

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLÓGÍA

Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral

VOL. 13, Nº 1 - enero / abril 2017

Indizada en EBSCO, Latindex, LILACS, SciELO, Scopus & Embase y SIIIC 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

10 años de crecimiento y publicaciones ininterrumpidas sobre metabolismo óseo y mineral

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.



Natalia Sánchez Valdemoros
"La reina", óleo sobre lienzo, 60 x 60 cm, 2016.
Colección Zurbarán

VOL. 13, Nº 1
enero /abril 2017
ISSN 1669-8975 (Print); ISSN 1669-8983 (Online)
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. 13, Nº 1

enero / abril 2017

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

www.osteologia.org.ar

Rosario (Santa Fe), Argentina

Aparición: cuatrimestral

Editores responsables:

Luisa Carmen Plantalech: Sección Osteopatías Metabólicas. Servicio de Endocrinología y Metabolismo. Hospital Italiano de Buenos Aires. Juan D Perón 4190, Ciudad de Buenos Aires (C1181ACH), Argentina.

Lucas R. M. Brun: Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Santa Fe 3100 (2000). Rosario, 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 / 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 de manuscritos 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).

Esta 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 con excepción del uso comercial. Sin embargo, los derechos de propiedad intelectual deben ser reconocidos, y para ello, cualquier reproducción de los contenidos de cualquier artículo de la revista debe ser debidamente referenciado, indicando la autoría y la fuente bibliográfica.

El contenido y las opiniones expresadas en los manuscritos son de entera responsabilidad del(de 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).

This is an Open Access journal. All content is freely available without charge. Users are allowed to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full text of the articles in this journal without asking prior permission from the publisher or the author except for commercial use. However, intellectual rights should be acknowledged, and to that purpose, any reproduction of the contents of any article of this Journal should be duly referenced, stating the authorship and the bibliographical source.

The content and opinions expressed in published articles are responsibility of the authors.

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Publicación de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

EDITORES RESPONSABLES

Luisa Carmen Plantalech

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

editora-responsable@osteologia.org.ar

Lucas R. M. Brun

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

editor-responsable@osteologia.org.ar

EDITORES ASOCIADOS

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.

SECRETARIAS DE REDACCIÓN

María Lorena Brance

Centro de Reumatología, Rosario, Argentina. redaccion@osteologia.org.ar

Mirena Buttazzoni

Sección Osteopatías Metabólicas. Servicio de Endocrinología y Metabolismo. Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina. redaccion@osteologia.org.ar

ASISTENTES COMITÉ EDITORIAL

Manuel Rebón

Licenciado en Ciencias de la Comunicación y Magister en Comunicación y Cultura de la Facultad de Ciencias Sociales, UBA.

Prof. María Isabel Siracusa

Correctora de textos.

CUERPO EDITORIAL

Alicia Bagur

MAUTALEN, Salud e Investigación. 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.

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 Hermeberg

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 (CEMFoC). Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina.

Ana María Galich

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

Diana González

MAUTALEN, Salud e Investigación. 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.

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). Argentina.

Carlos Mautalen

MAUTALEN, Salud e Investigación. 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). Argentina.

Hans L Porias Cuéllar

Nuevo Sanatorio Durango. México.

Rodolfo Puche

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de 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). Argentina.

Emilio Roldán

Departamento de Investigaciones Musculoesqueléticas, Instituto de Neurobiología (IDNEU). Dirección Científica, Gador SA. Argentina.

Ana Russo de Boland

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

Nori Tolosa de Talamoni

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

José R. Zanchetta

Instituto de Investigaciones Metabólicas (IDIM), Argentina.



**AUTORIDADES DE AAOMM
COMISIÓN DIRECTIVA 2016-2017**

Presidente

Dra. Cristina Tau

Vicepresidente

Dra. Susana Zeni

Secretaria

Dra. Paula Rey

Tesorera

Dra. María Diehl

Vocales

Dra. María Lorena Brance

Dra. Mirena Buttazoni

Bioq. Adriana Gonzalez

Dra. Virginia Lezcano

Dra. María Pía Lozano

Dra. Ana María Marchionatti

Dra. Marcela Morán

Dra. María Belén Zanchetta

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Vol 13, Nº 1, enero / abril 2017

ÍNDICE

EDITORIAL / Editorial

Destruir para construir un nuevo esqueleto: Participación de la autofagia como mecanismo clave en este reciclaje

Remodeling the cytoskeleton: a key role of autophagy in this recycling process

María Isabel Colombo

7

ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

Evaluación de la respuesta densitométrica en pacientes con osteoporosis posmenopáusica tratadas con ranelato de estroncio o denosumab

Densitometric response in postmenopausal osteoporosis treated with strontium ranelate or denosumab

Ariel Sánchez, Lucas R. Brun, Helena Salerni, Pablo R. Costanzo, Laura Maffei, Valeria Premrou, Marcelo A. Sarli, Paula Rey, María S. Larroudé, María L. Brance, Ana M. Galich, Diana González, Alicia Bagur, Beatriz Oliveri, Eduardo Vega, María B. Zanchetta, Vanina Farías, José L. Mansur, María S. Moggia, María R. Ulla, María M. Pavlove, Silvia Karlsbrum

9

Influencia del fosfato β -tricálcico de diferentes formas geométricas en la morfología de la regeneración del defecto experimental del tejido óseo compacto

Influence of β -tricalcium phosphate of different geometric shape on the morphology of regeneration of experimental defect of compact bone tissue

Alexey Korenkov

17

Marcadores de formación y resorción ósea y su utilidad para determinar el final del periodo de aposición ósea

Bone formation and resorption markers to evaluate the end of bone apposition

Mariana Seijo, Beatriz Oliveri, Juan Mariano Deferrari, Cristina Casco, Susana Noemi Zeni

28

**Investigación del efecto del fluoruro sobre la superficie de implantes de titanio. Análisis de la reacción fluoruro-óxido de titanio**

Investigation on the biological effect of fluorine present on the surface of titanium implants. Analysis of the reaction fluoride-titanium oxide

José A. Contribunale, Rodolfo C. Puche

37

Osteo-integración de implantes de titanio anodizado con y sin agregado de fluoruro en el electrolito. Estudio en la rata

Osseointegration of titanium implants anodized with and without fluoride in the electrolyte. A study in rats

José A. Contribunale, Rodolfo C. Puche

46

ACTUALIZACIONES / Reviews

El papel de las escasamente investigadas conexinas en el tejido músculo-esquelético: una breve revisión con énfasis en el tejido óseo

The role of under-investigated connexins in musculoskeletal tissue: a brief review with emphasis on bone tissue

Rafael Pacheco-Costa, Hannah M. Davis

58

CASUÍSTICAS / Case Reports

Hipercalcemia hipocalciurica familiar en una paciente con mutación del receptor de calcio: forma atípica de presentación y tratamiento con cinacalcet

Familial hypocalciuric hypercalcemia in a patient with calcium-sensing receptor mutation: atypical clinical presentation and treatment with cinacalcet

María Belén Bosco, María Diehl, Ana María Galich, Víctor Jäger, Eduardo Massaro, Luisa Plantalech

69

CARTAS AL COMITÉ DE REDACCIÓN / Letters to the Editor

Prevalencia de osteoporosis en mujeres argentinas posmenopáusicas

Prevalence of osteoporosis in Argentine postmenopausal women

Ariel Sánchez

80

INSTRUCCIONES PARA AUTORES / Authors Guidelines

81

EDITORIAL / Editorial

DESTRUIR PARA CONSTRUIR UN NUEVO ESQUELETO: PARTICIPACIÓN DE LA AUTOFAGIA COMO MECANISMO CLAVE EN ESTE RECICLAJE

María Isabel Colombo*

*Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Instituto de Histología y Embriología (IHEM).
Universidad Nacional de Cuyo. CONICET. Facultad de Ciencias Médicas, Mendoza, Argentina*

La autofagia es un proceso degradativo que permite el reciclaje de numerosos componentes en las células.¹ Moléculas presentes en el citoplasma celular así como organelas envejecidas (por ejemplo mitocondrias) o superfluas (exceso de retículo endoplasmático) son secuestradas por membranas especializadas (fagoforo) dando origen a vesículas de doble membrana, llamadas autofagosomas, que transportan el material para ser degradado hasta los lisosomas. Este proceso degradativo permite que las moléculas provenientes de la digestión de compuestos más complejos o incluso de organelas sean reutilizadas por la célula para producir nuevos compuestos, de allí su papel clave en este proceso de reciclaje y renovación celular.²

Dado su importante papel no solo en procesos fisiológicos sino en muchos procesos patológicos en los cuales está involucrada, esta vía se encuentra finamente regulada; en los últimos años se han identificado numerosos factores regulatorios,³ así como componentes moleculares que forman parte de la maquinaria necesaria para su correcto funcionamiento.⁴ Más de 30 factores conocidos como ATG (por “autophagy-related proteins”) constituyen el “core” de la maquinaria autofágica. Muchos de dichos factores fueron descubiertos por el Dr. Yoshinori Oshumi, quien recibió recientemente el mayor galardón internacional, el Premio Nobel en Medicina o Fisiología 2016, por sus relevantes contribuciones que permitieron entender en gran medida el funcionamiento de la autofagia. La autofagia es hoy en día reconocida como un importante proceso de antienvjecimiento y renovación celular y tisular, clave para la supervivencia celular.

La autorrenovación del esqueleto en los individuos adultos es un proceso que se lleva a cabo de forma continua durante la vida de una persona. La remodelación ósea, que ocurre principalmente en la superficie de los huesos, depende de la acción coordinada de los osteoblastos, las células responsables de la formación de los huesos, participando en la mineralización, y de los osteoclastos, las células involucradas en la resorción ósea. También cumplen un papel fundamental los osteocitos que se encuentran inmersos en la matriz ósea, están involucrados en funciones mecanosensitivas y, además, regulados por señales endocrinas.⁵ Tal remodelación es importante no solo para mantener una masa ósea normal y resistente sino también para la homeostasis mineral; por lo tanto, la

**Dirección postal: Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Histología y Embriología (IHEM)-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Casilla de Correo 56, Centro Universitario, Parque General San Martín, (5500) Mendoza, Argentina.
E-mail: mcolombo@fcm.uncu.edu.ar*



comunicación entre osteoclastos y osteoblastos es clave para la homeostasis ósea.⁶ Dicha comunicación se lleva a cabo mediante interacciones directas entre ambos tipos celulares y también a través de la secreción de distintas moléculas regulatorias así como por la participación de pequeñas vesículas conocidas como exosomas.⁷

Debido al papel clave de la autofagia en el reciclaje celular, numerosos trabajos recientes destacan la participación de este proceso en la remodelación ósea y describen cómo reguladores y moduladores de la autofagia intervienen en la fisiología del tejido óseo (para una revisión véase Ref. 8). A modo de ejemplo, en una publicación relativamente reciente se ha demostrado que la autofagia es necesaria para el proceso de mineralización llevado a cabo por los osteoblastos,⁹ ya que osteoblastos provenientes de ratones deficientes en autofagia presentan una capacidad de mineralización reducida debido en parte a que se requerirían vacuolas autofágicas para la secreción de cristales de apatita. Además, la deficiencia de autofagia en ratones genéticamente modificados favorece la generación de osteoclastos con la consiguiente reducción en la masa ósea.⁹ Asimismo se ha demostrado que la delección específica en los osteoblastos de una de las proteínas clave de la autofagia, el gen *Atg7*, produce una masa ósea reducida con un aumento de fracturas.¹⁰ También se ha encontrado una mayor acumulación de mitocondrias y retículo endoplasmático en los osteocitos, así como cambios morfológicos en este tipo celular caracterizados por una disminución de sus prolongaciones.

En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de la vía autofágica como blanco para el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos para el tratamiento de patologías relacionadas con alteraciones en los procesos de remodelación y calcificación ósea.

Conflicto de intereses: la autora declara no tener conflictos de intereses.

Recibido: marzo 2017.

Aceptado: abril 2017.

Referencias

1. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* 2011; 147:728-41.
2. Amaya C, Fader CM, Colombo MI. Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. *FEBS Lett* 2015; 589:3343-53.
3. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 2013; 15:713-20.
4. Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell (Graz, Austria)* 2016; 3:588-96.
5. Sims NA, Vrahnas C. Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Arch Biochem Biophys* 2014; 561:22-8.
6. Chen K, Lv X, Li W, et al. Autophagy is a protective response to the oxidative damage to endplate chondrocytes in intervertebral disc: implications for the treatment of degenerative lumbar disc. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017:4041768.
7. Xie Y, Chen Y, Zhang L, Ge W, Tang P. The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodelling. *J Cell Mol Med* 2017; 21:1033-41.
8. Pierrefite-Carle V, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al. Autophagy in bone: Self-eating to stay in balance. *Ageing Res Rev* 2015; 24:206-17.
9. Nollet M, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis. *Autophagy* 2014; 11:1965-77.
10. Piemontese M, Onal M, Xiong J, et al. Low bone mass and changes in the osteocyte network in mice lacking autophagy in the osteoblast lineage. *Sci Rep* 2016; 6:24262.

ARTÍCULOS ORIGINALES / *Originals*

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DENSITOMÉTRICA EN PACIENTES CON OSTEOPOROSIS POSMENOPÁUSICA TRATADAS CON RANELATO DE ESTRONCIO O DENOSUMAB

Ariel Sánchez,^{*1} Lucas R. Brun,² Helena Salerni,³ Pablo R. Costanzo,³ Laura Maffei,⁴ Valeria Premrou,⁴ Marcelo A. Sarli,⁵ Paula Rey,⁵ María S. Larroudé,⁶ María L. Brance,⁷ Ana M. Galich,⁸ Diana González,⁹ Alicia Bagur,⁹ Beatriz Oliveri,⁹ Eduardo Vega,¹⁰ María B. Zanchetta,⁵ Vanina Farías,⁵ José L. Mansur,¹¹ María S. Moggia,¹² María R. Ulla,¹³ María M. Pavlove,¹⁴ Grupo Argentino de Estudio de la Osteoporosis.

1) Centro de Endocrinología, Rosario. 2) Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. 3) Consultorios de Investigación Clínica Endocrinológica y del Metabolismo Óseo (CICEMO), Buenos Aires. 4) Consultorios Asociados de Endocrinología Dra. Laura Maffei, Buenos Aires. 5) IDIM, Instituto de Investigaciones Metabólicas, Buenos Aires. 6) Hospital Milstein, Buenos Aires. 7) Centro de Reumatología, Rosario. 8) Servicio de Endocrinología del Hospital Italiano de Buenos Aires. 9) Mautalen Salud e Investigación, Buenos Aires. 10) CESAN, Buenos Aires; Instituto de la Mujer, Campana. 11) Centro de Endocrinología y Osteoporosis, La Plata. 12) Centro Tiempo, Buenos Aires. 13) Centro de Endocrinología y Osteopatías Médicas, Córdoba. 14) Hospital Durand, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Tanto el ranelato de estroncio (RSr) como el denosumab (Dmab) son eficaces en el tratamiento de la osteoporosis (OP) posmenopáusica (PM). El efecto de cada fármaco por separado sobre la densidad mineral ósea (DMO) ha sido estudiado recientemente. Con ambas drogas se observó, al año de tratamiento, un aumento significativo de la DMO en columna lumbar (CL), cuello femoral (CF) y cadera total (CT). En este trabajo comparamos la respuesta densitométrica al año de tratamiento con una y otra droga. Utilizamos los registros de 425 pacientes PMOP tratadas con Dmab y 441 tratadas con RSr. En cada paciente analizamos el porcentaje de cambio; se clasificaron como respondedoras aquellas que mostraron un cambio $\geq 3\%$. Adicionalmente se comparó la respuesta en pacien-

tes no previamente tratadas con bifosfonatos (BF-*naïve*) en comparación con pacientes que habían recibido previamente un BF. Al analizar el grupo completo para Dmab, el porcentaje de pacientes respondedoras fue de 68,4% en CL, 63,3% en CF y 49,3% en CT. Por otro lado, en el grupo de pacientes tratadas con RSr, el porcentaje de respondedoras (53,8% en CL, 40,0% en CF y 35,6% en CT) fue estadísticamente menor. Cuando comparamos la respuesta entre las pacientes BF-*naïve* que recibieron RSr o Dmab, el Dmab indujo mayor respuesta en CL y CF que el grupo RSr, sin diferencias en CT. Cuando se analizaron los subgrupos BF-previo, las tratadas con Dmab mostraron mayor respuesta en todas las regiones. Conclusión: en pacientes con OP-PM, el tratamiento con Dmab produjo mayores incrementos densitométricos que el RSr, sien-

* Correo electrónico: asanvir@gmail.com



do el porcentaje de pacientes respondedoras mayor con Dmab que con RSr.

Palabras clave: osteoporosis posmenopáusicas, ranelato de estroncio, denosumab, bifosfonatos, respondedores.

Abstract

DENSITOMETRIC RESPONSE IN POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS TREATED WITH STRONTIUM RANELATE OR DENOSUMAB

Both strontium ranelate (SrR) and denosumab (Dmab) are effective in the treatment of postmenopausal osteoporosis (PMOP). The effect of each drug on bone mineral density (BMD) has been studied separately by us. With both treatments, there was a significant increase after one year of treatment at the lumbar spine (LS) and hip. In this paper we compared the densitometric response after one year of treatment with both drugs used separately. We used the clinical records of 425 PM patients treated with Dmab and 441 treated with SrR. For each patient we analyzed the percentage of change; those who showed a change $\geq 3\%$ were classified as

responders. Additionally, the response was compared in patients not previously treated with bisphosphonates (BP-naïve) compared to patients who had previously received a BP. When analyzing the complete group for Dmab, the percentage of "responders" was 65.2% at the LS, 62.9% at the femoral neck (FN) and 47.4% at the total hip (TH). On the other hand, in the group of patients treated with SrR the percentage of responders (53.8% at the LS, 40.0% at the FN and 35.6% at the TH) was statistically lower. When comparing the response between in BF-naïve patients receiving RSr or Dmab, Dmab induced a greater response at the LS and FN than the RSr group, with no statistical differences at the TH. When the subgroups with prior BP treatment were analyzed, those treated with Dmab showed greater response in all regions. Conclusion: in patients with PMOP treatment with Dmab produced greater densitometric increments than SrR, and the percentage of responders was higher with Dmab than with SrR.

Key words: postmenopausal osteoporosis, strontium ranelate, denosumab, bisphosphonates, responders.

Introducción

La osteoporosis es una enfermedad crónica caracterizada por disminución de la masa ósea y deterioro de la microarquitectura ósea que compromete la resistencia ósea y predispone a fracturas por fragilidad. Entre los tratamientos disponibles para la osteoporosis podemos mencionar los medicamentos antirresortivos que incluyen a los bifosfonatos (BF) y al denosumab (Dmab), los agentes formadores de hueso como la hormona paratiroidea (PTH₁₋₈₄ o PTH₁₋₃₄) y el ranelato de estroncio (RSr), el cual ha sido descrito con acción dual.^{1,2}

Varios estudios previos han demostrado que tanto el RSr³⁻⁶ como el Dmab⁷⁻¹¹ son eficaces en el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusicas ya que reducen la incidencia de fracturas vertebrales y no vertebrales. El efecto sobre la densidad mineral ósea (DMO) ha sido estudiado en forma reciente en nuestra población para cada fármaco en forma individual. En las dos investigaciones se observó un aumento significativo al año de tratamiento en todas las regiones estudiadas, aunque los porcentajes de cambio son diferentes.^{12,13} Asimismo, en ambos trabajos se evaluó la DMO en pacientes no tratadas previamente con

bifosfonatos (BF-*naïve*) en comparación con pacientes que fueron tratadas previamente con bifosfonatos (BF-previo). En el tratamiento con RSr, los incrementos en la DMO en CL, CF y CT se observaron tanto en las pacientes BF-*naïve* como en aquellas BF-previo; sin embargo, el aumento fue mayor en el grupo de pacientes BF-*naïve*.¹² Por otro lado, en el estudio realizado con Dmab, también se hallaron incrementos en la DMO en CL, CF y CT tanto en las pacientes BF-*naïve* como en las pacientes con BF-previo. Sin embargo, en este estudio no se hallaron diferencias entre las pacientes BF-*naïve* y BF-previo.¹³

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar en forma comparativa la respuesta densitométrica al año de tratamiento con RSr y Dmab.

Materiales y métodos

Se utilizaron los registros de DMO de 441 pacientes posmenopáusicas tratadas con RSr (2 g/día vía oral) por 1 año y 425 pacientes tratadas con Dmab (60 mg vía subcutánea, cada 6 meses) por igual lapso. Todas las pacientes tenían T-score inferior a -2,5 en cadera o columna vertebral o T-score inferior a -2,0 y factores de riesgo de fractura. Todas las pacientes incluidas habían recibido calcio (1000 mg/día) y vitamina D (800 U/día) concomitantemente. Se excluyeron pacientes que presentaran patologías o tomaran otros medicamentos que pudieran modificar el tejido óseo. Se compararon datos antropométricos y valores de laboratorio basales entre ambos grupos. La DMO (g/cm²) se midió por absorciometría dual de rayos X (DXA) en equipos Lunar Prodigy® (GE Lunar, Madison, WI, USA) en la CL (L2-L4), CF y CT. De cada paciente se analizó el porcentaje de cambio en la DMO al año de tratamiento y se clasificaron como “respondedoras” aquellas que mostraron un cambio porcentual $\geq 3\%$, mientras que se clasificaron como “no respondedoras” las pacientes en las que se observó un cambio porcentual inferior al 3%. Se tomó este punto de corte dado que el coeficiente de variación

fue menor que 3% en todos los centros donde se realizaron los estudios densitométricos.

