 12 meses después de la última dosis), respectivamente.<sup>4</sup> Este “rebote” del recambio óseo planteó la posibilidad de un aumento inminente del riesgo de fractura, asociado a un deterioro de la microarquitectura ósea. Un análisis inicial de un grupo de pacientes que habían discontinuado el fármaco durante el ensayo FREEDOM (*Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis Every 6 Months*) no evidenció un exceso del riesgo de fractura, quizá debido a que el período postratamiento fue corto y a que casi un tercio de los pacientes recibieron un tratamiento alternativo.<sup>5</sup> Posteriormente, se describieron diversos casos clínicos de fracturas vertebrales múltiples tras la discontinuación de denosumab, la mayoría entre 8 y 16 meses tras la última dosis.<sup>6,7</sup>

Un análisis *post-hoc* de FREEDOM y su extensión, publicado en 2018, evidenció que la tasa de nuevas fracturas vertebrales y no vertebrales fue similar en el grupo que discontinuó deno-

---

\*Correspondencia: Universidad de Barcelona. C/Villarroel 170. Barcelona 08036. España.  
E-mail: [nguanabens@ub.edu](mailto:nguanabens@ub.edu)



sumab o placebo. Sin embargo, entre las mujeres que tras discontinuar denosumab tuvieron al menos una fractura vertebral, la incidencia de fracturas vertebrales múltiples fue superior a la observada en el grupo placebo. Además, se identificó como principal factor de riesgo, la existencia de fracturas vertebrales previas.<sup>8</sup> Otros estudios han sugerido factores protectores frente al desarrollo de esta complicación. En este sentido, se ha indicado que el tratamiento previo con bisfosfonatos reduciría el riesgo, o bien que una administración de denosumab inferior a dos años no conferiría un riesgo aumentado para desarrollar fracturas vertebrales múltiples.<sup>9</sup> Sin embargo, estos factores protectores no han sido confirmados. Así, se ha observado en series con un número reducido de pacientes que la administración previa de bisfosfonatos no parecía ser un factor protector<sup>10,11</sup> y, aunque no está bien establecida la duración del tratamiento no asociada a este riesgo, no se ha descrito ningún paciente con fracturas vertebrales múltiples tras discontinuar después de una dosis única del fármaco.<sup>9</sup>

Los mecanismos implicados en este efecto “rebote” del remodelado óseo no están aclarados. Se han sugerido ciertas hipótesis que incluyen la reactivación del *pool* de precursores osteoclasticos “durmientes” y/o un índice RANKL/OPG muy aumentado, tras la discontinuación de denosumab y su aclaramiento de la circulación.<sup>12</sup> De hecho, se han demostrado niveles séricos elevados de RANK mRNA en este contexto.<sup>13</sup>

Tampoco se conoce la mejor opción terapéutica tras discontinuar denosumab, aunque hay acuerdo en que, en esta situación, se debe administrar un fármaco antirresortivo potente. Parece que la administración de una dosis única de ácido zoledrónico 5 mg a los 6 meses de la última dosis de denosumab no es suficiente para evitar el “rebote”, cuando el remodelado óseo está aún suprimido.<sup>14</sup> Otra opción, basada en los resultados del ensayo DAPS (*Denosumab Adherence Preference Satisfaction*), podría ser la administración de alendronato durante al menos un año.<sup>15</sup>

El conjunto de estas observaciones e incertidumbres terapéuticas motivó un artículo de posicionamiento de la European Calcified Tissue Society (ECTS), que propone una reevaluación de la paciente a los 5 años. Las pacientes con alto riesgo de fractura deberían continuar el tratamiento con denosumab hasta 10 años o cambiar a un tratamiento alternativo, especialmente bisfosfonatos. Si el riesgo de fractura es bajo a los 5 años, denosumab podría ser discontinuado pero, nuevamente, se debería administrar un bisfosfonato para reducir o prevenir el “rebote” del remodelado óseo.<sup>16</sup> Quizás un tratamiento más intensivo con ácido zoledrónico 5 mg o con alendronato durante uno o más años sea la secuencia óptima.

Es importante hacer un llamamiento a todos los facultativos de atención primaria, odontólogos, reumatólogos, endocrinólogos, entre otros, que tratan a pacientes con osteoporosis por su enfermedad ósea o por procesos intercurrentes, para que se conciencien del riesgo que supone suspender denosumab sin planificar la administración posterior de otro antirresortivo potente. Aunque hay dudas y muchos interrogantes por responder, también disponemos de certezas: No a las “vacaciones terapéuticas” de denosumab.

**Conflicto de intereses:** honorarios por colaboración en *Advisory Boards* y/o financiación de congresos de Amgen, Eli Lilly, UCB y Alexion.



## Referencias

1. Russell RGG. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone* 2011; 49:2-19.
2. Peris P, Torra M, Olivares V, et al. Prolonged bisphosphonate release after treatment in women with osteoporosis. Relationship with bone turnover. *Bone*. 2011; 49:706-9.
3. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 2009; 361:756-65.
4. Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK, et al. Effects of denosumab treatment and discontinuation on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women with low bone mass. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96:972-80.
5. Brown JP, Roux C, Törring O, et al. Discontinuation of denosumab and associated fracture incidence: analysis from the Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis Every 6 Months (FREEDOM) trial. *J Bone Miner Res*. 2013; 28: 746-52.
6. Anastasilakis AD, Makras P. Multiple clinical vertebral fractures following denosumab discontinuation. *Osteoporos Int*. 2016; 27:1929-30.
7. Aubry-Rozier B, González-Rodríguez E, Stoll D, Lamy O. Severe spontaneous vertebral fractures after denosumab discontinuation: three case reports. *Osteoporos Int*. 2016; 27:1923-5.
8. Cummings SR, Ferrari S, Eastell R, et al. Vertebral Fractures after Discontinuation of Denosumab: A Post Hoc Analysis of the Randomized Placebo-Controlled FREEDOM Trial and Its Extension. *J Bone Miner Res*. 2018; 33:190-8.
9. Tripto-Shkolnik L, Rouach V, Marcus Y, Rotman-Pikielny P, Benbassat C, Vered I. Vertebral Fractures Following Denosumab Discontinuation in Patients with Prolonged Exposure to Bisphosphonates. *Calcif Tissue Int*. 2018; 103:44-9.
10. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Makras P, Aubry-Rozier B, Kaouri S, Lamy O. Clinical Features of 24 Patients With Rebound-Associated Vertebral Fractures After Denosumab Discontinuation: Systematic Review and Additional Cases. *J Bone Miner Res*. 2017; 32:1291-6.
11. Florez H, Ramírez J, Monegal A, Guañabens N, Peris P. Spontaneous vertebral fractures after denosumab discontinuation: a report of 6 cases. *Ann Rheum Dis*. 2018; 77(Suppl A447).
12. McClung MR. Cancel the denosumab holiday. *Osteoporos Int*. 2016; 27:1677-82.
13. Anastasilakis AD, Yavropoulou MP, Makras P, et al. Increased osteoclastogenesis in patients with vertebral fractures following discontinuation of denosumab treatment. *Eur J Endocrinol*. 2017; 176:677-83.
14. Reid IR, Horne AM, Mihov B, Gamble GD. Bone Loss after Denosumab: Only Partial Protection with Zoledronate. *Calcif Tissue Int*. 2017; 101:371-4.
15. Freemantle N, Satram-Hoang S, Tang ET, et al. Final results of the DAPS (Denosumab Adherence Preference Satisfaction) study: a 24-month, randomized, crossover comparison with alendronate in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2012 23:317-26.
16. Tsourdi E, Langdahl B, Cohen-Solal M, et al. Discontinuation of Denosumab therapy for osteoporosis: A systematic review and position statement by ECTS. *Bone*. 2017; 105:11-7.

ARTÍCULO ORIGINAL / *Originals*

## UTILIDAD DE LA 18F-COLINA PET/TC EN HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO PERSISTENTE O RECURRENTE: EXPERIENCIA INICIAL

Carlos Collaud,<sup>1</sup> Martina Musumeci,<sup>1</sup> Ana Mollerach,<sup>1</sup> Irene Arma,<sup>1</sup> Isabel Hume,<sup>1</sup> Constanza Cianciarelli,<sup>1</sup> Eliana Vázquez,<sup>1</sup> Ana María Galich,<sup>2</sup> María Diehl,<sup>2</sup> Rodolfo Guelman,<sup>2</sup> Ariela Kitaidgrosky,<sup>2</sup> Mirena Buttazzoni,<sup>2</sup> Pablo Biedak,<sup>3</sup> Mariela Schonfeld,<sup>4</sup> Marcelo Figari,<sup>5</sup> Víctor Jager<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear. PET-TC. Hospital Italiano de Buenos Aires. <sup>2</sup> Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear. Hospital Italiano de Buenos Aires. <sup>3</sup> Servicio de Diagnóstico por Imágenes. PET-TC. Hospital Italiano de Buenos Aires. <sup>4</sup> Servicio de Densitometría, TCba Salguero, Buenos Aires. <sup>5</sup> Servicio de Cirugía General-Cabeza y Cuello. Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

### Resumen

El hiperparatiroidismo persistente/recurrente representa un desafío en la localización del tejido paratiroideo hiperfuncionante. En esta subpoblación, los métodos convencionales ofrecen un menor rédito diagnóstico. La 18F-colina PET/TC podría ser una buena alternativa dada su mejor resolución espacial, capacidad de detectar glándulas ectópicas y la conjunción de la imagen molecular y anatómica. Sin embargo, la evidencia en este subgrupo de pacientes es escasa. Objetivo: evaluar la utilidad de la 18F-colina PET/TC como método de localización en el hiperparatiroidismo persistente o recurrente. Materiales y métodos: se analizaron los pacientes con 18F-colina PET/TC para hiperparatiroidismo entre diciembre de 2015 y enero de 2018 en un centro terciario de alto volumen. Se analizaron el número de lesiones, su localización, tamaño y el *Standard Uptake Value* máximo (SUV max) en las imágenes tempranas y tar-

días. Se compararon los resultados con los métodos convencionales. Resultados: 7 de 15 pacientes habían sido operados previamente (persistentes/recurrentes). La 18F-colina PET/TC detectó 6/7 casos (83,33%), la ecografía cervical 1/4 (25%) y el SPECT de paratiroides y la resonancia nuclear magnética 2/5 (40%). El SUV max obtenido fue variable, en la mitad de los casos a los 10 minutos y en los restantes a la hora; el tamaño promedio de las lesiones fue 8,61 mm (6-12 mm). Conclusiones: la 18F-colina PET/TC muestra una alta tasa de detección en los pacientes con hiperparatiroidismo persistente/recurrente. La combinación del comportamiento biológico del PET con los hallazgos morfológicos aportados por la TC con contraste endovenoso le ofrecería ventajas sobre otros estudios que podrían posicionarlo como método de primera línea en esta subpoblación.

**Palabras clave:** hiperparatiroidismo primario, recurrencia, persistencia, 18F-colina PET-TC.

\*E-mail: [carlos.collaud@hospitalitaliano.org.ar](mailto:carlos.collaud@hospitalitaliano.org.ar)





## Abstract

### 18 F-CHOLINE PET-CT IN PERSISTENT OR RECURRENT PRIMARY HYPERPARATHYROIDISM: INITIAL EXPERIENCE

Persistent or recurrent hyperparathyroidism represents a challenge regarding the localization of the hyper-functioning parathyroid tissue. In this subpopulation of hyperparathyroid patients, conventional methods have a low diagnostic yield. The 18F-choline PET / CT could be a good alternative given its better spatial resolution, ability to detect ectopic glands, and the conjunction of the molecular and anatomical image. However, the evidence in this subgroup of patients is limited. Objective: to evaluate the utility of 18F-choline PET / CT as a localization method in persistent or recurrent hyperparathyroidism. Materials and methods: patients with 18F-choline PET / CT for hyperparathyroidism between December 2015 and January 2018 in a high-volume tertiary center were included. The number of le-

sions, and their location, size, and maximum Standard Uptake Value (SUV) in the early and late images were analyzed. The results were compared to conventional methods. Results: 7 of 15 patients had been previously operated (persistent/recurrent). 18F-choline PET / CT detected 6/7 cases (83,33%), cervical ultrasound 1/4 (25%) and parathyroid SPECT and magnetic resonance 2/5 (40%). The maximum SUV was variable, one half at 10 minutes and the other half at 60 minutes; the average size of the lesions was 8.61 mm (6-12 mm). Conclusions: 18F-Choline PET / CT shows a high detection rate in patients with persistent / recurrent hyperparathyroidism. The combination of the biological behavior of PET with the morphological findings provided by CT with intravenous contrast would offer advantages over other studies that could position it as a first line method in this subpopulation.

**Key words:** primary hyperparathyroidism, recurrence, persistence, F18-choline, PET/TC.

## Introducción

El hiperparatiroidismo primario (HPT) es una patología endocrina prevalente caracterizada por la secreción autónoma de parathormona (PTH) con el consiguiente aumento en los valores de calcemia. Su único tratamiento curativo es la cirugía.<sup>1</sup> Si bien en los últimos años ha habido grandes avances en el diagnóstico y tratamiento, el 2,5-5% de los pacientes evolucionan con hiperparatiroidismo persistente o recurrente.<sup>2</sup> Las principales causas del fracaso quirúrgico son la presencia de enfermedad multiglandular o de ectopia no conocida, la falta de un cirujano experimentado en la patología o, menos frecuentemente, el carcinoma paratiroideo.<sup>3</sup>

El manejo de estos casos es dificultoso dado que una segunda cirugía conlleva mayor riesgo de hipoparatiroidismo y de injuria del nervio laríngeo.<sup>4</sup> En primera instancia, son

necesarias la confirmación del diagnóstico y la exclusión de hipercalcemia hipocalciúrica familiar.<sup>5</sup> Si el paciente cumple criterios quirúrgicos, los estudios de imágenes son obligatorios dado que el éxito de la segunda cirugía depende de la adecuada localización. Dichos estudios no son diagnósticos. Su objetivo es guiar el procedimiento quirúrgico y no se debe explorar a ciegas un cuello ya intervenido.<sup>6</sup> La ecografía cervical y el centellograma de paratiroides con tecnecio 99m (99mTc) Sesta-MIBI se consideran de primera línea. La tomografía computarizada (TC) y la resonancia nuclear magnética (RNM) se reservan para casos negativos o discordantes y para confirmar la presencia de paratiroides ectópicas.<sup>7</sup> El rendimiento de los métodos disminuye frente al antecedente de una cirugía previa con un aumento de las tasas de falsos positivos y negativos.

Recientemente, se incorporó la tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada (PET/TC) como método diagnóstico en esta patología. Su mayor sensibilidad está relacionada con la mejor resolución espacial que permite detectar lesiones más pequeñas. Existen diferentes radiotrazadores para la localización del tejido paratiroideo hiperfuncionante. La metionina marcada con carbono 11 (11C-metionina) presenta una sensibilidad similar al centellograma, y su corto tiempo de semidesintegración (vida media del radioisótopo) determina la necesidad de contar con un ciclotrón en el centro de diagnóstico, lo que disminuye su disponibilidad. Por otro lado, la colina marcada con flúor 18 (18F-colina) es otro radiofármaco que se ha investigado en los últimos años con resultados alentadores; su tiempo medio más prolongado (109 minutos) le ofrece ventajas sobre la 11C-metionina.<sup>8,9</sup>

El objetivo del presente estudio piloto es evaluar los resultados de la 18F-colina PET/TC en pacientes con HPT primario persistente o recurrente que tuvieran estudios de localización negativos, no concluyentes, discordantes, o como método de primera línea.

### **Materiales y métodos**

**Población:** se analizaron retrospectivamente los pacientes a quienes se les efectuó 18F-colina PET/TC por hiperparatiroidismo primario entre diciembre de 2015 y enero de 2018. Del total de pacientes se seleccionaron solo aquellos que hubieran sido sometidos a paratiroidectomía previa al estudio y presentaran hipercalcemia o normocalcemia con PTH elevada luego de la intervención quirúrgica, siendo persistente cuando estos hallazgos se presentan dentro de los 6 meses posquirúrgicos y recurrente si suceden luego de un período de normalización de 6 meses. Fueron excluidos los pacientes con deficiencia de vitamina D (< 20 ng/ml), insuficiencia renal e hiperparatiroidismo hereditario.

### **Mediciones de laboratorio**

Se determinaron los dosajes de calcio y creatinina por colorimetría (rango de referencia 8,5-10,5 mg/dl y 0,5-1,2 mg/dl, respectivamente), fósforo por método complejo fosfomolibdato (2,5-4,5 mg/dl), 25-OH vitamina D y PTH por quimioluminiscencia (8,7-77,1 pg/ml). Además, se efectuó índice calcio/creatinina en orina de 24 horas (0,08-0,25).

### **18F-colina PET/TC**

Se realizó la adquisición del PET/TC con equipo Biographm CT 20® (Siemens) a los 10 y 60 minutos de la administración endovenosa de 1,5 megabecquerels/kg de 18F-colina mediante tomografía computarizada con y sin contraste endovenoso (EV), incluyendo tórax y mediastino superior en la fase temprana y desde la línea orbitomeatal hasta la raíz de los muslos en la imagen tardía. Se utilizó reconstrucción iterativa 3D con TOF (*time of flight*) con 2 iteraciones y 21 subsets en ambas adquisiciones con un tiempo por camilla de 2,5 minutos en la temprana (*Image Size* 256 × 256) y 2 min en la tardía (*Image Size* 200 × 200). La TC con contraste EV se realizó en fase arterial para evaluar el realce del tejido paratiroideo en relación con la imagen sin contraste.

El estudio fue analizado por dos observadores independientes y se consideró positivo ante un foco de captación del radiofármaco con correlato anatómico en TC en la región del cuello o mediastino. Se registró el *Standard Uptake Value* o índice de captación (SUV) y el diámetro transverso máximo por TC. El SUV máximo fue medido a través de la realización de un volumen de interés (VOI) sobre el área de captación paratiroidea.

### **Centellograma con 99mTc SESTAMIBI y ecografía**

Las ecografías fueron realizadas por un operador experimentado con transductor lineal de alta frecuencia, evaluando el cuello



desde la mandíbula hasta el hueso supraesternal. Se obtuvieron imágenes en el eje longitudinal y transversal y se evaluaron los hallazgos con modo bidimensional y Doppler color.

El protocolo de centellograma de paratiroides constó de la adquisición de imágenes estáticas a los 15 minutos y a las 2 horas posteriores a la inyección de 99mTc SESTAMIBI (550 megabecquerels) con imágenes SPECT (tomografía por emisión de fotón único) temprana y técnica de sustracción tiroidea con 99mTc.

#### Confirmación

Se consideró como procedimiento de referencia (estándar de oro) la histología compatible o el resultado del dosaje de PTH en líquido de lavado de aguja marcadamente elevado ( $> 1000$  pg/ml) mediante punción bajo guía ecográfica.

#### Resultados

Durante el período comprendido entre

diciembre de 2015 y enero de 2018 se realizaron 15 exámenes de 18F-colina PET/TC para estudio de hiperparatiroidismo en nuestra institución. De estos, 7 pacientes (p) presentaban paratiroidectomía previa (hiperparatiroidismo persistente/recurrente), 5 de los cuales fueron intervenidos antes en otro centro. Ninguno de ellos presentaba antecedentes de irradiación en cuello y no hubo casos familiares. Las características basales de la población se describen en la Tabla 1.

Del total, 5 eran mujeres y 2 hombres, con una media de edad de 61,28 años (51-77). Solo un caso evolucionó con aumento de los valores de PTH luego de su normalización, mientras que los otros 6 mantuvieron niveles hormonales incrementados desde el posquirúrgico inmediato. Los resultados histológicos de la primera intervención fueron negativos (3p), tejido paratiroideo de características conservadas (2p) e hiperplasia paratiroidea (1p). Una paciente operada en otro centro presentaba características indeterminadas (adenoma o hiperplasia).

Tabla 1. Características basales de la población.

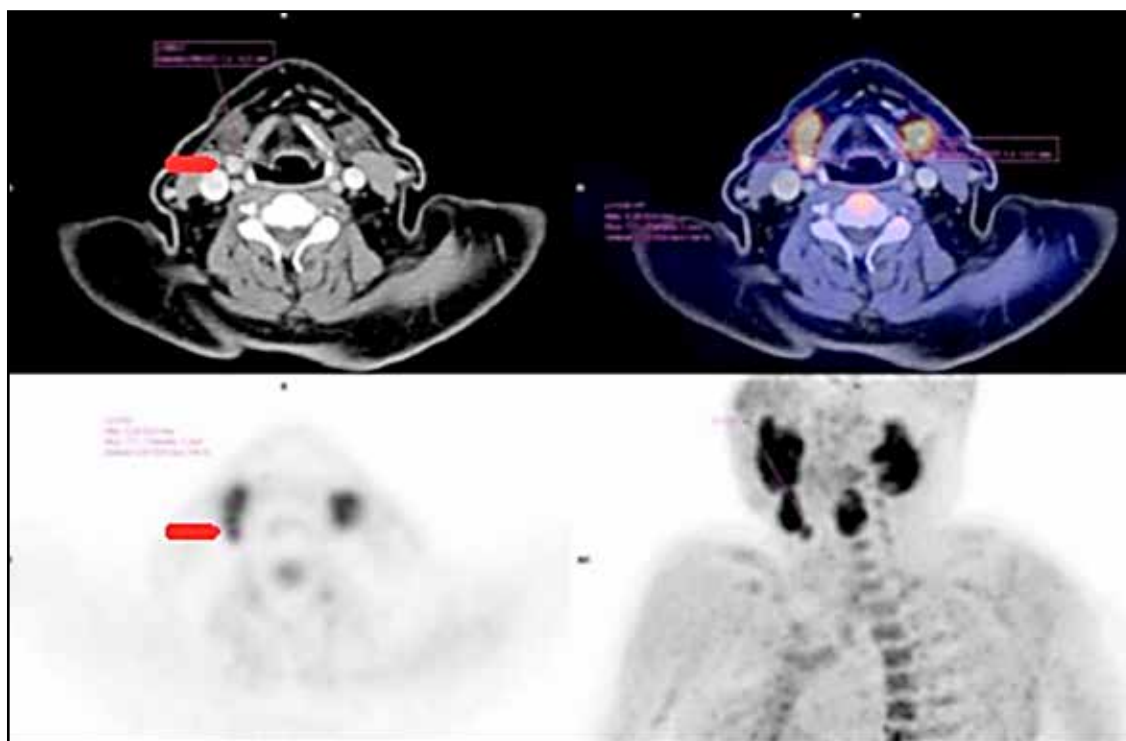
Paciente	Edad	Sexo	HPT primario	Calcio (mg/dl)	Fósforo (mg/dl)	PTH	25OH Vit D	Creatinina sérica (mg/dl)	Índice Cau/Creau	Anatomía patológica previa
1	68	M	Persistente	11,9	1,9	365	20,1	1,13	0,22	Negativa
2	52	F	Recurrente	10,2	2	268	82	0,54	0,37	Indeterminado
3	56	F	Persistente	12,3	2,4	309	36,5	0,77	0,78	Negativa
4	77	M	Persistente	11,6	2,7	273,5	32,1	1,33	0,11	Tejido paratiroideo conservado
5	51	F	Persistente	10,5	3	170,2	20,5	0,9	0,28	Tejido paratiroideo conservado
6	64	F	Persistente	9,6	3,7	137,4	25,5	0,74	0,22	Hiperplasia
7	61	F	Persistente	10,4	-	163	29	0,71	-	Negativa

Valores de referencia: Calcio 8-10,5 mg/dl, Fósforo 2,5-4,5 mg/dl, PTH 8,7-77,1 pg/ml, 25OH Vitamina D: deseable mayor de 30 ng/ml, Creatinina: 0,50-1,20 mg/dl, índice calcio/creatinina en orina de 24 horas: 0,08-0,25.



De los 7 estudios con 18F-colina PET/TC, 6 resultaron positivos y uno fue negativo. Las localizaciones en los estudios positivos fueron: 3 eutópicas y 3 ectópicas (2 mediastinales y uno a nivel submaxilar). La mitad de los pacientes presentaron el mayor SUV en las imágenes tempranas, mientras que la mitad restante a la hora. El tamaño medio de los focos de captación patológica fue de 8,61 mm (6-12 mm). De los 6 pacientes positivos se confirmaron 4 casos: 3 por estudio histológico de la pieza quirúrgica y 1 mediante punción con PTH en lavado de aguja, con resultado

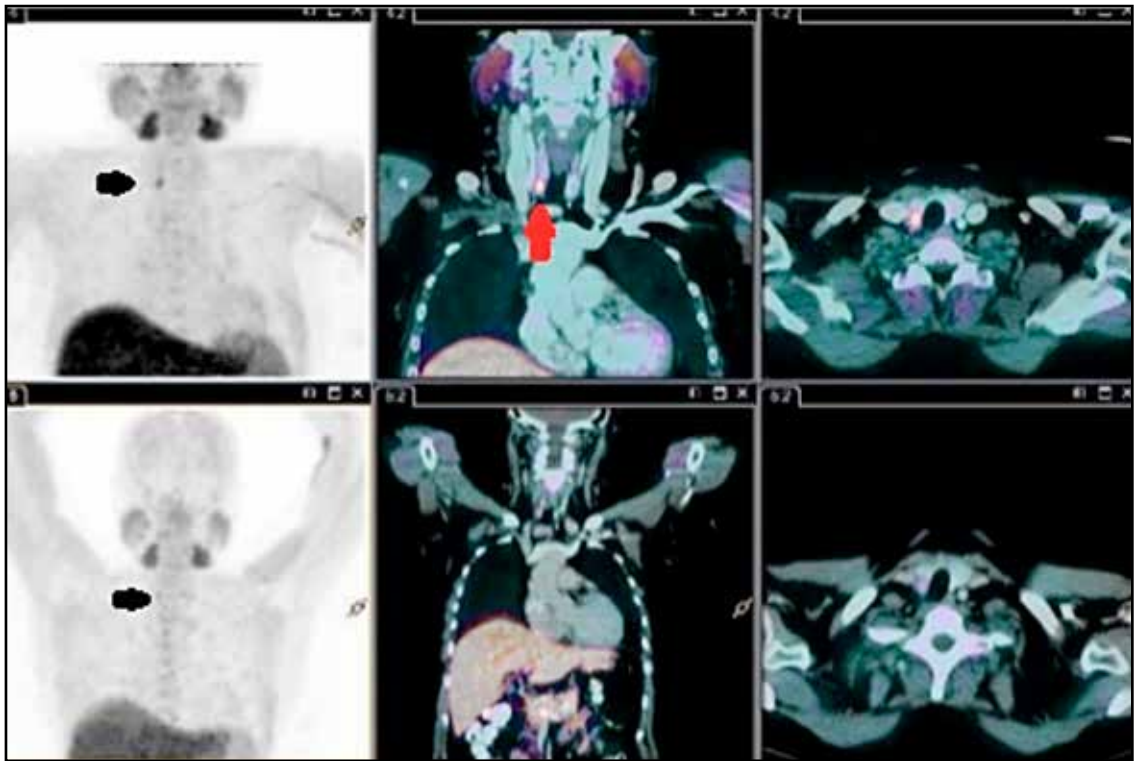
mayor de 1000 pg/ml. No hubo ningún falso positivo. La paciente 2 se encuentra en plan quirúrgico, mientras que a la paciente 6 en el ateneo interdisciplinario se decidió no reintervenirla (imagen mediastinal) e inició tratamiento médico con bifosfonatos. La paciente con 18F-colina PET/TC negativo presentó adenoma mediastinal detectado por RNM y confirmado por histología. En relación con la sensibilidad, tomando en cuenta los hallazgos confirmatorios, observamos a 4 de 5 pacientes positivos con 18F-colina PET/TC (80%) (Figura 1 y 2).



**Figura 1.** Paciente 1. Varón de 65 años. 18F-colina PET/TC que evidencia tejido paratiroideo hiperfuncionante por detrás de la glándula submaxilar derecha (flechas rojas en TC y PET) de 12 mm y SUV máx 5, confirmado en cirugía.

Al analizar los estudios preoperatorios convencionales, el centellograma de paratiroides con SPECT y la RNM fueron positivos en 2 de 5 casos (40%) y la ecografía

cervical solo detectó un caso que luego fue congruente con la 18F-colina PET/TC. Los resultados de los estudios se describen en la Tabla 2.



**Figura 2.** Paciente 3. Mujer de 56 años. Adquisiciones de 18F-colina PET/TC tempranas (arriba) y tardías (abajo) que muestran una lesión por debajo del lóbulo tiroideo derecho (flecha roja) con marcada avidéz por el radiofármaco a los 10 minutos, que disminuye notoriamente a los 60 minutos (flechas negras).

**Tabla 2.** Resultados de los estudios de localización.

Paciente	Ecografía	Centellograma SPECT	RNM	18F-colina PET/TC	Confirmación patológica
1	Negativa	-	-	Submaxilar derecho	Adenoma submaxilar derecho
2	Dudoso	Dudoso	Inferior derecho e izquierdo	Inferior derecho	Plan quirúrgico
3	Inferior derecho	Negativo	Negativo	Inferior derecho	PTH 48 500 pg/ml en lavado de aguja en imagen inferior derecha
4	-	-	-	Mediastinal	Adenoma mediastinal
5	Negativo	Mediastinal	Mediastinal	Negativo	Adenoma mediastinal
6	-	Negativo	Negativo	Mediastinal	-
7	-	Inferior derecho	Inferior derecho	Inferior derecho	Adenoma inferior derecho

## Discusión

Este es uno de los primeros estudios en evaluar el uso del 18F-colina PET/TC en la subpoblación de pacientes con hiperparatiroidismo primario persistente o recurrente. En esta serie hemos observado que este método diagnóstico provee un alto rédito para localización del tejido paratiroideo, ya que permitió detectar 6 de un total de 7 casos. Si consideramos solo aquellos confirmados, 18F-colina PET/TC fue positivo en 4/5 pacientes (80%).

La colina es un análogo fosfolipídico que se integra en las membranas de las células en proliferación y su captación se encuentra incrementada debido a la sobreexpresión de la colina quinasa, como ocurre en los adenomas paratiroides.<sup>10</sup> Su utilidad en el estudio del hiperparatiroidismo fue un hallazgo incidental en el contexto de su aplicación en los pacientes con cáncer de próstata.<sup>11</sup> A partir de entonces se han realizado diversos estudios piloto con resultados prometedores que lo posicionaría como un método de localización de segunda línea en los pacientes con estudios previos negativos o indeterminados. Michaud y col. compararon la ecografía, el centellograma con 99mTc SESTAMIBI y 18F-colina PET/TC en 17 pacientes con hiperparatiroidismo primario o secundario, y encontraron una sensibilidad por lesión de 42, 83 y 96%, respectivamente.<sup>12</sup> Lezaic y col. también informaron que 18F-colina PET/TC presenta una sensibilidad notablemente mayor con respecto al centellograma, principalmente ante hiperplasia o adenomas múltiples.<sup>13</sup> Recientemente, este grupo de trabajo publicó un ensayo donde 18F-colina PET/TC permitió realizar paratiroidectomía mínimamente invasiva sin PTH intraoperatoria en 100/114 pacientes y alcanzó una tasa de curación del 96,8%, similar al abordaje habitual.<sup>14</sup>

La elevada exactitud diagnóstica de este método fue confirmada por Quak y col., quienes demostraron una sensibilidad por lesión y por paciente del 91 y 90,5%, respectivamente, y un valor predictivo positivo del 87,5% por

lesión y de 86,4% por paciente. Incluyeron 25 pacientes con hiperparatiroidismo primario con estudios previos no concluyentes, de los cuales solo dos habían sido operados previamente; uno de ellos era un caso hereditario que alcanzó la cura con la segunda resección guiada por la 18F-colina PET/TC, mientras que el segundo paciente, con estudio negativo, se negó a la cirugía.<sup>15</sup>

El protocolo de adquisición aún es motivo de debate. Rep y col. analizaron el momento óptimo para la realización del *scan* encontrando que el SUV máximo en el tejido paratiroideo se hallaba en los primeros 5 minutos, pero fue a los 60 minutos de la administración del radiofármaco cuando se encontró la mayor relación lesión/fondo. Estos autores concluyeron que el momento ideal de adquisición era a la hora, pero sugieren mantener las imágenes tempranas ante la presencia de lesiones que solo captan en los primeros minutos.<sup>16</sup> Estos datos no fueron corroborados por Thanseer y col., quienes hallaron la máxima captación a los 60 minutos y dejaron de realizar imágenes tempranas.<sup>17</sup>

Respecto del estudio negativo fue nuestro primer paciente estudiado y solo se realizaron imágenes tardías y TC sin contraste endovenoso, protocolo que –como mencionamos– podría afectar el rendimiento del método.<sup>16</sup>

Este es, según nuestro conocimiento, el primer estudio en valorar la utilidad de la 18F-colina PET/TC exclusivamente en los pacientes con hiperparatiroidismo primario persistente o recurrente. De acuerdo con nuestra experiencia, el SUV max fue observado tanto a los 10 minutos como a la hora. En consecuencia, consideramos que el protocolo completo debe incluir ambas adquisiciones para mejorar el rédito diagnóstico del método. Por otra parte, una fortaleza de nuestro protocolo es la inclusión de TC en fase arterial, que permite combinar el comportamiento metabólico con los hallazgos morfológicos y agrega valor en la distinción



entre el tejido paratiroideo y los ganglios linfáticos. Si bien el número de pacientes incluidos es pequeño, creemos que la 18F-colina PET/TC podría considerarse como un estudio de primera línea en este subgrupo de pacientes.

**Conflictos de interés:** los autores declaran no tener conflictos de interés.

Recibido: mayo 2018

Aceptado: junio 2019

## Referencias

1. Khan AA, Hanley DA, Rizzoli R, et al. Primary hyperparathyroidism: review and recommendations on evaluation, diagnosis, and management. A Canadian and international consensus. *Osteoporos Int* 2017; 1:1-19.
2. Guerin C, Paladino NC, Lowery A, Castinetti F, Taieb D, Sebag F. Persistent and recurrent hyperparathyroidism. *Updates Surg* 2017; 2:161-9.
3. Nawrot I, Chudziński W, Ciągła T, Barczyński M, Szmidt J. Reoperations for persistent or recurrent primary hyperparathyroidism: results of a retrospective cohort study at a tertiary referral center. *Medical Science Monit* 2014; 20:1604-12.
4. Hindié E, Zanotti-Fregonara P, Tabarin A, et al. The role of radionuclide imaging in the surgical management of primary hyperparathyroidism. *J Nucl Med* 2015; 56: 737-44.
5. Karakas E, Müller HH, Schlosshauer T, Rothmund M, Bartsch DK. Reoperations for primary hyperparathyroidism-improvement of outcome over two decades. *Langenbecks Arch Surg* 2013; 398: 99-106.
6. Wells SA Jr, DeBenedetti MK, Doherty GM. Recurrent and persistent hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res* 2002; Suppl 2:158-62.
7. Kluijfhout WP, Pasternak JD, Thurston F, et al. Use of PET tracers for parathyroid localization: a systematic review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg* 2016; 401: 925-35.
8. Cetani F, Marcocci C. The use of positron emission tomography with 11C-methionine in patients with primary hiperparathyroidism. *Endocrine* 2013; 43:251-2.
9. Nanni C, Fantini L, Nicolini S, Fanti S. Non FDG PET. *Clin Radiol* 2010; 65:536-48.
10. Thanseer N, Bhadada SK, Sood A, et al. Comparative Effectiveness of Ultrasonography, 99mTc-Sestamibi, and 18F-Fluorocholine PET/CT in Detecting Parathyroid Adenomas in Patients with Primary Hyperparathyroidism. *Clin Nucl Med* 2017; 42(12):e491-e497.
11. Hocevar M, Lezaic L, Rep S, et al. Focused parathyroidectomy without intraoperative parathormone testing is safe after preoperative localization with 18F-Fluorocholine PET/CT. *Eur J Surg Oncol* 2017; 43:133-7.
12. Rep S, Lezaic L, Kocjan T, et al. Optimal scan time for evaluation of parathyroid adenoma with [18F]-fluorocholine PET/TC. *Radiol Oncol* 2015; 4:327-33.
13. Michaud L, Balogova S, Burgess A, et al. A pilot comparison of 18F-fluorocholine PET/CT, ultrasonography and 123I/99mTc-sestaMIBI dual phase dual-isotope scintigraphy in the preoperative localization of hyperfunctioning parathyroid glands in primary or secondary

- hyperparathyroidism. *Medicine* 2015; 94(41): e1701.
14. Lezaic L, Rep S, Sever MJ, Kocjan T, Hocevar M, Fettich J. 18F-Fluorocholine PET/CT for localization of hyperfunctioning parathyroid tissue in primary hyperparathyroidism: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014; 41:2083-9.
  15. Hodolic M, Huchet V, Balogova S, et al. Incidental uptake of 18F-fluorocholine (FCH) in the head or in the neck of patients with prostate cancer. *Radiol Oncol* 2014; 3:228-34.
  16. Quak E, Blanchard D, Houdu B et al. F18-choline PET/CT guided surgery in primary hyperparathyroidism when ultrasound and MIBI SPECT/CT are negative or inconclusive: the APACH1 study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018; 45:658-66.
  17. Wilhelm SM, Wang TS, Ruan DT, et al. The American Association of Endocrine Surgeons Guidelines for definitive Management of Primary Hyperparathyroidism. *JAMA Surgery* 2016; 151(10):959-68.
-





## ACTUALIZACIONES / Review

# ON THE SYNTHESIS OF VITAMIN D IN THE DARKNESS

Rodolfo C. Puche\*

Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Santa Fe, Argentina

### Abstract

Published evidence reports the existence of two routes for the transformation of 7-dehydrocholecalciferol into previtamin  $D_3$ : a photochemical route with the participation of UVB photons and another route that occurs in the darkness. Several reports appear to support the presence of these two routes in some mammals, birds, nonvascular plants (e.g.: mosses), vascular plants (e.g.: angiosperms) and lichens. The reviewed evidence suggests that in the darkness, the synthesis of vitamin  $D_3$  follows the same scheme of the photochemical pathway, but at a reduced rate respect to the synthesis under UVB radiation. The process of vitamin D synthesis in the dark, then, may be taken as an insurance for survival, at least for mammals and birds.

The low rate of the synthesis of vitamin  $D_3$  in the absence of light produce low concentrations of vitamin  $D_3$  metabolites in plasma. Long term survival under these circumstances might be possible through upregulation of vitamin D receptors (VDRs). In mole rats (South African rodents that live in the dark in underground tunnels), the reduced rate of vitamin  $D_3$  synthesis produce low levels of

plasma vitamin  $D_3$  and their metabolites 25(OH)  $D_3$  and  $1\alpha,25(OH)_2D_3$ . The fact that  $K_d$  and  $\beta_{max}$  of the complex  $1\alpha,25(OH)_2D_3$ -VDR from the intestinal mucosa, kidneys and the Harderian glands of the mole rat *Heterocephalus glaber* are significantly different in each one of these tissues, is interpreted as an indicator that the VDRs are, in each tissue, adapted to the maintenance of normal physiological functions.

**Key words:** vitamin D, darkness, receptors, regulation, synthesis in plants.

### Resumen

#### SOBRE LA SÍNTESIS DE VITAMINA D EN LA OSCURIDAD

Varios trabajos publicados han informado que existen dos mecanismos para la transformación de 7-dehidrocoleciferol en previtamina  $D_3$ : uno iniciado con el auxilio de fotones UVB y un segundo que ocurre en la oscuridad, sin el auxilio de radiación ultravioleta. Una serie de publicaciones contienen información que apoya la presencia de estos dos mecanismos en mamíferos, pájaros, plantas no vasculares (musgos), vasculares (angiospermas) y líquenes. La evidencia revisada sugiere que, en la oscuridad, la síntesis de vitamina  $D_3$  sigue

\*Correspondencia: 9 de Julio 1324. (2000) Rosario, Argentina

E-mail: [rodolfopuche@gmail.com](mailto:rodolfopuche@gmail.com)

el mismo esquema que la ruta fotoquímica y generalmente ocurre a una tasa reducida respecto de la síntesis bajo irradiación ultravioleta. La operación de la síntesis de vitamina D<sub>3</sub> en la oscuridad, por lo menos para mamíferos y pájaros, puede tomarse como un reaseguro de sobrevivida.

La reducida tasa de síntesis de vitamina D en ausencia de luz produce bajas concentraciones en plasma de los metabolitos de la vitamina. La sobrevivida saludable en estas condiciones sería posible mediante upregulation de los receptores. En las ratas topo *Heterocephalus glaber* (roedores sudafricanos que viven en

permanente oscuridad, en túneles subterráneos), la reducida tasa de síntesis de vitamina D<sub>3</sub> es la causa de los bajos niveles plasmáticos de la vitamina y sus metabolitos: 25(OH)D<sub>3</sub> y 1α,25OH<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. El hecho de que el K<sub>d</sub> y β<sub>max</sub> del complejo 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Vitamina-D-Receptor del intestino, riñón y glándulas de Harder de *Heterocephalus glaber* sean significativamente diferentes entre sí indicaría que los receptores se han modificado para mantener funciones fisiológicas normales en cada tejido.

**Palabras clave:** vitamina D, oscuridad, regulación, receptores, síntesis en vegetales

## Introduction

During the industrial revolution, started in Europe in the 18th century, an outbreak of Bone Deforming Disease (rickets) appeared in children. The possible relationship between the industrialization of Northern Europe and rickets was reported by Sniadecki in 1822.<sup>1</sup> He observed that children living in rural areas did not suffer from rickets while children born and raised in Warsaw were plagued with the disease, and attributed the high incidence of rickets, in Polish children to their lack of sun exposure. In 1919, Huldschinski<sup>2</sup> reported the observation that children with rickets had a dramatic healing of their disease after several months of exposure to radiation from a mercury arc lamp. Two years later Hess and Unger<sup>3</sup> reported that exposure to sunlight was an effective treatment for rickets. In 1935, 7-dehydrocholesterol was first isolated by Windaus *et al.* and vitamin D<sub>3</sub> was identified two years later by Windaus and Bock.<sup>5</sup> The fact that irradiation of 7-dehydrocholesterol produced vitamin D<sub>3</sub> was finally proven in 1978 by Esvelt *et al.*<sup>6</sup> through isolation and identification of vitamin D<sub>3</sub> by mass spectrometry. Details of the complete history of the cure of rick-

ets by irradiation to the discovery of vitamin D<sub>3</sub> and the effects of its metabolites can be read in a review by De Luca.<sup>7</sup>

For many years, only animal products were considered as sources of vitamin D<sub>3</sub>. Today we know that vitamin D<sub>3</sub> and their metabolites 25(OH)D<sub>3</sub> and 1α,25OH<sub>2</sub>D<sub>3</sub> are synthesized as well by nonvascular plants e.g.: mosses, vascular ones e.g.: angiosperms and lichens (a symbiosis between a fungus and an alga or cyanobacteria).<sup>8</sup> Planktonic microalgae<sup>9</sup> are small microscopic photosynthetic aquatic plants that produce vitamin D and are the source of vitamin D for fish. Microalgae are important for life on earth. They contain the photosynthetic pigments chlorophyll a and c; they produce approximately half of the atmospheric oxygen and simultaneously use carbon dioxide to grow photo-autotrophically.

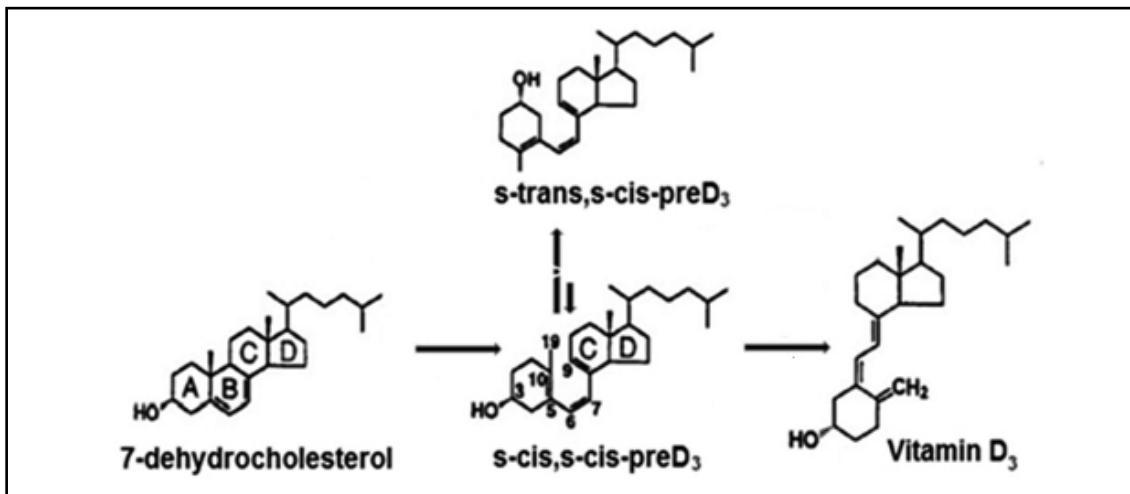
The physiological function of vitamin D<sub>3</sub> in plants is yet poorly known. Plants have calcium channels and pumps similar to those found in animals<sup>10</sup> and calcium ions are a core regulator of plant cell physiology.<sup>11</sup> Calcium is required for stimulation of growth, root initiation and promotion of germination in plants.<sup>12</sup> 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> has been shown to in-



fluence growth and calcium transport in roots of *Phaseolus vulgaris* (common bean)<sup>14</sup> by increasing synthesis of calmodulin.<sup>13</sup> a calcium-binding messenger protein found in all eukaryotic cells. The presence of tissue vitamin D<sub>3</sub> receptors (VDR) has been reported in *Solanum glaucophyllum* (waxyleaf nightshade).<sup>14</sup>

### Synthesis of vitamin D in the skin

In the skin, the synthesis of vitamin D<sub>3</sub> has two steps (Figure 1): It starts with  $\Delta^7$ -dehydrocholesterol which is converted first into pre-vitamin D<sub>3</sub>, which later isomerizes to vitamin D<sub>3</sub>. This two-reaction process was thoroughly investigated by Holick and coworkers.<sup>15</sup>



**Figure 1.** Photolysis of  $\Delta^7$ -dehydrocholesterol into s-cis,s-cis- previtamin D<sub>3</sub> and its thermal isomerization to vitamin D<sub>3</sub>. Adapted from Wacker & Holick.<sup>16</sup>

*First reaction:* UVB photons excite the 7-dehydrocholesterol molecule and transforms it into a secosteroid (a steroid with a “broken” ring): the pre-vitamin D<sub>3</sub>, a molecule that adopt two configurations: s-cis,s-cis- previtamin D<sub>3</sub> and s-trans,s-cis pre vitamin D<sub>3</sub>.

Wacker and Holick<sup>16</sup> postulated that in an organic solvent, such as hexane, previtamin D<sub>3</sub> preferentially exists in the s-trans,s-cis conformation, which is thermodynamically more stable. The less stable conformation: s-cis,s-cis- previtamin D<sub>3</sub> in hexane at 25°C isomerizes into vitamin D<sub>3</sub> with a half-life time of 91 h.

*Second reaction:* in the skin, previtamin D<sub>3</sub> is maintained in the s-cis, s-cis conformation, by interaction with membrane fatty acids. The

s-cis,s-cis- pre vitamin D<sub>3</sub> isomerize rapidly into vitamin D<sub>3</sub>, with a  $T_{1/2} = 8$  h. Much of the information about the previtamin D<sub>3</sub> isomerization to vitamin D<sub>3</sub> was obtained from experiments using organic solvents (e.g., hexane) to assess the conversion<sup>16,17</sup> and assumed to reproduce the same phenomena occurring in human skin. The reaction rate of this isomerization is a direct function of temperature. Earlier studies found that this process was not affected by acids, bases, catalysts, or inhibitors of radical chain processes. Holick et al.<sup>17</sup> concluded that the isomerization was a rearrangement within the molecule of previtamin D<sub>3</sub>. There is no evidence for the existence of an enzymatic process in the skin that can

convert previtamin D<sub>3</sub> to vitamin D<sub>3</sub>. During the synthesis of vitamin D<sub>3</sub>, the hydrophilic and hydrophobic interactions of the s-cis, s-cis-previtamin D<sub>3</sub> with the membrane fatty acids are disrupted, thereby facilitating the ejection of vitamin D<sub>3</sub> from the skin cell membrane into the extracellular space. It enters the circulation by binding to the serum vitamin D<sub>3</sub> binding protein DBP. The removal of vitamin D<sub>3</sub> from the skin as it is being produced changes the isomerization reaction from a reversible to an irreversible process.<sup>15-17</sup> This would explain the relatively rapid rise in the serum vitamin concentration after UVB exposure.

The importance of membrane microenvironments on the isomerization previtamin D<sub>3</sub>  $\rightleftharpoons$  vitamin D<sub>3</sub> received further support from a kinetic study in an aqueous solution of  $\beta$ -cyclodextrin.<sup>18</sup> Cyclodextrins, a group of naturally occurring, truncated cone-shaped oligosaccharides, have a unique ability to complex a variety of foreign molecules into their hydrophobic cavities in aqueous solution including vitamin D<sub>3</sub>. With this model, Tian and Holick<sup>18</sup> demonstrated that, at 5°C, the forward and reversed rate constants for the isomerization of previtamin D<sub>3</sub>  $\rightleftharpoons$  vitamin D<sub>3</sub> were increased by more than 40 and 600 times, respectively, compared with those in n-hexane.

*Transference of vitamin D<sub>3</sub> from the skin to the circulation.* After previtamin D<sub>3</sub> is thermally isomerized to vitamin D<sub>3</sub>, the latter is transported to the dermal capillary bed beneath the dermo-epidermal junction. The mechanism of translocation is largely unknown. In an attempt to understand this event Tian et al.<sup>19</sup> studied the kinetics of vitamin D<sub>3</sub> formation and the time course of appearance of vitamin in the circulation after exposure of chickens to UVB radiation. Their data indicate a fast rate of formation of vitamin D<sub>3</sub> from previtamin D<sub>3</sub> and a relatively fast rate of translocation from skin to circulation. By examining the time course of appearance of vitamin D<sub>3</sub> in circulation, they found a rapid

phase of vitamin D<sub>3</sub> appearance from 8 to about 30 h post-irradiation and a relatively slower phase of its disappearance after the peak of vitamin D<sub>3</sub> in the circulation. No previtamin D<sub>3</sub> could be detected 1 h after UVB irradiation. Thus, only vitamin D<sub>3</sub> is preferentially removed from skin into circulation.

The importance of DBP in the translocation of vitamin D<sub>3</sub> into circulation was defined by Haddad et al.<sup>20</sup> They investigated the transport of skin-synthesized vitamin D<sub>3</sub> into circulation in seven healthy volunteers who received whole-body irradiation by assessing the time course distribution of plasma protein-bound vitamin D<sub>3</sub> in high (>1.3 g/ml) and low density (<1.3 g/ml) fractions after UVB irradiation. They found that plasma vitamin D<sub>3</sub> concentration began to increase 10 h after irradiation, peaked at 24 h, and lasted for a week in the high-density layer where all the DBP was present. These observations indicated that the endogenously photosynthesized vitamin D<sub>3</sub> circulates in serum bound to the DBP. The latter phenomenon differs from the orally administered vitamin D<sub>2</sub><sup>20</sup>, which is evenly distributed between the high- and low-density layers at 4, 8, and 24 h after the ingestion.

### **Evidence on the synthesis of vitamin D<sub>3</sub> in the darkness**

Researchers have evaluated the synthesis of vitamin D in the darkness measuring vitamin D<sub>3</sub> and/or its hydroxylated metabolites as the end point of their experiments.

#### **A. Mammals**

Damara mole rats (*Fukomys damarensis*) live in underground tunnels (Pitcher et al.<sup>21</sup>). The plasma levels of 25(OH)D<sub>3</sub> and 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> of these animals increase when exposed to sunlight or supplemented with vitamin D<sub>3</sub> (Table 1). These experiments demonstrated that Damara mole rats have the capacity to produce vitamin D<sub>3</sub> and its metabolites without the participation of sunlight.