Dado que muchas mujeres con osteoporosis tratadas previamente con BF son tratadas luego con otro fármaco –ya sea por efectos adversos de los BF, porque mantienen alto riesgo de fractura, o tienen mala respuesta al tratamiento con BF– se comparó también la respuesta densitométrica en pacientes tratadas durante un año con RSr o Dmab en pacientes BF-*naïve* en comparación con pacientes BF-previo. Quienes recibieron RSr (n=441) se dividieron en BF-*naïve* (n=87) y BF-previo (n=350); 4 pacientes no fueron incluidas en este análisis porque usaron otros fármacos además de BF. Mientras que las pacientes que recibieron Dmab (n=425) se dividieron en BF-*naïve* (n=61) y BF-previo (n=269), 95 pacientes no fueron incluidas en este análisis porque habían usado teriparatida o RSr previamente (n=68) o no se contaba con el dato de tratamiento previo (n=27).

Análisis de datos

La comparación de las características basales se realizó con la prueba de Mann-Whitney o Wilcoxon, según correspondiese. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución de los datos. El análisis de los porcentajes de cambio de la DMO de los pacientes tratados con RSr o Dmab se analizó a través de la prueba de χ^2 . Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 2.0® (GraphPad, San Diego, USA).

Resultados

Las características basales de ambas poblaciones en estudio se muestran en la Tabla 1. Mientras que la mayoría de las variables no mostraron diferencias significativas, sí se observaron diferencias estadísticas en el calcio sérico, el fosfato sérico, la fosfatasa alcalina total y la osteocalcina, aunque se destaca que ambos grupos se encontraban dentro de los parámetros normales.



Tabla 1. Características basales de ambos grupos de pacientes (media±DS).

	RSr (n=441)	Dmab (n=425)
Edad (años)	67,20±0,50	67,72±0,48
Índice de masa corporal (kg/m ²)	24,55±0,18	24,23±0,25
Calcio sérico (mg/dl)	9,36±0,02	9,46±0,02*
Calcio urinario (mg/24 h)	171,30±5,20	169,00±6,48
Fosfato sérico (mg/dl)	3,97±0,03	3,84±0,03*
25(OH)vitamina D (ng/ml) [VR= >30]	32,04±1,00	33,98±0,73
PTHi (pg/ml) [VR= 15-65]	51,00±3,11	46,80±1,01
Fosfatasa alcalina total (UI/L) [VR= <270]	59,70±1,36	149,40±5,65*
BGP (ng/ml) [VR= 11-43]	17,02±0,98	19,33±0,75*
s-CTX (ng/l) [VR= 40-590]	331,10±16,03	332,40±14,39
DMO columna lumbar (g/cm ² ; T-score)	0,859±0,005; -2,75±0,04	0,864±0,006; -2,70±0,06
DMO cuello femoral (g/cm ² ; T-score)	0,718±0,004; -2,29±0,04	0,742±0,006; -2,38±0,05
DMO cadera total (g/cm ² ; T-score)	0,747±0,005; -2,17±0,05	0,747±0,006; -2,17±0,05

RSr: ranelato de estroncio, Dmab: denosumab, PTHi: hormona paratiroidea, BGP: osteocalcina; s-CTX: telopéptido carboxiterminal sérico del colágeno tipo I. * Indica diferencias significativas vs. RSr (prueba de Mann-Whitney, p<0,05).

Al analizar el grupo completo (n=425) luego de un año de tratamiento con Dmab, el porcentaje de pacientes “respondedoras” –consideradas como aquellas en quienes la DMO se incrementó $\geq 3\%$ – fue de 68,4% en CL, 63,3% en CF y 49,3% en CT. Por otro lado, en el grupo de pacientes tratadas un año con RSr (n=441), el porcentaje de “respondedoras” (53,8% en CL, 40,0% en CF y 35,6%

en CT) fue estadísticamente menor en comparación con el grupo de pacientes tratadas con Dmab (Tabla 2, prueba de χ^2 p=0,0002, p<0,0001 y p=0,0027, respectivamente).

Asimismo, la comparación entre los porcentajes de cambio de la DMO indica que el RSr produjo menos incremento porcentual que el Dmab en todas las regiones evaluadas (Tabla 2, prueba de Mann-Whitney, p<0,0001).

Tabla 2. Porcentaje de cambio de la DMO y de pacientes respondedoras luego de 1 año de tratamiento con RSr o Dmab.

	Porcentaje de cambio		Respondedoras (%)	
	RSr (n=441)	Dmab (n=425)	RSr (n=441)	Dmab (n=425)
Columna lumbar (%)	3,73	5,21*	53,8	68,4#
Cuello femoral (%)	2,00	3,50*	40,0	63,3#
Cadera total (%)	1,54	2,54*	35,6	49,3#

RSr: ranelato de estroncio, Dmab: denosumab. * y # Indican diferencia significativa vs. RSr.

Cuando se comparó la respuesta densitométrica entre las pacientes que recibieron RSr o Dmab en los subgrupos BF-naïve, el grupo Dmab BF-naïve mostró mejor porcentaje de respuesta en CL y CF que el grupo RSr BF-naïve sin diferencias estadísticas a nivel de la CT (Tabla 3, prueba de χ^2). Cuando se

comparó la respuesta densitométrica entre las pacientes que recibieron RSr o Dmab en los subgrupos BF-previo, el grupo Dmab BF-previo mostró mejor porcentaje de respuesta en todas las regiones estudiadas (CL, CF y CT) que el grupo RSr BF-previo (Tabla 3, prueba de χ^2).

Tabla 3. Porcentaje de pacientes respondedoras según utilización previa de BF luego de 1 año de tratamiento con RSr o Dmab.

	RSr		Dmab	
	BF-naïve (n=87)	BF-previo (n=350)	BF-naïve (n=61)	BF-previo (n=269)
Columna lumbar (%)	60,24	52,17	80,36*	65,20#
Cuello femoral (%)	46,15	38,51	64,81*	62,90#
Cadera total (%)	58,18	29,67	57,89	47,37#

RSr: ranelato de estroncio, Dmab: denosumab, BF: bifosfonatos.

* indica diferencia significativa vs. RSr BF-naïve; # indica diferencia significativa vs. RSr BF-previo.

Discusión

Debido a la ausencia de trabajos comparativos entre el RSr y el Dmab, este trabajo pretende evaluar en forma comparativa la respuesta densitométrica luego de un año de tratamiento con el RSr y el Dmab en condiciones de práctica clínica en centros especializados de la Argentina.

Tanto con el RSr como con el Dmab se observó un incremento significativo de la DMO al año de tratamiento en todas las regiones estudiadas: columna lumbar, cuello femoral y cadera total.^{12,13}

En las características basales de ambos grupos se observó mayor fosfatasa alcalina total y osteocalcina en el grupo tratado con Dmab. Dado que se trata de un trabajo retrospectivo, es posible que esto se deba a la presencia de fracturas o a un estado de mayor remodelado óseo, que indujera al médico tratante a considerar el Dmab como tratamiento. En ese caso es probable que no se optara por el RSr como tratamiento de primera línea y es *a priori* esperable que respondan mejor al Dmab.

Al analizar la respuesta densitométrica en función de respondedoras o no respondedoras, las pacientes tratadas con Dmab mostraron mejor porcentaje de “respondedoras” que el grupo tratado con RSr. Coincidentemente, Kamimura y col. han demostrado en forma reciente la eficacia del Dmab luego de un año de tratamiento en pacientes no respondedoras a BF.¹⁴ El mencionado trabajo incluyó 98 pacientes, 68 de las cuales no habían mostrado mejoría en la DMO en los últimos 2 años de tratamiento con BF, por lo cual fueron consideradas como no respondedoras. Las restantes 30 pacientes se consideraron respondedoras a BF, y en ellas el Dmab también mostró efecto positivo luego de un año de tratamiento.

Si bien no se registró la adherencia al tratamiento en los grupos evaluados como factor de comparación, hay que destacar que Dmab presenta ventajas en este sentido dada su frecuencia de administración. En un trabajo comparativo con alendronato semanal, el Dmab tuvo una adherencia significativamente mayor (92,5



vs. 63,5%).¹⁵ Considerando el efecto positivo sobre la DMO se puede especular que la adherencia fue alta en ambos grupos evaluados. Sin embargo, no se puede comparar la adherencia entre los grupos y, por lo tanto, no se puede inferir si el mayor efecto del Dmab es, al menos en parte, por una mejor adherencia respecto del RSr.

Cuando comparamos la respuesta densitométrica entre las pacientes que recibieron RSr o Dmab en los subgrupos BF-*naïve*, el grupo Dmab BF-*naïve* mostró mejor porcentaje de respuesta en CL y CF que el grupo RSr BF-*naïve* sin diferencias estadísticas a nivel de la CT, mientras que –cuando se analizaron los subgrupos BF-previo– el grupo Dmab BF-previo mostró mejor porcentaje de respuesta en todas las regiones estudiadas.

Varios estudios previos habían demostrado una mejor respuesta del RSr en pacientes BF-*naïve* en comparación con pacientes que habían recibido BF previamente.^{12,16} Middleton y col.¹⁷ publicaron también datos después de 2 años de tratamiento con RSr, según los cuales la DMO aumentó significativamente desde el inicio en ambos grupos, BF-*naïve* (CL = 8,9%; CT= 6,0%) y BF-previo (CL=4,0%; CT=2,5%). Cuando compararon los grupos BP-*naïve* vs. BF-previo encontraron incrementos más altos en el grupo BF-*naïve* a los 6 meses de tratamiento con RSr, que persistieron después de 24 meses.¹⁶

Por su parte, el Dmab también ha sido evaluado según el consumo previo de BF. El tratamiento con Dmab mostró inhibición marcada de los marcadores de resorción ósea, mientras que un efecto inhibitor leve se observó sobre los marcadores de formación ósea tanto en las pacientes con BF-previo como en aquellas que recibieron Dmab como primer fármaco.¹⁸ Este mismo trabajo mostró que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y la PTH se incrementaron significativamente en la primera semana, con posterior reducción gradual en el grupo que solo recibió Dmab, pero no se observaron cambios significativos en el grupo tratado previamente con BF. Otro trabajo mos-

tró que el tratamiento con Dmab incrementó la DMO tanto en un grupo que solo recibió Dmab como en el grupo que previamente había sido tratado con ácido zoledrónico. Los marcadores óseos disminuyeron en ambos grupos a pesar de los niveles basales más bajos en pacientes tratadas antes con ácido zoledrónico.¹⁹ En mujeres posmenopáusicas con adhesión subóptima al tratamiento con alendronato, el cambio a Dmab fue bien tolerado y mostró mayor eficacia que el risedronato en aumentar la DMO y reducir los marcadores de remodelado óseo.²⁰ También se demostró que algunas mujeres con baja adherencia a los BF orales mostraron una mayor respuesta cuando fueron rotadas a Dmab en comparación con el grupo que fue rotado a un BF oral mensual (ibandronato o risedronato).²¹ Asimismo, Dmab mostró ganancias significativamente mayores en la DMO y mayor reducción en los marcadores de remodelado en comparación con el alendronato²² y la transición a Dmab produjo mayores aumentos de la DMO de cadera y columna lumbar y una mayor reducción en el remodelado óseo que el alendronato.²³

La bibliografía indica que el Dmab es eficaz aun en pacientes previamente tratadas con BF. En cambio, los agentes con efecto anabólico predominante como el RSr y la teriparatida tienen una acción más retardada y de menor magnitud sobre la DMO en pacientes previamente tratadas con BF.²⁴ Sin embargo, en el estudio STAND que compara pacientes con tratamiento previo con alendronato que cambian a Dmab versus pacientes que venían recibiendo alendronato y continuaron con él, se observó un aumento superior de la DMO en la rama que cambió a Dmab pero, si se comparan los resultados de esta rama con el estudio FREEDOM (Dmab en pacientes *naïve*), el aumento de la DMO fue menor.^{7,25} Por lo tanto, el Dmab según estos estudios también tendría menor magnitud de respuesta en pacientes tratadas previamente con BF.

Como limitaciones de este trabajo se puede mencionar que es una comparación retrospectiva, que no se trata de un estudio longitudinal

“cabeza a cabeza” de dos medicamentos, que se evaluó el efecto solamente luego de 12 meses de tratamiento y no se cuenta con registros de fracturas previas al tratamiento ni el tiempo desde que se produjo la fractura hasta que se les indicó el tratamiento evaluado. Además, dada la diferencia basal de FAL y BPG, se podría considerar que el grupo que recibió Dmab tenía mayor remodelado óseo (a pesar de que los s-CTX son comparables entre los grupos) y por lo tanto el RSr no sería un tratamiento de primera línea y es *a priori* esperable que respondan mejor al Dmab. El punto de corte para definir pacientes respondedoras es arbitrario y relativamente alto. Se eligió porque había muchos centros participantes y se quiso poner una cifra que englobara las posibles diferencias técnicas en las evaluaciones densitométricas de los sitios esqueléticos axiales considerados. Puede haber habido pacientes con incrementos menores en su DMO, y por eso las tasas de respondedoras están quizás por debajo de lo esperado.

En síntesis, este trabajo nos permite concluir que, en pacientes con osteoporosis posmeno-

páusica, el tratamiento con Dmab produjo mayores incrementos densitométricos que el RSr, siendo el porcentaje de pacientes respondedoras mayor con Dmab que con RSr.

Conflicto de intereses

Los siguientes autores han recibido honorarios como oradores de compañías farmacéuticas: A. Sánchez (GlaxoSmithKline, Eli Lilly, Servier, Gador, Spedrog-Caillon); J. L. Mansur (TRB Pharma); M. S. Larroudé (Genzyme, Shire, Eli Lilly, Abbie, Bristol Squibb Myers, Pfizer); H. Salerni (GlaxoSmithKline); M. B. Zanchetta (GlaxoSmithKline); B. Oliveri (GlaxoSmithKline), P. Rey (Servier, Eli Lilly, Raffo), M. L. Brance (Servier), A. M. Galich (Servier, Eli Lilly, GlaxoSmithKline, Shire, Bristol Squibb Myers), E. Vega (Servier); P. R. Costanzo (Eli Lilly), A. Bagur (GlaxoSmithKline). Los autores restantes declaran no tener conflicto de intereses.

Recibido: diciembre 2016

Aceptado: abril 2017

Referencias

1. Schurman L, Bagur A, Claus-Hermberg H, et al. Guías 2012 para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la osteoporosis. *Medicina (B Aires)* 2013; 73:55-74.
2. Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone* 2008; 42:129-38.
3. Meunier PJ, Roux C, Seeman E, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2004; 350:459-68.
4. Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, et al. Strontium ranelate reduces the risk of non-vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:2816-22.
5. Meunier PJ, Roux C, Ortolani S, et al. Effects of long-term strontium ranelate treatment on vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 2009; 20:1663-73.
6. Seeman E, Vellas B, Benhamou C, et al. Strontium ranelate reduces the risk of vertebral and nonvertebral fractures in women eighty years of age and older. *J Bone Miner Res* 2006; 21:1113-20.
7. 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.
8. Papapoulos S, Chapurlat R, Libanati C, et al. Five years of denosumab exposure in women with postmenopausal osteoporosis: results from the first two years of the FREEDOM extension. *J Bone Miner Res* 2012; 27:694-701.



9. Bone HG, Chapurlat R, Brandi ML, et al. The effect of three or six years of denosumab exposure in women with postmenopausal osteoporosis: Results from the FREEDOM extension. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:4483-92.
10. Brown JP, Reid IR, Wagman RB, et al. Effects of up to 5 years of denosumab treatment on bone histology and histomorphometry: the FREEDOM study extension. *J Bone Miner Res* 2014; 29:2051-6.
11. Papapoulos S, Lippuner K, Roux C, et al. The effect of 8 or 5 years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the FREEDOM Extension study. *Osteoporos Int* 2015; 26:2773-83.
12. Brun LR, Galich AM, Vega E, et al. Strontium ranelate effect on bone mineral density is modified by previous bisphosphonate treatment. *SpringerPlus* 2014; 3:676.
13. Sánchez A, Brun LR, Salerni H, et al. Effect of denosumab on bone mineral density and markers of bone turnover among postmenopausal women with osteoporosis. *J Osteoporos* 2016; 8738959.
14. Kamimura M, Nakamura Y, Ikegami S, Uchiyama S, Kato H, Taguchi A. Significant improvement of bone mineral density and bone turnover markers by denosumab therapy in bisphosphonate-unresponsive patients. *Osteoporos Int* 2017; 28:559-66.
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. Middleton ET, Steel SA, Aye M, Doherty SM. The effect of prior bisphosphonate therapy on the subsequent BMD and bone turnover response to strontium ranelate. *J Bone Miner Res* 2010; 25:455-62.
17. Middleton ET, Steel SA, Aye M, Doherty SM. The effect of prior bisphosphonate therapy on the subsequent therapeutic effects of strontium ranelate over 2 years. *Osteoporos Int* 2012; 23:295-303.
18. Nakamura Y, Kamimura M, Ikegami S, et al. Changes in serum vitamin D and PTH values using denosumab with or without bisphosphonate pretreatment in osteoporotic patients: a short-term study. *BMC Endocr Disord* 2015; 15:81.
19. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Efstathiadou ZA, et al. Denosumab in treatment-naïve and pre-treated with zoledronic acid postmenopausal women with low bone mass: Effect on bone mineral density and bone turnover markers. *Metabolism* 2015; 64:1291-7.
20. Roux C, Hofbauer LC, Ho PR, et al. Denosumab compared with risedronate in postmenopausal women suboptimally adherent to alendronate therapy: efficacy and safety results from a randomized open-label study. *Bone* 2014; 58:48-5.
21. Palacios S, Agodoa I, Bonnicks S, Van den Bergh JP, Ferreira I, Ho PR, Brown JP. Treatment satisfaction in postmenopausal women suboptimally adherent to bisphosphonates who transitioned to denosumab compared with risedronate or ibandronate. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100:E487-92.
22. Brown JP, Prince RL, Deal C, et al. Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res* 2009; 24:153-61.
23. Kendler DL, Roux C, Benhamou CL, et al. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women transitioning from alendronate therapy. *J Bone Miner Res* 2010; 25:72-81.
24. Obermayer-Pietsch BM, Marin F, McCloskey EV, et al; EUROFORS Investigators. Effects of two years of daily teriparatide treatment on BMD in postmenopausal women with severe osteoporosis with and without prior antiresorptive treatment. *J Bone Miner Res* 2008; 23:1591-600.
25. Kendler DL, Roux C, Benhamou CL, et al. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women transitioning from alendronate therapy. *J Bone Miner Res* 2010; 25:72-81.

ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

INFLUENCE OF β -TRICALCIUM PHOSPHATE OF DIFFERENT GEOMETRIC SHAPE ON THE MORPHOLOGY OF REGENERATION OF EXPERIMENTAL DEFECT OF COMPACT BONE TISSUE

Alexey Korenkov*

Sumy State University, Department of Human Anatomy 2, Rymskogo-Korsakova st., Sumy, 40007, Ukraine.

Abstract

Purpose: to compare the healing process of a defect of compact bone tissue after the implantation of osteoplastic materials based on β -tricalcium phosphate (“ChronOSTTM” and “Calc-i-oss[®]”), which differ by manufacturer, geometrical shape and microscopic structure. **Methods:** the experiment was performed on 48 white male Wistar rats. In the middle third of the diaphysis of the femur we produced a perforated defect of 2.5 mm diameter in the medullary canal, which in the animals of the first group was filled with the osteoplastic material “ChronOSTTM” (block, Synthes, Switzerland), and in the animals of the second group with “Calc-i-oss[®]” (granules, «Degradable Solutions Dental», Switzerland). Fragments of the injured bones were studied on the 60th and 120th day by light microscopy with morphometry and by scanning electron microscopy. **Results:** it was found that regardless the geometric shape and the microscopic structure, both osteoplastic materials show high biocompatibility, osteoconductive properties, good integration with bone tissue of the regenerate, and that the microscopic structure of β -tricalcium phosphate (“ChronOSTTM”) may

significantly affect the microscopic structure of bone tissue of the regenerate, which manifests itself in the specificity of its geometric shape. It was noticed that osteoplastic materials “ChronOSTTM” and “Calc-i-oss[®]” almost at the same rate were subjected to resorption and replacement by the bone tissue, the ratio of which was 22.55 ± 1.25 to 77.45 ± 1.25 and $25.72 \pm 2.06\%$ to $74.28 \pm 2.06\%$ on the 60th day of the experiment, and 17.65 ± 1.09 to 82.35 ± 1.09 and $18.31 \pm 1.54\%$ to $81.69 \pm 1.54\%$ on the 120th day.

Key words: rats, bone, β -tricalcium phosphate, reparative osteogenesis.