**Table 1.** Plasma levels (mean  $\pm$  SEM) of 25(OH)D<sub>3</sub> and 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in controls, vitamin D<sub>3</sub> supplemented and exposed to sunlight Damara mole rats.

Metabolites	Controls no sunlight exposure n=10	Vit D <sub>3</sub> supplemented, n=5 2.5 ng/g of food eaten	Sunlight exposure n=5 15 min/day/3 weeks
25(OH)D <sub>3</sub> , ng/ml	< 5	30 $\pm$ 3	< 5
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> , pg/ml	12 $\pm$ 2	35 $\pm$ 2	25 $\pm$ 3

**Table 2.** Saturation analysis of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> binding to VDRs from the intestinal mucosa, kidney, Harderian glands and skin of naked mole rats. (Sergeev et al., 1993<sup>22</sup>)

	Tissue	$\beta_{max}$ (fmoles/mg protein)	K <sub>d</sub> (pM)
Control mole rats	Intestine mucosa	380 $\pm$ 51.7	748 $\pm$ 148
	Kidney	79.9 $\pm$ 9.4 <sup>b</sup>	183 $\pm$ 20.2 <sup>b</sup>
	Harderian glands	28.1 $\pm$ 4.2 <sup>b,c</sup>	97.0 $\pm$ 12.2 <sup>b,c</sup>
	Skin	<1.5	ND
Mole rats supplemented with a high dose of vitamin D <sub>3</sub> 10 days before assay	Intestine mucosa	599 $\pm$ 90.7 <sup>a</sup>	813 $\pm$ 93.9
	Kidney	158 $\pm$ 27.6 <sup>a,b</sup>	206 $\pm$ 9.0 <sup>b</sup>
	Harderian glands	32.3 $\pm$ 5.0 <sup>b,c</sup>	81.7 $\pm$ 7.6 <sup>b,c</sup>
	Skin	<1.5	ND

ND: not determined. Results are means  $\pm$  SEM. P<0.05: <sup>a</sup>: from the control group, <sup>b</sup>: from the intestinal mucosa in the same group, <sup>c</sup>: from the kidney in the same group.

Table 2 has been transcribed from the paper of Sergeev et al.<sup>22</sup> to point out that low plasma levels of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> may be compensated by upregulation of the VDRs. Table 2 displays K<sub>d</sub> values (inversely related to of the drug affinity for the binding site) and the maximum number of binding sites per mg of receptor protein ( $\beta_{max}$ ), of naked mole rats (*Heterocephalus glaber*). These investigators succeeded in upregulating VDR, administering a high dose of vitamin D<sub>3</sub>. This acute treatment increased the  $\beta_{max}$  from the intestinal mucosa and kidney tissue, did not affect the K<sub>d</sub> values of VDRs of the intestinal mucosa, kidney and Harderian

glands and increased the 24-hydroxylase activity in the kidneys (vitamin D<sub>3</sub> treated mole rats: 64.0 $\pm$ 09.9 pmol/h/g tissue; vitamin D<sub>3</sub> deficient animals: 16.3 $\pm$ 1.37 pmol/h/g tissue; P<0.05).

The fur of fur-bearing animals had been thought to be comparable to clothing in humans, which prevents vitamin D<sub>3</sub> synthesis in the skin during exposure to sunlight. The work of Hymøller and Jensen,<sup>23</sup> demonstrated otherwise. Sixteen Danish Holstein dairy cows were deprived of vitamin D<sub>3</sub> for 6 months by omitting the vitamin D<sub>3</sub> in their feed and housing them without access to sunlight. They were subjected to 4 degrees of coverage of their



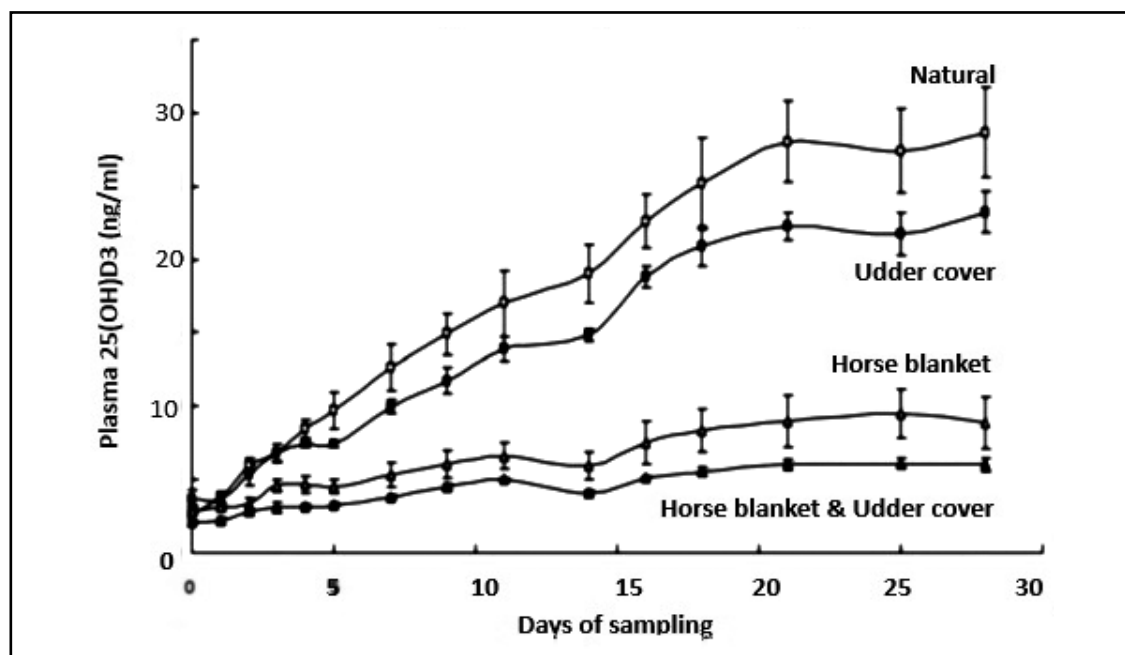
bodies with a fabric that prevented vitamin D<sub>3</sub> synthesis in the covered skin areas. The experimental groups were: a) cows without any coverage (100% exposed body surface area), b) cows fitted with udder covers (94% exposed body surface area), c) cows fitted with horse blankets (28% exposed body surface area) and d) cows fitted with both horse blankets and udder covers (24% exposed body surface area). The cows were let out to pasture daily between 10.00 and 15.00 h for 4 weeks. Blood samples were collected during the study and analyzed for their 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> content.

The results (Figure 2) showed that uncovered cows had a higher 25(OH)D<sub>3</sub> concentration in plasma after 28 days of access to sunlight compared with covered cows and that the estimated peak plasma concentration of 25(OH)D<sub>3</sub> at the end of the experiment was inversely correlated to the body surface area covered ( $R^2 = 0.99556$ ,  $P < 0.0022$ ). It was concluded that cows, like humans, synthesize vitamin D<sub>3</sub> evenly over their body surface.

## B. Birds

The feathers of feather-bearing birds has been thought to be comparable to clothing in humans, which prevents vitamin D<sub>3</sub> synthesis in the skin during exposure to sunlight. Two hypotheses predominate among those proposed for the origin of feathers: they evolved for flight or for thermal insulation (McGowan, 1989<sup>24</sup>).

Kale et al.<sup>25</sup> (Tables 3 and 4) has reported the vitamin D status of a flightless nocturnal bird, the brown kiwi (*Apteryx mantelli*). Kiwis caught in the wild had significantly low plasma levels of 25(OH)D<sub>3</sub> (3.0nmol/L, n=4). These birds feed mainly on earthworms (Reid et al.<sup>26</sup>) that contain undetectable concentrations of Vitamin D<sub>3</sub> (Finke<sup>27</sup>), with small amounts of plant matter (Reid et al.<sup>26</sup>). No significant differences were observed in plasma 25(OH)D<sub>3</sub> concentrations between those kept captive in outdoor enclosures receiving natural sunlight (19.8±10.9, n=6) and those kept in nocturnal houses receiving no supplemental UV-B light (19.7±9.5, n=6). Captive birds are fed on a mixture of in-



**Figure 2.** Plasma concentration of 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> of dairy cows, after 6 months of vitamin D<sub>3</sub> deprivation and exposed to sunlight without (natural) and three degrees of body surface covering (see text for further details). Redrawn from Hymøller and Jensen.<sup>23</sup>



**Table 3.** Plasma 25(OH)D<sub>3</sub>, ng/ml (mean ± SEM) of kiwi, tuatara and New Zealand sea lions (Kale et al. 2018).<sup>25</sup>

Species	Plasma 25(OH)D <sub>3</sub>
Kiwi, wild ( <i>Apteryx mantelli</i> )	3.0
Tuatara, captive ( <i>Sphenodon punctatus</i> )	104.2±12.8
New Zealand sea lions ( <i>Phocarctos hookeri</i> )	104.4±10.0

**Table 4.** Concentration of vitamin D<sub>3</sub> (µg of vit D<sub>3</sub>/g of fresh skin tissue) after excision of tissue samples from individuals of three species. Kale et al. 2018.<sup>25</sup>

Species	n	not irradiated	after 8 hours UVB*
Kiwi	4	<0.03	0.038
Tuatara	4	<0.03	0.084
Sea Lion	2	0.50	1.60

\*5 J/cm<sup>2</sup>

sects, vegetables, fruit, minced ox heart, and nutritional supplements, including a premix that contains vitamin D (Minson<sup>28</sup>), which explains their plasma levels of 25(OH)D<sub>3</sub>.

Kale et al.<sup>25</sup> also performed *in vitro* experiments with the skins of kiwis to gain information on this site of synthesis of vitamin D<sub>3</sub>. Skin samples were prepared in a dark room. Any fat or feathers present were removed. For each bird, two pieces of skin, two 10 cm<sup>2</sup> pieces of skin were dissected. One piece was exposed to UVB radiation for 8 h, equivalent to 5 J/cm<sup>2</sup> of accumulated UV light, in a reflector box at 37 °C. The skin was moistened with phosphate-buffered saline at 1 h intervals. The control skin sample was kept wrapped in aluminum foil at 4 °C. Each sample was then cut into 5 × 5 mm pieces in a dark room, placed in a light proof bag, weighed and freeze-dried. Freeze-dried samples was extracted and analyzed for Vitamin D<sub>3</sub> contents. Analysis of extracts were done by reverse phase high performance liquid chromatography. Non-irradiated kiwi skins

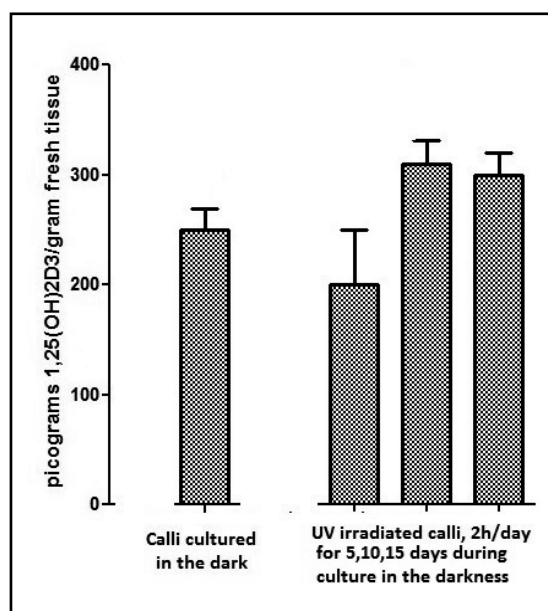
had Vitamin D<sub>3</sub> levels below the detection limit of the assay: <0.03 µg of vit D<sub>3</sub>/g of fresh skin tissue. There was, however, a measurable increase in response to UV exposure, indicating the existence of the dermal synthesis pathway: 0.038 µg of vit D<sub>3</sub>/g of fresh skin tissue.

Kiwi skins produced small but measurable amounts of Vitamin D<sub>3</sub> after UV irradiation. Analysis of the characteristics of their VDRs might confirm an adaptation to physiological low levels of vitamin D<sub>3</sub> similar to that of mole rats.

### C. Plants

*S. glaucophyllum* is a plant native of South America. The ingestion of its leaves causes calcinosis in cattle (Worker and Carrillo 29). Early studies correlated this property to the existence in the plant of vitamin D<sub>3</sub>, 15(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Wasserman et al.,<sup>30</sup> Espareza et al.<sup>31</sup>). Curino et al.<sup>32</sup> carried out experiments with *S. glaucophyllum* tissue (callus). The term “callus” refers to an undifferentiated

plant cell mass grown on a culture medium, to produce genetically identical cells. For calli cultures, leaf explants from plants collected in the field, thoroughly disinfected, were inoculated in agar-solidified Murashige-Skoog medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin and grown at 25°C under complete darkness. Calli began to develop after 15 days of culture. After two months of subculture all the surface of culture flasks was covered with tissue. Calli grown for at least 4 months in the dark were placed in liquid nitrogen and submitted to lipids extraction. Figure 3 displays the results of Curino et al.<sup>32</sup>, the  $1\alpha,25(\text{HO})_2\text{D}_3$  contents of *S. glaucophyllum* calli grown in the darkness vs. calli grown in the darkness + timed UV irradiation. The most interesting result of these experiments is the significant amount of  $1\alpha,25(\text{HO})_2\text{D}_3$  in calli grown in the darkness and not the relatively small increase of the metabolite under UV irradiation.



**Figure 3.** Tissue content of  $1\alpha,25(\text{HO})_2\text{D}_3$  of *S. glaucophyllum* cells cultured in the darkness and in the darkness+UV irradiation. Redrawn from Curino et al.<sup>32</sup>

Björn and Wang<sup>33</sup> confirmed a UVB dependent synthesis of vitamins D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> in the leaves of the tomato plant. Plants were grown in a greenhouse with or without UVB radiation 0.85 kJ plant weighted UVB radiation/m<sup>2</sup>.per day (Table 5).

**Table 5.** Contents of provitamins and vitamins D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> µg/g of dry matter in tomato plants *Solanum lycopersicum* (Björn and Wang, 2001).<sup>33</sup>

	Not irradiated	Irradiated
Provitamin D <sub>2</sub>	1.83	2.23
Vitamin D <sub>2</sub>	0	0.087
Provitamin D <sub>3</sub>	0.61	0.76
Vitamina D <sub>3</sub>	0	0.28

An interesting observation is that the provitamin D<sub>3</sub> content of tomato leaves is not reduced by growing plants under UV-B radiation, although a substantial amount of vitamin D<sub>3</sub> is formed. Björn and Wang<sup>33</sup> assume the existence of a feedback mechanism regulating the amount of the provitamins.

The evidence reported by Jäpelt et al.<sup>34,35</sup> (Table 6) agrees with the above mentioned results. Note that the absence of irradiation does not cancel the synthesis of vitamin D<sub>3</sub> and its metabolites and that UVB irradiation increases the content of vitamin D<sub>3</sub> and its metabolites.

As shown by Wang et al.<sup>36</sup> provitamin D<sub>2</sub>, vitamin D<sub>2</sub> and vitamin D<sub>3</sub> have been identified in the thallus of the lichen species *Cladina arbuscula*.

Inspection of Figure 4 and Table 7, indicate that the contents of vitamins D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> in *Cladina arbuscula* decrease as a function of the latitude. There is a significant positive correlation between the vitamins D contents

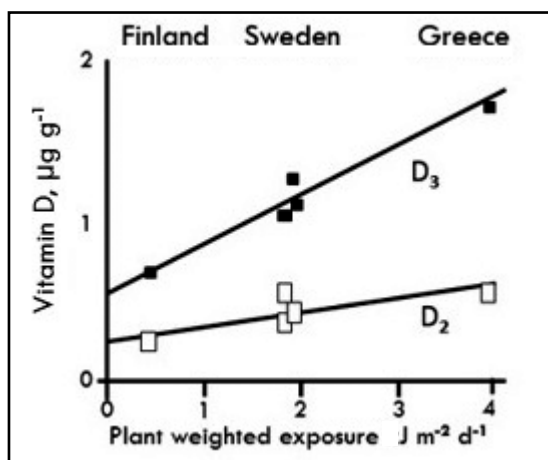


**Table 6.** Contents of 7-dehydrocholesterol, vitamin D<sub>3</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (ng/g of dry matter) of plants cultured with a 16/8 light/dark cycle, with or without additional irradiation with an UVB source (30 min per day for 7 days). Data from Jäpelt et al.<sup>34, 35</sup>

Species	7-Dehydrocholesterol	Vitamin D <sub>3</sub>	25(OH)D <sub>3</sub>	1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>
<b>Controls</b>				
<i>Solanum lycopersicum</i>	470	1.7	<0.02	<0.1
<i>Solanum glaucophyllum</i>	670	3.2	0.8	<0.1
<i>Capsicum annuum</i>	30	<0.02	<0.02	<0.1
<b>UVB-irradiated</b>				
<i>Solanum lycopersicum</i>	230	100	4.3	<0.1
<i>Solanum glaucophyllum</i>	1260	200	31	32
<i>Capsicum annuum</i>	30	2.9	0.5	<0.1

**Table 7.** Ranges of provitamin D<sub>2</sub>, vitamin D<sub>2</sub> and vitamin D<sub>3</sub> contents (µg/g of dry weight of *Cladina arbuscula*) measured by high performance liquid chromatography, electrospray ionization mass spectrometry and UV spectrophotometry Wang et. al. 2001.<sup>36)</sup>

Place	Approx. latitude	provitamin D <sub>2</sub>	Vitamin D <sub>2</sub>	Vitamin D <sub>3</sub>
Finland	67°N	91 - 99	0.23 - 0.49	0.67 - 2.04
Sweden	56°N	106 - 120	0.43 - 0.54	1.04 - 1.24
Greece	40°N	149	0.57	1.73 - 1.84



**Figure 4.** Left: linear relationship between the vitamins D<sub>2</sub> and vitamin D<sub>3</sub> contents of *C. arbuscula* as a function of the weighted UV exposure. Latitude of sampling places: Finland: 66-67°N, Sweden: 56°N and Greece: 40°N. Redrawn from Wang et al.<sup>36)</sup>

and the estimated radiant energy received by lichens collected at three different latitudes. Björn et al.<sup>33</sup> believe that the lichen might function as receptors of UV radiation. In agreement with the observations of Jäpelt et al.,<sup>34,35</sup> the contents of vitamins increase with the amount of radiant energy. Inspection of the Figure 4 indicate that vitamins content of *Cladina* are not zero at zero irradiation, which is interpreted to support the hypothesis that the synthesis of vitamin D<sub>3</sub> may proceed both with and without UV irradiation.

The coexistence of the two vitamins D in *Cladina* (the contents of vitamin D<sub>3</sub> is greater than that of D<sub>2</sub>) may be explained by the fact that lichens are composite organisms that arise from algae or cyanobacteria living with fungi in a symbiotic relationship.

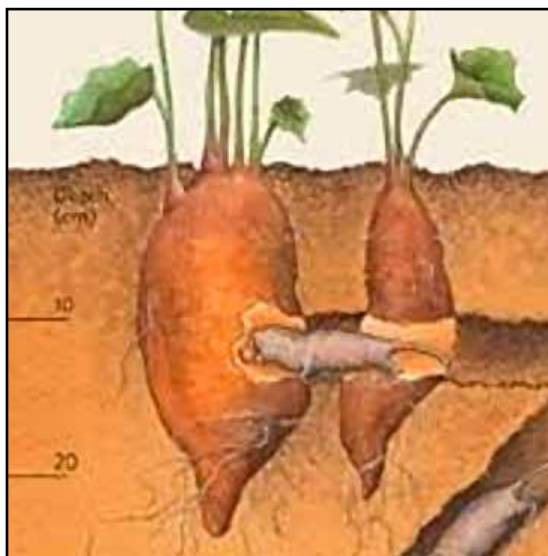
### Comments on the survival of terrestrial species that live in the dark

The reviewed evidence on the synthesis of vitamin D<sub>3</sub> in the darkness, allows the following conclusions:

a) It uses the same components of the photochemical pathway (Figure 1).

b) It has a reduced rate respect to the synthesis under UVB irradiation.

The identification of the mechanism/s by which certain species, though lacking access to sunlight, produce enough vitamin D<sub>3</sub> to meet their physiological functions is an as yet unsolved matter. Assessed by actual human standards, mole rats and fruit bats<sup>37,38</sup> are vitamin D deficient. The natural habitats of both species exclude sunlight and their diet is herbivorous with no obvious source of vitamin D<sub>3</sub>.



**Figure 5.** Scheme of the hábitat of mole rats (upper-left corner of a figure in the paper by Park and Buffenstein<sup>39</sup>).

Figure 5 suggests that mole rats feed on the roots of plants. This reviewer could not find a survey of the plants with subterranean enlarged organs (enlarged to store energy in the form of carbohydrates) in the

areas of mole rats colonies. The amount of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> that can be obtained from this source is probably negligible but it is as yet unknown.

With the commercial availability of [<sup>3</sup>H]1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> as a radioligand of high specific activity, the presence of a specific binding site for 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in low numbers (~ 100 fmol/mg protein) have been reported in *Solanum glaucophyllum* leaves, berries, stems and roots (Weissenberg et al).<sup>40</sup> The protein binding of [<sup>3</sup>H]-vitamin D<sub>3</sub> has been demonstrated in *Phaseolus vulgaris* (French beans) roots.<sup>41</sup>

The low rate of the synthesis of vitamin D<sub>3</sub> in the absence of light produce low concentrations of vitamin D<sub>3</sub> metabolites in plasma. Long term survival under these circumstances might be possible through upregulation of VDRs. The fact that the Kd of the complex 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-VDR from the intestinal mucosa, kidneys and the Harderian glands of *Heterocephalus glaber* (south African mole rats that live in the dark in networks of underground tunnels) are significantly different for each one these tissues (Table 2),<sup>22</sup> is interpreted to indicate that the VDRs are, in each tissue, adapted to the maintenance of normal physiological functions.

Described in organic chemistry terms, the photochemical production of vitamin D<sub>3</sub> (Figure 1) is a conrotatory<sup>A</sup> electrocyclic<sup>B</sup> opening of the B-ring of 7-dehydrocholesterol to provide the triene<sup>C</sup> previtamin D<sub>3</sub>, which then undergoes a thermally-induced sigmatropic<sup>D</sup> rearrangement to yield vitamin D<sub>3</sub>.<sup>42</sup> It is of interest that *sigmatropic reactions usually do not require a catalyst*. A steric interaction between the C ring and the carbon 19 methyl group of s-cis, s-cis-previtamin D<sub>3</sub>, could produce a conformer of previtamin D<sub>3</sub> energetically unfavorable and therefore less stable. As a result, a rotation around the carbon 5 and carbon 6 single bond occurs and an energetically more stable s-trans, s-cis-previtamin D<sub>3</sub> is formed (Figure 1). The unstable s-cis, s-cis-previtamin D<sub>3</sub> configuration can undergo an intramolecular hydrogen rearrangement to form vitamin D<sub>3</sub>.

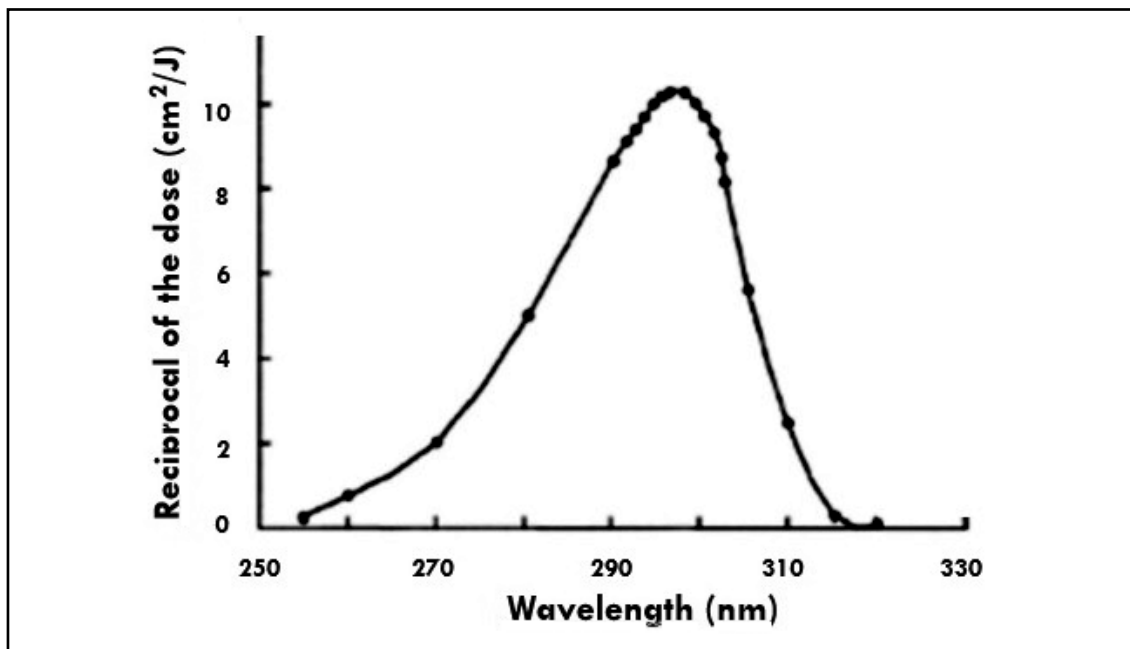




Which is/are the element/s that, in the darkness, would replace the energy of UVB photons for the opening of ring B? Hypothetically, they might be replaced by a) some as yet undetermined fraction of the electromagnetic component of cosmic rays or b) by the existence of a specific binding protein for 7-dehydrocholesterol. Experimental proof is needed to support these hypotheses.