Resumen

INFLUENCIA DEL FOSFATO β -TRICALCICO DE DIFERENTES FORMAS GEOMÉTRICAS EN LA MORFOLOGÍA DE LA REGENERACIÓN DEL DEFECTO EXPERIMENTAL DEL TEJIDO ÓSEO COMPACTO

Objetivo: Comparar el proceso de cicatrización de un defecto del tejido óseo compacto tras la implantación de materiales osteoplásticos a base de fosfato β -tricalcico («ChronOSTTM») and «Calc-i-oss[®]») que difieren según

* Correo electrónico: korenkov-alexsey@mail.ru



el fabricante en la forma geométrica y estructura microscópica. El estudio fue realizado en 48 ratas Wistar machos en los cuales se produjo, en el tercio medio de la diáfisis del fémur, un defecto perforado de 2,5 mm de diámetro, el cual fue llenado con el material «ChronOS™» (block, Synthes, Switzerland) en un grupo y con «Calc-i-oss®» (granules, «Degradable Solutions Dental», Switzerland) en el segundo grupo. El sector del defecto fue evaluado en los días 60 y 120 por microscopía óptica y por microscopía electrónica de barrido. Resultados: independientemente de la forma geométrica y la estructura microscópica, ambos materiales osteoplásticos mostraron alta biocompatibilidad, propiedades osteoconductoras y buena integra-

ción con el tejido óseo regenerado. La estructura microscópica del fosfato β -tricalcico («ChronOS™») puede afectar significativamente a la estructura microscópica del tejido óseo regenerado, que se manifiesta en su forma geométrica. Adicionalmente, se observó que ambos materiales osteoplásticos «ChronOS™» y «Calc-i-oss®» mostraron valores similares de resorción y reemplazo por tejido óseo, cuya relación al 60° día del experimento fue de $22,55 \pm 1,25$ a $77,45 \pm 1,25$ y $25,72 \pm 2,06\%$ a $74,28 \pm 2,06\%$, y a los 120 días de $17,65 \pm 1,09$ a $82,35 \pm 1,09$ y de $18,31 \pm 1,54\%$ a $81,69 \pm 1,54\%$ respectivamente.

Palabras clave: ratas, hueso, fosfato β -tricalcico, osteogénesis.

Introduction

Because of the similarity of the chemical structure with the bone tissue and its biological inertness, β -tricalcium phosphate showed excellent characteristics for the replacement of bone defects in traumatology, spinal surgery and dentistry.¹⁻⁴ Today, β -tricalcium phosphate, which is produced in the form of granules, blocks or cylinders, is mentioned in numerous promotional publications, which proves its safety and biocompatibility. However, it should be noted that the majority of works devoted to the research of β -tricalcium phosphate were conducted on the bones of the skull and cancellous bones.^{5,6,7} We have found no information in the scientific literature about the studies of the comparative influence of various by the manufacturer, geometric shape and microscopic structure β -tricalcium phosphate on the dynamics of healing of compact bone tissue defects. Moreover, the information about such determining properties of β -tricalcium phosphate as dynamics of the biodegradation rate and replacement by bone tissue of the regenerate for certain commercial drugs, is completely absent, whereas for other parameters there

is a significant divergence in data (up to one year).^{8,9,10} Moreover, these differences are probably influenced by many factors, such as size of defect, bone tissue regeneration potential, the characteristics of the osteoplastic material (manufacturer, geometric shape, total porosity, pore size, design, size, etc.).^{11,12} All this indicates the need for a more predictable dynamics of rate of formation of the bone tissue of the regenerate and resorption of osteoplastic materials, which might differ by manufacturer, geometric shapes and microscopic structure, experimental models of bone defects. On the latter in standard conditions and using different research methods it is possible to study and compare with each other osteoplastic materials that optimize reparative osteogenesis. Therefore the aim of our study was to compare the process of healing of an experimental defect of compact bone tissue after the implantation of osteoplastic materials obtained from two different manufacturers.

Materials and methods

The experiment was performed on 48 8-month-old male white Wistar rats, with an av-

erage weight of 250 ± 10 g. All procedures were in agreement with the Commission on Biomedical Ethics of Sumy State University (Minutes N° 4/14 of 06.11.2015). The study protocol was done according to the provisions “European Community Directive of 24 November 1986 on the maintenance and use of laboratory animals for research purposes”. Before surgery, animals were injected with 2.5 mg/kg acepromazine intramuscular and 5 minutes later, with 75 mg/kg ketamine intramuscular (Calypsol, Gedeon Richter, Budapest-Hungary). After the induction of anesthesia, a 2.5 mm-diameter defect in the medullary canal was produced under aseptic conditions in the middle third of the femoral diaphysis using a portable drill with a spherical cutter at low speed with cooling. Further, the experimental animals were divided into 2 groups:

Group 1 (n=24) – where the defect without rigid fixation was filled with the osteoplastic material “ChronOS™” (Synthes, Switzerland), which is a pure β -tricalcium

phosphate in the form of block with a total porosity of 70%, with macropore size from 100 to 500 μm and micropores to 10 μm (Figure 1).

Group 2 (n=24) – where the defect without rigid fixation was filled with the osteoplastic material “Calc-i-oss®” («Degradable Solutions Dental», Switzerland), which is a synthetic granular material (1-1.6 mm) made of pure β -tricalcium phosphate (β -phase purity of >99%, Ca / P - 1.5) with a total porosity of 50% and the size of micropores is from 1 to 6 μm (Figure 2).

Before the implantation the blocks of “ChronOS™” and the granules of “Calc-i-oss®” were moistened with the rat’s own blood (which was taken from the tail vein) to fill pores, remove residual air from the material and ensure the necessary consistency, which would permit easy cutting of the materials by scalpel and thus modelling the shape of the defect.

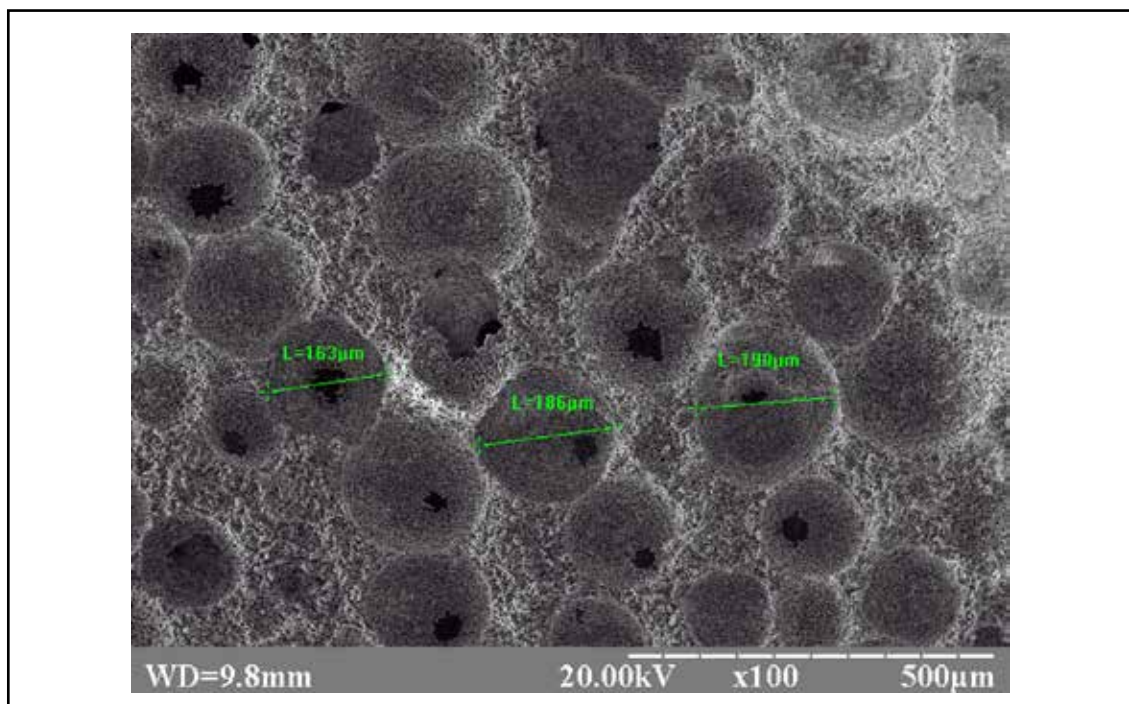


Figure 1. Microstructure of the osteoplastic material “ChronOS™”. Visible numerous pores ranging in size from 163 μm to 190 μm . Electronic scanning image 100X.

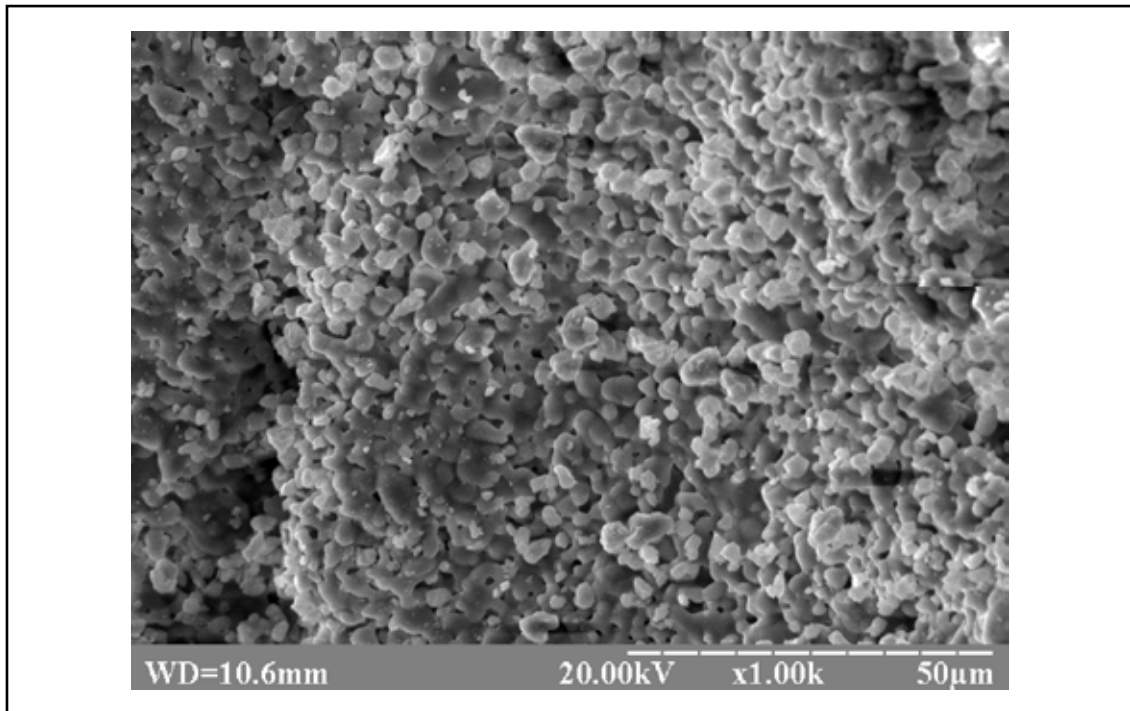


Figure 2. Microstructure of the osteoplastic material “Calc-i-oss®”. Electronic scanning image 1000X.

After entering into the bone defect of osteoplastic material the wound was tightly stitched with silk thread through all layers of soft cover, the seam was treated with 3% alcohol iodine solution. Then, during the next 3 days after operation for prevention of septic complications the after-operation seam was treated with an alcohol iodine solution and for analgesia ketorolac (JSC “Synthesis”, Kurgan, Russia) was injected intramuscularly at a dose of 0.6 mg twice a day.

Next on the 60th and 120th day after surgery animals were taken out of the experiment by decapitation under deep ether anesthesia, followed by a study of injured bones using light microscopy with morphometry and scanning electron microscopy.

For light microscopy, we extracted the fragments of femoral bones from the site of implantation of osteoplastic material and fixed them in 10% neutral buffered formalin. After

washing with water, the bone samples were subjected to decalcification in 5% aqueous solution of Trilon B (Edetic acid), dehydrated in alcohols of increasing concentration and poured into paraffin. Histological sections were made using a Sannomiya microtome “Reichert”, stained with hematoxylin-eosin, analyzed at the light microscope «Olympus» and photographed using a digital camera.¹³

Morphometric analysis consisted in identifying the area of bone tissue and remnants of osteoplastic material in the site of the defect, which was performed using the program for image processing “Video-Test” and “Video-Size”.

For scanning electron microscopy we extracted the fragments of the femur from implanted osteoplastic material and placed samples in glutaraldehyde holder. Next day the samples were washed in phosphate buffer, fixed in 1% OsO₄ solution and dehydrated

in ethanol of increasing concentrations. Further, the bone fragments were glued to metal tables with electricity conductive adhesive, sprayed with carbon dust in standard vacuum installation of VUP-5 type and examined with an electron microscope "SEM 106-1".

Using light and scanning electron microscopy we established morphological characteristics of bone tissue, the nature of its interaction with the bone material "ChronOS™" and "Calc-i-oss®". In addition, we investigated the state of the structure of adjacent to the site of implantation maternal bone in order to establish or refute postoperative complications due to the presence or absence of signs of necrobiosis and necrosis of osteocytes.¹⁴ The resulting digital values were analyzed statistically by calculating the arithmetic mean (M) and its standard er-

ror (m). The significance of differences between the indicators of the animals of the first and second groups, of the 60th and the 120th days was evaluated using Student t-test. The differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

In the animals of the first group on the 60th day of the experiment there was located lamellar bone tissue throughout the area of the defect directly in the pockets and on the surface of the osteoplastic material "ChronOS™". The lamellar tissue was presented by separate specific rounded formations that by shape and pores size corresponded to "ChronOS™", were interconnected by "bridges" of bone tissue and contained a significant amount of osteoblasts and osteocytes (Figure 3).

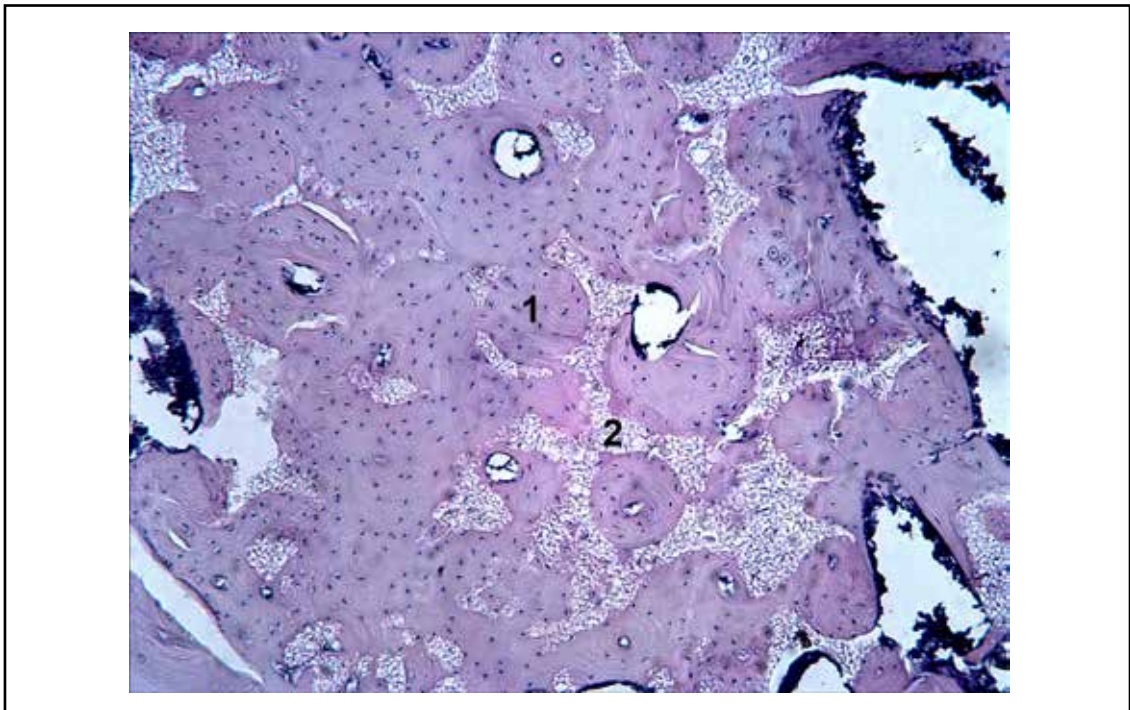


Figure 3. The area of the defect of femur of a rat on the 60th day after implantation of "ChronOS™". Bone tissue of the regenerate, constructed from individual particles of specific rounded shape (1), between which the remnants of osteoplastic material are located (2). Hematoxylin & Eosin 100X.



In the animals of the second group the area of the defect was also filled with lamellar bone tissue. Here, in the peripheral part of the defect the bone tissue lacked “Calc-i-oss[®]”, was solid, and contained even elements of the marrow in the central part and between the individual parts with remnants of osteoplastic material, and in deeper cuts. In the animals of the first group between the separate parts of the bone tissue of the rounded form in the direct connection with them there were also found the remnants of the osteoplastic mate-

rial, and in peripheral parts of the defect there were areas where the bone tissue was represented by solid margins and immured into its matrix remnants of the osteoplastic material. In the lacunae of bone tissue of the regenerate of the animals of the first and second groups there were well observed osteocytes and osteoblasts with spikes, and inside and on the outer surface of osteoplastic materials osteogenic cells, osteoclasts and sometimes small areas of osteogenic tissue can be seen (Figure 4).

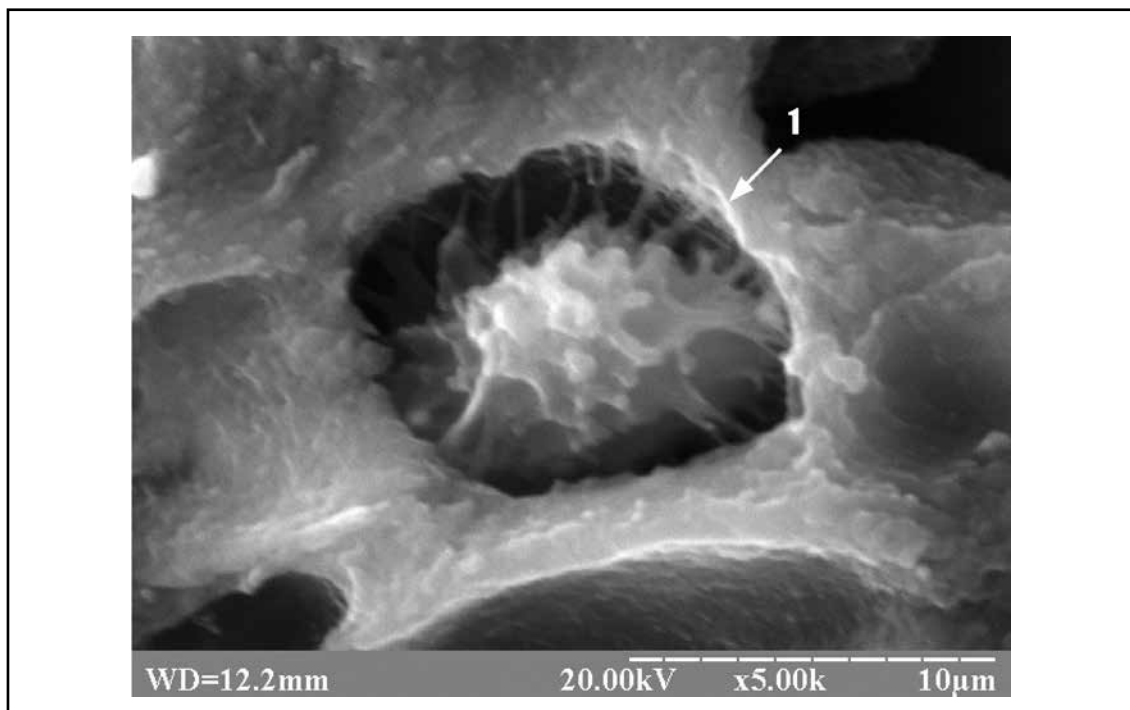


Figure 4. The area of the defect of femur of a rat on the 60th day after implantation of “Calc-i-oss[®]”. Osteocytes (1) with spikes in the lacunae of lamellar bone tissue, which is formed on the surface of the osteoplastic material. Electronic scanning image 5000X.

The relative area of “ChronOS[™]” and “Calc-i-oss[®]” within two months of the experiment similarly decreased to $22.55 \pm 1.25\%$ and $25.72 \pm 2.06\%$ ($p > 0.05$), and was replaced by the bone tissue the relative area of which was $77.45 \pm 1.25\%$ in the first and $74.28 \pm 2.06\%$

in the second case ($p > 0.05$). In animals of both groups no signs of inflammation were detected in the area of the defect and the maternal bone was characterized by typical osteocytes, which were located in bone lacunae and had long spikes.

On the 120th day of the experiment in the animals of the second group, the area of the defect was filled with the bone tissue of the regenerate, which had lamellar structure and

differed from the maternal bone only by the presence of remnants of the osteoplastic material integrated into its structure, and by the elements of the bone marrow (Figure 5).