Cosmic rays have three kinds of components: muons and hadrons (particles that have rest masses) and photons of the electromagnetic spectrum: radio waves, microwaves, infrared, visible light, ultraviolet, X-rays, and gamma rays. The ultraviolet radiation has

a wavelength range 10 to 400 nm.<sup>43,44</sup> It appears possible that penetrating UV radiation, attenuated by the interaction with leather or feathers reach the cells containing 7-dehydrocholesterol and may contribute to the synthesis of vitamin D<sub>3</sub>. Inspection of the action spectrum for the conversion of 7-dehydrocholesterol to previtamin D<sub>3</sub> (Figure 6), reveals that the optimum wavelengths for the production of previtamin D<sub>3</sub> lie between 295 and 300 nm with a maximum at 297 nm. It also indicate that wavelengths below 295 nm (though with lower efficiency) can break the C9-C10 bond of 7-dehydrocholesterol and produce previtamin D<sub>3</sub> (Figure 6).<sup>45</sup>



**Figure 6.** Action spectrum for the conversion of 7-dehydrocholesterol to vitamin D<sub>3</sub> in the human skin. Redrawn from MacLaughlin et al.<sup>45</sup>

**Other possible but as yet not experimentally demonstrated mechanisms for the synthesis of vitamin D<sub>3</sub> in the darkness**

Norman and Norman,<sup>46</sup> centering their attention on the opening of the B-ring of 7-dehydrocholesterol have stated: “A major

unresolved problem concerns identification of the biological mechanisms by which certain animals possessing an endoskeleton but lacking access to sunlight, produce sufficient amounts of vitamin D<sub>3</sub> to meet their physiological needs. This includes many

sea fish, which live in the ocean below the level of sunlight penetration (10-20 m) and ...have massive quantities... of vitamin D<sub>3</sub> in their livers". They report that the chorismate mutase (an enzyme present in microorganisms) acting on chorismic acid produced a retro-ene-rearrangement similar to that transforming 7-dehydrocholesterol into provitamin D<sub>3</sub>. In simple words, an enzyme may replace the lack of light.

They also stated: "Steroid biosynthesis have been shown to proceed from squalene via a selective epoxidation and acid catalyzed olefinic cyclization. It therefore seem reasonable to suggests that such pathways have also evolved in animals lacking access to light, to catalyze the conversion of 7-dehydrocholesterol to vitamin D<sub>3</sub>". They describe three mechanisms based on the existence enzymes demonstrated in the synthesis of steroids in vertebrates. They conclude that "It should be appreciated that the four mechanisms offered here are suggestions based upon an understanding of organic chemistry; there is no evidence to support their existence".<sup>46</sup>

### Footnotes

A Conrotatory: An electrocyclic reaction can either be classified as conrotatory or disrotatory based on the rotation at each end of the molecule. In conrotatory mode, both

atomic orbitals of the end groups turn in the same direction such as both atomic orbitals rotating clockwise or counter-clockwise.

B Pericyclic: a reaction in which bonds are made or broken in a concerted cyclic transition state. A concerted reaction is one which involves no intermediates during the course of the reaction

C triene: an unsaturated hydrocarbon containing three double bonds between carbon atoms

D sigmatropic: the name *sigmatropic* is the result of a compounding of the sigma designation from single carbon-carbon bonds and the Greek word *tropos*, meaning turn. A sigmatropic reaction in organic chemistry is a pericyclic reaction wherein the net result is one  $\sigma$ -bond is changed to another  $\sigma$ -bond in an uncatalyzed the reaction intra-molecular process. In this type of rearrangement reaction, a substituent moves from one part of a  $\pi$ -bonded system [alternating single and double bonds] to another part in an intra-molecular reaction with simultaneous rearrangement of the  $\pi$  system.

**Conflicto de intereses:** el autor declara no tener conflicto de intereses.

Recibido: octubre 2018

Aceptado: enero 2019

---

### References

1. Mozolowski W, Jedrzej Sniadecki (1768-1838) on the cure of rickets. *Nature* 1939; 143:121.
2. Huldschinsky K. in *The Ultra-Violet Light Treatment of Rickets*. 1928; Alpine Press, Newark, NJ, USA. Quoted in Holick MF, Chen TC, Lu Z, Sauter E. Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res* 2007; 22 (Suppl 2):V28-33.
3. Hess AF, Unger LJ. The cure of infantile rickets by sunlight. *JAMA*. 1921; 77:39-41.
4. Windaus A, Lettre H, Schenck F. 7-dehydrocholesterol. *Ann Chem* 1935; 520:98107.
5. Windaus A, Bock F. Über das Provitamin aus dem Sterin der Schweineschwarte. *Z Physiol Chem* 1937; 245:168-70.
6. Esvelt RP, Schnoes HK, DeLuca HF. Vitamin



- D<sub>3</sub> from rat skins irradiated *in vitro* with ultraviolet light. *Arch Biochem Biophys* 1978; 188:282-6.
7. De Luca HF. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *BoneKey Rep* 2014; 3:479.
  8. Jäpelt RB, Jakobsen J. Vitamin D in plants: a Review of occurrence, analysis, and biosynthesis. *Front Plant Sci* 2013, 4:1-20.
  9. Kirsten H, Huerlimann R. Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. In: Handbook of Marine Microalgae. Academic Press, 2015. Pages 25-41.
  10. Dodd AN, Kudla J, Sanders D. The language of calcium signaling. *Ann Rev Plant Biol* 2010; 61:593-620.
  11. Bikle, D. Vitamin D: An ancient hormone. *Exp Dermatol* 2010; 20:7-13.
  12. Pythoud F, Buchala AJ. (1989): Investigations on the mechanism of adventitious rooting promotion by vitamin D and indolbutyric acid in *Populus tremula* L. *Plant Cell and Environment* 1989; 12:489-94.
  13. Boland RL. Plants as a source of vitamin D<sub>3</sub> metabolites. *Nutr Rev* 1986; 44:18.
  14. Milanese L, Boland, R. Presence of vitamin D<sub>3</sub> receptor (VDR)-like proteins in *Solanum glaucophyllum*. *Physiol Plant* 2006; 128:341-50.
  15. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT Jr, Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P. Photosynthesis of vitamin D<sub>3</sub> in human skin and its physiologic consequences. *Science* 1980; 210:203-5.
  16. Wacker M, Holick MF. Sunlight and Vitamin D. A global perspective for health. *Dermatoendocrinol* 2013; 5:51-108.
  17. Esvelt RP, Schnoes HK, DeLuca HF. Vitamin D<sub>3</sub> from rat skins irradiated *in vitro* with ultraviolet light. *Arch Biochem Biophys* 1978; 188:282-6.
  18. Tian X, Holick MF. Catalyzed thermal isomerization between previtamin D<sub>3</sub> via  $\beta$ -cyclodextrin complexation. *J Biol Chem* 1995; 270:8706-11.
  19. Tian XQ, Chen TC, Lu Z, Shao Q, Holick MF. Characterization of the translocation process of vitamin D<sub>3</sub> from the skin into the circulation. *Endocrinology* 1994; 135:655-61.
  20. Haddad JG, Matsuoko LY, Hu YZ, Worstman J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest* 1993; 91:2552-5.
  21. Pitcher T, Sergeev IN, Buffenstein R. Vitamin D metabolism in the Damara mole-rat is altered by exposure to sunlight yet mineral metabolism is unaffected. *J Endocrinol* 1994; 143:367-74.
  22. Sergeev IN, Buffenstein R, Pettifor JM. Vitamin D receptors in a naturally vitamin D-deficient subterranean mammal: the naked mole rat (*Heterocephalus glabe*): biochemical characterization. *Gen Comp Endocrinol* 1993; 90:338-45.
  23. Hymøller L, Jensen SK. Vitamin D<sub>3</sub> synthesis in the entire skin surface of dairy cows despite hair coverage. *J Dairy Sci* 2010; 93:2025-9.
  24. McGowan C. Feather structure in flightless birds and its bearing on the question of the origin of feathers. *J. Zool* 1989; 218: 537-47.
  25. Kale MS, Dittmer KE, Roe WD, Gartrel BD. Interspecies differences in plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and dermal vitamin synthesis of kiwi (*Apteryx mantelli*), tuatara (*Sphenodon punctatus*) and New Zealand sea lions (*Phocarctos hookeri*). *Comp Physiol B* 2018; 188:325-31.
  26. Reid B, Ordish R, Harrison M. An analysis of the gizzard contents of 50 North Island brown kiwi, *Apteryx australis mantelli*, and notes on feeding observations. *NZ J Ecol* 1982; 5:76-85.
  27. Finke MD. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol* 2002; 21:269-85.
  28. Minson CJ. Diet related factors in the conservation of kiwi (*Apteryx mantelli*). Dissertation. Massey University, Palmerston North, quoted by Kale et al.<sup>25</sup>
  29. Worker NA, Carrillo BJ. 'Enteque seco', calcification and wasting in grazing animals in Argentina. *Nature* 1967; 215:72-4.
  30. Wasserman RH, Henion MR, Haussler MR, McCain TA. Evidence that a calcinogenic factor in *Solanum malacoxylon* is 1,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> glycoside. *Science* 1976; 194:853-5.
  31. Esparza M, Vega M, Boland R. Synthesis and composition of vitamin D<sub>3</sub> metabolites in *Sola-*

- num malacoxylon*. *Biochim Biophys Acta* 1982; 719:633-40.
32. Curino A, Skliar M, Boland R. Identification of 7-dehydrocholesterol, vitamin D<sub>3</sub>, 25(OH)vitamin D<sub>3</sub> and 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>2</sub> in *Solanum glaucophyllum* cultures growth in absence of light. *Biochim Biophys Acta*; 1998; 1425:485-92.
  33. Björn LO, Wang T. Is provitamin D a UV-B receptor in plants? *Plant Ecol* 2001; 154: 1-8.
  34. Jäpelt RB, Silvestro D, Smedsgaard J, Jensen PE, Jakobsen J. LC-MS/MS with atmospheric pressure chemical ionization to study the effect of UV treatment on the formation of vitamin D<sub>3</sub> and sterols in plants. *Food Chem* 2011; 129:217-25.
  35. Jäpelt RB, Silvestro D, Smedsgaard J, Jensen PE, Jakobsen J. Quantification of vitamin D<sub>3</sub> and its hydroxylated metabolites in waxy leaf night shade (*Solanum glaucophyllum* Desf.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chem* 2013; 138:1206-11.
  36. Wang T, Bengtsson G., Kärnefelt I, Björn LO. Provitamins and vitamins D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> in *Cladina* spp. over a latitudinal gradient: possible correlation with UV levels. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2001; 62:118-22.
  37. Pitcher T, Sergeev IN, Buffenstein R. Vitamin D metabolism in the Damara mole-rat is altered by exposure to sunlight yet mineral metabolism is unaffected. *J Endocrinol* 1994; 143:367-74.
  38. Puche RC Normal physiological functions in two animal species with highly different vitamin D status compared to that of humans. *Actual Osteol* 2018; 14(3):191-205.
  39. Park TJ, Buffenstein R. Digging the Underground Life. *TheScientist* 2012, June 1.
  40. Weissenberg, M, Levy, A, Wasserman, RH . Distribution of calcitriol activity in *Solanum glaucophyllum* plants and cell cultures. *Phytochemistry* 1989; 28:795-8.
  41. Vega MA, Boland RL. Presence of sterol-binding sites in the cytosol of French-bean (*Phaseolus vulgaris*) roots *Biochem J* 1988; 250: 565-9.
  42. Woodward RB, Hoffmann R. Stereochemistry of Electrocyclic Reactions. *J Am Chem Soc* 1965; 87: 395-404.
  43. Real A, Sundell-Bergman S, Knowles JF, Woodhead DS, Zinger I. Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals: relevant data for environmental radiation protection. *J Radiol Prot* 2004; 24:A123-37.
  44. Desouky O, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J Radiat Res Appl Sci* 2015; 8:247-54.
  45. MacLaughlin JA, Anderson RR, Holick MF. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub> and its photoisomers in human skin. *Science* 1982; 216:1001-3.
  46. Norman TC, Norman AW. Consideration of chemical mechanisms for the non-photochemical production of vitamin D<sub>3</sub> in biological systems. *Bioorganic Med Chem Lett* 1993; 3:1785-8.



## ACTUALIZACIONES / Review

# Inmunopatología de la brucelosis osteoarticular

María Victoria Delpino\*

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM). CONICET. Hospital de Clínicas. Universidad de Buenos Aires. Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Argentina.

### Resumen

La brucelosis es una de las enfermedades zoonóticas más importantes a nivel mundial capaz de producir enfermedad crónica en los seres humanos. La localización osteoarticular es la presentación más común de la enfermedad activa en el hombre. Sin embargo, algunos de los mecanismos moleculares implicados en la enfermedad osteoarticular han comenzado a dilucidarse recientemente. *Brucella abortus* induce daño óseo a través de diversos mecanismos en los cuales están implicados TNF- $\alpha$  y RANKL. En estos procesos participan células inflamatorias que incluyen monocitos/macrófagos, neutrófilos, linfocitos T del tipo Th17 y linfocitos B. Además, *B. abortus* puede afectar directamente las células osteoarticulares. La bacteria inhibe la deposición de la matriz ósea por los osteoblastos y modifica el fenotipo de estas células para producir metaloproteinasas de matriz (MMPs) y la secreción de citoquinas que contribuyen a la degradación del hueso. Por otro lado, la infección por *B. abortus* induce un aumento en la osteoclastogénesis, lo que au-

menta la resorción de la matriz ósea orgánica y mineral y contribuye al daño óseo. Dado que la patología inducida por *Brucella* afecta el tejido articular, se estudió el efecto de la infección sobre los sinoviocitos. Estos estudios revelaron que, además de inducir la activación de estas células para secretar quemoquinas, citoquinas proinflamatorias y MMPs, la infección inhibe la muerte por apoptosis de los sinoviocitos. *Brucella* es una bacteria intracelular que se replica en el retículo endoplásmico de los macrófagos. El análisis de los sinoviocitos infectados con *B. abortus* indicó que las bacterias también se multiplican en el retículo endoplásmico, lo que sugiere que la bacteria podría usar este tipo celular para la multiplicación intracelular durante la localización osteoarticular de la enfermedad. Los hallazgos presentados en esta revisión intentan responder a preguntas sobre los mediadores inflamatorios implicados en el daño osteoarticular causado por *Brucella*.

**Palabras clave:** *Brucella*, sinoviocito, osteoblasto, osteoclasto, células T y B, neutrófilo, macrófago.

\*E-mail: [mdelpino@ffyb.uba.ar](mailto:mdelpino@ffyb.uba.ar)



## Abstract

### IMMUNOPATHOLOGY OF OSTEOARTICULAR BRUCELOSIS

*Brucellosis is one of the most important zoonotic diseases that can produce chronic disease in humans worldwide. Osteoarticular involvement is the most common presentation of human active disease. The molecular mechanisms implicated in bone damage have started to be elucidated. B. abortus induces bone damage through diverse mechanisms in which TNF- $\alpha$  and RANKL are implicated. These processes are driven by inflammatory cells, including monocytes/macrophages, neutrophils, Th17 lymphocytes and B cells. Also, Brucella abortus (B. abortus) can directly affect osteoarticular cells. The bacterium inhibits bone matrix deposition by osteoblast and modifies the phenotype of these cells to produce matrix metalloproteinases (MMPs) and cytokine secretion that contribute to bone matrix degradation. B. abortus also affects osteoclast increasing mineral and organic*

*bone matrix resorption and contributing to bone damage. Since the pathology induced by Brucella species involves joint tissue, experiments conducted in sinoviocytes revealed that besides inducing the activation of these cells to secrete chemokines, proinflammatory cytokines and MMPs, the infection also inhibits sinoviocyte apoptosis. Brucella is an intracellular bacterium that replicate in the endoplasmic reticulum of macrophages. The analysis of B. abortus infected sinoviocytes indicated that bacteria also replicate in their reticulum suggesting that the bacterium could use this cell type for intracellular replication during the osteoarticular localization of the disease. The findings presented in this review try to answer key questions about the inflammatory mediators involved in osteoarticular damage caused by Brucella.*

**Key words:** *Brucella, synoviocyte, osteoblast, osteoclast, B and T cells, neutrophil, macrophage.*

## Brucelosis

Las bacterias del género *Brucella* son organismos negativos que se comportan como patógenos intracelulares facultativos. Estas bacterias producen enfermedades en forma directa sobre el hombre y los animales relacionadas con su alimentación: bovinos, caprinos, porcinos y ovinos.

La brucelosis es una enfermedad endémica en muchos países en vías de desarrollo.<sup>1</sup> La Organización Mundial de la Salud considera la brucelosis como una de las siete zoonosis olvidadas que contribuye a la perpetuación de la pobreza.<sup>2</sup>

En la Argentina, *Brucella abortus* es la especie que tiene mayor incidencia en la región de la Pampa Húmeda donde predomina la explotación de ganado vacuno.<sup>1</sup> Los esfuerzos para controlar la brucelosis han sido un reto, con el reciente resurgimiento de la enferme-

dad y nuevos focos endémicos que presentan riesgos significativos para la salud humana.<sup>3</sup> El manejo de individuos con brucelosis es extremadamente complejo debido a su amplio espectro de manifestaciones clínicas, lo que deriva en un alto fracaso inicial del tratamiento y un riesgo significativo de recaída.<sup>3,4</sup> Las complicaciones osteoarticulares de la infección por *Brucella* son la manifestación clínica más común, pero los síntomas también incluyen daño neurológico, cardíaco y hepático debilitante.<sup>4</sup> En un estudio reciente, realizado en Turquía, hasta el 46,5% de los pacientes con brucelosis experimentaron complicaciones osteoarticulares.<sup>5</sup>

La afección osteoarticular por *Brucella* puede ser de dos tipos: osteomielitis (destrucción del hueso) y artritis (inflamación y destrucción de la articulación). Entre las osteomielitis, los huesos más frecuentemen-



te afectados son las vértebras (espondilitis), mientras que las artritis suelen afectar con mayor frecuencia la articulación sacroilíaca.<sup>6,7</sup> Si bien las complicaciones osteoarticulares son las más frecuentes en la brucelosis activa en el hombre, solo una parte de los mecanismos inmunes implicados en la patología ósea o articular por *Brucella* spp han sido recientemente estudiados. Debido a que frecuentemente los desafíos de la brucelosis clínica están asociados a las formas localizadas de la enfermedad, estudiar los mediadores inmunes e inflamatorios implicados en el daño osteoarticular causado por *Brucella* puede ser de gran utilidad tanto para fines diagnósticos como terapéuticos.

### Osteoinmunología

El hueso es un componente crucial del sistema esquelético-locomotor, que también funciona como un órgano del sistema inmune que alberga células madre hematopoyéticas y células progenitoras inmunitarias. El área de la osteoinmunología ha comenzado investigarse desde el descubrimiento de RANKL en los años 90; sus primeros aportes se realizaron en estudios sobre el papel de la respuesta inmune en el daño ocasionado por la artritis reumatoide.

Hoy en día es sabido que existe una íntima relación entre las células óseas y las células del sistema inmune tanto durante la homeostasis como en la enfermedad.

El hueso está compuesto de células y una matriz extracelular que se mineraliza y que proporciona rigidez y fuerza ósea. El hueso tiene tres tipos de células diferentes que actúan en un proceso coordinado entre la formación y la degradación del hueso durante el remodelado óseo que ocurre en condiciones fisiológicas: osteoblastos o células formadoras de hueso, osteoclastos o células de resorción ósea, y osteocitos, que son osteoblastos diferenciados terminalmente.<sup>8</sup> Para equilibrar la formación y resorción ósea, los osteoblastos secretan RANKL, que regula la diferencia-

ción de los osteoclastos. Los osteocitos son la fuente del antagonista de la vía de señalización de Wnt, esclerostina. La señalización de Wnt regulada por esclerostina modula la actividad de los osteoblastos<sup>9</sup> y de los osteocitos, que también secretan RANKL contribuyendo a regular la actividad de los osteoclastos.<sup>10</sup>

La formación de osteoclastos requiere, en condiciones fisiológicas, la presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y RANKL.

En condiciones patológicas, otras citoquinas y factores de crecimiento pueden estar implicados en la formación de osteoclastos.<sup>11</sup> En presencia de M-CSF, otras moléculas como TNF- $\alpha$ , LIGHT (un receptor expresado en linfocitos T), APRIL (un ligando que induce proliferación), BAFF (un factor de activación de células B), el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I, según sus siglas en inglés), TGF- $\beta$ , IL-6 IL-8 pueden participar de la osteoclastogénesis.<sup>11</sup>

Otras citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-7, IL-17 e IL-23 son capaces de inducir osteoclastogénesis mediante un mecanismo indirecto que involucra la inducción de la secreción de RANKL por otras células y el incremento de la expresión de su receptor RANK en la superficie de los precursores de osteoclastos.<sup>12</sup>

Su contraparte, los osteoblastos, son muy conocidos por su función en construir el esqueleto, el cual provee soporte mecánico, un sitio para la inserción de los músculos y un reservorio de fósforo y calcio. Sin embargo, estas células tienen funciones adicionales, al contribuir al microambiente de la médula ósea y desempeñar un papel preponderante en la hematopoyesis.<sup>13</sup>

Por otro lado, la expresión de RANKL, por parte de los osteoblastos es estimulada por las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ .<sup>14</sup>

El hueso normalmente es resistente a las infecciones; sin embargo, las bacterias del género *Brucella* tienen un tropismo por la localización osteoarticular. Por lo tanto, en esta

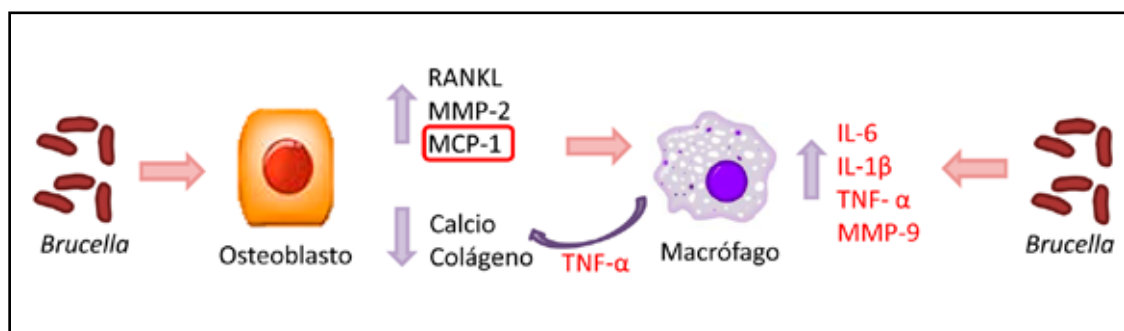
revisión, nos centraremos en la interacción de *Brucella* con las células óseas y el papel que desempeñan las células inmunes que podrían estar infiltrando la zona osteoarticular durante la infección.

### **Brucella y su interacción con los osteoblastos, los osteocitos, los osteoclastos y los sinoviocitos**

#### **Osteoblastos**

*Brucella abortus* es capaz de infectar osteoblastos, osteocitos y precursores de osteoclastos. Al infectar a los osteoblastos, *B. abortus* modifica su metabolismo inhibiendo la deposición de matriz orgánica y mineral, e

induciendo la expresión de RANKL y la metaloproteasa de matriz (MMP)-2.<sup>15</sup> Por otro lado, los osteoblastos secretan quemoquinas en respuesta a la infección por *Brucella*; entre estas, MCP-1 es la principal involucrada en atraer monocitos/macrófagos al sitio de infección. Los macrófagos, además de constituir el principal nicho de multiplicación de las bacterias del género *Brucella*, secretan las citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) y MMP-9 en respuesta a la infección.<sup>16</sup> Los macrófagos infectados contribuyen mediante un mecanismo dependiente de TNF- $\alpha$  a la inhibición de la deposición de matriz extracelular tanto orgánica como mineral por parte de los osteoblastos (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de la interacción de *Brucella abortus* con los osteoblastos y los macrófagos y los mediadores implicados en la modulación de la diferenciación y actividad de los osteoblastos.

#### **Osteocitos**

Los osteocitos constituyen el estadio de diferenciación final de los osteoblastos, que residen embebidos en la matriz ósea mineralizada y comprenden más del 95% de las células del hueso del esqueleto de un adulto.<sup>17</sup> Por otro lado, son los principales reguladores de la diferenciación y actividad de los osteoblastos y de los osteoclastos durante el remodelado óseo.<sup>18</sup> Los osteocitos secretan MMP-9, RANKL y citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) en respuesta a la infección por *B. abortus*. Esta respuesta inflamatoria induce la diferenciación de osteoclastos a partir de precursores derivados de médula ósea mediante

un mecanismo que depende de la presencia de RANKL y TNF- $\alpha$ . Debido a que los osteocitos se encuentran inmersos en la matriz mineralizada del hueso, la comunicación intercelular está mediada por comunicaciones intercelulares “gap junction”. Dentro de estas, conexina-43 (Cx43) es la predominante en el hueso. La infección por *B. abortus* inhibe la expresión de Cx43, que no solo participa en la comunicación intercelular, sino también en mantener la viabilidad de los osteocitos. Sin embargo, la inhibición en la expresión de Cx43 inducida por la infección por *B. abortus* no es suficiente para inducir la muerte celular (Figura 2).<sup>19</sup>

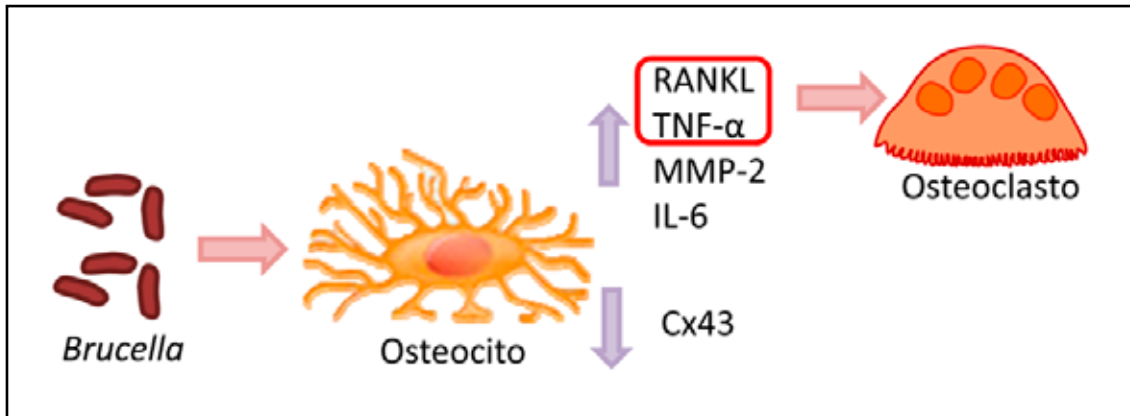


Figura 2. Esquema de la interacción de *Brucella abortus* con los osteocitos.