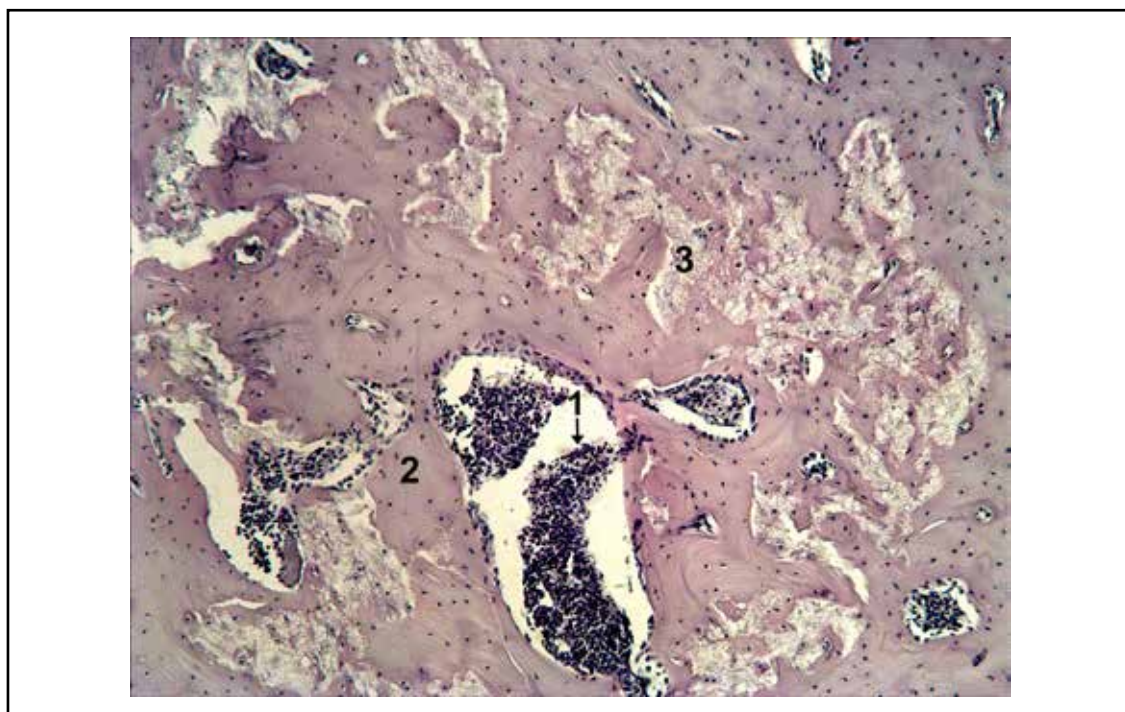


Figure 5. The area of the defect of femur of a rat on the 120th day after implantation of "Calc-i-oss®". Bone marrow (1) and lamellar bone tissue of the regenerate (2) with the integrated into its structures remnants of osteoplastic material (3). Hematoxylin & Eosin 100X.

In the animals of the first group, the area of the defect was also filled with lamellar bone tissue. The latter was formed directly on the surface and in the pores of the osteoplastic material "ChronOS™". Thanks to this, the bone tissue, as on the 60th day of the experiment, looked like separate parts of specific round shape (corresponding to the pores of the implant), which were closely in contact with each other and contained typical osteoblasts, osteocytes, and sometimes osteoclasts. Osteoblasts had an oval shape and numerous short spikes, which allow the inter-

action with each other and the differentiated osteocytes (Figure 6). Osteocytes, with a size of approximately 10-15 μm were located in the bone lacunae and had longer spikes than osteoblasts, and osteoclasts on the electronic scanning image had ellipsoid shape with the flattened basis with the size of approximately 100 μm . Furthermore, in the animals of the first group rounded areas of lamellar bone tissue merged together in continuous fields were seen, but in the thickness of their matrix the remnants of the osteoplastic material were still observed.

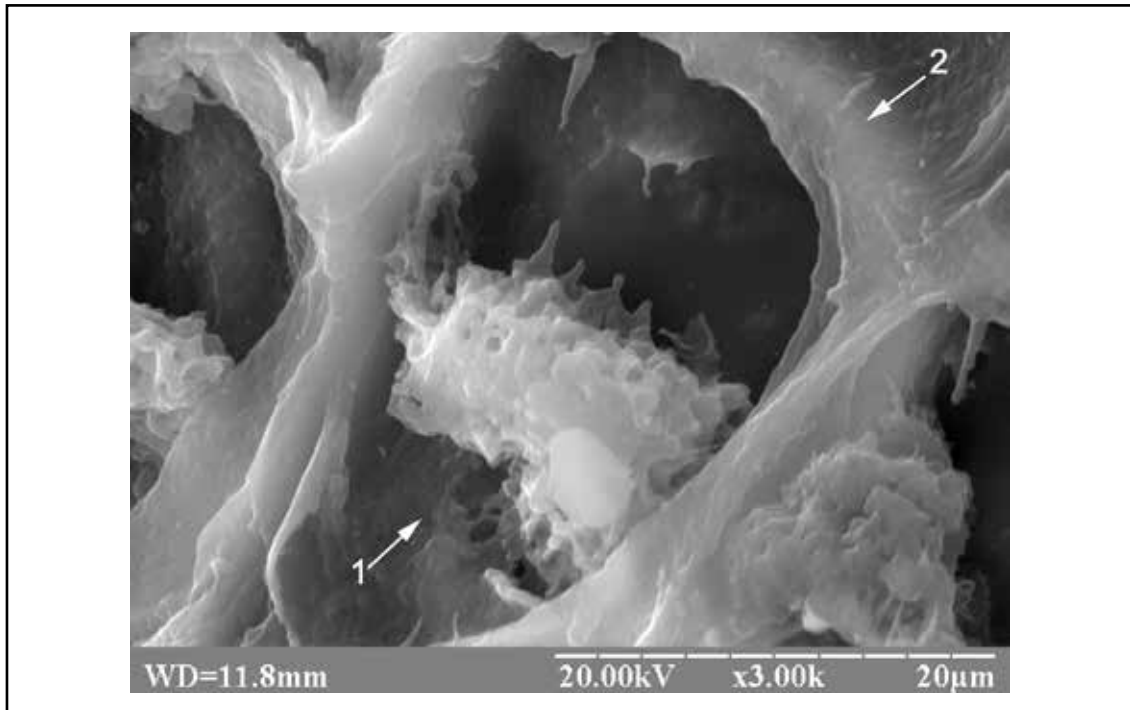


Figure 6. The area of the defect of femur of a rat on the 120th day after implantation of “ChronOS™”. Osteoblast (1) in the lacunae of the bone tissue (2), which was formed in the pore of the osteoplastic material. Electronic scanning image 3000X.

The area of the bone tissue of the regenerate in the animals of the first and the second groups compared to the 60th day increased by 6.32% ($p < 0.05$) and 9.97%, and the area of the osteoplastic material on the contrary, decreased by 21.73% ($p < 0.05$) and 28.81% ($p < 0.05$) and was 82.35 ± 1.09 and $81.69 \pm 1.54\%$ in the first and $17.65 \pm 1.09\%$ and $18.31 \pm 1.54\%$ in the second case. Inside and on the outer surface of the osteoplastic materials osteogenic cells, which formed foci of osteogenesis were found. In the area of implantation of “ChronOS™” and “Calc-i-oss®” no signs of inflammation were seen, and the maternal bone, as in the previous term of experiment, had a normal structure.

Discussion

The conducted study with the help of light and scanning electron microscopy showed

that the dynamics of the healing of the defect of the femoral shaft diaphysis had both similarities and differences depending on origin of the implanted calcium phosphate osteoplastic material.

To common features we can refer those that osteoplastic materials “ChronOS™” and “Calc-i-oss®” during the whole period of the experiment demonstrated their high biocompatibility, as evidenced by the absence the inflammatory process in the site of the defect, of necrosis and necrobiosis of osteocytes in the composition of the maternal bone. These results are consistent with the data of most researchers.^{8,9} Furthermore, in all the periods of observation high tropism of osteogenic cells to osteoplastic materials was found, as evidenced by their location and formation of foci of osteogenesis, both on the outer surface

and inside “ChronOS™” and “Calc-i-oss®”. It should be noted that the established fact is also the evidence of good integration of bone tissue of the regenerate with osteoplastic materials and manifestation of their osteoconductive properties. This is connected with the fact that one of the definitions of osteoconduction is the ability of osteogenic cells to use osteoplastic material as a platform for attaching and generating on the surface and in its cavities of the new bone tissue.¹⁵

One of the most important properties of calcium phosphate osteoplastic materials is their ability to be resorbed and replaced by the bone tissue of the regenerate. In the literature there are works on the impact of β -tricalcium phosphate on healing of the bone defects. But such studies were conducted on the bones of the skull and cancellous bone, and the results of these studies either lack the data of morphometric parameters or have significant divergence. So, Jensen SC, et al established almost complete disappearance of β -tricalcium phosphate granules from mandibular angle defect of mini-pigs on the 60th day, where their number remained 2.5% (from 0 to 5.1%), and on the 180th day 0.8% (from 0 to 2.5%).¹⁶ At the same time Gotterbarm T. et al found 4.35% of remnants of β -tricalcium phosphate granules even in a year after their implantation with collagen into the defect of epiphysis of the tubular bone of mini pigs.¹⁷ Osteoplastic material “ChronOS™”, according to the advertising information can completely undergo resorption. However, the period for which this occurs, is from 6 to 18 months. In addition, the research of T. Stoll have shown that if you implant “ChronOS™” with bone marrow into the defect of the tibia of sheep, in 6 weeks its balance would amount 43.10%, and if with blood - 53.10%. Here, the area of the defect was filled with bone (16.50% and 4.10%) and connective tissue (40.40 and 42.80%).¹²

During conducting the research of compact bone tissue defect we also observed

gradual resorption of implanted material in the cavity containing the osteoplastic materials “ChronOS™” and “Calc-i-oss®” and their replacement by bone tissue of the regenerate. However, in our experiment, the ratio of the amount of the implant and the bone tissue of the regenerate on the 60th day of the experiment was $22.55 \pm 1.25\%$ to $77.45 \pm 1.25\%$ in the area of implantation of “ChronOS™” and $25.72 \pm 2.06\%$ to $74.28 \pm 2.06\%$ in the area of implantation of “Calc-i-oss®”, and on the 120th day $17.65 \pm 1.09\%$ to $82.35 \pm 1.09\%$ and $18.31 \pm 1.54\%$ to $81.69 \pm 1.54\%$, respectively. And here, the given quantitative indicators had no authentic difference. Although, on the 60th day of the experiment a slight predominance in the rate of resorption of the osteoplastic material (by 14.05%, $p > 0.05$) and formation of the bone tissue of the regenerate (by 4.09%, $p > 0.05$) was found in the area of implantation of “ChronOS™”. On the 120th day of the experiment none of osteoplastic materials underwent complete resorption, though all of their remnants were fully integrated into lamellar bone tissue of the regenerate. In this case, the area that was occupied by “ChronOS™” ($17.65 \pm 1.09\%$) and “Calc-i-oss®” ($18.31 \pm 1.54\%$) and bone tissue of the regenerate (82.35 ± 1.09 and $81.69 \pm 1.54\%$) in the animals of both groups was almost the same.

A vivid distinction between the studied osteoplastic materials became the geometric shape of the bone tissue of the regenerate, which was formed in the area of implantation of “ChronOS™” and “Calc-i-oss®”. Thus, in the area of implantation of “Calc-i-oss®” the bone tissue had no significant features and differed from the maternal bone only by the presence of integrated into its structures remnants of the osteoplastic material. Unlike “Calc-i-oss®”, in the area of implantation of “ChronOS™” the geometric shape of the bone tissue had a fundamental difference. In all periods of surveillance the bone tissue of the regenerate was mainly represented by specific individual and interrelated rounded



formations, which in shape and size were direct reflections of the pockets of osteoplastic material "ChronOS™". This fact indicates that the pores of the implant served as the conductor for the vessels, cellular elements and bone tissue, which in turn is the proof of the osteoconductive impact of the osteoplastic material "ChronOS™" on the reparative osteogenesis. Here, it should be noted that the described and vividly demonstrated structure of the cells of the bone tissue did not depend on which of the calcium-phosphate osteoplastic material was implanted into the defect of the femoral shaft diaphysis.

Conclusion

Regardless of the geometric shape and microscopic structure of β -tricalcium

phosphate the osteoplastic materials based on it ("ChronOS™" and "Calc-i-oss®") exhibit high biocompatibility, osteoconductive properties, good integration with bone tissue of the regenerate and almost the same speed of resorption and replacement by the bone tissue. However, the microscopic structure of β -tricalcium phosphate ("ChronOS™") might significantly affect the microscopic structure of bone tissue of the regenerate, which manifests itself in the specificity of its geometric shape.

Conflict of interests The author declares no conflicts interest.

Recibido: junio 2016.

Aceptado: septiembre 2016.

References

1. Pochon JP. Knochenersatzplastiken mit tricalciumphosphatkeramik im kindesalter. *Aktuelle Probleme in Chirurgie und Orthopaedie* 1990; 36:146.
2. Steffen T, Stoll T, Arvinte T, Schenk RK. Porous tricalcium phosphate and transforming growth factor used for anterior spine surgery. *Eur Spine J* 2001; 10:132-40.
3. Schugg J, Niderost B, Schmidlin P. Prävention der Alveolarkammatrophy nach Zahnextraktion durch Wurzelreplikas. *Die Zahnarztwoche* 2002; 47:14-5.
4. Wheeler D. Grafting of massive tibial subchondral bone defects in a caprine model using β -tricalcium phosphate versus autograft. *J Orthop Trauma* 2005; 19:85-91.
5. Momma F, Nakazawa T, AmaqasaM. Repair and regeneration of vertebral body after antero-lateral partial vertebrectomy using beta-tricalcium phosphate. *Neurol Med Chir* 2008; 48:337-42.
6. Sakamoto A. Joint preserved reconstruction after curettage in giant cell tumor of bone arising in the distal radius: Case report. *Int J Surg Case Rep* 2015; 16:181-3.
7. Yang J, Kang Y, Browne C, Jiang T, Yang Y. Graded porous β -tricalcium phosphate scaffolds enhance bone regeneration in mandible augmentation. *J Craniofac Surg* 2015; 26:148-53.
8. Arora R, Milz S, Sprecher C, Sitte I, Blauth M, Lutz M. Behaviour of ChronOs™ inject in metaphyseal bone defects of distal radius fractures: tissue reaction after 6–15 months. *Injury* 2012; 43:1683-8.
9. Ruffieux K. Synthetic bone graft substitute for oral surgery calc-i-oss CLASIC. *Implants extra international magazine of oral implantolo-*

- gy. *Bone regeneration. Special Edition Degradable Solutions AG* 2012; 1: 30-1.
10. Eftekhari H, Farahpour MR, Rabiee SM. Histopathological evaluation of potential impact of β -tricalcium phosphate (HA+ β -TCP) granules on healing of segmental femur bone defect. *Bratisl Lek Listy* 2015; 116:30-4.
 11. Pankratov AS, Lekishvili MV, Kopetsky IS. Bone Grafting in Dentistry and Maxillofacial Surgery. *Osteoplastic Materials: A Guide for Physicians*. Moscow: BINOM, 2011, p. 100-167.
 12. Stoll T, Maissen O, Meury T, Becker S. New aspects in osteoinduction. *Mat.-wiss U Werkstofftech* 2004; 35:198-202.
 13. Yuehuei HA, Kylie LM. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2003, p. 209-80.
 14. Grigorian AS, Toporkova AK. Problems of integration of implants in bone tissue (theoretical aspects). Moscow: Technosphere, 2007, p. 100-28.
 15. Jenkins MJ. *Polymers in biology and medicine*. Moscow: Scientific world, 2011, p. 200-56.
 16. Jensen SS, Yeo A, Dard M, Hunziker E, Schenk R, Buser D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Impl Res* 2007; 18:752-60.
 17. Gotterbarm T, Breusch SJ, Jung M, et al. Complete subchondral bone defect regeneration with a tricalcium phosphate collagen implant and osteoinductive growth factors: A randomized controlled study in Göttingen minipigs. *J Biomed Mater Res* 2014; 102:933-42.



ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

MARCADORES DE FORMACIÓN Y RESORCIÓN ÓSEA Y SU UTILIDAD PARA DETERMINAR EL FINAL DEL PERÍODO DE APOSICIÓN ÓSEA

Mariana Seijo,¹ Beatriz Oliveri,¹ Juan Mariano Deferrari,¹ Cristina Casco,² Susana Noemí Zeni^{1*}

1. Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Óseas, INIGEM-CONICET-UBA, Hospital de Clínicas, Buenos Aires, Argentina. 2. Mautalen-Salud e Investigación, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

El pico de masa ósea (PMO) se alcanza entre los 20 y 35 años, pero la aposición ósea continúa hasta alcanzar el pico de fortaleza ósea (PFO). Se crea así una ventana entre ambos picos que podría ser evaluada mediante marcadores bioquímicos de recambio óseo, ya que durante dicho período la densidad mineral permanece constante. El objetivo fue determinar el final de la aposición ósea mediante marcadores bioquímicos óseos. Se evaluaron por décadas entre 20 y 49 años de edad 139 sujetos sanos de ambos sexos (69 hombres y 70 mujeres), determinando fosfatasa alcalina ósea (FAO), osteocalcina (OC), propéptido amino terminal del colágeno tipo 1 (P1NP) y telopéptido C-terminal del colágeno tipo 1 (CTX). Los marcadores correlacionan negativamente con la edad (OC: $r = -0,3$; $p < 0,01$; P1NP: $r = -0,4$; $p < 0,01$ y CTX: $r = -0,4$; $p < 0,01$), exceptuando FAO. En hombres de 20-29 años, P1NP y el CTX fueron significativamente mayores vs. 30-39 años ($p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente), y entre 30-39 años vs. de 40-49 años en P1NP y CTX ($p < 0,05$;

$p < 0,001$, respectivamente). En mujeres de 20-29 años, P1NP y CTX fueron significativamente mayores vs. 30-39 años ($p < 0,0001$ y $p < 0,01$, respectivamente). Conclusión: los marcadores de remodelado óseo más sensibles y específicos permitirían determinar bioquímicamente el fin de la aposición ósea que se produce entre el PMO y el PFO. Si bien es necesario ampliar el número de sujetos evaluados, los datos que surgen de la presente investigación sentarían las bases para futuros estudios epidemiológicos referidos al fin de la aposición ósea.

Palabras clave: marcadores bioquímicos óseos, aposición ósea, densidad mineral ósea, pico de masa ósea, fortaleza ósea.

Abstract

BONE FORMATION AND RESORPTION MARKERS TO EVALUATE THE END OF BONE APPPOSITION

Peak bone mass is achieved between 20-35 years; however bone apposition continues to reach an optimal skeleton strength. The

* Dirección postal: Av. Córdoba 2351 - 8° Piso (1120) C.A.B.A., Argentina.
E-mail: snzeni@hotmail.com

window between peak bone mass and peak bone apposition may be evaluated by biochemical bone turnover markers. The objective of this study was to determine the end of bone apposition through biochemical bone markers in both sexes. A total of 139 subjects (69 men and 70 women) were divided by decades between 20 and 49 years of age. Bone alkaline phosphatase (BAL), osteocalcin (OC), type I collagen propeptide (P1NP) and type I collagen C-terminal telopeptide (CTX) were evaluated. Except BAL, the other bone markers negatively correlated with the age [OC ($r = -0.3$; $p < 0.01$); P1NP ($r = -0.4$; $p < 0.01$) and CTX ($r = -0.4$; $p < 0.01$)]. Regarding men aged 20 to 29 years, P1NP and CTX were significantly higher vs. 30-39 years ($p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectively) and vs. 40-49 years ($p < 0.05$; $p < 0.001$, respectively). In women, the

results were similar. Regarding 20-29 years, P1NP and CTX were higher vs. 30-39 years ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectively). Bone remodeling rate decreases after the third decade, suggesting the end of the apposition period of peak bone mass. Conclusion: The most specific and sensitive bone markers would biochemically determine the end of bone apposition that extends between the peak of bone mass and the peak of bone strength. Although it is necessary to increase the number of subjects evaluated, the data that emerge from the present study would establish the bases for future epidemiological studies referring to the end of bone apposition.

Key words: biochemical bone markers, bone apposition, bone mineral density, peak bone mass.

Introducción

El hueso es un tejido metabólicamente activo, que se modela durante el crecimiento y se remodela a lo largo de toda la vida.¹ Estos procesos se suceden continuamente en más de un millón de unidades de remodelado óseo (URO) que se encuentran en el esqueleto. La actividad de todas ellas puede evaluarse bioquímicamente mediante los marcadores óseos. Dichos marcadores se dividen en dos grupos: marcadores de formación que provienen de la actividad de osteoblastos y marcadores de resorción que provienen de la actividad de los osteoclastos.^{2,3}

Los niveles de los marcadores óseos reflejan cambios en el metabolismo óseo más rápidamente que los cambios que se producen en la densidad mineral ósea (DMO).

Muchos factores interrelacionados pueden influir en el pico de masa ósea (PMO) durante el crecimiento, incluidos genética, sexo, origen étnico, nutrición y factores hormonales; así como también ciertos factores de riesgo como pueden ser: el alcoholismo, el

tabaquismo y el uso de algunos medicamentos. Varios estudios familiares y de gemelos han estimado que hasta un 60-80% de la varianza en el pico de masa ósea es atribuible a factores genéticos.⁴

El PMO, evaluado por densitometría ósea (metodología DXA), se alcanza durante la adolescencia entre mediados y final de la segunda década (primero en fémur y columna lumbar y posteriormente en el esqueleto total), más tempranamente en mujeres.⁵⁻⁸ A pesar de ello, la aposición ósea continúa hasta lograr el denominado pico de fortaleza ósea que finalizaría alrededor de la tercera década. La bibliografía no evidencia resultados concluyentes respecto del rango de edad en el cual se produce el final de dicha aposición. Las diferencias encontradas entre los distintos autores han sido atribuidas a varios factores como la edad, el sexo, el método de reclutamiento, los criterios de inclusión y exclusión de los sujetos de estudio, la región geográfica de pertenencia (incluidos los hábitos culturales), el método utilizado en las determinaciones, la



experiencia del laboratorio y el enfoque estadístico para realizar el análisis de los datos.^{9,10}

La aposición ósea hace variar los niveles de los marcadores bioquímicos según edad y sexo;¹¹ a pesar de ello, la mayoría de los estudios sobre marcadores óseos han focalizado los niveles que presentan las mujeres en la etapa posmenopáusica en comparación con los de mujeres premenopáusicas, para evidenciar pérdida de masa ósea.¹²⁻¹⁴ Existen muy pocos estudios que determinen los niveles de los distintos marcadores óseos en hombres y mujeres durante el período determinado por el final de la adolescencia y el comienzo de la adultez. Un estudio reciente publicó niveles de ambos marcadores para diferentes grupos poblacionales. Dicho estudio fue realizado en el contexto de proponer como marcadores óseos de referencia internacional el propéptido del colágeno tipo 1 aminoterminal (P1NP) y el telopéptido carboxilo terminal del colágeno tipo 1 (CTX).¹⁵ Sin embargo, de acuerdo con nuestro conocimiento, no se han realizado investigaciones para demostrar el final de la aposición ósea mediante marcadores bioquímicos óseos. Sobre esa base, el presente trabajo tiene como objetivo evidenciar el final de la aposición ósea o pico de fortaleza ósea utilizando distintos marcadores bioquímicos de remodelado óseo en adultos jóvenes de ambos sexos.