### Osteoclastos

Como mencionamos, el nicho preferencial de multiplicación de las bacterias del género *Brucella* lo constituyen las células del linaje monocito/macrófago, las cuales no solo contribuyen al daño óseo mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias sino pueden contribuir a la resorción ósea al diferenciarse a osteoclastos durante la infección. Debido a la incapacidad de los macrófagos de secretar RANKL, los macrófagos infectados con *B. abortus* inducen osteoclastogénesis a través de la secreción de citoquinas proinflamatorias; entre estas, TNF- $\alpha$  es la principal involucrada en la inducción de osteoclastos maduros capaces de resorber matriz ósea.<sup>20</sup> Esto se demostró al utilizar precursores de osteoclastos provenientes de médula ósea de ratones deficientes en el receptor de TNF- $\alpha$  (TNFR1p55<sup>-/-</sup>) y empleando anticuerpos neutralizantes anti-TNF- $\alpha$ .

Otras células inmunes que contribuyen a la osteoclastogénesis durante la infección por *B. abortus* son los linfocitos T y B.

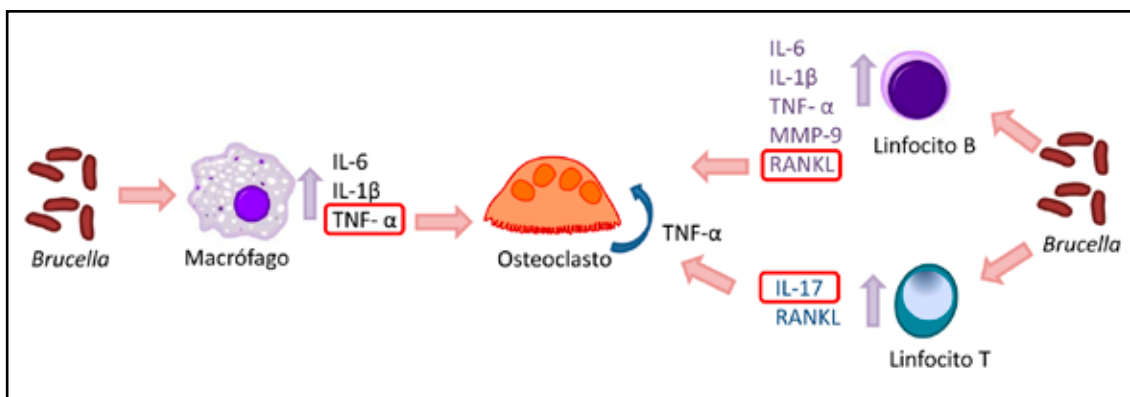
La interacción entre los linfocitos T y los osteoclastos es importante tanto en la patología ósea de origen infeccioso como no infeccioso.<sup>21</sup> En función del estímulo, los linfocitos T pueden responder secretando citoquinas que inhiban (IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10) o que estimulen

(RANKL, TNF- $\alpha$  e IL-17) la osteoclastogénesis.<sup>22</sup> En la brucelosis osteoarticular, la presencia de linfocitos T constituye un hallazgo patológico característico.<sup>7</sup> Los estudios *in vitro* utilizando linfocitos T murinos permitieron dilucidar, al menos en parte, la contribución de este tipo celular en la osteoclastogénesis durante la infección por *B. abortus*. El receptor de los linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) se une a pequeños péptidos que están asociados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de las células presentadoras de antígeno, produciendo su activación. El TCR está asociado sobre la membrana de los linfocitos T con otras moléculas denominadas en conjunto CD3. El complejo entre TCR y CD3 es necesario para la interacción estable entre la célula T y la célula presentadora de antígenos. *In vitro* es posible simular la activación de los linfocitos T, mediante la estimulación con un anticuerpo anti-CD3. Esta activación induce la secreción de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, cuando estos linfocitos T previamente activados con anti-CD3 son estimulados con sobrenadantes de macrófagos infectados por *B. abortus*, las células T cambian su fenotipo para convertirse en secretoras de RANKL e IL-17.<sup>23</sup> Utilizando anticuerpos neutralizantes anti-IL-17 o realizando los experimentos utilizando pre-

cursores de médula ósea provenientes de ratones deficientes en la expresión del receptor de IL-17 (IL17R<sup>-/-</sup>), se demostró que IL-17 desempeña un rol preponderante en la inducción de osteoclastogénesis. Esto resultó llamativo, ya que RANKL es la principal citoquina que regula la diferenciación de osteoclastos. Una posible explicación es que, si bien las células Th17 son capaces de secretar RANKL, el aporte de dicha citoquina por este tipo celular no es fundamental en la osteoclastogénesis, ya que la principal fuente de RANKL son las células que provienen del linaje mesenquimal.<sup>24</sup> Por otro lado, estos linfocitos activados por los sobrenadantes de macrófagos infectados por *B. abortus*, además de RANKL e IL-17, como fue mencionado, secretan IL-10. Esta última tiene la capacidad de inhibir la interacción de RANKL y RANK<sup>25</sup> y de exacerbar la artritis inducida por colágeno, al favorecer el reclutamiento de células T productoras de IL-17 hacia la articulación afectada.<sup>26</sup> IL-17 media la osteoclastogénesis indirectamente, a través de la inducción de citoquinas proinflamatorias por parte de los precursores de osteoclastos. Al utilizar precursores provenientes de ratones deficientes en el receptor de TNF- $\alpha$  (TNFRp55<sup>-/-</sup>) demostramos que TNF- $\alpha$  es la principal citoquina involucrada en la osteoclastogénesis inducida por IL-17 proveniente de los linfocitos T.<sup>23</sup> Por otro lado, cuando los experimentos fueron realizados utilizando las subpoblaciones T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>

separadas, demostramos que los linfocitos T CD8 no inducen osteoclastogénesis durante la infección por *Brucella*.<sup>23</sup> El papel que desempeñan otras subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> en la brucelosis osteoarticular no ha sido dilucidado aún.

Las otras células de la inmunidad adaptativa y que pueden participar en la osteoclastogénesis son los linfocitos B, a pesar de que su función primaria es la producción de inmunoglobulinas antimicrobianas contra el patógeno que está causando la infección. La infección por *B. abortus* no solo activa los linfocitos B, sino además estas células constituyen un nicho de persistencia para la bacteria.<sup>27,28</sup> Asimismo, los linfocitos B se encuentran infiltrando el tejido osteoarticular en los pacientes con brucelosis.<sup>7,29</sup> En estudios *in vitro* se demostró que los linfocitos B provenientes de bazo de ratón secretan MMP-9, RANKL, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en respuesta a la infección por *B. abortus*, induciendo la diferenciación de osteoclastos a partir de los precursores de médula ósea. RANKL así como las citoquinas proinflamatorias secretadas por los linfocitos B infectados podrían ser capaces de inducir osteoclastogénesis. Sin embargo, los ensayos de diferenciación de osteoclastos realizados en presencia de osteoprotegerina (OPG) revelaron que RANKL es la principal citoquina involucrada en la osteoclastogénesis mediada por estas células<sup>30</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la modulación de la respuesta inmune durante la infección por *Brucella abortus* y sus implicancias en la osteoclastogénesis.



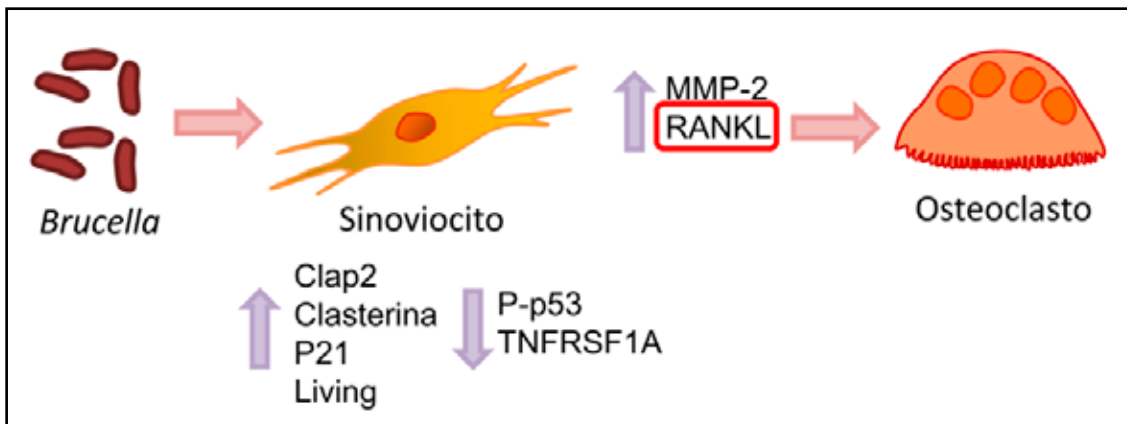


### Sinoviocitos

La membrana sinovial está formada por dos tipos de sinoviocitos: los de tipo A o macrófagos sinoviales, y los de tipo B o fibroblastos sinoviales. Los macrófagos sinoviales son células fagocíticas con características similares a los macrófagos, mientras que los fibroblastos sinoviales tienen funciones sintéticas relacionadas con la homeostasis de la matriz extracelular, así como también con la secreción de los componentes esenciales del líquido sinovial.

Los fibroblastos sinoviales median el daño articular en la artritis inflamatoria tanto infecciosa como estéril.<sup>31,32</sup> Su papel está determinado por su capacidad de producir MMPs, citoquinas y quemoquinas que pueden mediar la atracción de células inmunes a la sinovia y su subsecuente activación. La infección por *B. abortus* de fibroblastos sinoviales humanos demostró que estos secretan RANKL, MMP-2 y mediadores proinflamatorios que podrían promover la migración de monocitos y neutrófilos al sitio de infección. Los fibroblastos sinoviales infecta-

dos por *B. abortus* son capaces de inducir osteoclastogénesis vía la secreción de RANKL.<sup>33</sup> Además, la infección inhibe la muerte por apoptosis de los fibroblastos sinoviales, mediante un mecanismo que involucra el aumento de factores que inhiben la apoptosis como cIAP-2, clasterina, livin y P21/CIP/CDNK1A, y la reducción de factores que promueven la apoptosis como P-p53 y TNFRSF1A.<sup>33</sup> Debido a que las bacterias que tienen su nicho de replicación intracelular inhiben la apoptosis de la célula que colonizan, se puede especular que los fibroblastos sinoviales podrían constituir un nicho de multiplicación alternativo cuando la bacteria alcanzó la localización osteoarticular. De acuerdo con esta hipótesis, las imágenes de microscopia confocal revelaron que –tal como ocurre en los macrófagos (el principal nicho de multiplicación de *Brucella*)– la bacteria se multiplica en vacuolas positivas para marcadores de retículo endoplasmático.<sup>33</sup> Esto indica que los fibroblastos sinoviales podrán tener un papel importante en la persistencia de la infección (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de la interacción de *Brucella abortus* con los sinoviocitos, mediadores implicados en la inducción del daño óseo y la modulación de los factores de supervivencia y muerte celular.

### MMPs

Las MMPs son enzimas de la familia de las endopeptidasas dependientes de zinc y calcio, con capacidad para degradar matriz

extracelular durante el remodelado de tejido, la inflamación crónica, la metástasis celular asociada a procesos tumorales y la progresión de varias enfermedades infecciosas.<sup>34-36</sup>

Las MMPs son secretadas como proenzimas inactivas y subsecuentemente activadas por escisión proteolítica.<sup>37,38</sup>

Las MMPs desempeñan un papel importante al facilitar la migración de células inflamatorias de la inmunidad innata.<sup>39</sup> Sin embargo, un aumento excesivo en los niveles de MMPs puede causar daño en los tejidos.<sup>40</sup> MMP-2 y 9 (gelatinasas A y B, respectivamente) pueden degradar una variedad de colágenos incluyendo el presente en la membrana basal (colágeno de tipo IV), el colágeno fibrilar desnaturalizado de tipo I (gelatina) y el colágeno de tipo V.<sup>41</sup> El incremento en los niveles locales de MMPs se ha observado en numerosas enfermedades osteoarticulares, incluyendo condiciones reumáticas (artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis) y en artritis infecciosas tales como la observada en la enfermedad de Lyme.<sup>41-43</sup> Incluso, el incremento en los niveles de MMPs no solo ha sido observado durante la infección *in vitro* como se mencionó previamente, sino también en el líquido sinovial de un paciente con bursitis causada por la infección por *Brucella*. El líqui-

do sinovial del paciente con *bursitis* presentó altos niveles de MMP-9 medidos por zimografía y ELISA, los cuales fueron más elevados que los encontrados en el líquido sinovial de pacientes con artritis séptica o artritis reumatoide que fueron incluidos como control en el mismo ensayo.<sup>44</sup> Esto apoya fuertemente la hipótesis de que las MMPs pueden estar involucradas en el daño osteoarticular mediado por la infección por *Brucella*.

### Conclusiones

En este trabajo de revisión se analizó el conocimiento actual sobre los mediadores inflamatorios implicados en el daño osteoarticular causado por la infección por *B. abortus*.

Este conocimiento sienta las bases para futuras investigaciones que llevarán a proponer nuevos blancos terapéuticos para ser abordados junto con la terapia antibiótica durante la forma localizada de la enfermedad.

**Conflicto de intereses:** la autora declara no tener conflicto de intereses.

Recibido: octubre 2018

Aceptado: febrero 2019

---

### Referencias

1. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. *N Engl J Med* 2005; 352 (22): 2325-36.
2. World Health Organization (WHO) The Control of Neglected Zoonotic Diseases: a Route to Poverty Alleviation. (2006, Sept) [http://www.who.int/zoonoses/Report\\_Sept06.pdf](http://www.who.int/zoonoses/Report_Sept06.pdf).
3. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 6(2):91-9.
4. Buzgan T, Karahocagil MK, Irmak H, et al. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. *Int J Infect Dis* 2010; 14(6): e469-78.
5. Turan H, Serefhanoglu K, Karadeli E, Togan T, Arslan H. Osteoarticular involvement among 202 brucellosis cases identified in Central Anatolia region of Turkey. *Intern Med* 2011; 50(5):421-8.
6. Adamopoulos IE, Bowman EP. Immune regulation of bone loss by Th17 cells. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(11):225.



7. Madkour MM. Osteoarticular brucellosis. In: Madkour MM (ed.). Madkour's brucellosis, 2nd ed. Berlin: Springer; 2001. p. 74-87.
8. Ikeda K, Takeshita S. The role of osteoclast differentiation and function in skeletal homeostasis. *J Biochem* 2016; 159(1):1-8.
9. Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cell Mol Life Sci* 2016; 74(9):1649-57.
10. Chen H, Senda T, Kubo KY. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med Mol Morphol* 2015; 48(2):61-8.
11. Lampiasi N, Russo R, Zito F. The Alternative Faces of Macrophage Generate Osteoclasts. *Biomed Res Int* 2016, 9089610.
12. Adamopoulos IE, Chao CC, Geissler R, et al. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(1):R29.
13. Visnjic D, Kalajzic I, Gronowicz G, et al. Conditional ablation of the osteoblast lineage in Col2.3deltatg transgenic mice. *J Bone Miner Res* 2001; 16(12):2222-31.
14. Mori G, D'Amelio P, Faccio R, Brunetti G. The Interplay between the bone and the immune system. *Clin Dev Immunol* 2013, 720504.
15. Scian R, Barrionuevo P, Fossati CA, Giambartolomei GH, Delpino MV. *Brucella abortus* invasion of osteoblasts inhibits bone formation. *Infect Immun* 2012; 80(7):2333-45.
16. Scian R, Barrionuevo P, Giambartolomei GH, Fossati CA, Baldi PC, Delpino MV. V. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor- and tumor necrosis factor alpha-mediated matrix metalloproteinase production by human osteoblasts and monocytes after infection with *Brucella abortus*. *Infect Immun* 2011; 79(1):192-202.
17. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011; 26(2):229-38.
18. Zhao S, Zhang YK, Harris S, Ahuja SS, Bonewald LF. MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002; 17(11):2068-79.
19. Pesce Vigiuetti AI, Arriola Benítez PC, Gentilini MV, et al. *Brucella abortus* Invasion of Osteocytes Modulates Connexin 43 and Integrin Expression and Induces Osteoclastogenesis via Receptor Activator of NF-kappaB Ligand and Tumor Necrosis Factor Alpha Secretion. *Infect Immun* 2016; 84(1):11-20.
20. Delpino MV, Barrionuevo P, Macedo GC, et al. Macrophage-elicited osteoclastogenesis in response to *Brucella abortus* infection requires TLR2/MyD88-dependent TNF-alpha production. *J Leukoc Biol* 2012; 91(2):285-98.
21. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007; 7 4): 292-304.
22. Takayanagi H. The unexpected link between osteoclasts and the immune system. *Adv Exp Med Biol* 2010; 658:61-8.
23. Giambartolomei GH, Scian R, Acosta-Rodríguez E, Fossati CA, Delpino MV. *Brucella abortus*-infected macrophages modulate T lymphocytes to promote osteoclastogenesis via IL-17. *Am J Pathol* 2012; 181(3):887-96.
24. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006; 203(12):2673-82.
25. Park-Min KH, Ji JD, Antoniv T, et al. IL-10 suppresses calcium-mediated costimulation of receptor activator NF-kappa B signaling during human osteoclast differentiation by inhibiting TREM-2 expression. *J Immunol* 2009; 183(4):2444-55.
26. Tao J, Kamanaka M, Hao J, et al. IL-10 signaling in CD4+ T cells is critical for the pathogenesis of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011; 13(6):R212.
27. Goenka R, Parent MA, Elzer PH, Baldwin CL. B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus*. *J Infect Dis* 2011; 203 (8):1136-46.
28. Goenka R, Guirnalda PD, Black SJ, Baldwin CL. B Lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium *Brucella abortus*. *J Infect Dis* 2012; 206(1):91-8.

29. Young EJ. Family studies in brucellosis. *Infection* 2008; 36:578-9.
30. Pesce Viglietti AI, Arriola Benitez PC, Giambartolomei GH, Delpino MV. *Brucella abortus*-infected B cells induce osteoclastogenesis. *Microbes Infect* 2016; 18(9): 529-35.
31. Inman RD, Payne U. Determinants of synoviocyte clearance of arthritogenic bacteria. *J Rheumatol* 2003; 30(6):1291-7.
32. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010; 233(1):233-55.
33. Scian R, Barrionuevo P, Rodríguez AM, et al. *Brucella abortus* invasion of synoviocytes inhibits apoptosis and induces bone resorption through RANKL expression. *Infect Immun* 2013; 81(6):1940-51.
34. Okamoto T, Akuta T, Tamura F, van Der Vliet A, Akaike T. Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation. *Biol Chem* 2004; 385(11):997-1006.
35. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001; 69(6):851-9.
36. Shapiro SD. Diverse roles of macrophage matrix metalloproteinases in tissue destruction and tumor growth. *Thromb Haemost* 1999; 82(2):846-9.
37. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(3):207-14.
38. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(8):617-29.
39. Elkington PT, O’Kane CM, Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol* 2005; 142(1):12-20.
40. Lai WC, Zhou M, Shankavaram U, Peng G, Wahl LM. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 2003; 170(12):6244-9.
41. Rengel Y, Ospelt C, Gay S. Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(5):221.
42. Behera AK, Hildebrand E, Scagliotti J, Steere AC, Hu LT. Induction of host matrix metalloproteinases by *Borrelia burgdorferi* differs in human and murine lyme arthritis. *Infect Immun* 2005; 73(1):126-34.
43. Vandooren B, Kruithof E, Yu DT, et al. Involvement of matrix metalloproteinases and their inhibitors in peripheral synovitis and down-regulation by tumor necrosis factor alpha blockade in spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2004; 50(9):2942-53.
44. Wallach JC, Delpino MV, Scian R, Deodato B, Fossati CA, Baldi PC. Prepatellar bursitis due to *Brucella abortus*: Case report and analysis of the local immune response. *J Med Microbiol* 2010; 59(12):1514-18.



## ACTUALIZACIONES / Review

# SERVICIO DE ENLACE PARA PACIENTES CON FRACTURAS POR OSTEOPOROSIS

Vivian Marcela Morán,<sup>1\*</sup> María Diehl,<sup>2</sup> Luisa Carmen Plantalech<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Endocrinología. Hospital Británico de Buenos Aires. <sup>2</sup> Sección Osteopatías Metabólicas, Servicio de Endocrinología y Metabolismo. Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

### Resumen

Los pacientes con fracturas por fragilidad presentan elevadas tasas de morbilidad y mortalidad, lo que implica además un alto costo para el erario público. Luego de una fractura por osteoporosis, la mayoría de los pacientes no recibe una adecuada evaluación y tratamiento. Para suplir este vacío de atención médica se crearon distintas políticas; la mejor de ellas son los Servicios de Enlace de Pacientes con Fracturas (*Fracture Liaison Service*, en inglés). Estos programas tienen una vigencia internacional de más de diez años y son patrocinados por organismos internacionales.

La finalidad de estos servicios es la prevención secundaria de fracturas. La modalidad de trabajo tiene como objetivo facilitar y asegurar la rápida identificación, el diagnóstico y la terapéutica de esta población en diferentes contextos asistenciales. La experiencia internacional demuestra que estos servicios son exitosos pues logran incrementar el inicio y la adherencia al tratamiento, disminuir las tasas de mortalidad, de morbilidad y de nuevas fracturas, y son costo-efectivos.

En nuestro medio, el inicio de los Servi-

cios de Enlace es reciente. El propósito de esta actualización es realizar una revisión de los fundamentos, características, modalidad operativa y los logros obtenidos por dichos programas.

Las fracturas por fragilidad ósea constituyen un problema importante para la salud pública. Esta presentación tiene como objetivo alertar y motivar a la comunidad médica a intervenir de manera sistemática y dinámica para mejorar el cuidado habitual en esta población de pacientes.

**Palabras clave:** Servicios de Enlace de Fracturas, fracturas, mortalidad, morbilidad, osteoporosis, costo-beneficio.

### Abstract

#### **OSTEOPOROTIC FRACTURE LIAISON SERVICE**

*Fragility fractures are associated with increased morbidity and mortality rates and higher costs. After a fracture, most patients do not receive adequate assessment and treatment. To fill this gap in medical care, different policies have been created; the best of them being the Fracture Liaison Services. These programs have been in place for over*

\*E-mail: [vmmoran@hotmail.com](mailto:vmmoran@hotmail.com)



ten years worldwide and are sponsored by international organisms and societies.

The purpose of the Fracture Liaison Services is secondary fracture prevention. Their goal is to ensure the rapid identification, diagnosis and treatment of this population in different clinical contexts. They increase treatment adherence and decrease mortal-

ity and morbidity rates and the incidence of new fractures. International experience shows that these services are successful and cost-effective.

**Key words:** Fracture Liaison Service, fractures, mortality, morbidity, osteoporosis, cost-effectiveness.

## ¿Por qué son necesarios los servicios de enlace de fracturas?

### Fundamentos

Las fracturas por osteoporosis son un problema de la salud pública mundial. Una de cada dos mujeres y uno de cada cinco varones sufrirá en su vida una fractura por fragilidad luego de los 50 años. La prevalencia de fracturas se incrementa con el paso del tiempo de 3% en la sexta década de la vida a 47,2% en la población mayor de 80 años.<sup>1,2</sup> Las fracturas se asocian con mayor morbilidad y mortalidad. El impacto en el gasto público es considerable, por lo que esta problemática requiere una evaluación multidisciplinaria que permita mejorar la salud ósea, evitar la primera fractura (prevención primaria) y las subsiguientes (prevención secundaria).<sup>3</sup>

Las fracturas vertebrales y de cadera tienen un gran impacto negativo en la sobrevivencia de la población. Se estima una tasa de mortalidad entre el 10 y el 40% al año para las fracturas de cadera. El "exceso de mortalidad" persiste más allá de los 10 años, según diferentes trabajos.<sup>4-10</sup> Se describe un aumento del riesgo de mortalidad de 2 a 8 veces en pacientes con fracturas vertebrales.<sup>11-13</sup> En nuestro medio se han descrito las tasas de mortalidad al mes, al año y más de 30 meses de seguimiento luego de una fractura de cadera; la población más vulnerable son los varones y los pacientes de mayor edad o con comorbilidades.<sup>14-19</sup> Las tasas de mortalidad por las restantes fracturas mayores también

tienen un alto impacto, debido a su frecuencia en la población.<sup>20,21</sup>

Las fracturas por fragilidad ósea se asocian con cambios en el estatus funcional y de la calidad de vida. Asimismo, la fractura de cadera ocasiona en muchos pacientes la internación en hogares, pérdida de la independencia en las actividades del diario vivir y altos costos económicos, mientras que las fracturas vertebrales se vinculan con dolor crónico, comorbilidades respiratorias y discapacidad.<sup>22-25</sup>

*Los pacientes con una fractura por fragilidad tienen un alto riesgo de volver a fracturarse*

La fractura de cadera aumenta 3 veces el riesgo de una nueva fractura que se observa con mayor frecuencia dentro de los primeros 6 a 12 meses del incidente. Las fracturas vertebrales están asociadas con nuevas fracturas. Se describió un incremento del riesgo de 1,7 a 2,3 veces luego de una fractura vertebral clínica. El riesgo aumenta en aquella población con mayor número de fracturas vertebrales prevalentes. Otros autores observaron que los pacientes con fracturas mayores (cadera, vértebra, antebrazo y húmero) también tienen mayor riesgo de nueva fractura por un período que se extiende más allá de los 10 años.<sup>26-30</sup>

### Costos económicos de las fracturas

El impacto económico de las fracturas por fragilidad ósea motivó investigaciones en diferentes sistemas médicos públicos y privados. En Canadá (sistema público) se estable-



ció que el promedio de costos pos-fractura de cadera fue de C\$ 22.759 y, luego de un año de seguimiento, el presupuesto fue tres veces mayor (C\$ 63.649). El gasto en Salud Pública de Canadá por todas las fracturas al año de seguimiento es de C\$ 4.619.665.079. Los costos se estimaron teniendo en cuenta la admisión en sala de emergencias, internación, día de cirugía, rehabilitación, cuidados complejos continuos a largo plazo (1 año) en el hogar, servicios clínicos ambulatorios y dispositivos para movilidad. Se deduce de estas cifras la importancia de los costos relacionados con la rehabilitación y los cuidados a largo plazo.<sup>31</sup>

En Gran Bretaña (sistema público) se estimaron 300.000 fracturas por fragilidad por año, de las cuales 85.000 son fracturas de cadera. El costo hospitalario de estas representa 1.9 billones de libras esterlinas excluyendo los costos sociales.<sup>32</sup>

En los sistemas privados de salud de los Estados Unidos como el Medicare, el promedio de costos de cuidados de salud (costos médicos y farmacia) en el año que sigue a la fractura incidental fue USD 27.844 y difiere significativamente entre pacientes con y sin nueva fractura USD 34.897 vs. USD 20.790, respectivamente.<sup>28</sup>

En nuestro país, Spivacow y Sánchez evaluaron los costos de cada tipo de fractura: la de cadera en el episodio agudo representaba un costo de USD 3.800 en 2004. El gasto anual por fractura de cadera (considerando 34.000 casos por año) se estimó en USD 129.200.000 para todos los servicios de salud. Las fracturas vertebrales representaban una inversión de USD 163 por caso y se estableció un costo total anual de USD 62.282.000 por 382.100 fracturas vertebrales anuales. Este dato no incluye los procedimientos como vertebroplastia o cifoplastia, cuyos valores se estiman en USD 1.750 y 10.500, respectivamente. En nuestro medio se conoce el impacto económico de la hospitalización, pero se sabe poco sobre los costos de los cuidados a largo pla-

zo que se triplican al año, según datos de países desarrollados.<sup>33</sup>

Los gastos económicos de las fracturas impactan en diferentes sistemas médicos: públicos y privados. En una revisión sistemática sobre fracturas de cadera se estimó un costo promedio USD 10.075 y el costo total en el primer año (tratamientos, asistencia y costos sociales) se valoró en USD 43.669 por paciente.<sup>34</sup>

*La prevención secundaria no se realiza en forma sistemática en nuestro país ni en el mundo*

Los múltiples tratamientos para la osteoporosis han demostrado la disminución del riesgo de fracturas y de las tasas de morbilidad;<sup>35-39</sup> sin embargo, solamente son tratados entre el 20 y el 25% de los pacientes. El 70-80% de la población recibe únicamente asistencia ortopédica. Múltiples son los motivos de este fenómeno, que se pueden resumir en: falta de conocimiento de la importancia en los profesionales de la salud, las comorbilidades de la población con fracturas que dejan en segundo plano el evento, la falta de conciencia de la población sobre la importancia del impacto, las burocracias de los sistemas de salud en concretar visitas médicas a especialistas, entre otras.<sup>40-43</sup>

Para subsanar esta ausencia de tratamiento en la población con osteoporosis grave, se desarrollaron distintas estrategias procedentes de organismos gubernamentales o sociedades científicas. En 1999 surgieron los Servicios de Enlace de Fracturas (SEF) (FLS en inglés, *Fracture Liaison Service*) destinados a identificar y facilitar el diagnóstico y tratamiento de pacientes con fractura reciente.<sup>44-47</sup> Los SEF están promovidos por los Ministerios de Salud, los hospitales, los Seguros de Salud, los organismos de calificación institucional como la Joint Commission y sociedades científicas como la International Osteoporosis Foundation (IOF). Recientemente, la American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) publicó un

consenso de sociedades científicas destinado a desarrollar un plan de trabajo conjunto para prevenir nuevas fracturas en la población de alto riesgo.<sup>48-50</sup>

### ¿Qué son los servicios de enlace de fracturas (SEF)?

Los SEF son entidades autárquicas inter-servicios cuya finalidad es una asistencia rápida para lograr una terapéutica eficaz y un seguimiento que asegure la adherencia a los tratamientos por osteoporosis luego de una fractura. La misión es “capturar” al paciente, para facilitar su tratamiento. La población de interés son los adultos mayores de 50 años con fracturas por fragilidad de cualquier tipo.

Las funciones del SEF son: identificar al paciente, referir para investigar (diagnóstico) su condición de salud ósea y riesgo de nuevas fracturas; informar (educar) sobre osteoporosis y sus tratamientos tanto a los pacientes como a los profesionales de la salud; intervenir con terapéuticas apropiadas para evitar nuevas fracturas e integrar las actividades de los servicios médicos para realizar un adecuado seguimiento que garantice la adherencia al tratamiento.<sup>51</sup>

Los SEF tienen distintas características dependiendo de los objetivos, las posibilidades, los organismos que los impulsan y los recursos económicos. Se clasifican según la cantidad de servicios que prestan. El servicio tipo A es aquel que incorpora, estudia, educa, trata y sigue al paciente por largo tiempo. Algunas formas intermedias de ellos identifican, estudian y comunican al médico tratante (tipo B); otras identifican, educan y derivan a los sistemas médicos para el tratamiento de los pacientes (tipo C); el tipo D solo educa al paciente.<sup>49, 52-54</sup>

La experiencia internacional de los SEF ha demostrado ser exitosa pues se han logrado metas entre las que se destacan:

1) Una *significativa reducción de nuevas fracturas* entre 40-56% en un período de

2-6 años, en relación con las intervenciones tradicionales.<sup>55-57</sup>

- 2) Se observó *disminución de las tasas de mortalidad* entre 16-35%, según diferentes trabajos.<sup>15,56,58</sup>
- 3) Se informó un *incremento significativo de inicio de tratamiento* en pacientes con fractura de cadera entre un 51 y un 90%.<sup>59-61</sup>
- 4) Las evidencias muestran que los pacientes tienen un mayor compromiso con el tratamiento. Se ha observado *una adherencia* a este entre el 44 y el 80% en los pacientes supervisados por los SEF.<sup>60, 62-64</sup>
- 5) La realización de la *densitometría ósea* es un motivo importante de adherencia a estos programas. La demanda de dicha herramienta fue superior en los SEF comparados con los sistemas convencionales de salud.<sup>44,65,66</sup>
- 6) La organización de un SEF es costo-eficaz.<sup>67-69</sup>

### Costo-eficacia de los SEF.

El Departamento de Salud de Inglaterra realizó un análisis económico de diferentes publicaciones realizadas en Australia, Canadá, Reino Unido y Estados Unidos con el objetivo de fundamentar la política nacional relacionada con los SEF.<sup>67</sup> En ese informe se destacan:

- El trabajo australiano realizado en 2011 a través del *Minimal Trauma Fracture Liaison* (MTFL) refiere un beneficio del sistema. El índice QALY (medida de estado de salud cualitativa y cuantitativa de vida que se utiliza para valorar la rentabilidad de las intervenciones médicas) se incrementó en 0,089 por esta intervención. A pesar del aumento de costos en el desarrollo de estos sistemas, la eficacia del servicio se asocia con un aumento del *Incremental Cost Effectiveness Ratio* “ICER” (Índice que relaciona costo-eficacia con el buen uso de los recursos). El servicio MTFL es una intervención costo-eficaz para reducir las fracturas recurrentes por osteoporosis.<sup>45</sup>



- El *Osteoporosis Exemplary Care Program*, del Hospital St. Michael en Toronto, realizó un análisis económico del programa y demostró que el sistema con coordinador para 500 pacientes/año con fractura por fragilidad ósea, es costo-eficaz. Se advirtió una reducción en el número de fracturas de cadera, con un ahorro de costo neto de C\$ 48.950, en el primer año, demostrando el beneficio de esta intervención desde la perspectiva hospitalaria.<sup>46</sup>

- En un estudio realizado en el SEF de Glasgow se demostró la prevención de 18 fracturas (11 fracturas de cadera) en 1.000 pacientes, lo que implicó un ahorro económico estimado en 21.000 libras. La proyección sobre la población de pacientes con fracturas por fragilidad del Reino Unido (300.000 pacientes/año) estimaría una disminución 6,3 millones de libras en gastos de Salud Pública.<sup>47,32</sup>

- El *Kaiser Permanent Healthy Bones Program* de California, Estados Unidos, observó una reducción del 37% de fracturas de cadera (de 2.510 a 1.575) en el período 2001-2009, que se refirió directamente a la implementación del SEF y a la adherencia que fomenta la realización de una densitometría ósea. Teniendo en cuenta que el costo del tratamiento de una fractura de cadera es de USD 33.000, se estimó que el programa ahorró más de USD 30,8 millones.<sup>68</sup>

Estos estudios demuestran por distintos métodos de evaluación, más refinados o más sencillos, que estos programas son costo-eficaces. Una reciente publicación de análisis sistemáticos de SEF de diversos países corrobora los resultados presentados.<sup>69</sup>

#### *Programas de prevención secundaria de fracturas en la Argentina*

En nuestro país son pocas las intervenciones realizadas y se carece de políticas estatales al respecto. En 2008-2010 funcionó en el Hospital Italiano de Buenos Aires un programa destinado a la prevención secundaria de fracturas luego de una fractura de cadera.<sup>70</sup> El

Sanatorio Las Lomas de San Isidro tiene un SEF para pacientes con fracturas por osteoporosis supervisado por la IOF. Los comienzos de estos servicios son aún incipientes en la Argentina.<sup>71</sup>

En el Hospital Italiano de Buenos Aires, los pacientes con fractura de cadera fueron detectados a través de la Historia Clínica Electrónica (HCE). La intervención consistió en una serie de medidas destinadas a facilitar el acceso al tratamiento por osteoporosis que incluía educación al paciente y su familia y a profesionales de la salud. Las medidas se iniciaban durante la internación con la evaluación clínica y el estudio de parámetros de laboratorio. Se ofrecía iniciar el tratamiento con suplemento de calcio y vitamina D y drogas osteoactivas (principalmente bifosfonatos). Los profesionales de Medicina Domiciliaria evaluaban la seguridad en el hogar y ofrecían la opción de tratamiento con bifosfonatos (ácido zoledrónico) en el domicilio. Se consideró el registro de compras de medicación. Se realizaba un seguimiento telefónico para lograr la adherencia. Los pacientes fueron evaluados por clínica, traumatología, enfermería y kinesiología en el domicilio y en los consultorios externos. Se evaluó la seguridad ambiental en el domicilio y se entregó una planilla con las medidas recomendadas para prevenir caídas. Se procuró el acceso a un consultorio atendido por especialistas en endocrinología (Sección Osteopatías Metabólicas) sin demora.<sup>71</sup> Este programa ha sido, por sus características, un SEF orientado a pacientes internados con fracturas de cadera. Las conclusiones fueron:

1. La tasa de mortalidad posfractura de cadera, a los 2,33 años, en la población histórica fue de 30,8% en los varones y 24,5% en mujeres. Los factores de riesgo de mortalidad posfractura fueron la edad, la diabetes y la demencia. Se observó que más del 80% de los pacientes presentaban hipovitaminosis D.<sup>14,72</sup>
2. La tasa de mortalidad a los 30 meses fue

del 5,8% en los pacientes que adherían al programa intensivo de tratamiento y del 11,4% en los pacientes tratados con programa específico y sin él vs. 20,4% en los pacientes no tratados por osteoporosis.<sup>15</sup>

3. El tratamiento con drogas osteoactivas luego de una fractura de cadera aumentó a un 87,3% en los pacientes que aceptaron participar del programa versus 31,9% de los que no accedieron, comparados con el 38,5% de una cohorte histórica.<sup>15</sup>
4. Las medidas HEDIS de control de calidad mostraron una mejoría de la evaluación y/o tratamiento por osteoporosis luego de una fractura de cadera a lo largo de los años en el Plan de Salud del HIBA.<sup>61</sup>

Desde 2010 hasta la actualidad se continuó con la detección y evaluación de los pacientes con fractura de cadera en la internación. Esta actividad está a cargo del equipo de internación de la Sección Osteopatías Metabólicas. Los pacientes son seguidos al alta por Medicina Domiciliaria y, en forma ambulatoria, por su médico de cabecera o especialistas. Por otra parte se generó el Registro Hospitalario de Fracturas de Cadera con fines de investigación.<sup>73</sup>

### **¿Cómo se estructuran y funcionan los servicios de enlace de fracturas (SEF)?**

Los SEF están conformados por un equipo multidisciplinario integrado por los servicios que detectan o asisten pacientes con fracturas: Ortopedia, Endocrinología, Reumatología, Clínica Médica, Emergentología, Medicina Familiar, Imágenes y Ginecología. En general, son estructuras autárquicas dentro de los diferentes sistemas de salud. Las modalidades organizativas son diferentes de acuerdo con los objetivos y posibilidades de cada país, hospital o servicio de salud.

El buen funcionamiento del SEF y el logro de resultados dependen en gran medida de la posibilidad de coordinar distintos servicios que disponen de autonomía. Para ello,

el SEF debe poseer una dirección ejecutiva central, ser de utilidad para los servicios intervinientes y reportar a autoridades hospitalarias, estatales, seguros de salud según su origen. Por ejemplo los SEF de Canadá dependen de Osteoporosis Canadá; Medicare es una estructura de seguros de salud en los Estados Unidos; en Holanda e Italia son organizaciones hospitalarias.

La revisión de la literatura muestra los distintos estilos de SEF: su organización principal está constituida por una dirección general (uno o dos médicos) cuya función es llevar adelante los proyectos asistenciales de educación e investigación e interactuar con los servicios involucrados y las autoridades.

La principal actividad está centrada en el Coordinador, tarea a cargo de un enfermero o profesional de la salud cuya principal actividad es *identificar* al paciente con fractura reciente (historia clínica [HC] y listados de pacientes), *otorgar turnos para facilitar el acceso a estudios diagnósticos y consultas médicas* y realizar un estricto *seguimiento* del cumplimiento de los distintos pasos programados para el paciente. También recibe y direcciona las consultas procedentes de otros servicios.

El agente de salud es un colaborador (opcional) entrenado para la educación de los pacientes en la internación y en el ambulatorio y para evaluar dificultades. Realiza el contacto directo, telefónico, por correo electrónico con el paciente para el seguimiento a distancia y supervisa el cumplimiento del tratamiento.

Los médicos diseñan la intervención del paciente identificado, asisten y/o derivan al paciente al médico de cabecera, organizando su tratamiento y seguimiento. Intercambian con los otros médicos y elaboran el material educativo tanto para los pacientes como para los profesionales de la salud involucrados.

Es fundamental contar con una base de datos de acceso común a todos los servi-





cios en el campus virtual de la institución; un secretario incorpora todos los datos procedentes de la historia clínica. Un investigador independiente analizará las estadísticas

y proyecciones. Un analista contable es de importancia para evaluar la relación costo-beneficio de este programa (Figuras 1 y 2).

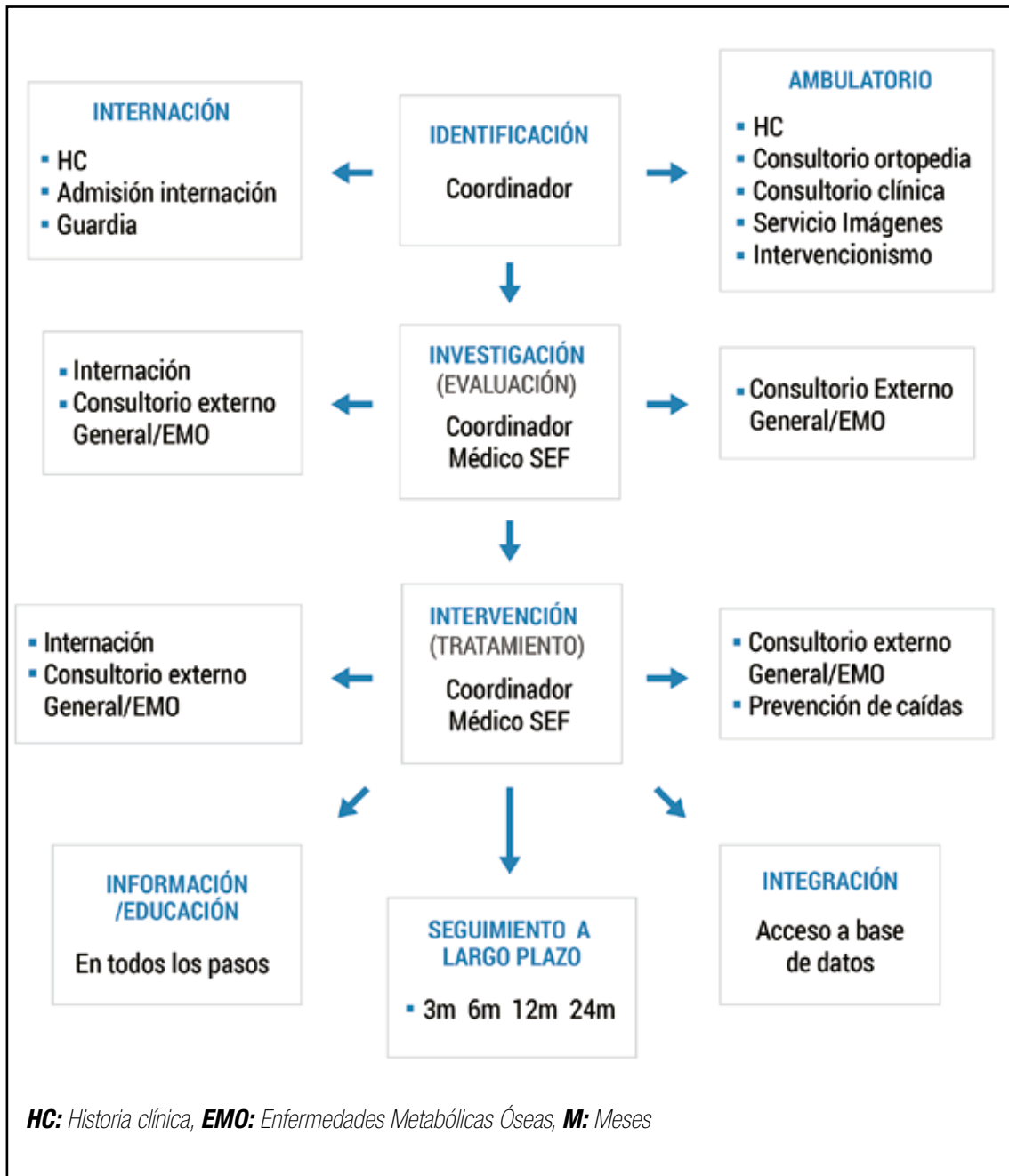


Figura 1. Servicio de Enlace de Fracturas (SEF). Estructura clásica de organización.



**Figura 2.** Organigrama de las principales actividades que se realizan en el Servicio de Enlace de Fracturas: identificación, investigación, informar, intervención, integración y seguimiento alejado.

Es de buena práctica contar con un consejo consultor integrado por miembros de los distintos servicios intervinientes, quienes evalúan la marcha, modifican el programa y supervisan a los miembros ejecutivos.

#### *Control de calidad del servicio de enlace de fracturas*

Para mejorar la calidad del programa a medida que transcurre el tiempo, siguiendo experiencias internacionales, es necesario observar los siguientes ítems:

A. Estimar la adecuada atención del paciente (diagnóstico y tratamiento) mediante el registro en la HC y la base de datos de todos los eventos realizados.

B. Medir el grado de calidad de atención en el diagnóstico y el tratamiento, mediante el control de los estudios (densitometría ósea y bioquímica); asistencia a las consultas (presentismo); iniciación y seguimiento del tratamiento (cuestionarios al paciente y registro de compras en farmacia).

C. Integración armónica del SEF con los



profesionales de la salud de los servicios intervinientes mediante:

- Accesibilidad a la base de datos de todos los profesionales del programa (Campus virtual).
- Disponibilidad de información educativa en el sitio web del SEF (Campus virtual), folletería y artículos impresos.
- Intercambio con los profesionales del SEF en forma directa y horizontal a través del consejo consultor.

D. Encuestas obligatorias a los pacientes que se tratan en el SEF para evaluar la calidad de atención recibida.

E. Se realizará una auditoría interna (consejo consultor) y externa (autoridades institucionales).

F. Inserción en estructuras internacionales que evalúan marcos de calidad como la IOF y la Joint Commission.

## Conclusiones

Los Servicios de Enlace de Pacientes con Fracturas son estructuras autárquicas que

tienen como principal objetivo realizar el *enlace* interservicios (Ortopedia con Medicina Interna, Geriátrica, Endocrinología, etc.) para facilitar el tratamiento a los pacientes mayores de 50 años con fracturas por fragilidad. Estos sistemas han demostrado eficacia para aumentar el inicio del tratamiento luego de una fractura por osteoporosis y mejorar la adherencia. Se ha observado disminución de la morbimortalidad. La relación costo-eficacia es adecuada a mediano plazo pues se evitan nuevas fracturas. La utilidad de los SEF, por todo lo expuesto, es de relevancia y está recomendada su implementación a nivel mundial. El objetivo de este trabajo es difundir la importancia de este tipo de intervenciones en nuestro país.

**Conflicto de intereses:** las autoras declaran no tener conflicto de intereses.

Recibido: diciembre 2018

Aceptado: junio 2019

## Referencias

1. United States Public Health Service. Office of the Surgeon General. Bone health and osteoporosis: A report of the Surgeon General. Rockville, MD.: U.S. Dept. of Health and Human Services Public Health Service Office of the Surgeon General; 2004.
2. Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmo. *Osteoporosis Int* 2000; 11:669-74.
3. Binkley N, Blank RD, Leslie WD, Lewiecki EM, Eisman JA, Bilezikian JP. Osteoporosis in Crisis: It's Time to Focus on Fracture. *J Bone Miner Res* 2017; 32: 1391-94.
4. Khan MA, Hossain FS, Ahmed I, Muthukumar N, Mohsen A predictors of early mortality after hip fracture surgery. *Int Orthop* 2013; 37:2119-24.
5. Abrahamsen B, van Staa T, Ariely R, Olson M, Cooper C. Excess mortality following hip fracture: a systematic epidemiological review. *Osteoporos Int* 2009; 20:1633-50.
6. Magaziner J, Simonsick EM, Kashner TM, Hebel JR, Kenzora JE. Survival experience of aged hip fracture patients. *Am J Public Health* 1989; 79:274-8.
7. Leal J, Gray AM, Prieto-Alhambra D, Arden NK, et al. Impact of hip fracture on hospital care cost: a population-based study. *Osteoporos Int* 2016; 27:549-58.
8. Nielsen KA, Jensen NC, Jensen CM, et al. Quality of care and 30 day mortality among patients with hip fractures: a nation wide cohort study. *BMC Health Serv Res* 2009; 9:186.