Materiales y métodos

Población

El presente estudio descriptivo de base poblacional fue realizado en sujetos del área metropolitana de la Ciudad de Buenos Aires, República Argentina. Para ello se invitó a participar a hombres y mujeres con un rango de edad de 20 a 49 años. Se seleccionaron 175 sujetos, todos los cuales completaron un cuestionario clínico que incluía el tipo de medicación utilizada al momento del estudio y firmaron un consentimiento informado previo a este. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas, el cual

cumplía con los requisitos de la declaración de Helsinki y sus modificaciones.¹⁶

Criterios de inclusión: sujetos voluntarios clínicamente sanos de 20-49 años de ambos sexos con índice de masa corporal (IMC) (kg/m²) entre 20 y 25 kg/m²; mujeres con ciclos menstruales regulares (cada 25 a 35 días) al menos en los 6 meses previos al estudio.

Criterios de exclusión: sujetos con situaciones que pudieran afectar el metabolismo óseo como: patología conocida (malignidad, enfermedad gastrointestinal crónica reciente <6 meses– o patología tiroidea); medicaciones, fractura traumática en los 2 años anteriores al estudio, fractura por fragilidad durante la adultez; cirugía en últimos 3 meses; inmovilización prolongada; trastorno alimentario; embarazo o uso de anticonceptivos hormonales al momento del estudio o en los 12 meses previos; lactancia actual o en los últimos 3 meses; niveles de creatinina sérica > 1,5 mg/dl. También fueron excluidos del análisis aquellos individuos que presentaran alteración en la homeostasis fosfocálcica (calcemia o fosfatemia, o ambas, fuera del rango de referencia). Por ello, el análisis bioquímico final se realizó sobre un total de 139 personas.

Determinaciones bioquímicas

Las muestras de sangre fueron obtenidas en ayunas (-10.30 horas a.m.), se centrifugaron y los sueros fueron guardados congelados a -18 °C hasta las mediciones bioquímicas. Las determinaciones de osteocalcina (OC), telopéptido C-terminal del colágeno tipo 1 (CTX), propéptido amino terminal del colágeno tipo 1 (PINP) fueron realizadas en el laboratorio Mautalen-Salud e Investigación, y las determinaciones de calcemia, creatininemia y fosfatasa alcalina ósea (FAO), en el Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Óseas, INIGEM-CONICET-UBA del Hospital de Clínicas. Dichos análisis se realizaron al final del protocolo en un único ensayo, para disminuir las variaciones interensayo.

El calcio fue evaluado por absorción atómi-

ca (CV intraensayo de 0,9%), el fósforo (P) y la creatinina por colorimetría (Wiener S.A, Rosario, Argentina) (CV intraensayo de 1% y 2,5%, respectivamente). La FAO se determinó mediante el uso de un kit comercial (Wiener S.A.), previa precipitación de la isoforma ósea con germen de trigo (CV intraensayo de 4,8%). Las mediciones de OC (CV intraensayo de 3%); P1NP (CV intraensayo de 1,0 a 2,1%) y CTX (CV intraensayo de 1,2 a 4,1%) fueron realizadas utilizando la metodología ECLIA automatizado (Eleclys 2010®, Roche S.A.).

Análisis estadístico

Los sujetos fueron divididos por sexo y separados en grupos de acuerdo con la edad: 20 a 29 años; 30 a 39 años y 40 a 49 años. A su vez, los grupos fueron subdivididos también por sexo cada 5 años de edad. Los datos se expresaron como media \pm DS e intervalo de confianza del 95% (IC 95%) para los diferentes marcadores analizados en cada uno de los grupos estudiados. Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar la normalidad de las variables. En función de los resultados de esta prueba se realizaron análisis descriptivos de la población, paramétricos o no paramétricos. Las comparaciones entre hombres y mujeres se efectuaron usando la prueba de T para muestras independientes. Las comparaciones por rango de edad fueron realizadas mediante la prueba de ANOVA de un factor, utilizando el test de Bonferroni como prueba "post hoc" para observar la diferencia intergrupos. En todos los análisis se realizó la prueba de Levene para evaluar homogeneidad de varianzas. Los coeficientes de correlación fueron calculados por la prueba de Pearson. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo. Para el análisis estadístico se utilizó un procesador SPSS 20.0® Chicago, IL, USA.

Resultados

De los 139 adultos jóvenes incluidos en el estudio (20 a 49 años), 69 fueron hombres (49,6%), con una edad promedio de $32,6 \pm 8,6$ años

y 70 (50,4%) fueron mujeres con una edad promedio de $32,1 \pm 8,8$ años.

Cuando se evaluaron las correlaciones entre los niveles de los marcadores óseos en función de edad para todo el grupo poblacional de hombres y mujeres, se observó que, mientras los niveles de FAO no presentaron correlación alguna, el resto de los marcadores evaluados presentaron correlaciones negativas estadísticamente significativas en función de la edad (OC: $r = -0,3$; $p < 0,01$; P1NP: $r = -0,4$; $p < 0,01$ y CTX: $r = -0,4$; $p < 0,01$). Cuando se separaron por sexo, los hombres mostraron una correlación negativa en los niveles de CTX ($r = -0,42$; $p < 0,01$) y de P1NP ($r = -0,29$; $p < 0,05$) en función de la edad, mientras que en las mujeres la correlación negativa se observó entre los niveles de OC ($r = -0,54$; $p < 0,01$), de P1NP ($r = -0,52$; $p < 0,01$) y de CTX ($r = -0,41$; $p < 0,01$) en función de la edad.

Los niveles promedios de FAO, OC, P1NP y CTX según el sexo se muestran en la Tabla 1. Los marcadores óseos en los hombres fueron superiores a los observados en mujeres y solo alcanzaron diferencias estadísticamente significativas los niveles de FAO ($p < 0,001$) y de CTX ($p < 0,05$).

Los niveles promedio de los marcadores divididos por décadas y por sexo se muestran en la Tabla 2. En hombres los niveles promedio de FAO no presentaron diferencias según la edad; en cambio, los niveles de OC, P1NP y el CTX fueron significativamente mayores en el grupo de 20-29 años respecto del grupo de 30-39 años ($p < 0,05$; $p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente), y en los niveles de P1NP y CTX respecto del grupo de 40-49 años ($p < 0,05$; $p < 0,001$, respectivamente). Sin embargo, no se observaron diferencias en ninguno de los marcadores entre los grupos de 30-39 y 40-49 años. En mujeres, los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados en los hombres al dividir por décadas de edad. El grupo de 20-29 años mostró diferencias significativas en los valores de OC, P1NP y CTX tanto respecto del grupo de 30-39 años



Tabla 1. Valores de marcadores de remodelado óseo en hombres y mujeres sin dividir por grupos etarios.

Determinaciones bioquímicas	Hombres (n=69)			Mujeres (n=70)			Valor p (Hombres vs. Mujeres)
	Media	DS	IC 95%	Media	DS	IC 95%	
FAO (UI/l)	70,7	10,7	67,1 - 73,6	64,0	11,2	61,3 - 66,7	<0,001
OC (ng/ml)	25,1	8,6	22,8 - 27,5	25,5	9,6	23,3 - 27,9	ns
P1NP (ng/l)	65,5	24,0	59,6 - 72,1	59,6	24,0	53,5 - 65,6	ns
CTX (ng/l)	461,5	189,4	414,1 - 508,5	379,9	159,9	341,5 - 418,3	<0,05

Tabla 2. Valores promedio de los marcadores de remodelado óseo divididos por décadas y por sexo.

Determinaciones bioquímicas	Hombres 20 - 29 años (n= 31)			Mujeres 20 - 29 años (n= 34)		
	Media	DS	IC 95%	Media	DS	IC 95%
FAO (UI/l)	70,4	9,0	67,1 - 73,8	66,7	9,4	62,9 - 69,5
OC (ng/ml)	28,7	10,1	25,0 - 32,4	29,6	9,4	26,3 - 32,9
P1NP (ng/l)	74,2	25,5	64,5 - 83,9	72,4	23,6	64,1 - 80,8
CTX (ng/l)	558,8	184,2	488,7 - 628,8	448,2	147,4	396,8 - 499,6

Determinaciones bioquímicas	Hombres 30 - 39 años (n= 18)			Mujeres 30 - 39 años (n= 18)		
	Media	DS	IC 95%	Media	DS	IC 95%
FAO (UI/l)	72,9	12,0	66,9 - 78,9	61,9	13,0	55,5 - 68,3
OC (ng/ml)	21,7*	7,5	17,8 - 25,5	20,5**	6,5	17,3 - 23,7
P1NP (ng/l)	60,1	20,2	48,9 - 71,2	45,1***	16,0	36,6 - 53,7
CTX (ng/l)	335,6**	151,1	260,4 - 410,7	299,2**	114,2	242,4 - 356,0

Determinaciones bioquímicas	Hombres 40 - 49 años (n= 20)			Mujeres 40 - 49 años (n= 18)		
	Media	DS	IC 95%	Media	DS	IC 95%
FAO (UI/l)	71,8	12,7	65,8 - 77,7	64,2	13,4	65,8 - 77,7
OC (ng/ml)	24,9	9,2	5,0 - 29,3	21,1**	8,1	5,0 - 29,3
P1NP (ng/l)	55,7*	21,9	43,9 - 67,4	46,1#	13,2	43,9 - 67,4
CTX (ng/l)	363,2**	152,8	287,2 - 439,1	328,6*	173,2	287,2 - 439,1

*p<0,05 vs. 20-29 años.

**p<0,001 vs. 20-29 años.

*p< 0,05 vs. 20-29 años.

**p<0,01 vs. 20-29 años.

***p<0,001 vs. 20-29 años.

p<0,0001 vs. 20-29 años.

(p<0,001; p<0,0001 y p<0,01, respectivamente), como respecto del grupo de 40-49 años (p<0,001; p<0,0001 y p<0,05, respectivamente) y no se encontraron diferencias entre el grupo de 30-39 años y el de 40-49 años.

Cuando se analizó la disminución porcentual en el nivel de los marcadores entre los grupos

de 20-29 y de 30-39, se encontraron los siguientes porcentajes de disminución: OC 29% para ambos sexos; P1NP: 15% y 42% y CTX: 40% y 33% para hombres y mujeres, respectivamente. Con el objeto de evidenciar cambios en los marcadores óseos tanto en hombres como en mujeres que habían mostrado diferencias signifi-

ficativas dentro de los grupos de 20-29 y de 30-39 años, ambas décadas fueron subdivididas en grupos de 5 años cada una. Los resultados de este último análisis en hombres revelaron que los niveles de los marcadores óseos disminuyeron en el grupo de 25-29 años respecto del grupo de 20-24 años; tanto la OC como el CTX mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente). Asimismo, aunque continuaron disminuyendo tanto el P1NP como el CTX, mostraron significancia estadística entre los grupos de 25-29 y

30-34 años ($p < 0,05$ para ambos marcadores). En las mujeres, los niveles de los marcadores dentro del grupo de 20-24 años no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo de 25-29 años; sin embargo, tanto los niveles de P1NP como de CTX mostraron significancia estadística en el grupo de 20-24 años respecto del grupo de 30-34 años ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente) y en el grupo de 25-29 años respecto del grupo de 35-39 años en OC y P1NP ($p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente) (Tabla 3).

Tabla 3. Valores promedio de los marcadores de remodelado óseo divididos por lustros y por sexo.

Determinaciones bioquímicas	Hombres 20 - 24 años (n= 15)			Determinaciones bioquímicas	Mujeres 20 - 24 años (n= 17)		
	Media	DS	IC 95%		Media	DS	IC 95%
FAO (UI/l)	68,9	8,9	63,8 - 74,1	FAO (UI/l)	64,4	8,6	59,9 - 68,8
OC (ng/ml)	33,2	11,5	26,9 - 39,6	OC (ng/ml)	29,9	10,2	24,7 - 35,2
P1NP (ng/l)	78,2	32,5	58,6 - 97,9	P1NP (ng/l)	71,1	20,6	60,1 - 82,1
CTX (ng/l)	572,1	143,5	485,4 - 658,8	CTX (ng/l)	461,4	124,4	397,4 - 525,3

Determinaciones bioquímicas	Hombres 25 - 29 años (n= 16)			Determinaciones bioquímicas	Mujeres 25 - 29 años (n= 17)		
	Media	DS	IC 95%		Media	DS	IC 95%
FAO (UI/l)	71,8	9,1	66,9 - 76,6	FAO (UI/l)	68,0	10,0	62,8 - 73,2
OC (ng/ml)	24,5 ^b	6,2	21,2 - 27,8	OC (ng/ml)	29,3	8,8	24,6 - 34,0
P1NP (ng/l)	70,9	18,4	61,1 - 80,7	P1NP (ng/l)	73,7	26,6	60,1 - 87,4
CTX (ng/l)	547,9 ^a	215,9	432,9 - 662,9	CTX (ng/l)	435,1	170,2	347,6 - 522,6

Determinaciones bioquímicas	Hombres 30 - 34 años (n= 13)			Determinaciones bioquímicas	Mujeres 30 - 34 años (n= 10)		
	Media	DS	IC 95%		Media	DS	IC 95%
FAO (UI/l)	69,6	10,9	63,1 - 76,2	FAO (UI/l)	66,7	15,3	55,8 - 77,6
OC (ng/ml)	19,9	6,6	15,9 - 23,8	OC (ng/ml)	22,6	6,8	17,7 - 27,5
P1NP (ng/l)	58,1 ^c	10,6	51,0 - 65,2	P1NP (ng/l)	54,4 ^b	16,6	40,5 - 68,2
CTX (ng/l)	346,8 ^c	167,3	245,7 - 447,8	CTX (ng/l)	343,8 ^a	105,3	268,5 - 419,1

Determinaciones bioquímicas	Hombres 35 - 39 años (n= 5)			Determinaciones bioquímicas	Mujeres 35 - 39 años (n= 8)		
	Media	DS	IC 95%		Media	DS	IC 95%
FAO (UI/l)	81,6	11,5	67,3 - 95,9	FAO (UI/l)	55,9	5,8	51,0 - 60,7
OC (ng/ml)	27,5	7,9	14,9 - 40,1	OC (ng/ml)	17,88 ^c	5,3	13,5 - 22,3
P1NP (ng/l)	65,4	38,4	4,3 - 126,5	P1NP (ng/l)	35,91 ^d	9,0	26,4 - 43,4
CTX (ng/l)	306,4	107,8	172,5 - 440,3	CTX (ng/l)	243,5	105,1	155,7 - 331,3

a $p < 0,05$ vs. 20-24 años.

b $p < 0,01$ vs. 20-24 años.

c $p < 0,05$ vs. 25-29 años.

a $p < 0,05$ vs. 20-24 años.

b $p < 0,01$ vs. 20-24 años.

c $p < 0,05$ vs. 25-29 años.

d $p < 0,0001$ vs. 25-29 años.



Discusión

La cantidad de hueso aumenta desde la infancia hasta el final de la adolescencia y para conservar sus características homeostáticas y biomecánicas se remodela constantemente. Durante el crecimiento, la adquisición de masa ósea se produce por modelamiento, en un proceso no acoplado y en el cual la formación osteoblástica predomina por sobre la resorción osteoclástica. Durante toda la vida, el hueso se remodela mediante un proceso acoplado en el que la cantidad que se pierde por resorción en cada una de las URO es reemplazado por igual cantidad de hueso de reciente formación. El PMO es la máxima cantidad de masa ósea que se adquiere durante el crecimiento, de acuerdo con la genética del individuo y con otros factores previamente citados, y se reconoce como un factor determinante para reducir el riesgo de sufrir una fractura osteoporótica en la adultez.¹⁷ Al alcanzar el PMO, el hueso deja de modelarse, pero por ser un tejido dinámico sufre un continuo remodelado. Una vez alcanzado el PMO, la densidad mineral del esqueleto permanece constante por un determinado período de tiempo conformando una meseta hasta que comienza la pérdida de hueso, con mayor velocidad en la posmenopausia.

La mayoría de los estudios transversales han propuesto que la máxima densidad mineral ósea o PMO se adquiere al final de la segunda década, aunque otros sugieren que es al final de la tercera.^{18,19} Un estudio longitudinal posterior, que evaluó la densidad mineral en individuos con edades comprendidas entre los 8 y los 30 años, concluyó que el PMO se adquiere al final de la segunda década o al comienzo de la tercera, se sugiere con una meseta en la densidad mineral ósea.⁶ Es importante destacar que durante la tercera década, el esqueleto aún se encuentra receptivo ante estímulos osteogénicos como los que ocurren con la actividad física, favoreciendo la aposición de hueso hasta lograr un pico de fortaleza ósea y no solo de masa ósea.²⁰ La

fortaleza que adquiere el hueso es un factor determinante de la resistencia a la carga mecánica y, con ello, de la fragilidad ósea a lo largo de toda la vida. Sin embargo, la técnica DXA no es lo suficientemente sensible como para diferenciar los pequeños cambios en la masa ósea de los parámetros relacionados con la fortaleza ósea como geometría, microarquitectura y calidad ósea y que se produce por aposición de hueso.

Los niveles de los marcadores de remodelado óseo en función de la edad presentan una función paralela a la curva de la velocidad de crecimiento y reflejan la combinación de crecimiento, modelado y remodelado del tejido óseo. Como la velocidad de crecimiento disminuye con la edad, los marcadores más sensibles y específicos también lo hacen. En nuestro estudio se ha observado una regresión negativa con la edad en los marcadores tanto de formación como de resorción ósea.

Los niveles circulantes de los marcadores óseos permiten evidenciar cambios en el metabolismo óseo más rápidamente que los que se observan en la DMO. Es por ello que se podría observar un desfase entre los marcadores óseos y la densitometría, que se evidencia a través del valor constante en la DMO y los niveles aún aumentados de ciertos marcadores óseos. La coexistencia de la meseta en la densidad mineral y el nivel elevado de los marcadores podría interpretarse sobre la base de que la DMO contribuye únicamente en un 70-80% en la variación de la fortaleza ósea. El 20-30% restante se debería a efectos acumulativos y sinérgicos de otros factores como la geometría, la microarquitectura, la calidad ósea y la fuerza muscular, indispensables para asegurar una fortaleza ósea adecuada.²¹ Esta diferencia generaría una ventana entre el PMO y el fin de la aposición ósea que fue evidenciado en el presente estudio a través del P1NP y el CTX tanto en hombres como en mujeres.

Saggese y col. en el año 2002 propusieron que, durante la pubertad, los marcadores de

formación se relacionarían con la DMO, mientras que los de resorción lo harían con dos factores implicados en la fortaleza ósea como son el volumen óseo y el tamaño del esqueleto.²¹ Sin embargo, de acuerdo con esto se debe tener en cuenta que los marcadores de formación evidencian etapas de diferenciación osteoblástica distintos, por lo cual no todos ellos serían suficientemente sensibles y específicos como para discriminar el fin de la aposición ósea. En el presente estudio, los niveles de FAO no mostraron variaciones significativas entre los 20 y los 34 años, nivel en el cual la DMO permanece constante y se produciría el pico de fortaleza ósea. Por otra parte, la OC no mostró un comportamiento definido, posiblemente debido a que los métodos utilizados para su medición evalúan tanto la OC de reciente formación como aquella que proviene de la OC liberada de la matriz ósea que ocurre durante el proceso de resorción. Ello determinaría que no se trata de un marcador de formación típico sino posiblemente de remodelado.^{2,22} Contrariamente, los niveles de P1NP más elevados sí se observaron durante el período de 20-24 años en ambos sexos para luego disminuir en forma significativa al alcanzar el período de 30-34 años. Este comportamiento fue similar al observado para el marcador de resorción CTX que, según lo mencionado previamente, se encontraría relacionado con ciertos factores implicados en la fortaleza ósea, sugiriendo que al comienzo de la década de los 30 años se produciría el fin de la aposición ósea. Por ello, los cambios en los niveles de P1NP y de CTX durante el período de adquisición de masa ósea permitirán discriminar el pico de fortaleza ósea.

Referencias

1. Martin TJ, Seeman E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22:701-22.

Una de las limitaciones del presente estudio estaría determinada por el escaso número de individuos, lo cual debilitaría los resultados reportados en relación con los hallazgos en las diferencias en medias de los distintos grupos de edad, con el fin de individualizar adultos jóvenes en riesgo de adquirir una baja fortaleza ósea. No obstante, entendemos que la importancia clínica de esta investigación radicaría en que se han aportado datos que brindan información complementaria a lo planteado previamente sobre el comportamiento de éstos durante el período comprendido entre el PMO y el pico de fortaleza ósea.

Conclusiones

El presente trabajo logró cumplir con el objetivo de mostrar que los marcadores bioquímicos de remodelado óseo permitirían determinar el final de la aposición ósea. Si bien es necesario ampliar el número de sujetos evaluados, los datos que surgen de esta investigación sentarían las bases para futuros estudios epidemiológicos referidos al final de la aposición ósea.

Agradecimientos

Se agradece la colaboración de la Técnica de laboratorio Sra. Julia Somoza por la realización de las determinaciones bioquímicas de calcemia, fosfatemia, creatininemia y fosfatasa alcalina ósea. Este trabajo fue llevado a cabo con subsidios parciales del CONICET y la UBA.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Recibido: marzo 2016

Aceptado: abril 2017

2. Reynaga Montecinos B, Zeni SN. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo: Utilidad clínica. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2009; 43:177-93.



3. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, et al. International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine position on bone marker standards in osteoporosis. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49:1271-4.
4. Bonjour JP, Chevalley T, Rizzoli R, Ferrari S. Gene-environment interactions in the skeletal response to nutrition and exercise during growth. *Med Sport Sci* 2007; 51:64-80.
5. Bachrach LK, Hastie T, Wang MC, et al. Bone mineral acquisition in healthy Asian, Hispanic, black, and Caucasian youth: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4702-12.
6. Baxter-Jones AD, Faulkner RA, Forwood MR, et al. Bone mineral accrual from 8 to 30 years of age: an estimation of peak bone mass. *J Bone Miner Res* 2011; 26:1729-39.
7. Bonjour JP, Theintz G, Buchs B, et al. Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73:555-63.
8. Theintz G, Buchs B, Rizzoli R, et al. Longitudinal monitoring of bone mass accumulation in healthy adolescents: evidence for a marked reduction after 16 years of age at the levels of lumbar spine and femoral neck in female subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:1060-5.
9. Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. *Ann Clin Biochem* 2014; 51(Pt 2):189-202.
10. Szulc P, Bauer D, Eastell R. Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. In: Rosen CJ (ed). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 8th ed. American Society for Bone and Mineral Research. Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2013. pp. 297-305.
11. Glover SJ, Gall M, Schoenborn-Kellenberger O, et al. Establishing a reference interval for bone turnover markers in 637 healthy, young, premenopausal women from the United Kingdom, France, Belgium, and the United States. *J Bone Miner Res* 2009; 24:389-97.
12. Walsh JS, Henry YM, Fatayerji D, Eastell R. Lumbar spine peak bone mass and bone turnover in men and women: a longitudinal study. *Osteoporos Int* 2009; 20:355-62.
13. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, et al. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 2000; 11:S2-17.
14. Michelsen J, Wallaschofski H, Friedrich N, et al. Reference intervals for serum concentrations of three bone turnover markers for men and women. *Bone* 2013; 57:399-404.
15. Bauer D, Krege J, Lane N, et al. National Bone Health Alliance Bone Turnover Marker Project: current practices and the need for US harmonization, standardization, and common reference ranges. *Osteoporos Int* 2012; 23:2425-33.
16. World Medical Association. Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013; 310:2191-4.
17. Bonjour JP, Chevalley T, Ferrari S, et al. The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis. *Salud Pública Mex* 2009; 51(Suppl 1):S5.
18. Lu PW, Briody JN, Ogle GD, et al. Bone mineral density of total body, spine, and femoral neck in children and young adults: a cross-sectional and longitudinal study. *J Bone Miner Res* 1994; 9:1451-8.
19. Recker RR, Davies KM, Hinders SM, et al. Bone gain in young adult women. *JAMA* 1992; 268:2403-8.
20. Forwood MR. Growing a Healthy Skeleton: The Importance of Mechanical Loading. In: Rosen CJ (ed). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 8th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2013; 149-55.
21. Saggese G, Baroncelli GI, Bertelloni S. Puberty and bone development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2002; 16:53-64.
22. Li J, Zhang H, Yang C, et al. An overview of osteocalcin progress. *J Bone Miner Metab* 2016; 34:367-79.

ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

INVESTIGATION ON THE BIOLOGICAL EFFECT OF FLUORINE PRESENT ON THE SURFACE OF TITANIUM IMPLANTS. ANALYSIS OF THE REACTION FLUORIDE-TITANIUM OXIDE

José A. Contribunale,¹ Rodolfo C. Puche²

1. Clínica de Prosthodontia Fija. Facultad de Odontología. 2. Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

Abstract

The aim of this work was to investigate the state of fluoride at the surface of fluoride-modified titanium implants, and to provide information to support or discard the hypothesis that fluoride ion participates in the osseointegration of implants. Titanium is coated with a 2-10 nm thick layer of stable and adherent TiO₂, which reacts with fluoride as a function of the anion concentration. Under present experimental conditions, the half-life of the reaction is about 2 minutes at 17 °C. The stoichiometry of the reaction Ti:F is 0.46 ± 0.03 , which do not differs significantly from 0.5, the ratio inferred from the reaction between sodium fluoride and TiO₂: $3 \text{ TiO}_2 + 6 \text{ NaF} \rightarrow \text{Na}_2\text{TiF}_6 + 2 \text{ Na}_2\text{TiO}_3$. The reaction proceeds as a function of the fraction of anionic fluoride concentration, which increases from a minimum at pH 1 to a maximum close to pH

6. The number of fluoride μmoles that react with TiO₂ grows exponentially as a function of fluoride concentration, towards a maximum at 0.24 M fluoride. According to literature reports, potassium hexafluorotitanate is insoluble in water and it decomposes by heating at 780 °C, indicating a high formation constant. It is concluded that the hexafluorotitanate would not ionize to provide fluoride ion to the implant-bone environment and to promote growth and differentiation of osteoblasts. The effect of fluoride on the surface of titanium sheet was investigated under SEM, showing that the titanium sheet surface is roughened and electron dispersive spectroscopic microanalysis indicated that fluorine is included in the TiO₂ layer.

Key words: fluorine, fluoride, titanium, implants.

* E-mail: josecontribunale@hotmail.com



Resumen

INVESTIGACIÓN DEL EFECTO DEL FLUORURO SOBRE LA SUPERFICIE DE IMPLANTES DE TITANIO. ANÁLISIS DE LA REACCIÓN FLUORURO-ÓXIDO DE TITANIO.

El objetivo de este trabajo fue investigar el estado del flúor en la superficie de implantes de titanio tratados con fluoruro de sodio y obtener información para descartar o apoyar la hipótesis de su participación en el proceso de osteo-integración. El titanio está recubierto con una capa estable y adherente de TiO_2 , de 2-10 nm de espesor, que reacciona con el fluoruro en función de la concentración del anión. En las condiciones experimentales utilizadas el tiempo de vida media de la reacción es de 2 minutos a 17°C , pH 5,5. La reacción procede en función de la fracción de fluoruro iónico de la concentración total de fluoruro, que aumenta de un mínimo a pH 1 a un máximo

a pH 6. El número de μmoles de fluoruro que reaccionan con TiO_2 crece exponencialmente en función de la concentración del anión, hacia un máximo a 0,244 M. La relación estequiométrica de la reacción Ti:F es 0.46 ± 0.03 no difiere significativamente de 0.5; relación inferida de la reacción: $3 \text{TiO}_2 + 6 \text{NaF} \rightarrow \text{Na}_2\text{TiF}_6 + 2 \text{Na}_2\text{TiO}_3$. Como el hexafluorotitanato de potasio es insoluble en agua y tiene una elevada constante de formación (se descompone por calentamiento a 780°C), se concluye que no se disociará para proveer fluoruro a las células óseas en contacto con el implante. La observación al microscopio electrónico de barrido y el análisis por espectroscopía de dispersión de rayos X de la superficie de un trozo de hoja de titanio tratado con solución de NaF a pH 3.5, indicaron aumento de la rugosidad y presencia de flúor en la capa de TiO_2 .

Palabras clave: flúor, fluoruro, titanio, implantes.

Introduction

Titanium is a highly biocompatible metal due to its resistance to corrosion, bio-inertness, capacity for osseointegration, and high fatigue limit. Titanium biocompatibility is the result of the protective oxide film that forms naturally in the presence of oxygen. The oxide film is strongly adherent, insoluble, and chemically impermeable, preventing reactions between the metal and its environment.¹

Treatment of titanium surface with fluoride was one of procedures that initiated the "second generation" of implants. Ellingsen² was the first to demonstrate that pretreatment with fluoride improves implant osseointegration. He suggested (but did not investigate) that "the presence of a fluoride coat on the surface of titanium implants stimulates the bone response leading to a

connection between titanium and phosphate from tissue fluids. Free fluoride ions will catalyze this reaction and induce the formation of fluoridated hydroxyapatite and fluorapatite in the surrounding bone". He et al.³ reported the improved bone response to rough titanium implants treated with hydrofluoric acid/nitric acid (HF/HNO_3) solution. Only two reports on the *in vitro* proliferation of pluripotent mesenchymal cells of different sources or the gene expression of osteoblasts^{4,5} employing titanium with fluoride modified surface were published in the last ten years.

Human fluorosis demonstrated that the chronic intake of fluoride has a strong bone anabolic effect. Its effect on the proliferation of osteoblasts has been investigated and two hypotheses (probably complementary) have been published. Lau et al.⁶ reported that

fluoride ion inhibits an acid protein-tyrosine-phosphatase responsible for the hydrolysis of a phosphate in one or more proteins involved in the MAP-kinase signaling cascade that leads to osteoblasts proliferation. Other investigators (Ammann et al.⁷ Caverzasio et al.,⁸ Jeschke et al.,⁹ Susa M.,¹⁰ Lau et al.¹¹) assign the activation of osteoblast proliferation to the synthesis of aluminum fluoride (AlF₄). Aluminum is an oligoelement always present in our circulation. According to these investigators AlF₄ replace the γ phosphate of GTP producing GDP-AlF₄, in the G-protein that acts as agonist regulator of adenylatecyclase. The stability of GDP-AlF₄ maintains the synthesis of cAMP unchecked. The high levels of the latter conduce to osteoblasts proliferation.

The aim of this work was to investigate the state of fluoride at the surface of fluoride-modified titanium implants and to provide information to support or discard the hypothesis that fluoride ion participates in the osseointegration of implants. None of the reports cited above investigated this point.

Materials and Methods

Experimental models: Reaction of titanium oxide with fluoride and reaction of 4% NaF solution, pH 3.5 on the surface of a piece of titanium sheet.

Measurement of fluoride ion concentration: Fluoride was measured by direct potentiometry using an ion selective electrode ORION 94-09 and a reference electrode of Ag/AgCl connected to a digital analogical converter.¹²

Reagents: Titanium oxide.titania (TiO₂, Sigma-Aldrich, \geq 99% pure) was used suspended in distilled water (20 mg/ml [250 mmol/l]). The suspension was stirred for 30 minutes before using. The TiO₂ suspension was added to the mixture of reagents in aliquots of 100 μ l (or smaller when indicated) with a micropipette.

NaF stock solution. A 0.244 M NaF solution

was prepared dissolving 10.248 g of the salt (Sigma-Aldrich, purity \geq 99%) in one liter of distilled water. Standard fluoride solutions were obtained by successive dilutions 1:10 of the stock solution: 0.24 M to 10⁻⁶ M.

Buffer solutions. Acetic/acetate 1 M buffer pH 5.5. Aliquots of this solution were adjusted with concentrated HCl or NaOH solutions to attain pH 4.5 and 6.5, when indicated.

Glycine/HCl 1M buffer pH 3.5. Aliquots of the solution were adjusted with concentrated HCl to attain pH 3.5, 2.5 and 1.5, when indicated.

Total Ionic Strength Adjustor. To provide constant background ionic strength, aliquots of a 1 M NaCl solution were used as indicate below.

General design of experiments.

Experiments were carried out in triplicate. The table displays the design of the typical experiment. Three 25 ml plastic vials were used for each experiment; buffer, NaCl and standard fluoride solutions were added as indicated. They were placed on a magnetic stirrer with a small stir bar. With the readings of these vials (H column) and the log of the actual NaF concentration (F column) the calibration curve was constructed. The suspension of TiO₂ was added and the mV readings recorded as a function of time (I). The latter allowed the calculation of the fluoride concentration at the end of the reaction with TiO₂ (J), the difference with the actual [NaF concentration (K = F-I) and the number of μ moles consumed in the experiment (L). The suspension of TiO₂ was added either at the beginning or in successive aliquots.

Investigation of the presence of titanium ion (Ti⁺⁴) in solution after the reaction between fluoride concentration 0.244 M and TiO₂: The suspension of TiO₂ + fluoride solution was centrifuged at 1000 g for 5 minutes and the presence of Ti⁺⁴ ion in the supernatant was investigated with chromotropic acid¹³ (that



Table 1. Design of a typical experiment. *moles/L, pH=5.5

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Vial	Buffer, ml	NaCl 1M, ml	NaF std., ml	Initial [NaF] std.*	Actual [NaF] std.*	Log [NaF]	Initial mV	Final mV	Final [NaF] *	(F-J)= moles/L	$\Delta\mu\text{moles of F reacting with TiO}_2$
1	1.0	1.0	10.0	0.0024	0.00203	-2.692	21.20				
2	1.0	1.0	10.0	0.0244	0.0203	-1.692	17.07				
3	1.0	1.0	10.0	0.2440	0.2030	-0.692	11.87	12.67	0.148	0.055	0.66

gives a red chelate with Ti^{+4} with maximum absorbance at 443 nm) and with sulfuric acid and hydrogen peroxide solutions^{14,15} to obtain the peroxo-titanic sulfate (yellow complex, with maximum absorbance at 410 nm).

*The Ellingsen's treatment of fluoride-modified titanium implants:*² A 1x5 cm piece of titanium sheet (Grade 2, 0.3 mm thick) was immersed in 4% NaF solution in 1 M glycine buffer, pH 3.4-3.6, during 30 minutes. After a brief wash in distilled water the titanium sheet was allowed to dry spontaneously. The latter and a piece of untreated titanium sheet were examined under the scanning electron microscopy and the composition of the oxide layer assessed by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS).

Statistical analysis. Data is reported as the mean \pm standard error. Comparisons were done with ANOVA and covariance analyses. Best fit of linear and nonlinear regressions and their parameters were performed with a computer program (GraphPad Prism 5.0, San Diego, California, USA). The algorithm proceeds by iterating until the difference between two consecutive sums of squares is less than 0.01. The differences were considered significant if the probability of different outcomes is less than 0.05.

Results

The curve of Figure 1 reveals that the addition of 250 $\mu\text{mol TiO}_2$ to a 0.080M fluoride solution pH 5.5, 17°C (vial 3, Table 1) with continuous stirring, reduces the concentration of fluoride at a fast rate. The half time ($T_{1/2}$) is 2 minutes and independent of fluoride concentration in the present experimental model.

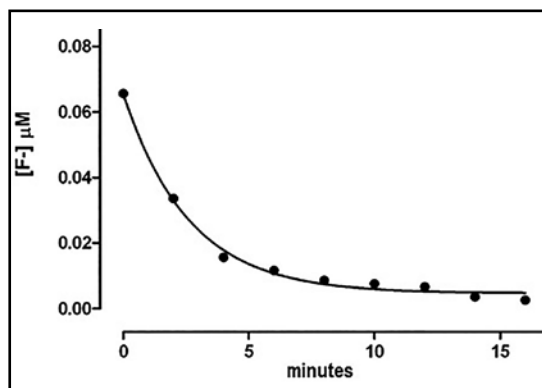


Figure 1. Fluoride concentration as a function of time, after the addition of 250 $\mu\text{mol TiO}_2$ to a vial containing a 0.080 M fluoride solution, pH 5.5, 17°C.

This experiment was repeated at different pH values and the $T_{1/2}$ were compared (Table 2). The analysis of variance of $T_{1/2}$ data indicated that they do not differ significantly from each other

($p=1.000$). It is concluded that the reaction is fast and that this parameter is not affected by acidification of the medium (pH values 4.45 to 6.55).

Table 2. $T_{1/2}$ of the reaction between 0.1 M fluoride solution and 250 $\mu\text{mol TiO}_2$ as a function of pH.

pH	$T_{1/2} \pm \text{SEM}$
4.45	1.9 ± 0.3
4.75	2.0 ± 0.3
5.50	2.1 ± 0.1
6.55	2.9 ± 0.5

The measurements of fluoride concentration between pH 1.5 to 6.55 were estimated comparing the parameters of the calibration curves.

Figure 2 shows that the value of the slopes of the calibration curves increased (toward more negative figures) linearly as a function of pH values and the same applies

to the values of the ordinates. The analysis of variance reveals that the values of the slopes and the ordinates are significantly affected by pH (Table 3). Difference between slopes: $F = 9.267$, $p < 0.0008$; differences between ordinates: $F = 5.573$, $p < 0.002$. As pH values determine the fraction of fluoride in ionic form, these results indicate that the accuracy of fluoride measurements is affected by pH value. It is concluded that the calibration curve of any experiment must have the same pH and ionic strength of the latter.

Table 3. Slopes, ordinates and their SEM of triplicates or calibration curves of fluoride as a function of pH.

pH	Slope	SEM	Ordinate	SEM
1.50	-0.1454	0.00568	1.055	0.112
2.69	-0.1784	0.00478	1.456	0.087
3.68	-0.2098	0.01869	1.823	0.321
4.53	-0.2174	0.00163	1.980	0.028
5.50	-0.2308	0.00615	2.524	0.114
6.30	-0.2134	0.01410	1.875	0.242

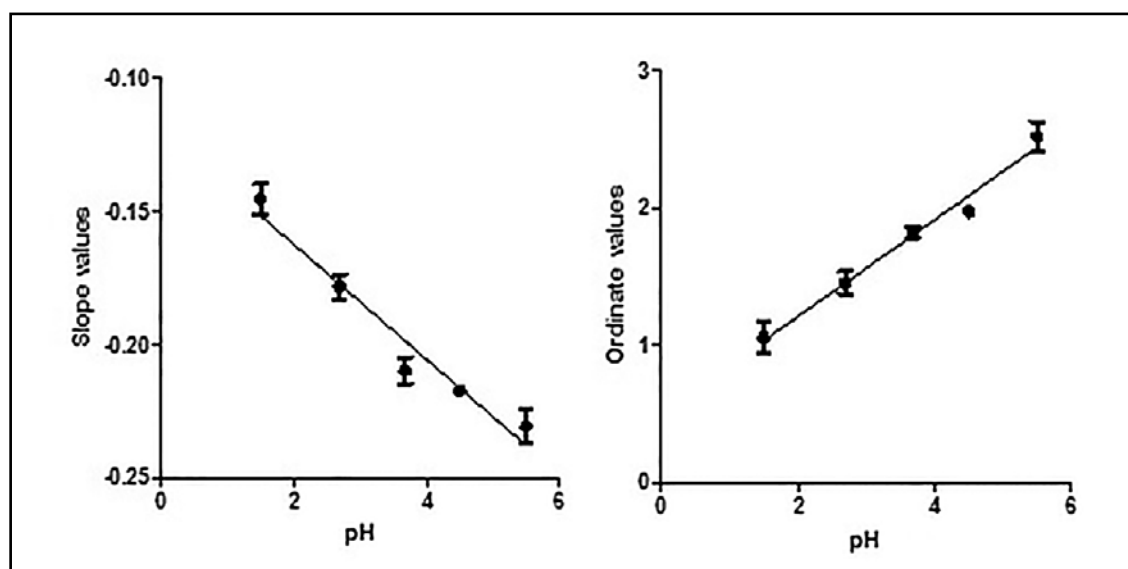


Figure 2. Modification of the slopes (left) and ordinates (right) of fluoride calibration curves as a function of pH values.



Figure 3 exhibits the number of fluoride μmol that react with 250 μmol of TiO_2 , (pH 5.5, 17 °C) increases exponentially approaching the fluoride concentration 0.244 M.

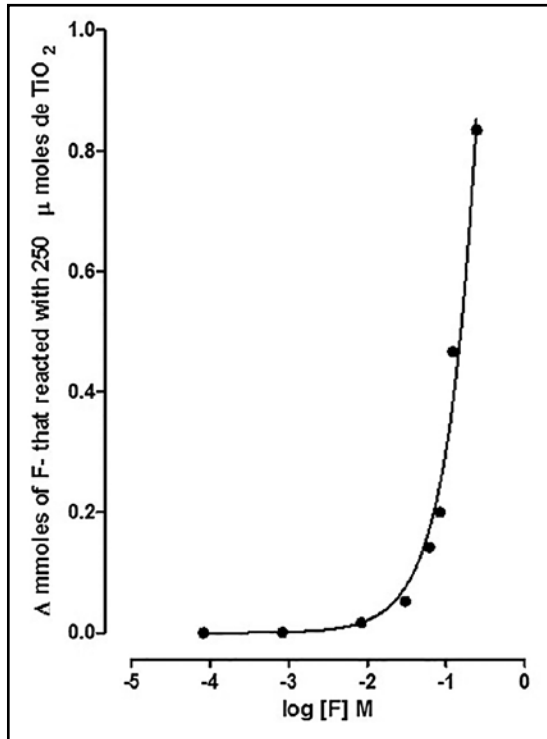


Figure 3. Number of TiO_2 μmol that reacted with fluoride, as a function of the concentration of fluoride solution.