9. Katsoulis M, Benetou V, Karapetyan T, et al. Excess mortality after hip fracture in elderly persons from Europe and the USA: the CHANCES Project. *Journal of Internal Medicine* 2017; 281:300-10.
10. Haentjens P, Magaziner J, Colón-Emeric CS, et al. Meta-analysis: excess mortality after hip fracture among older women and men. *Ann Intern Med* 2010; 152:380-90.
11. Schousboe J. Epidemiology of Vertebral Fractures. *J Clinical Densitometry Assessment and Management of Musculoskeletal Health* 2016; 19: 8-22.
12. Lau E, Ong K Kurtz S, Schmier J, Edidin A. Mortality following the diagnosis of a Vertebral Fracture in the Medicare Population. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90:1479-86.
13. Clark P, Cons-Molina F, Deleze M, et al. The prevalence of vertebral deformity in Latin-American Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS). *Osteoporos Int* 2009; 20:275-82.
14. Beratarrechea A, Diehl M, Saimovici J, et al. Mortalidad a largo plazo y factores predictores en pacientes con fractura de cadera. *Actual Osteol* 2011; 7:9-18.
15. Diehl M, Beratarrechea A, Pace N, et al. Disminución del riesgo de mortalidad en pacientes tratados con bifosfonatos luego de una fractura de cadera por osteoporosis. *Actual Osteol* 2013; 9: 154-64.
16. Bagur A, Mautalen C, Rubin Z. Epidemiology of hip fractures in an urban population of central Argentina. *Osteoporos Int* 1994; 4:332-5.
17. Morosano M, Masoni A, Sánchez A. Incidence of hip fractures in the city of Rosario Argentina. *Osteoporos Int* 2005; 16: 1339-44.
18. Claus-Hermsberg H, Lozano Bullrich MP, Pozzo MJ, et al. Incidencia de fracturas de cadera en mujeres afiliadas al plan médico del Hospital Alemán. *Actual Osteol* 2008; 4: 57-62.
19. Cipitria JA, Sosa MM, Pezotto SM, Puche RC, Bocanera R. Outcome of hip fractures among elderly subjects. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57: 530-4.
20. Tran T, Bliuc D, vanGeel T, et al. Population-wide impact of non-hip non-vertebral fractures on mortality. *J Bone Miner Res* 2017; 32: 1802-10.
21. Tran T, Bliuc D, Hansen L, et al. Persistence of excess mortality following individual non-hip fractures: A relative survival analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 103: 3205-14.
22. Fischer S, Kapinos KA, Mulcahy A, Pinto L, Hayden O, Barron R. Estimating the long-term functional burden of osteoporosis-related fractures. *Osteoporos Int* 2017; 28: 2843-2851.
23. Dyer SM, Crotty M, Fairhall N, et al. A critical review of the long-term disability outcomes following hip fracture. *BMC Geriatric* 2016; 16:158.
24. Siggeirsdottir K, Aspelund T, Brynjolfur YJ, et al. Effects of vertebral fractures on function quality of life and hospitalization .the AGES-Reykjavik study. *Age and Aging* 2012; 41:351-57.
25. Fink H, Litwack-Harrison S, Ensrud K, et al. Association of Incident, Clinically Undiagnosed Radiographic Vertebral Fractures With Follow-Up Back Pain Symptoms in Older Men: the Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study. *J Bone Miner Res* 2017; 32: 2263-68.
26. Lyles KW, Schenck AP, Colón-Emeric CS. Hip and other osteoporotic fractures increase the risk of subsequent fractures in nursing home residents. *Osteoporos Int* 2008; 19:1225-33.
27. van Geel TACM, van Helden S, Geusens PP, Winkens B, Dinant G-J. Clinical subsequent fractures cluster in time after first fractures. *Ann Rheum Dis* 2009; 68:99-102.
28. Weaver J, Sajjan S, Lewiecki M, Harrias S, Marvos P. Prevalence and cost of subsequent fractures among U.S. patient with an incident fracture. *J Manag Care Spec Pharm* 2017; 23:461-71.
29. Frederiksen A, Abrahamsen B, Sörensen HA, et al. Danish, national cross-sectional observational study on the prevalence of prior major osteoporotic fractures in adults presenting with hip fracture-limitation and scope for fracture liaison service in prevention of hip fracture. *Osteoporos Int* 2017; 29:109-14.
30. Giangregorio L, Leslie W for de Manitoba Bone Density Program. Time Since Prior Fracture Is



- Modifier for 10-Year Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res* 2010; 25:1400-5.
31. Hopkins R, Burke N, Von Keyserlingk C, et al. The current economic burden of illness of osteoporosis in Canadá. *Osteoporos Int* 2016; 27:3023-32.
  32. British Orthopedic Association/ British Geriatric Society. The care of patients with fragility fracture. London: British Orthopaedic Association; 2007. [www.bgs.org.uk/resources/care-of-patients-with-fragility-fracture-blue-book](http://www.bgs.org.uk/resources/care-of-patients-with-fragility-fracture-blue-book).
  33. Spivacow F, Sánchez A. Epidemiología y costos financieros de la osteoporosis en Argentina. *Actual Osteol* 2010; 6:184-93.
  34. Williamson S, Landeiro F, Mc Connell T, et al. Costs of fragility hip fractures globally: a systematic review and meta-regression analysis *Osteoporos Int* 2017; 28:2791-800.
  35. Center JR, Bliuc D, Nguyen ND, Nguyen TV, Eisman JA. Osteoporosis Medication and Reduced Mortality Risk in Elderly Women and Men. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1006-14.
  36. Lyles KW, Colón-Emeric C, Magaziner Jay S, et al. Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N Engl J Med* 2007; 357:1799-809.
  37. Wells GA, Cranney A, Peterson J, et al. Alendronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Cochrane Data Base Syst Rev* 2008; 23: CD 001155. Doi: 10.1002/14651858.CD001155.pub2.
  38. Beuprev LA, Morrish DW, Hanley DA, et al. Oral bisphosphonates are associated with reduced mortality after hip fracture. *Osteoporosis Int* 2011; 22: 983-91.
  39. BondoL, Eiken P, Abrahamsen B. Analysis of the association between bisphosphonate treatment survival in Danish hip fracture patients-a nationwide register-based open cohort study. *Osteoporos Int* 2013; 24:245-52.
  40. Giangregorio L, Papaioannou A, Cranney A, Zytaruk N, Adachi JD. Fragility fractures and the osteoporosis care gap: an international phenomenon. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 35:293-305.
  41. Greespan SL, Wyman A, Hooven FH, et al. Predictor of treatment with osteoporosis medications after recent fragility fractures in a multinational cohort of postmenopausal women. *J Am Geriatr Soc* 2012; 60: 455-61.
  42. Leslie WD, Giangregorio LM, Yosendan M, et al. A population-based analysis of the post-fracture care gap 1996-2008: the situation is not improving. *Osteoporos Int* 2012; 23:1623-9.
  43. Keshishian A, Boytosov N, Burge R, et al. Examining the treatment gap and risk of subsequent fractures among females with fragility fracture in the US Medicare population. *Osteoporos Int* 2017; 28:2485-94.
  44. McLellan AR, Gallacher SJ, Fraser M, Mc Quillian C. The fracture liaison service: success of a program for the evaluation and management of patients with osteoporotic fracture. *Osteoporos Int* 2003; 14:1028-34.
  45. Cooper MS, Palmer AJ, Seibel MJ. Cost-effectiveness of the Concord Minimal Trauma Fracture Liaison Service, a prospective, controlled fracture prevention study. *Osteoporos Int* 2012; 23: 97-107.
  46. Sander B, Elliot-Gibson V, Beaton DE, Bogoch ER, Moetzel A. A coordinator program in post-fracture osteoporosis management improves out-comes and saves costs. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90:1197-205.
  47. McLellan AR, Wolowacz SE, Zimovetz EA, et al. Fracture liaison service for the evaluation and management of patients with osteoporotic fracture a cost- effectiveness evaluation based on data collected over 8 years of service provision. *Osteoporos Int* 2011; 22:2083-98.
  48. Silverman S. Quality of care in osteoporosis measuring osteoporosis quality: the work of the Joint Commission. *Curr Osteoporos Rep* 2013; 11:354-56.
  49. Javaid MK, Kyer C, Mitchell PJ, et al. IOF Working Group. EXCO. Effective secondary fracture prevention: implementation of a global benchmarking of clinical quality using the IOF



- Capture the Fracture Best Practice Framework tool. *Osteoporos Int* 2015; 26:2573-8.
50. American Society of Bone and Mineral Research. ASBMR Secondary Fracture Prevention Initiative: Coalition Clinical Recommendations. (Septiembre de 2018). <http://www.asbmr.org>.
  51. Gittoes N, McLellan A, Cooper A, et al. Effective Secondary Prevention of Fragility Fractures: Clinical Standards for Fractures Liaison Services- National Osteoporosis Society- Abril 2015. <http://www.nos.org.uk> policy.issues (Septiembre de 2018).
  52. Ganda K, Puech M, Chen JS, et al. Models of care for the secondary prevention of osteoporosis fractures: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 2013 24:393-406.
  53. Osteoporosis New Zealand. Clinical Standards for Fracture Liaison Services in New Zealand. Osteoporosis New Zealand (2016). <http://osteoporosis.org.nz/wp-content/uploads/ONZ-FLS-Clinical-Standards-WEB.pdf>
  54. Wellington Osteoporosis Canada (2014) Quality Standards for Fracture Liaison Services in Canada. Osteoporosis Canada, Toronto. <https://www.osteoporosis.ca/wp-content/uploads/OC-Quality-Standards-ENG-Nov-2014.pdf>
  55. Nakayama A, Major G, Holliday E, Attia J, Bogduk N. Evidence of effectiveness of a FLS to reduce the re-fracture rate. *Osteoporos Int* 2016; 27:873-9.
  56. Huntjens KM, van Gel TA, van der Bergh JP, et al. Fracture liaison services: impact on subsequent non vertebral fracture incidence and mortality. *J Bone Joint Surg Am* 2014; 96:e29.
  57. Astrand J, Nilsson J, Thorgren KG. Screening for osteoporosis reduced new fracture incidence by almost half: a 6-year follow-up of 592 fracture patients from an osteoporosis screening program. *Acta Orthop* 2012; 83: 661-5.
  58. Hawley S, Jadavaid MK, Prieto-Alhmbra et al. REFRESH Study Group. Clinical effectiveness of orthogeriatric and fractures liaison service models of care hip fracture patients: population based longitudinal study. *Age Ageing* 2016; 45: 236-242.
  59. Majumdar SR, Beaupre LA, Harley CH, et al. Use of a case manager to improve osteoporosis treatment after hip fracture: results of a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2007; 167:2110-5.
  60. Ruggiero C, Zampi E, Rinonapoli G, et al. Fracture prevention service to bridge the osteoporosis care gap. *Clin Interv Aging* 2015;10:1035-42.
  61. Hospital Italiano de Buenos Aires. Memoria 2018 Medición HEDIS y Radar de indicadores del cuidado médico tratamiento de osteoporosis período 2007-2017 [http://hiba.hospitalitaliano.org.ar/intranet/sec\\_informacion/conf\\_contenido/Memoria2018.pdf](http://hiba.hospitalitaliano.org.ar/intranet/sec_informacion/conf_contenido/Memoria2018.pdf)
  62. Ganda K, Schaffer A, Pearson S, Seibel MJ. Compliance and persistence to oral bisphosphonate therapy following initiation within a secondary fracture prevention program: a randomized controlled trial of specialist vs. non-specialist management. *Osteoporos Int* 2014; 25:1345-55.
  63. Boudou L, Gerbay B, Chopin F, Ollagnier E, Collet P, Thomas T. Management of osteoporosis in fracture liaison service associated with long-term adherence to treatment. *Osteoporos Int* 2011; 22:2099-106.
  64. Naranjo A, Ojeda-Bruno S, Bilbao-Cantarero A, Quevedo-Abeledo JC, Díaz-Gonzalez BV, Rodríguez-Lozano C. Two-year adherence to treatment and associated factors in a fracture liaison service in Spain. *Osteoporos Int* 2015; 26:2579-85.
  65. Huntjens KM, van Geel TA, Blonk MC, et al. Implementation of osteoporosis guidelines: a survey of five large fracture liaison services in the Netherlands. *Osteoporos Int* 2011; 22:2129-35.
  66. Dell R, Greene D, Scheikun SR, Williams K. Osteoporosis disease management: the role of the orthopaedic surgeon. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90 (Suppl 4):188-94.



67. Department of Health of England (2009). Falls and Fracture: effective interventions in health and social care. In Department of Health (ed) [http://www.laterlifetraining.co.uk/wp-content/uploads/2011/12/FF\\_Effective-Interventions-in-health-and-social-care.pdf](http://www.laterlifetraining.co.uk/wp-content/uploads/2011/12/FF_Effective-Interventions-in-health-and-social-care.pdf)
  68. Dell R, Greene D. Is osteoporosis disease management cost effective? *Current Osteoporosis Report* 2010; 8: 49-55.
  69. Wu CH, Kao IJ, Hung SC, et al. Economic impact and cost-effectiveness of fracture liaison services: a systematic review of the literature *Osteoporosis International*. *Osteoporos Int* 2018; 29: 1227-42.
  70. Trossero A, Beratarrechea A, Diehl M, et al. Programa de prevención secundaria en pacientes con fractura de cadera. *Rev Hosp. Ital. B. Aires* 2011; 31: 131-6.
  71. <https://www.capturethefracture.org/sanatorio-las-lomas> (visto 13 de noviembre de 2018).
  72. Diehl M, Beratarrechea A, Saimovici J, et al. Niveles de Vitamina D en pacientes con fractura de cadera. *Actual Osteol* 2014; 10: 254-63.
  73. Benchimol J, Fiorentini F, Elizondo CM, et al. Institutional Registry of Elderly Patients With Hip Fracture in a Community-Based Tertiary Care Hospital in Argentina (RI AFC). *Geriatr Orthop Surg Rehabil* 2016; 7:121-5.
-

## REPORTE DE CASOS / *Case Report*

# FRACTURAS VERTEBRALES MÚLTIPLES POSTSUSPENSIÓN DE DENOSUMAB. REVISIÓN DEL TEMA A PARTIR DE DOS CASOS CLÍNICOS

Mirena Buttazoni\*, Ana María Galich

Sector Osteopatías Metabólicas, Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear. Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

### Resumen

Los tratamientos para osteoporosis se indican por tiempo variable dependiendo del tipo de droga, anabólica o anticatabólica, y de la gravedad de la enfermedad. Denosumab es un anticuerpo monoclonal totalmente humano que inhibe a RANK-L evitando de esa manera la interacción entre RANKL-RANK, con la consiguiente inhibición de la formación de los osteoclastos, su activación y supervivencia. Disminuye la resorción ósea cortical y trabecular. Su administración subcutánea de 60 mg cada 6 meses al cabo de 3 años ha demostrado reducción de la resorción ósea, incremento de la densidad mineral ósea y disminución de las fracturas vertebrales, no vertebrales y de cadera. Está indicado para el tratamiento de la osteoporosis con alto riesgo de fractura. Su mecanismo de acción es reversible. Se han descrito pérdida de la DMO y elevación de los marcadores de remodelado óseo postsuspensión. Una situación clínica grave son las fracturas vertebrales múltiples postsuspensión. Este evento es infrecuente y se lo atribuye a un rebote del remodelado óseo, postulándose se postula una predisposición especial, probablemente relacionada con microRNA.

Se describen dos mujeres con osteoporosis que presentaron este cuadro. Las fracturas ocurrieron entre 7 y 10 meses posteriores a la última dosis de denosumab. Registraron elevación de C-telopéptidos y disminución de la DMO conjuntamente con las fracturas vertebrales agudas en cascada.

**Palabras clave:** denosumab, fractura vertebral, osteoporosis.

### Abstract

#### **DISCONTINUATION OF DENOSUMAB AND MULTIPLE VERTEBRAL FRACTURES: REPORT OF TWO CASES AND REVIEW OF THE LITERATURE**

*The duration of osteoporosis treatments depends on the drug type, anabolic or anti-catabolic, and the severity of the disease. Denosumab is a fully human monoclonal antibody that inactivates RANK-L, inhibiting the RANKL-RANK interaction. This inhibits osteoclast formation, activation, and survival. It also reduces cortical and trabecular bone resorption. Subcutaneous administration of 60 mg every 6 months for 3 years has reduced bone resorption, increased bone mineral den-*

\*E-mail: [mirena.buttazoni@hospitalitaliano.org.ar](mailto:mirena.buttazoni@hospitalitaliano.org.ar)



sity (BMD) and decreased vertebral, non-vertebral and hip fractures. It is indicated for the treatment of osteoporosis with high risk of fracture. Denosumab mechanism of action is reversible. After discontinuation, loss of BMD and elevation of bone turnover markers have been observed. In addition, multiple vertebral fractures after the suspension of the drug have been reported. These rebound-associated vertebral fractures are rare. A special gene-

tic predisposition related to miRNA has been proposed. Two women with this clinical presentation are described. Fractures occurred between 7 and 10 months respectively after the last dose of denosumab. They presented with an increase in circulating C-telopeptid levels and a decrease in BMD with acute multiple vertebral fractures.

**Keywords:** multiple vertebral fractures, discontinuation denosumab.

## Introducción

Los tratamientos para osteoporosis se indican por tiempo variable dependiendo del tipo de droga, anabólica o anticatabólica, y de la gravedad de la enfermedad. La óptima duración del tratamiento es aún motivo de controversia. Los bifosfonatos (BF) usados desde hace más de 40 años presentan la particularidad de unirse marcadamente a los cristales de hidroxipatita. Por tal motivo, la suspensión de estos se acompaña de persistencia de la actividad por largos años sin modificación desfavorable de la densidad mineral ósea (DMO). El uso prolongado se acompaña de efectos adversos importantes como osteonecrosis de maxilares y fracturas atípicas. En cambio, denosumab (Dmab), un anticuerpo monoclonal totalmente humano que inhibe a RANK-L con la consiguiente inhibición de la formación de los osteoclastos, su activación y sobrevida, tiene una acción reversible. La administración subcutánea de 60 mg cada 6 meses al cabo de 3 años ha demostrado reducción del 86% en los C-telopéptidos séricos (CTX) respecto del placebo, incremento de 9,2% en la DMO de raquis lumbar y 6,0% en cadera total y disminución de 68% de las fracturas vertebrales, 20% de las no vertebrales y 40% de cadera.<sup>1</sup> El uso crónico de Dmab no ha demostrado incremento de infecciones crónicas, celulitis ni eccema. La suspensión luego de varios años de tratamiento se acompaña de pérdida de la DMO y elevación de los marcadores

de remodelado óseo.<sup>2</sup> Esta situación puede acompañarse de fracturas vertebrales múltiples, más que las habituales en los pacientes con osteoporosis.<sup>3</sup> Este rebote del remodelado con fracturas es poco frecuente; se postula una predisposición especial probablemente relacionada con microRNA.<sup>4</sup>

Dada la escasa frecuencia de este evento, comunicamos el cuadro clínico de dos pacientes que recibieron Dmab como tratamiento para su osteoporosis, quienes presentaron después de su discontinuación fracturas vertebrales múltiples (FVM) en cascada conjuntamente con elevación de CTX y disminución de la DMO. Las fracturas ocurrieron entre los 7 y 10 meses posteriores a la última dosis de Dmab.

Los casos clínicos comunicados fueron presentados en la Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral 2016.

**Caso clínico 1:** mujer de 72 años que consultó por osteoporosis en columna lumbar por DMO una década previa. Recibió 3 meses de tratamiento con BP orales y 12 meses de ranelato de estroncio, sin respuesta en la DMO por baja adherencia a ellos debido a intolerancia digestiva. No refería antecedentes familiares ni personales de fracturas por fragilidad. Antecedentes personales: hipertensión arterial e hipercalcemia. Historia ginecológica normal. Hábitos: tabaquista (10 cigarrillos/día), ingesta

regular de calcio dietario (600 mg/día) y moderada actividad física diaria. Al examen físico se observaba peso: 74 kg, talla: 168 cm, índice de masa corporal: 26,2 kg/m<sup>2</sup> y tensión arterial: 120/80 mm Hg. Recibió Dmab 60 mg/semestral por vía subcutánea (5 dosis), colecalciferol 100.000 UI trimestral, indapamida 2,5 mg/d y citrato de calcio 750 mg/día por 2,5 años. Bajo este tratamiento, la paciente

presentaba las determinaciones bioquímicas correspondientes al metabolismo mineral y óseo en rango de referencia.

Debido a la mejoría de la DMO de osteoporosis a rango de osteopenia, 4,8% en columna lumbar (CL) y 5% en cadera total (CT) (Tabla 1) se decidió suspender Dmab y administrar ácido zoledrónico 5 mg (AZ5), que la paciente no recibió por problemas personales.

**Tabla 1.** Variación de la DMO (GE-Lunar Prodigy®) bajo denosumab y luego de discontinuación del tratamiento en caso 1.

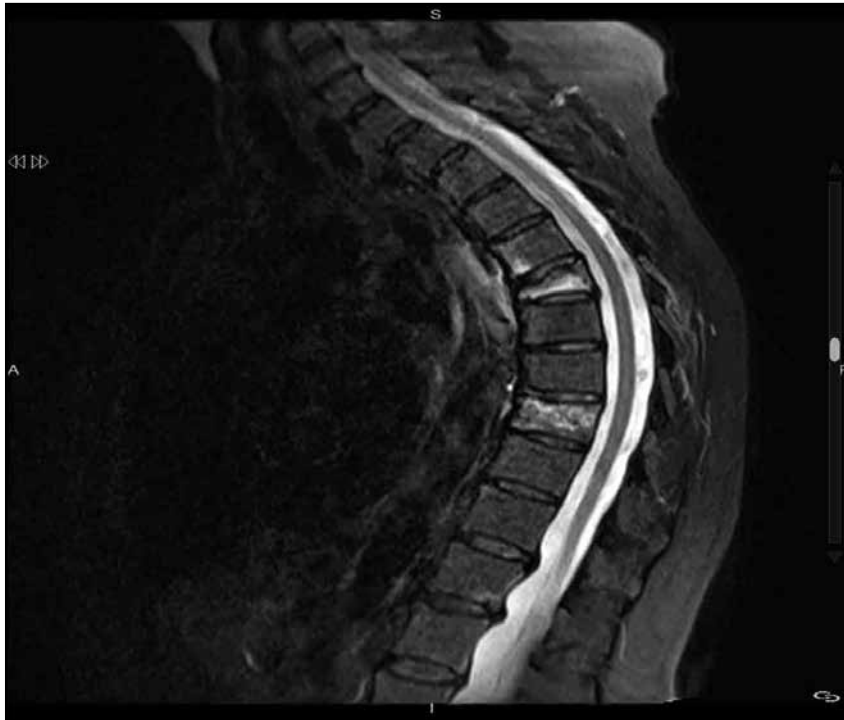
	Pre-Dmab	Bajo Dmab (5 dosis)	Variación	Postsuspensión Dmab (7meses)	Variación
<b>L1-L4 g/cm<sup>2</sup></b>	0,886	0,929	+4,8%	0,895	-3,6%
<b>T-score</b>	-2,5	-2,1		-2,4	
<b>Cuello g/cm<sup>2</sup></b>	0,854	859	=	865	=
<b>T-score</b>	-1	-1		-1	
<b>Fémur total g/cm<sup>2</sup></b>	0,792	0,832	+5%	0,804	-3,3%
<b>T-score</b>	-1,7	-1,4		-1,6	

Siete meses posteriores a la última dosis de Dmab presentó dorsalgia aguda, de intensidad 10/10. La resonancia nuclear magnética (RNM) de columna dorsal sin contraste mostró acúñamientos con edema óseo a nivel de vértebras dorsales (D6 y D9). Fue tratada con vertebroplastia con mejoría parcial (intensidad 7/10) y transitoria del dolor.

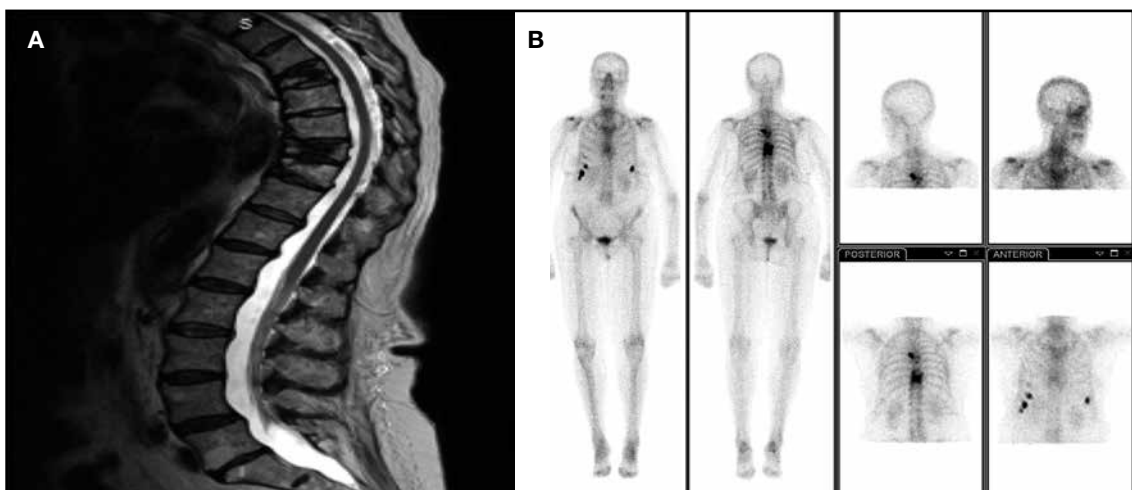
Dos meses después, por incremento del dolor, una nueva RNM confirmó la aparición de otras fracturas vertebrales (D10, D5, D8). El centellograma óseo evidenció hipercaptación en 4 vértebras dorsales coincidentes con RNM y a nivel costal (Figuras 1 y 2 A-B). El laboratorio mostró alto remodelado óseo: fosfatasa alcalina total (FAL): 144 UI/ml (VN: hasta 100 UI/ml), CTX 1100 pg/ml (VN: hasta 570 pg/ml) y fosfatasa alcalina ósea (FAO): 25,6 UI/ml (VN: hasta 14 UI/ml). La DMO 7 meses des-

pues de la última dosis de Dmab descendió en CL: 3,6% y en CT: 3,3%. Se descartaron causas secundarias de osteoporosis. Se indicó AZ5, sin mejoría rápida del dolor. Cedió a los 2 meses. Descendió 6 cm de talla y deterioró su calidad de vida. No presentó nuevas fracturas a los 12 meses del AZ5.

**Caso clínico 2:** mujer de 61 años que consultó por lumbalgia posterior a esfuerzo mínimo. Se constataron fracturas vertebrales múltiples por radiografías y RNM de raquis. A los 47 años, edad de su menopausia, se le diagnosticaron hipercalcemia leve, que fue tratada con tiazidas, y osteoporosis vertebral. Presentaba antecedentes maternos de dicha enfermedad. Fue tratada durante 9 años consecutivos con BP (inicialmente alendronato 70 mg semanales y los 2 últimos años con ibandronato 150 mg mensuales).



**Figura 1.** Paciente (caso 1) con fracturas vertebrales múltiples luego de 7 meses de suspensión del denosumab. Se advierte en la RMN edema y acúñamiento de D6 y D9.



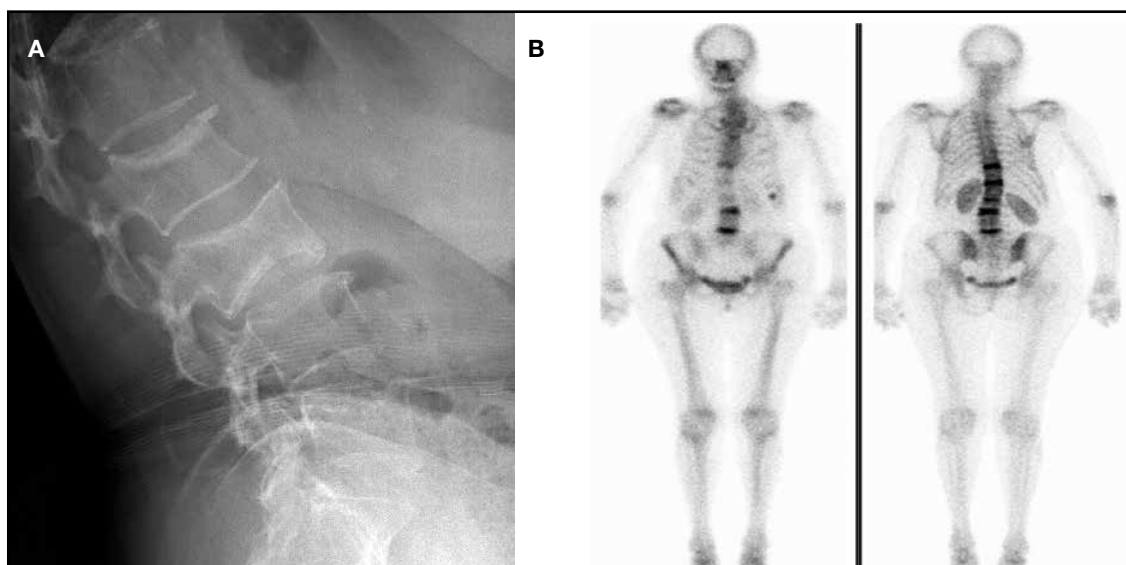
**Figura 2.** Paciente (caso 1) con fracturas vertebrales múltiples luego de 9 meses de suspensión del denosumab. **A.** Se advierte en RMN cementación de D6-D9 y nuevas fracturas en D5-D8-D10 contiguas a las citadas. **B.** En el centellograma óseo con tecnecio 99 se observa hipercaptación a nivel de columna dorsal y en ambas parrillas costales.