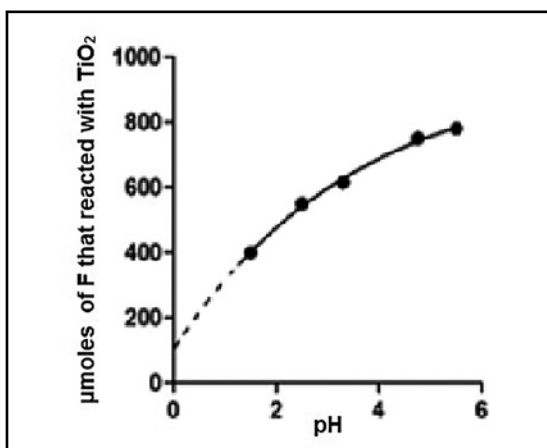


Figure 4. Number of TiO_2 μmol that reacted with fluoride as a function of pH values.

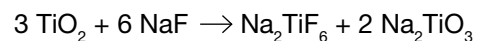
What is the amount of fluoride capable of reacting with 250 μmol TiO_2 , as a function of pH?

The values obtained were adjusted to a growing exponential function (Figure 4) tending to a plateau of the form:

$$Y = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) * (1 - \exp(-K * x))$$

Where Y is the number of fluoride μmol that reacted with TiO_2 , Y_0 is the ordinate (estimated value = 102 μmol), Plateau (estimated = 964 μmol), K (constant) = 0.2842, $R^2 = 0.9920$. Clearly the reaction depends on the concentration of ionic fluoride, which increases approaching neutral pH values.⁷

The following experiment was performed to determine the stoichiometry of the reaction. A series of known amounts of TiO_2 were added successively to a 0.244 M solution of sodium fluoride, pH 5.5, 17 °C. The reaction was left to proceed to completion before each addition of TiO_2 and the number of accumulated μmoles of fluoride consumed were plotted against the cumulative μmoles of titanium added. The analysis of the results exhibited in Figure 5 reveals a slope: 2.07 ± 0.13 mol fluoride per mol of titanium. This relationship agrees with the ratio F:Ti of the reaction⁶ whose products are sodium-hexafluortitanate and sodium titanate.



The presence of titanium ion (Ti^{4+}) was investigated in the supernatant of a mixture of fluoride solution with an excess of TiO_2 . The reactions with chromotropic acid or with hydrogen peroxide + sulfuric acid were negative. As discussed below, these results are consistent with the experimental conditions (and also probably under physiological ones). The hexafluortitanate complex would not add fluoride ion to the implant environment.

The above information led us to investigate the state the chemical composition at the surface of a polished titanium sheet etched

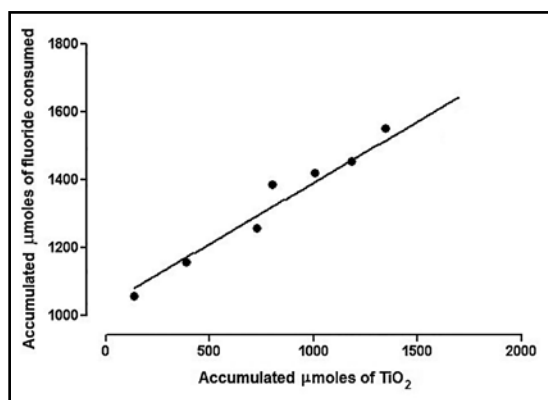


Figure 5. Relationship between the fluoride μmol consumed as a function of the number of μmoles added to the reaction mixture.

Table 4. Microanalysis by EDS of the surface of untreated and F-modified titanium sheet according to Ellingsen.⁵

Element	Untreated Titanium		F-modified Titanium	
	Wt %	At %	Wt %	At %
Carbon	12.81	36.96	2.92	7.29
Oxygen			6.03	9.50
Fluorine			11.26	14.66
Sodium			1.02	1.08
Chloride			1.66	1.40
Titanium	85.27	61.01	54.62	34.13
Lead			5.87	0.85

with 4% NaF solution pH 3.5, according to Ellingsen.² The results obtained were: a) EDS microanalysis indicated the presence

of fluorine and b) treatment increased the roughness of the surface (Figure 6, Table 4).

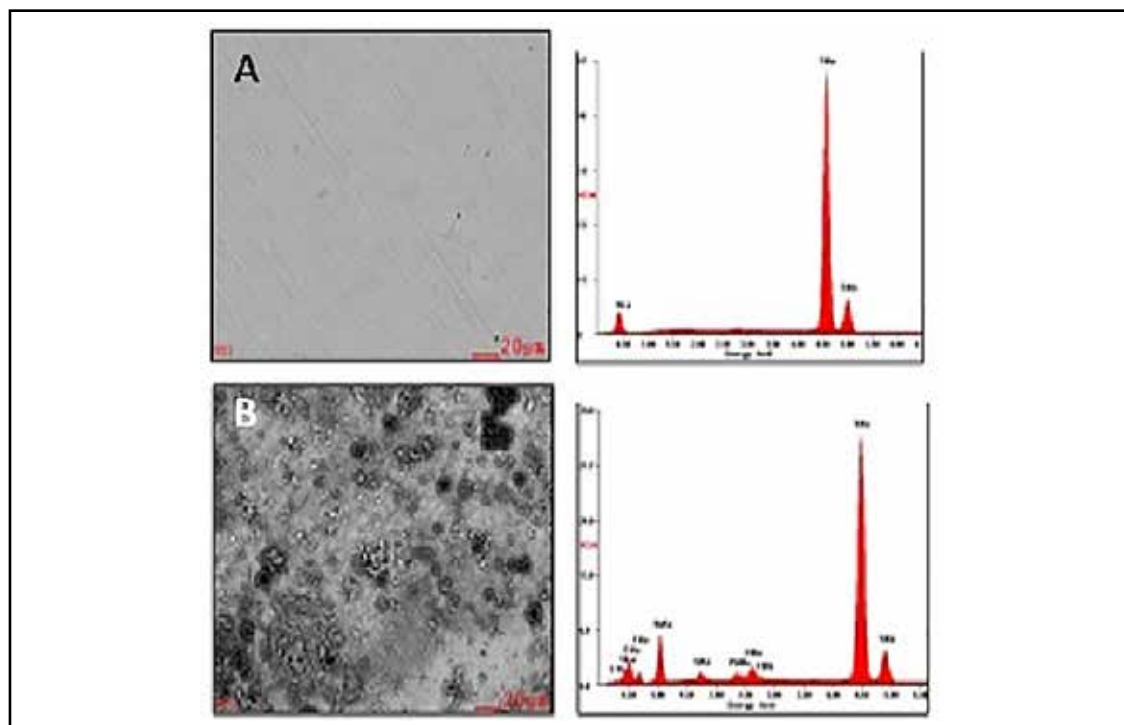
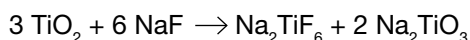


Figure 6. SEM images, spectra of X-ray dispersive energies and elements present in the surface of A: polished titanium sheet and B: F-modified titanium sheet according to Ellingsen.⁵



Discussion

Titanium is coated with a 2-10 nm thick layer of stable and adherent TiO_2 , which reacts with fluoride as a function of the anion concentration. Under the stated experimental conditions, the half-life of the reaction is about 2 minutes at 17°C , $\text{pH} = 5.5$. The stoichiometry of the reaction Ti:F is 0.46 ± 0.03 which does not differ significantly from the theoretical ratio inferred from the reaction between fluoride and TiO_2 giving sodium hexafluorotitanate and sodium titanate as products.¹⁶



The reaction proceeds as a function of anionic fluoride concentration, which increases from a minimum at $\text{pH} 1$ to a maximum close to $\text{pH} 6$.¹⁷ The number of μmoles of fluoride which reacts with TiO_2 grows exponentially as a function of fluoride concentration, toward a maximum at 0.244 M , fluoride.

Potassium hexafluorotitanate is insoluble in water and it decomposes by heating in air over 780°C ^{18,19} (giving TiO_2 and KF), indicating a high formation constant. It is concluded that the hexafluorotitanate would not dissociate to provide fluoride ion to the implant-bone environment, to promote growth and differentiation of osteoblasts.

The overall information afforded by present experiments allows us to conclude that a) fluorine can be included in the TiO_2 layer, most probably as insoluble hexafluorotitanate

and b) treatment with fluoride roughened the surface of polished titanium, in agreement with the report by Korotin et al: "acid treatment of Ti reduces the content of hydrocarbons increasing the surface energy and bio-compatibility. In addition oxygen concentration on the surface of F-modified Ti is much higher than for the untreated sample, because the acid treatment removes contaminants, increases their reactivity, and provides a better passivation and formation of thick protecting TiO_2 layer".²⁰

It is concluded that fluoride reacts with the titanium dioxide that covers the surface of the metal producing hexafluorotitanate, a complex and highly stable anion that, under physiological conditions would not dissociate to provide fluoride anions in the vicinity of the implants.

Acknowledgements

We acknowledge with thanks to Dr. Eng. Sergio Geninatti (Director of the Escuela de Ingeniería Electrónica U.N. Rosario) for advice and the use of equipment for the anodizing experiments and to Dr. Emilio Roldán (Laboratorios Gador) for the gift of titanium oxide.

Conflict of interests: The authors declare no conflicts interest.

Recibido: septiembre 2016.

Aceptado: febrero 2017.

References

1. Schroeder A, Sutter F, Krekeler G. *Implantología Oral*. Pp. 98. Panamericana, 1989.
2. Ellingsen JE. Pre-treatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1995; 6:749-53.
3. He FM, Yang GL, Zhao SF, Cheng ZP. Mechanical and histomorphometric evaluations of rough titanium implants treated with hydrofluoric acid/nitric acid solution in rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011; 26:115-22.
4. Isa ZM, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford CM. Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006; 21:203-11.
5. Guo J, Padilla RJ, Ambrose W, De Kok IJ, Cooper LF. The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO₂ grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2007; 28:5418-25.
6. Lau KH, Farley JR, Freeman TK, Baylink DJ. A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells: inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. *Metabolism* 1989; 38:858-68.
7. Ammann P, Rizzoli R, Caverzasio J, Bonjour JP. Fluoride potentiates the osteogenic effects of IGF-I in aged ovariectomized rats. *Bone* 1998; 22:39-43.
8. Caverzasio J, Palmer G, Bonjour JP. Fluoride: mode of action. *Bone* 1998; 22:585-9.
9. Jeschke M, Standke GJ, Scaronuscarona M. Fluoroaluminate induces activation and association of Src and Pyk2 tyrosine kinases in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem*. 1998; 273:11354-61.
10. Susa M. Heterotrimeric G proteins as fluoride targets in bone (review). *Int J Mol Med*. 1999; 3:115-26.
11. Lau KH, Goodwin C, Arias M, Mohan S, Baylink DJ. Bone cell mitogenic action of fluoruroaluminate and aluminium fluoride but not that of sodium fluoride involves up-regulation of the insulin-like growth factor system. *Bone*. 2002; 30:705-11.
12. Rigalli A, Pera L, Di Loreto V, Brun LR. Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. 1ª Ed. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Argentina. 2007. ISBN 978-950-673-616-3.
13. Brandt WW, Preiser AE. Spectrophotometric investigation of reaction of titanium with Chromotropic Acid. *Anal Chem*. 1942; 14:791-2.
14. Occupational, Safety and Health Administration (US Department of Labor). (2015, Dec 6) http://www.osha.gov/dts/sltc/methods/inorganic/id006/hydrogen_peroxide.html
15. Feigl F, Schaeffer A. Occupational, Safety and Health Administration (US Department of Labor). *Anal Chem* 1951; 23:353 (2015, Dec 6) http://www.osha.gov/dts/sltc/methods/inorganic/id006/hydrogen_peroxide.html
16. Fine LW. *Chemistry*. 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins Co. 1978.
17. Fovet Y, Gal JY, Toumelin-Chemla. Influence of pH and fluoride concentration passivating layer: stability of titanium dioxide. *Talanta* 2001; 53:1053-63.
18. CMC Cometals. Safety Data Sheet of Potassium fluorotitanate. (2015, Dec 6) <http://www.guidechem.com/reference/dic-19144.html>
19. Paredes JL. El uso de la anodización en materiales. (2015, Dec 6) http://www.difusioncultural.uam.mx/casadeltiempo/28_iv_feb_2010/casa_del_tiempo_eIV_num28_59_65.pdf
20. Korotin DM, Bartkowski S, Kurmaev EZ, et al. Surface characterization of titanium implants treated in hydrofluoric acid. *J Biomater Nanobiotechnol* 2012; 3:87-91.



ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

OSSEOINTEGRATION OF TITANIUM IMPLANTS ANODIZED WITH AND WITHOUT FLUORIDE IN THE ELECTROLYTE. A STUDY IN RATS

José A. Contribunale,^{1*} Rodolfo C. Puche²

1. Clínica de Prosthodontia Fija. Facultad de Odontología. 2. Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario.

Abstract

Based on the hypothesis that fluoride acts as a bone anabolic agent, the aim of this study was to measure in rats the osseointegration of implants (grade II titanium wire, 1 mm diameter, 4 mm long) submitted to anodic oxidation in 2 M phosphoric acid solution (*control implants*) or b) in 2 M phosphoric acid solution plus 0.2 M NaF (*F-modified implants*). Chemical composition of the implants surface was assessed by energy-dispersive X-ray spectroscopy. The surface of F-modified implants contained a 2.57% fluorine in weight. Adult male Sprague Dawley rats (300-350 g body weight) received two implants (in the femur and in the tibia, close to the knee) in each hind limb. Control and F-modified implants were inserted in the left and right hind limbs, respectively. Three weeks after surgery, the animals were sacrificed. The undecalcified

bones were embedded in methylmetacrylate. Sections were obtained to measure two histomorphometric magnitudes: bone-to-implant contact (BIC) and bone volume in a defined volume of tissue around the implant (BV/TV). BIC was significantly increased on F-modified implants with respect to their controls ($57.2\% \pm 3.3\%$, vs. 47.9 ± 3.4 , $p < 0.05$). BV/TV did not differ significantly between F-modified and control implants ($24.5 \pm 2.2\%$ vs. 22.9 ± 1.4 , $p = 0.30$). Profiles of the average gray pixel levels of pseudo3D images showed a greater roughness of F-modified implants respect to their controls ($p < 0.05$). The relative contributions of surface roughness and its fluorine content to the osseointegration process requires further research.

Key words: implant, osseointegration, rat, fluoride.

* E-mail: josecontribunale@hotmail.com

Resumen

OSTEO-INTEGRACIÓN DE IMPLANTES DE TITANIO ANODIZADO CON Y SIN AGREGADO DE FLUORURO EN EL ELECTROLITO. ESTUDIO EN LA RATA.

Con la hipótesis de que el ión fluoruro actúa como anabólico sobre las células óseas, el objetivo de este trabajo fue determinar el grado de osteo-integración (en la rata) de implantes (alambre de titanio II, 1 mm de diámetro, 4 mm de largo) anodizados en solución de ácido fosfórico 2 M + NaF 0,2 M (implantes-F) comparados con implantes controles, anodizados en solución de ácido fosfórico 2 M. La composición química de la superficie de los implantes fue evaluada mediante el espectro de dispersión de rayos X producidos durante la observación en el microscopio electrónico de barrido. La superficie de los implantes-F contiene 2.57% de flúor. Ratas macho Sprague-Dawley recibieron dos implantes (en el

fémur y en tibia, próximos a la rodilla). Los implantes-F y controles se insertaron en las patas izquierda y derecha respectivamente. En los cortes de hueso sin decalcificación previa se midió el contacto hueso-implante (BIC) y volumen óseo en un volumen definido de tejido (BV/TV). BIC fue significativamente mayor con los Implantes-F respecto de los controles ($57,2\pm 3,3\%$ vs. $47,9\pm 3,4$, $p<0,05$). BV/TV no exhibió diferencias significativas entre implantes-F y controles ($24,5\pm 2,2\%$ vs. $22,9\pm 1,4$, $p=0,30$). Los perfiles de los niveles de grises de los imágenes pseudo3D de las superficies de los implantes pusieron en evidencia la mayor rugosidad de los implantes-F respecto de los controles ($p<0,05$). Las contribuciones relativas de la rugosidad y del flúor en el proceso de osteo-integración requieren investigación adicional.

Palabras clave: implantes, osteo-integración, rata, fluoruro.

Introduction

Ellingsen (1955)¹ first demonstrated that pretreatment with fluoride improves bone retention of implants. He “suggested that the presence of a fluoride coat on the surface of titanium implants stimulates the bone response leading to a connection between titanium and phosphate from tissue fluids. Free fluoride ions will catalyze this reaction and induce the formation of fluoridated hydroxyapatite and fluorapatite in the surrounding bone”. Other reports (reviewed in the Discussion section) confirmed the positive effect of acid etching of the layer of titanium oxide with hydrofluoric acid or with alkaline fluoride + nitric or phosphoric acids solutions, producing implants with roughened surfaces, the common denominator of *second generation implants*. Anodizing of titanium is another method introduced in the

second generation implants. This procedure increased the thickness of the titanium oxide layer, together with the production of a nanostructured surface with hydrophilic properties, rich in electrostatic charges given by the inclusion of phosphate ions in the titanium oxide layer.

Fluorosis showed that fluoride is a powerful bone anabolic agent. Two hypotheses (not mutually exclusive) have been published to explain the effect of fluoride on the proliferation of osteoblasts. Lau et al.² (1989) demonstrated that fluoride inhibits a protein-tyrosine acid phosphatase, responsible for the hydrolysis of phosphate in one or more signaling proteins of the MAP kinase cascade launched by action of hormones and cytokines. Other researchers³⁻⁷ assigned activation of osteoblast proliferation to AlF_4^- , the complex of fluoride with aluminum, a trace element present in the circulation.



Many cell receptors have two associated G-proteins (stimulatory and inhibitory), which function is to control the initiation of the above-mentioned cascade. This control requires that the inhibitory G-protein have a GTP molecule in its structure. Aluminum fluoride replaces the γ -phosphate residue in guanosine diphosphate inhibitory G-protein and, as a consequence, the system remains stimulated. Present experiments were conducted to investigate whether fluoride present on the anodized surface of the implant stimulates osteogenic cells.

Materials and methods

Animals: Adult male Sprague Dawley rats, 300-350 g of body weight (11-week-old) were obtained from the vivarium of the School of Medical Sciences of the National University of Rosario. They were maintained in a controlled climate environment and fed with balanced chow and water *ad libitum*. All experiments were carried out in accordance with the guidelines on the NIH guide.⁸

Anesthesia, surgery and euthanasia

Pre-surgical preparation. Each rat received 0.25 ml of a 1 g/dl acepromazine solution per 100 g body weight by subcutaneous injection. Half an hour later the rat was placed in a 2.5 liters container together with a cotton swab embedded with 2 ml of isoflurane. Anesthesia took effect in 15 minutes.

Surgical procedure. Each rat received successive intramuscular injections: 0.3 ml of a ketamine solution (50 mg/ml), 0.1 ml of a diclofenac solution (25 mg/ml), and 0.1 ml of a ceftriaxone solution (30 mg/ml) per 100 g weight. During surgery, the snout of the rat was covered with a tube containing a swab with isoflurane.

The rat hind limbs were shaved and scrubbed with 10% povidone-iodine solution. The distal aspect of the femur and the proximal aspect of the tibia of each leg were carefully exposed via a skin incision and muscle

dissection. Tissue was reflected to expose the flat portions of the femur and tibia, above and below the knee. The implant sites were prepared at 7 mm from the articular surfaces by hand drilling a hole, perpendicular to the bone surface, with a 1.1 mm diameter round bur. The implants were subsequently placed into the osteotomy and carefully pushed into place. After the correct implants positions were achieved, surgical sites were closed in layers. Muscle and skin were sutured separately with absorbable sutures. All rats recovered from surgery and displayed normal mobility and activity after 1 or 2 hours. Rats received standard rodent chow and water *ad libitum*. Analgesic was administered in the drinking water (0.25 g of diclofenac per liter) for one week.

Euthanasia. Each rat received, 0.25 ml per 100 g body weight of a acepromazine solution (1 g/dl), by subcutaneous injection. Half an hour later the rats were anesthetized as indicated above and then they were placed into carbon dioxide chamber for the time necessary for the death.

Implants: Titanium wire, grade II, 1 mm in diameter, was obtained at Roberto Cordes SA (Argentina). Raw wire lengths (40 cm) were submitted to two different anodizing conditions: a) in 2 M phosphoric acid solution (*control implants*) and b) in 2 M phosphoric acid solution plus 0.2 M NaF (*F-modified implants*).⁹

The wire (anode) was placed into a 500 ml plastic measuring cylinder internally lined with a 0.1 mm thick sheet of bronze (cathode). In order to ensure uniformity of the electric field, the titanium wire was centered into the cylinder with the aid of plastic discs attached at the ends. Anodizing was done at room temperature, constant 20 volts for one hour. After anodizing, implants were prepared by cutting the wire into 4 mm-long sections. They were cleaned by soaking in 96% ethanol for 24 hours and autoclaved.

Experimental design: Each rat received two implants in each hind limb. Control implants were inserted in the left leg and F-modified implants in the right leg. Three weeks after receiving the implants the animals were sacrificed to assess the osseointegration as described below.

Preparation of histological sections. After a healing period of 3 weeks, rats were euthanized as detailed above. The skin was incised on the medial side on the femoral-tibio-patellar region separating musculature from bone. Bone specimens (tibia and femur) were removed, cleaned of soft tissue, and fixed in phosphate-buffered paraformaldehyde solution for 12 hours. Subsequently, the specimens were dehydrated in an ascending series of ethanol (50–96%) over 2 days, cleared with xylene and finally embedded in methylmetacrylate, according to Maniatopoulos et al.¹⁰ Once polymerized, blocks of acrylic were cut transversely to the implant axis, with a low speed metalographic saw (Isomet). The sections were made with a thickness of about 150 μm . Three to five cross sections were obtained of each implanted bone. The sections were thinned using 400

grit sandpaper and finally polished with 1000 grit sandpaper, lubricating with water. The 60 to 80 μm -sections were stained with of 2% Alizarin Red aqueous solution, for 5 minutes.