Por no presentar mejoría en la DMO inició Dmab 60 mg semestrales por vía subcutánea durante 2,5 años. Se suspendió al alcanzar osteopenia. A los 10 meses de la suspensión presentó las fracturas vertebrales agudas: dorsales 10 y 12 y lumbares 1, 2 y 3 con la consiguiente pérdida de 6 cm de su estatura (Figura 3 A y B).

Los datos bioquímicos posfractura evidenciaron elevación de CTX y descenso de la DMO respecto de la previa. Se indicó BP por vía intravenosa (ibandronato 3 mg), que recibió con buena tolerancia. No repitió episodios de fracturas.

En la tabla 2 se muestra resumen comparativo de ambos casos.



**Figura 3.** Paciente (caso 2) con fracturas vertebrales múltiples luego de 10 meses de suspensión del denosumab. **A.** Se observan en radiografía simple de columna lumbar fracturas L2 y L3. **B.** En el centellograma óseo con tecnecio 99 se observa hipercaptación a nivel dorsal y lumbar (5 vértebras).

### Discusión

El denosumab es un anticuerpo monoclonal humano, una IgG2 que inactiva al ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa\beta$  (RANK-L), aprobado por la agencia de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA, del inglés Food and Drug Administration) para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica en junio de 2010. Está disponible en nuestro país para el uso clínico desde mayo de 2012.

Es un potente inhibidor de la resorción ósea y disminuye el riesgo de fractura vertebral, no vertebral y de cadera.<sup>5</sup>

Los efectos del Dmab sobre la DMO y el re-

modelado óseo se pierden con su suspensión debido a su mecanismo de acción reversible. A diferencia de los BP, no se incorpora a la matriz ósea.<sup>6</sup>

Hemos evaluado a dos pacientes sin fracturas osteoporóticas previas con evidencia bioquímica de alto remodelado óseo posterior a la suspensión de Dmab y desarrollo de 5 fracturas vertebrales agudas en cascada en cada paciente. En ambos casos se descartaron causas secundarias de osteoporosis.

Este cuadro es una situación grave por el intenso dolor y las alteraciones somáticas relacionadas con la pérdida aguda y significativa



**Tabla 2.** Resumen de los casos clínicos de pacientes con fracturas vertebrales múltiples postsuspensión del denosumab.

	<b>Caso 1</b>	<b>Caso 2</b>
<b>Edad (años)</b>	72	61
<b>Dosis Dmab (n)</b>	5	5
<b>Fracturas previas</b>	no	no
<b>Bifosfonatos previos</b>	no	sí
<b>Hiper calciuria</b>	sí	sí
<b>DMO basal</b>	osteoporosis	osteoporosis
<b>RMN (vértebras fracturadas)</b>	5	5
<b>Centellograma óseo (vértebras hipercaptación)</b>	4	5
<b>CTX bajo Dmab (VN: hasta 570 pg/ml)</b>	197	64
<b>FAL bajo Dmab (V: hasta 100 UI/ml)</b>	68	50
<b>Calcemia bajo Dmab (VN: 8,5-10,5 mg/dl)</b>	9,3	9,3
<b>CTX sin Dmab (pg/dl)</b>	1100	660
<b>FAL sin Dmab (UI/ml)</b>	144	118
<b>Calcemia sin Dmab (mg/dl)</b>	10,1	10,3

CTX: C-telopéptidos séricos, FAL: fosfatasa alcalina total.

de la talla; sin embargo, el rebote del remodelado óseo con fracturas es poco frecuente.

Anastasilakis y col. han reportado 24 pacientes con FVM postsuspensión de Dmab desde 2015.<sup>7-9</sup> Todas las pacientes fueron de sexo femenino probablemente porque es la población más tratada y porque presentan mayor deterioro del hueso trabecular respecto de los hombres.

En el estudio FREEDOM, un grupo de pacientes que discontinuaron el tratamiento luego de la 2.<sup>a</sup> a la 5.<sup>a</sup> dosis no presentaron diferencias respecto del placebo en la incidencia de nuevas fracturas (13,5/100 personas/año-placebo vs. 9,7/100 personas/año-Dmab en 2 años). Al analizar el tipo de fracturas vertebrales en la rama de Dmab se observaron con mayor frecuencia FVM clínicas (60,7%) vs. placebo 34,5%.<sup>10</sup>

En el mismo estudio FREEDOM, al año de

suspensión de Dmab se observó aumento del remodelado y descenso de la DMO (6,6% en CL y 6,1% en CT). La mayor pérdida fue en el primer año (25% en CL y 100% en CT).<sup>10</sup>

Nuestras pacientes presentaron un cuadro similar al descrito en la literatura: fracturas vertebrales múltiples (5 fracturas cada una en un período de 3 meses) y los aplastamientos sucedieron entre 6 y 12 meses luego de la última dosis de Dmab. También recibieron 5 dosis de Dmab como las pacientes reportadas por la literatura.<sup>11</sup>

La paciente 1 presentó 2 fracturas contiguas después de la vertebroplastia. Se ha descrito mayor riesgo de fracturas vertebrales en las adyacentes a las vértebras cementadas en este grupo de pacientes, por lo cual se contraindica dicho procedimiento para esta patología.<sup>8</sup>

En nuestro caso, el procedimiento se realizó antes de la descripción de este cuadro. La

DMO, durante el tratamiento, presentó buena respuesta y después de la suspensión de la droga descendió, en 6 meses, a niveles basales demostrando la pérdida acelerada, en coincidencia con el aumento del remodelado óseo.

El mecanismo propuesto es la expansión del *pool* de precursores de osteoclastos que se activan simultáneamente o un alto índice RANK-L/OPG después de la desaparición del efecto del Dmab. En este contexto se observa aumento del número y profundidad de las lagunas de resorción, con adelgazamiento y perforación trabecular. Se produce acumulación del microdaño en el hueso trabecular y aumenta la fatiga del tejido ante las cargas fisiológicas.<sup>8</sup>

En coincidencia con otros autores consideramos que es escasa la población que presenta este fenómeno de fracturas por rebote luego de la suspensión de Dmab: se trataría de un subgrupo con una biología ósea característica.

Recientemente, Anastasilakis y col. evaluaron pacientes con FVM postsuspensión de Dmab y hallaron aumento en las vías de regulación de la osteoclastogénesis (evaluada por análisis de microRNA) comparándolas con pacientes sin fracturas postsuspensión de Dmab y con mujeres con fracturas vertebrales sin tratamiento.<sup>4</sup>

Hasta el presente no hay evidencias de cuáles son los tratamientos para realizar luego de la suspensión de Dmab. En este trabajo se observó que los pacientes que recibieron BP antes o 6 meses después de la última inyección de Dmab tenían menor rebote de los CTX.<sup>8</sup>

Se recomienda mantener estrictamente la dosis semestral del Dmab y no realizar vacaciones de la droga como está indicado en el tratamiento prolongado con BP.

En presencia de FVM proponemos tratamiento con altas dosis de BP o reiniciar Dmab. El interrogante que se plantea es cuándo iniciar los BP y cuál de ellos utilizar. En el trabajo de Reid y col., AZ5 fue recibido a los 6 meses de la última dosis de Dmab. Preservó parcialmente la masa ósea, pero se destaca que la DMO se evaluó a los 18-23 meses.<sup>12</sup>

Horne y col. sugieren iniciar BP vía oral a los 6 meses de última de la dosis de Dmab y BP por vía intravenosa (AZ5) alrededor de los 7-8 meses de la última dosis y repetir al año. De esta manera, las unidades de remodelado óseo estarán menos inhibidas y la captación esquelética será mayor.<sup>13</sup>

El grupo de Lausanne, Suiza, realizó una serie de recomendaciones para considerar luego de la suspensión del Dmab. El objetivo es mantener los marcadores de resorción ósea (CTX), en rango de la mujer premenopáusica. Sugieren las siguientes estrategias: si se indican BP orales (alendronato 70 mg/semana), iniciarlos a los 6 meses de la última dosis de Dmab y controlar los CTX a los 2 meses. Si los valores son < 600 ng/l, continuar los controles de CTX bimestrales. Si se opta por BP por vía intravenosa, a partir de los 6 meses de la última dosis de Dmab controlar mensualmente CTX. Si estos son > 200 ng/l, indicar AZ5 y controlar los marcadores óseos en forma trimestral. Si los CTX ascienden a más de 600 ng/l, realizar una segunda infusión.<sup>14</sup>

Todavía no se conoce el tiempo de tratamiento con BP después de Dmab para evitar el rebote que, se conoce, es mayor en el primer año posterior a la suspensión.

## Conclusión

Denosumab es un tratamiento eficaz y seguro que permite una mejoría importante de la DMO y la consiguiente reducción de fracturas. La rápida reversión de estos efectos luego de discontinuarlo y el riesgo de fracturas vertebrales agudas hacen imprescindible que la comunidad médica se preocupe por educar a los pacientes en la adherencia debido a que este efecto grave, que altera la calidad de vida de los pacientes, surge del manejo inadecuado de la suspensión.

**Conflicto de intereses:** las autoras declaran no tener conflicto de intereses.

Recibido: marzo 2019

Aceptado: julio 2019



## Referencias

1. Cummings SR, San Martín J, Mc Clung MR, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2009; 361(8):756-65.
2. Roux C, Briot K. How long should we treat? *Osteoporos Int* 2014; 25(6):1659-66.
3. de Villiers TJ, Gass ML, Haines CJ, et al. Global consensus statement on menopausal hormone therapy. *Climacteric* 2013; 16(2):203-4.
4. Anastasilakis AD, Yavropoulou MP, Makras P, et al. Increased osteoclastogenesis in patients with vertebral fractures following discontinuation of denosumab treatment. *Eur J Endocrinol* 2017; 176(6):677-83.
5. Miller PD. A review of the efficacy and safety of denosumab in postmenopausal women with osteoporosis. *Ther Adv Musculoskel Dis* 2011; 3(6):271-82.
6. Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK, et al. Effects of denosumab treatment and discontinuation on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women with low bone mass. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(4):972-80.
7. Aubry-Rozier B, González-Rodríguez E, Stoll D, Lamy O. Severe spontaneous vertebral fractures after denosumab discontinuation: three case reports. *Osteoporos Int* 2016; 27(5):1923-5.
8. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Makras P, Aubry-Rozier B, Kaouri S, Lamy O. Clinical features of 24 patients with rebound-associated vertebral fractures after denosumab discontinuation: systematic review and additional cases. *J Bone Miner Res* 2017; 32(6):1291-6.
9. Popp AW, Zysset PK, Lippuner K. Rebound-associated vertebral fractures after discontinuation of denosumab from clinic and biomechanics. *Osteoporos Int* 2016; 27(5):1917-21.
10. Brown JP, Roux C, Torring O, et al. Discontinuation of denosumab and associated fracture incidence: analysis from the Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis Every 6 Months (FREEDOM) trial. *J Bone Miner Res* 2013; 28(4): 746-52.
11. Lamy O, González-Rodríguez E, Stoll D, Hans D, Aubry-Rozier B. Severe rebound-associated vertebral fractures after denosumab discontinuation: nine clinical cases report. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 102(2):354-8.
12. Reid IR, Horne AM, Mihov B, Gamble GD. Bone loss after denosumab: Only partial protection with zoledronate. *Calcif Tissue Int* 2017; 101(4): 371-374.
13. Horne A M, Mihov B, Reid IR. Bone loss after romosozumab/denosumab: effects of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 2018; 103(1):55-61.
14. Lamy O, González-Rodríguez E, Stoll D, Aubry-Rozier B, Livio F. Multiple Vertebral Fractures after Denosumab Discontinuation: How to Avoid Them? *Praxis* 2018; 107(12):649-54.

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

El envío de un artículo a **Actualizaciones en Osteología** es considerado como una declaración tácita de que no ha sido enviado a evaluar al mismo tiempo o aceptado para su publicación en otro medio. En las directrices para la preparación de manuscritos, **Actualizaciones en Osteología** sigue los requisitos del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE) en la versión más reciente disponible en <http://www.icmje.org>.

Los manuscritos deben ser preparados usando Word, hoja A4 con márgenes de al menos 20 mm, espacio simple, en tipografía Arial 10 u otra de tamaño similar. El manuscrito **-en español o en inglés-** debe enviarse por correo electrónico a [actualizaciones@osteologia.org.ar](mailto:actualizaciones@osteologia.org.ar). Las páginas deben estar numeradas consecutivamente empezando por la que incluye el título. Abreviaturas y símbolos: sólo se deberán utilizar abreviaturas estándares, evitando su uso en el título y en el resumen.

*Los manuscritos que no se ajusten a los requisitos de **Actualizaciones en Osteología**, incluidos su organización, estructura y figuras serán devueltos a los autores sin revisión.*

La **primer página** debe contener: (a) Título del trabajo en español e inglés, (b) título abreviado para el encabezado de página, (c) nombre completo de los autores **-subrayado el apellido-**, (d) nombre de las instituciones en la cual se desempeña cada autor, (e) dirección de correo electrónico de un autor, (f) sección de la revista a la que corresponde el artículo y (g) conflicto de intereses.

Las secciones de la revista son: **Artículos Originales, Actualizaciones, Comunicaciones Breves, Casuísticas, Editoriales, Cartas al Editor.**

Los **Artículos Originales** deben ser divididos en Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión. Los títulos deben estar escritos en letra negrita. La extensión máxima del texto recomendado es de 5.000 palabras y hasta 5 figuras y 5 tablas. Se sugiere no incluir más de 50 referencias. Las **Actualizaciones** tienen una extensión máxima recomendada de 6.000 palabras y hasta 5 figuras y 5 tablas. Se sugiere no incluir más de 60 referencias. Para las **Comunicaciones Breves** y **Casuísticas** se sugiere un máximo de 3.000 palabras de extensión y hasta 4 figuras y 4 tablas. Se sugiere no incluir más de 30 referencias. La **Casuística** deben contener las siguientes secciones: Introducción, Caso Clínico y Discusión.

Para cualquier tipo de artículo mencionado anteriormente, se debe incluir un **resumen en español y en inglés** sin incluir tablas o figuras, cada uno con una extensión máxima de 250 palabras. Además, se requieren de 3 a 6 palabras clave en inglés y español.

## AUTHOR GUIDELINES

Submission of a manuscript to "**Actualizaciones en Osteología**" is regarded as a tacit declaration that has not been submitted at the same time or accepted for publication elsewhere. In the guidelines for the preparation of manuscripts, "**Actualizaciones en Osteología**" follows the requirements of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) in the most recent version available in <http://www.icmje.org>.

Manuscripts should be prepared using Word on A4 paper with margins of at least 20 mm, simple spacing, in letter font type Arial 10, or other of a similar size. The manuscript **-in Spanish or in English-** should be submitted by email to [actualizaciones@osteologia.org.ar](mailto:actualizaciones@osteologia.org.ar). Pages must be consecutively numbered starting with the title page. Units of measurement: metric units should be used, with decimal points. Abbreviations and Symbols: only standard abbreviations should be used, avoiding them in the title and abstract.

*Manuscripts that do not conform to "**Actualizaciones en Osteología**" requirements, including requirements for manuscript organization, format, and figure will be returned to the authors without review.*

The **first page** must contain: (a) title of the work in Spanish and English, (b) abbreviated title for running head, (c) complete name of the authors **-the latter must be underlined-**; (d) name of the institutions in which they work, (e) address and email of the corresponding author, (f) section of the journal to which paper corresponds; (g) conflict of interest.

The journal sections include: **Original Articles, Reviews, Brief Communications, Case Reports, Editorials, Letters to the Editor.**

**Original Articles** should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. Titles must be written in bold type. The recommended maximum text extension is 5,000 words and up to 5 figures and 5 tables will be accepted. It is suggested not to include more than 50 references. **Reviews** have a recommended maximum text extension of 6,000 words and up to 5 figures and 5 tables will be accepted. It is suggested not to include more than 60 references. **Brief Communications** and **Case Reports** should have a recommended maximum of 3,000 words of text extension and up to 4 figures and 4 tables will be accepted. It is suggested not to include more than 30 references. **Case Reports** should be divided into Introduction, Clinical Case and Discussion.

For all type of article described previously, a **250-word Abstract in Spanish and in English**, not including tables or figures, must also be included. Also, 3 to 6 key words in English and Spanish are required. Authors who are not fluent in Spanish and,



En los **Artículos Originales** y **Casuísticas** detallar la solicitud de consentimiento informado. Además se solicita se indiquen las normas y directrices éticas y los métodos estadísticos utilizados (Originales).

Para las **Cartas al editor** y **Editoriales** se sugiere un máximo de 1.000 palabras y se admitirán para las Cartas al Editor hasta 2 figuras o tablas. Se sugiere no incluir más de 10 referencias. **Agradecimientos:** la ayuda técnica, el apoyo financiero y las contribuciones que no justifican la autoría se pueden enumerar en este ítem. **Conflicto de intereses:** los autores deben revelar cualquier relación financiera que podría conducir a un conflicto de intereses en relación con el artículo publicado.

Las **referencias** deben ser numeradas consecutivamente. Usar números en superíndices para indicar las referencias en el texto. Para las referencias seguir los siguientes ejemplos:

1. Revistas: Todos los autores serán incluidos si son seis o menos; si hay más de seis, el tercero será seguido de "et al". Los títulos de las revistas deben abreviarse de acuerdo con el estilo usado en el Index Medicus (disponible en <http://www.nlm.nih.gov>). Los nombres de las revistas deben ir en itálica. Ejemplo: T Diab, Wang J, S Reinwald, Guldborg RE, Burr DB. Efectos de la combinación de tratamiento de raloxifeno y alendronato en las propiedades biomecánicas de hueso vertebral. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 270-6.
2. Capítulo de libro: Rigalli A. Eutanasia. En: Rigalli A, Di Loreto VE (eds). *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2009, p. 31-2.
3. Sitios Web: Organización Mundial de la Salud (OMS). The Stop TB Web Alert. (2000, Dec 6) <http://www.stoptb.org/updates/index.html>

Las **Tablas** con sus respectivos títulos explicativos se presentarán al final del manuscrito numeradas en números arábigos. Deben ser indispensables y comprensibles por sí mismas. No se utilizarán líneas verticales entre las columnas y sólo se emplearán líneas horizontales en los siguientes casos: parte superior de la tabla, parte inferior del encabezado de la tabla y final de la tabla. En el texto manuscrito se indicará la ubicación aproximada con la leyenda "Insertar Tabla aquí".

Las **Figuras** deben ser presentadas separadamente del texto. El manuscrito sólo incluirá una leyenda explicativa. El formato requerido de imágenes es ".jpg o .tif" en calidad no menor de 300 dpi de resolución. No se aceptarán imágenes en archivos de Word ni Power Point. En las micrografías se debe indicar la escala o el aumento que se usó. Tener en cuenta que en la versión *on line* la imagen se mostrará a color, mientras que en la versión impresa se observará en escala de grises. En el manuscrito se indicará la ubicación aproximada con la leyenda "Insertar Figura aquí".

therefore, are not able to include the abstract and keywords in this language, can submit the manuscript without them.

In **Original papers** and **Case Reports** record informed consent by patients. Ethical standards and guidelines followed will be indicated and statistical methods will be described (in Originals).

**Letters to the editor** and **Editorials** have a recommended maximum of 1000 words and for Letters to the editor up to 2 figures or tables will be accepted. It is suggested not to include more than 10 references.

**Acknowledgments:** technical assistance, financial support, and contributions that do not justify authorship may be listed. **Conflict of interest:** authors must disclose any financial relationship that could lead to a conflict of interest in relation to the published article.

**References** should be numbered consecutively. Use superscript numerals for references in the text. References should be mention according to the following examples:

1. Journals: All authors will be included if they are six or less; if more than six, the third one will be followed by "et al". The titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus (also available in <http://www.nlm.nih.gov>). The names of journals should be in italics. Example: Diab T, Wang J, Reinwald S, Guldborg RE, Burr DB. Effects of the combination treatment of raloxifene and alendronate on the biomechanical properties of vertebral bone. *J Bone Miner Res* 2011; 26:270-6.
2. Books chapter: Rigalli A. Euthanasia. In: Rigalli A, Di Loreto VE (eds). *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Boca Raton, Florida: CRC press, 2009, p. 31-2.
3. Web sites: World Health Organization (WHO). The Stop TB Web Alert. (2000, Dec 6) <http://www.stoptb.org/updates/index.html>

**Tables** and its legends will be presented at the end of the manuscript numbered in Arabic numerals. They should be indispensable and comprehensible by themselves. No vertical lines between columns and horizontal lines will be used, except in general three lines: one separating the Table title, another for the headings of the rest, and the last one indicating the end of the Table. The manuscript text will indicate the approximate location with the legend "Insert Table here".

**Figures** should be submitted separately from the text. The manuscript text will only include an explanatory legend. The required format of images is ".jpg or .tif" no less than 300 dpi resolution. Images in Word files will not be accepted. In the micrographs the scale or magnification used must be indicated. *Take into account that while in the online version the image is shown in color, in the printed version it will be presented in grayscale.* The manuscript text will indicate the approximate location with the legend "Insert Figure here".



Todos los artículos publicados en **Actualizaciones en Osteología** están sujetos a revisión por pares. La revisión se hace por un editor y al menos dos revisores con amplia experiencia en el tema. La identidad de los autores y revisores se mantiene confidencial. El editor devolverá a los autores, sin pasar por el proceso de arbitraje aquellos manuscritos que no se ajusten a las normas de preparación o que no coincidan con los propósitos de **Actualizaciones en Osteología**. El tiempo de evaluación dura entre 30 y 60 días. El autor será notificado por correo electrónico de la aceptación (con o sin correcciones) o rechazo del manuscrito. La decisión es definitiva sin posibilidad de apelar. El Comité Editorial se reserva el derecho de introducir, con conocimiento de los autores, todos los cambios de redacción necesarios de acuerdo a reglas gramaticales y de diseño. Los trabajos aceptados serán devueltos a los autores con las modificaciones solicitadas y se les concederá un periodo no mayor de 30 días para el envío de la versión corregida. Después de la aceptación y el diseño del artículo, los autores dispondrán de 72 horas para revisar la prueba de galera.

## **POLÍTICAS EDITORIALES**

**Actualizaciones en Osteología** es una revista de Acceso Abierto.

**Costo de publicación:** La publicación de artículos no tiene costo con excepción de las imágenes a color en caso de que esto sea requerido por los autores.

**Derechos de autor.** Actualizaciones en Osteología es la publicación oficial de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM) que posee los derechos de autor de todo el material publicado en dicha revista.

**Responsabilidades éticas.** Cuando se describan experiencias en seres humanos, los autores deberán indicar si los procedimientos realizados siguieron las normas éticas de un comité institucional o regional en la experimentación con seres humanos, y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki. Los autores también enviarán el modelo de consentimiento informado utilizado para el estudio. Cuando se describen experimentos con animales, se debe indicar si se siguieron los lineamientos de un Comité o Consejo sobre el cuidado y uso de animales de experimentación.

**Duplicación/publicación redundante.** Los autores son responsables de asegurar que el manuscrito -incluyendo todos los datos, figuras y tablas- no ha sido publicado anteriormente. Además, es responsabilidad de los autores asegurar que el manuscrito no ha sido, ni será, sometido a evaluación por otra revista mientras está bajo revisión por Actualizaciones en Osteología. Los artículos originales que proporcionan nuevos datos de los estudios que han sido objeto de publicaciones anteriores deben evitar la superposición de los mismos y los autores deberán enviar información sobre todas las publicaciones previas al Editor responsable.

All articles published in **Actualizaciones en Osteología** are subject to peer review. The review is made by an Editor and at least two reviewers with extensive experience in the particular subject. The identity of the authors and reviewers is kept confidential. The Editor will return to the authors, without going through the arbitration process those manuscripts that do not conform to the standards of preparation or that do not match the purposes and orientation of **Actualizaciones en Osteología**. Evaluation time takes between 30 and 60 days. The corresponding author will be notified by email on the acceptance (with or without corrections) or rejection of the manuscript. This decision is final. The Editorial Committee reserves the right to introduce, to the authors' knowledge, all editorial changes required by grammatical rules and layout needs. Accepted papers will be returned with modifications to authors for any corrections and they will be granted a return period of not more than 30 days. After acceptance and layout, authors will be awarded 72 hours to review the galley proof.

## **EDITORIAL POLICIES**

**Actualizaciones en Osteología** is an Open Access Journal.

**Page Fees:** No charge for publication is required except for color figures if requested by authors.

**Copyright.** Actualizaciones en Osteología is the official journal of the Argentinean Association of Osteology and Mineral Metabolism (AAOMM), which holds copyright to all material published in the Journal.

**Ethical responsibilities.** When experiments performed in humans are described, authors must indicate whether the procedures performed followed ethical standards of the (institutional or regional) committee on human experimentation, and in accordance with the World Medical Association and the Declaration of Helsinki. Authors must also send the informed consent model used for the study. When animal experiments are described, it should be indicated whether guidelines of an institution or research council on care and use of laboratory animals were followed.

**Duplicate/Redundant Publication.** The corresponding author is responsible for ensuring that the manuscript -including all data, figures, tables, and supplementary materials- has not been previously reported or published. Further, it is the responsibility of the corresponding author to ensure that the manuscript has not been, and will not be, submitted to another journal while under review by Actualizaciones en Osteología. Original Articles providing new data from studies that have been the subject of previous publications must avoid data overlap and authors must provide information on all previous publications to the Editor-in-Chief.



**A.A.O.M.M.**

(Asociación Argentina de Osteología  
y Metabolismo Mineral)