Histomorphometric analysis. Digital images of section were obtained using a trinocular light microscope (Leitz, Wetzlar, Germany). Digital images of sections were obtained at a 40x magnification with a camera (Olympus SP-350, China). Digital images were analyzed using the NIH image software.¹¹ Two histomorphometric parameters were determined in each section:

a) Bone-to-implant contact (BIC): BIC was measured around the implant (Figure 1A). Percent contact was defined as the length of bone contacting the implant, divided by the circumference length of the implant. Bone contact was defined as no visible gap at the light microscopic level. For this system, this represents any bone within 10 μm of the implant surface.

b) Bone volume within a defined volume of tissue around the implant (BV/TV). It is expressed as a fraction of the area occupied by bone within a ring (centered in the implant) 500 and 1000 μm of internal and external radii, respectively (Figure 1B).

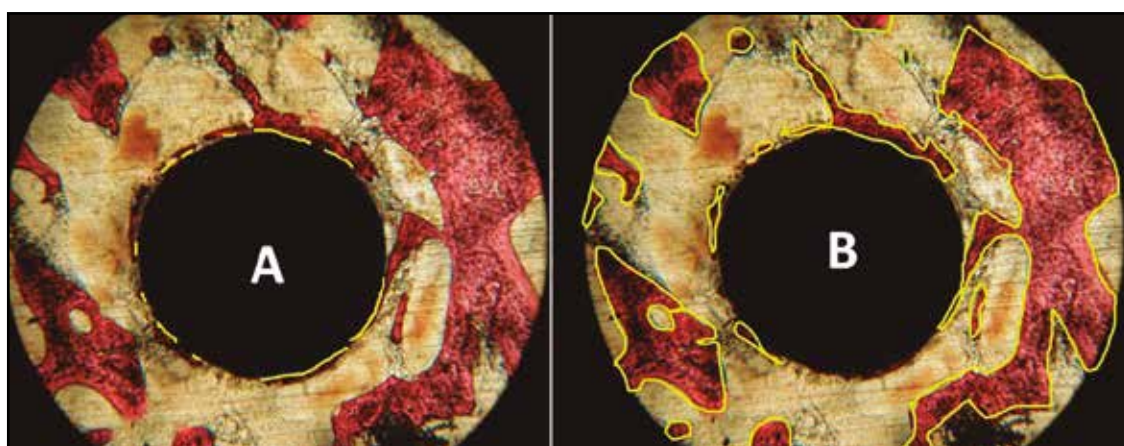


Figure 1. A: BIC. The lines around the circumference of the implant mark the lengths of bone-to implant-contact. **B:** BV/TV. The lines mark the areas of bone within the ring of standard dimensions around to the implant. The implant has a diameter of 1 mm.



Analysis of the implants surface at the Scanning Electron Microscope (SEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS).

Anodized (with or without fluoride in the electrolyte) and non-anodized titanium wire samples were examined by the scanning electron microscopy and the composition of the oxide layer was analyzed by EDS (spectroscopy energy dispersive).

Pseudo3D images of the surface of the implants. The RGB images of the implants (969x720 pixels) were converted to 16 bit-gray images. With the aid of the digital images analysis program, pseudo3D images of the surfaces of the implants were obtained as follows. The images were selected with the rectangle tool and a two-column table, summarizing the outline of the image was obtained. The column of the vertical axis (Y) contains the gray level average of the 720 pixels for each one of the 969 pixels of the X axis. Statistical analysis of the latter values gave the maximum and minimum values, the average and its standard deviation values and the 95% confidence interval of the average. These figures were used as surrogate variables to compare the surface roughness of the controls vs. F-modified implants.

Statistical analysis. Seven rats were used in these experiments, each one of which received four implants. Each implant produced 3 to 6 sections for histological analysis. Digital images of the sections were analyzed individually. The values of the measured variables were averaged for each implant. The percentage figures BIC and BV/TV were normalized by the angular transformation (angle = arcsine $\sqrt{\text{percentage}}$), before statistical analysis. The results were analyzed using the Student t-test.¹² Statistical significance was assigned if the value of $p < 0.05$.

Results

Samples of raw and anodized titanium wire, with and without fluoride added to the electrolyte used in the process were observed under a scanning electron microscope. The Figure 2 reveals that anodizing modifies the roughness of titanium surface. The microanalysis of the elements present in the passivating layer (Table 1) reveals the presence of phosphorous and oxygen (from phosphoric acid) and fluorine in the F-modified wire, plus some contaminants granted, most probably, from the bronze anode.

Table 1. Elements composition at the surface of implants, assessed by energy dispersive spectroscopy.

Elements	Implants not anodized Weight %	Implants anodized in 2M H ₃ PO ₄ Weight %	Implants anodized in 2M H ₃ PO ₄ + 0.2 M NaF Weight %
Carbon	12.81	23.31	18.00
Oxygen	n.d.	28.82	27.30
Fluorine	n.d.	n.d.	2.57
Sodium	n.d.	0.93	1.37
Magnesium	n.d.	0.49	0.80
Aluminum	1.91	1.69	1.77
Silica	n.d.	3.51	2.84
Phosphorous	n.d.	1.42	0.67
Titanium	85.27	38.59	44.46

n.d.= not-detected

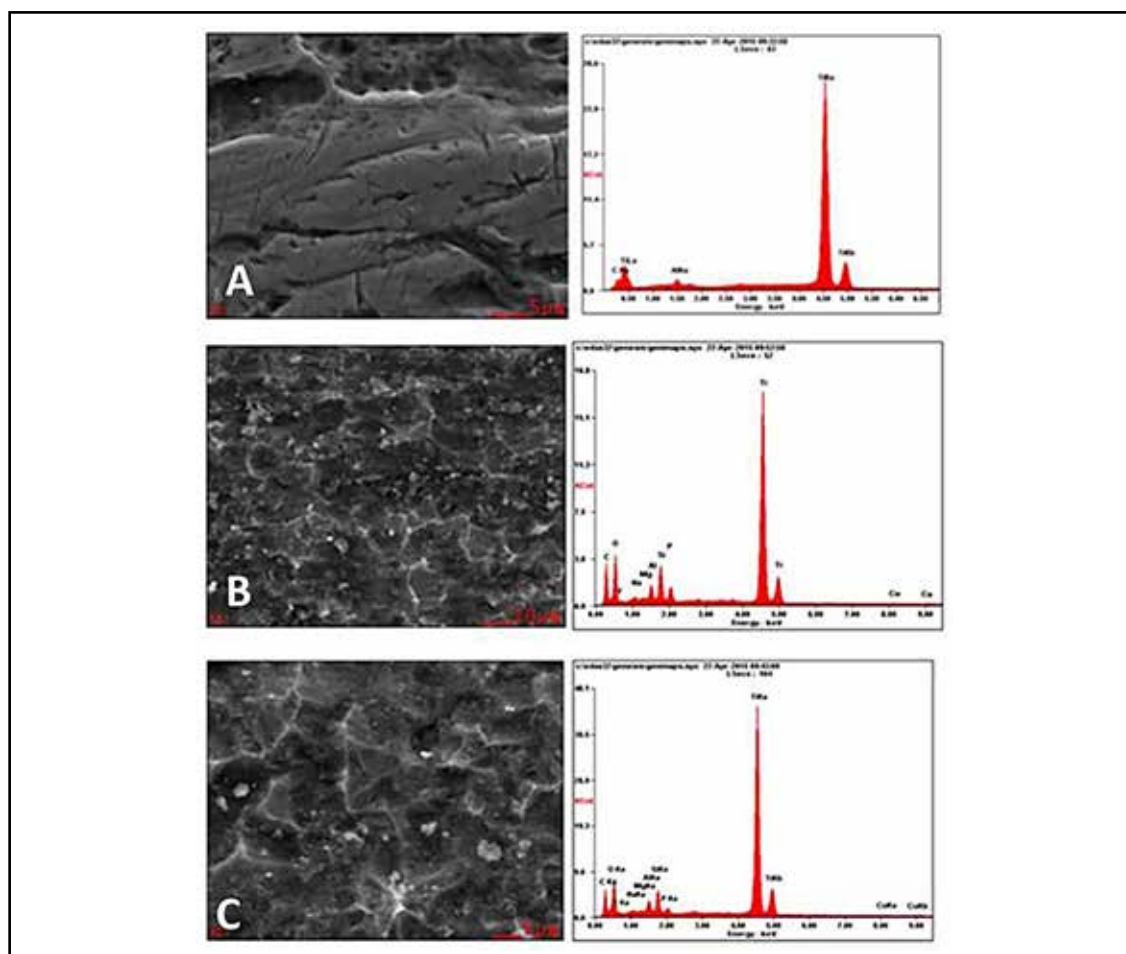


Figure 2. Left: **A:** surface of the coarse grained titanium wire. **B:** surface of anodized wire in phosphoric acid 2M. **C:** surface of anodized wire in phosphoric acid 2M+NaF 0.2M. Right: spectra of characteristic X-rays produced at the SEM.

The experimental model indicated that each rat received two implants in each hind limb. Control implants were inserted in the flat portions of the femur and tibia of the left leg, at 7 mm above and below the knee. F-modified implants were similarly inserted in the right leg. Three weeks after surgery the animals were sacrificed and bones were processed to assess osseointegration using two measures: BIC and BV/TV (Figure 1).

As expected, implants (control or F-modified) inserted in the femurs showed not significant differences with those of the tibia,

either in the BIC or the BV/TV measurements (Tables 2 and 3).

When the pooled data of controls was compared with that of F-modified implants, significant differences were observed in the BIC variable and not in the BV/TV (Tables 4 and 5).

To compare the surface roughness of implants, the images of Figure 2 were converted to gray images of 16 bits to obtain the pseudo3D images. As described in Material and Methods a summary of the outline of the images of control and F-modified implants were obtained.



Table 2. Comparison of the osseointegration, assessed by BIC, of control (left femur and tibia) and F-modified implants (right femur and tibia) in the rat.

	Implants anodized in 2M H ₃ PO ₄		Implants anodized in 2M H ₃ PO ₄ + 0.2 M NaF	
	Tibia	Fémur	Tibia	Fémur
Number of rats	7			
BIC, mean±SEM, %	48.3±5.4	46.8±3.8	58.3±3.5	56.1±3.1
“t” test	0.611		1.245	
p value	0.554		0.237	

Table 3. Comparison of the osseointegration assessed by BIC, of control vs. F-modified implants, in the rat.

	Implants anodized in 2M H ₃ PO ₄	Implants anodized in 2M H ₃ PO ₄ + 0.2 M NaF
Number of implants	14	14
BIC, mean±SEM, %	47.9±3.4	57.2±3.3
“t” test		2.047
p value		<0.05

Table 4. Comparison of the osseointegration, assessed by BV/TV, of control (left femur and tibia) and F-modified implants (right femur and tibia) in the rat.

	Implants anodized in 2M H ₃ PO ₄		Implants anodized in 2M H ₃ PO ₄ + 0.2 M NaF	
	Tibia	Fémur	Tibia	Fémur
Number of rats	7			
BV/TV, mean±SEM, %	21.90±2.2	26.1±2.1	24.7±3.3	21.2±3.0
“t” test	1.381		0.750	
p value	0.159		0.434	

Table 5. Comparison of the osseointegration assessed by BV/TV, of control vs. F-modified implants, in the rat.

	Implants anodized in 2M H ₃ PO ₄	Implants anodized in 2M H ₃ PO ₄ + 0.2 M NaF
Number of implants	14	14
BV/TV, mean±SEM, %	24.5±2.2	22.9±1.4
“t” test		1.056
p value		0.3007

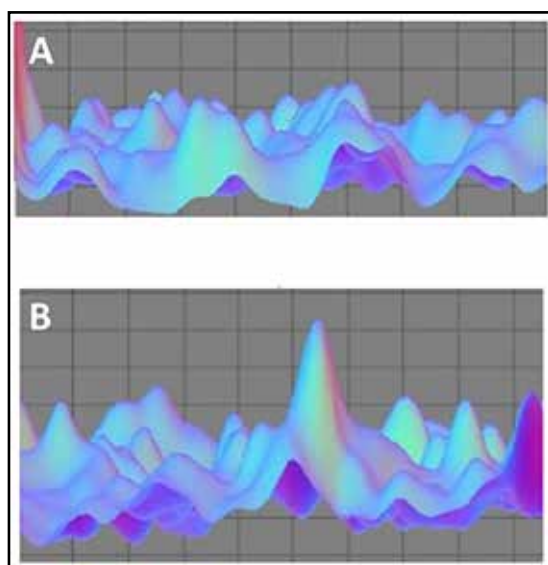


Figure 3. Pseudo3D images of the surfaces of anodized implant in phosphoric acid 2M (A) and in phosphoric acid 2M+NaF 0.2M.

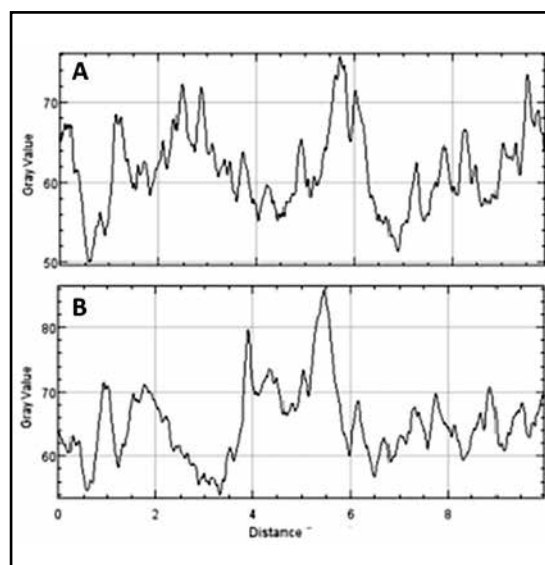


Figure 4. The graphs present the profiles of the average gray levels outline of the images of implants surfaces, previously converted to gray images of 16 bits. The ordinate shows the average gray level of the 720 pixels for each one of the 969 pixels of the width of the images. **A.** Implants anodized in phosphoric acid 2M; **B.** Anodized in phosphoric acid 2M+NaF 0.2M.

Table 6. Statistical summary of the profiles of average gray levels (surrogate variable of superficial roughness of implants) shown in Figure 4.

	Implants anodized in 2M H ₃ PO ₄	Implants anodized in 2M H ₃ PO ₄ + 0.2 M NaF
Minimum	3266	1429
Maximum	65470	65530
Mean ± SD	16350 ± 3484	16840 ± 3323
95% Confidence Interval of the mean	16100-16600	16590-17090

Statistical analysis of the outlines gave the maximum and minimum values, the average and its standard deviation values and the 95% confidence interval of the average. These data were used as surrogate variables to compare the surface roughness of the controls vs. F-modified implants. Inspection of Table 6 reveals that F-modified implants

are significantly rougher than control ones ($p < 0.05$).

Discussion

The concept of osseointegration was discovered by Brånemark et al.¹⁵ and has had a great influence on the clinical treatment of oral implants. The first generation of titanium implants



had a machined surface. Shortly after, the second generation of implants appeared in the market. Clinical experience revealed that implants with a rough surface with homogeneous and uniform pores, gave the best molecular interactions, cell response and osseointegration.

The experiments reported in this paper investigate the effect of three particularities of the implants surface related to the osseointegration process: roughness, anodic oxidation and fluoride incorporation. A brief review of the literature on these particularities follows before reporting the results of present experiments.

Surface roughness. Surface roughness can be achieved with sand, Al_2O_3 or TiO_2 grit-blasting, coupled or not with acid etching, anodic oxidation and more recently with laser.¹⁶⁻¹⁹ It has been proposed that the improvement in osteoconductivity of these strategies is related to the altered topography of the implant resulting in greater adhesion of osteoblasts and pre-osteoblasts.^{20,21} The surface of implants should exhibit a microporous structure of about 0.5 to 1.0 μm diameter to facilitate insertion of osteoblasts filopodia. Additional micropores, 3 to 5 μm diameter allow osteoblasts to adhere strongly to those depressions. It is known, however, that the success of the implant depends on the complex environment that includes components of blood and other cells, not only osteogenic cells. So far, published clinical trials do not clearly describe whether the implants under investigation have machined or micro/nanotechnological surfaces.¹⁴

Anodic oxidation. The electrochemical process of anodic oxidation provides two types of oxide layers as a function of the quality of the electrolyte employed to dissolve the oxide layer, A) nonporous films are produced with electrolytes in which the dissolution of the oxide is negligible and B) porous films are obtained with electrolytes containing acids in which the oxide is soluble. As the pores formed by anodic oxidation measure 10-100 nm, they

are recognized as nanoporous structures.²⁰ The structural and chemical properties can be varied by controlling various parameters: anode potential, electrolyte composition, temperature, and current.²¹ At lower voltage, a fairly constant growth of the oxide layer is obtained, while at higher voltage, gas evolution increases and thickening of the oxide layer is obtained.²² Furthermore, depending on the electrolyte composition, different ions could be integrated into the oxide layer.^{23,24} Anodic oxidation improves bone to implant contact and requires more torque to extract the threaded implants.^{25,26}

Fluoride modified implants. In the 1995-2015 period, only one paper was published using fluoride modified implants *in vivo*. Ellingsen¹ reported that fluoride pre-treatment of titanium implants increased four times their retention in rabbits ulnas, after four and eight weeks of healing period, as measured by a push out technique. He F et al.²⁷ investigated the bone response to rough titanium implants treated with hydrofluoric acid/nitric acid (HF/HNO_3) solution. Two to 8 weeks after surgery, the tibias of rabbits were retrieved and prepared for removal torque testing and histomorphometric evaluation. In the same period, eight reports were published investigating the proliferation of pluripotent mesenchymal cells of different sources or the gene expression of osteoblasts *in vitro*.²⁸⁻³³ Only two of these reports employed anodized titanium with fluoride modified surfaces. Jimbo et al.³³ reported the enhanced expression of genes involved in osseointegration in a culture of human osteoblast-like cell line. Kim et al.³² investigating the behavior of pluripotent mesenchymal cells reported that surface roughness enhances the hydrophilic property of the anodized Ti and improves the initial cell response to it.

Present experiments. Anodic oxidation of the implants employed in this report were

performed in phosphoric acid solutions because it is less corrosive to titanium and it is associated with a most interesting feature: the reaction with and permanent presence of phosphate anions on the surface of titanium oxide. The 0.5 to 4 M phosphoric acid solutions contain un-dissociated acid and $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$ ions exhibiting strong affinity to cations. Anodizing the implant in 2 M H_3PO_4 + 0.2 M NaF solution, as detailed by Krasicka-Cyzdik et al.⁹ modifies the surface of the

implants: increases the thickness of the TiO_2 layer, incorporates hydrophilic quality and electrostatic charges to the surface providing a nanostructured platform for binding different proteins, modifies the topography and surface roughness, and incorporates fluoride to the oxide layer. The scheme of Figure 5 is based on the presumed reaction between phosphoric acid and titanium oxide. The chemical binding of fluoride in this structure, however, is as yet unknown.

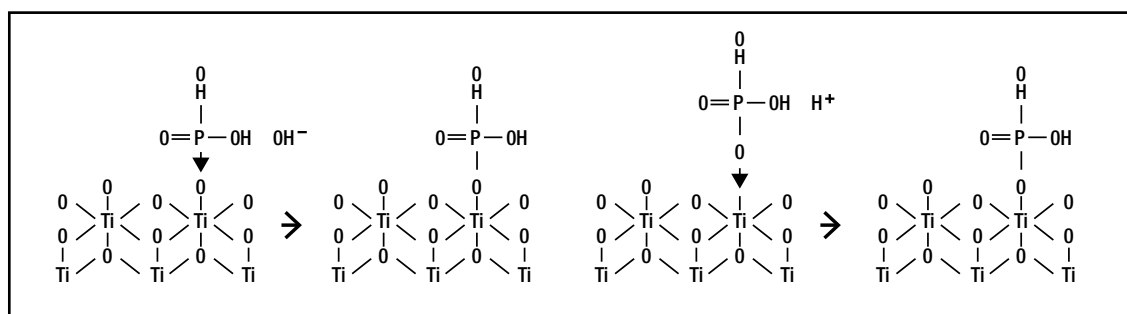


Figure 5. Theoretical scheme of phosphoric acid-titanium oxide structure, inferred from studies of electron spectroscopy.¹³

According to Puleo and Nanci,¹⁴ bone formation occurs in the periprosthetic region in two directions simultaneously: from the implant to the bone (contact osteogenesis) and from the metaphyseal trabecular bone towards the implant (distant osteogenesis).

Contact osteogenesis was assessed by BIC (bone to implant contact). The results obtained indicate that F-modified surface significantly improves implant osseointegration, and agree with the report by Ellingsen et al.¹

Anodizing with the incorporation of fluoride did not affect the BV/TV variable. It is not possible to draw a definitive conclusion on whether the inclusion of fluoride affected or not distant osteogenesis, a phenomenon that requires evaluation with the tetracycline

labeling technique. According to Puleo and Nanci,¹⁴ analysis of fluorochrome labeling demonstrates that the bone extending away from the implant forms at a rate about 30% faster than that moving toward the biomaterial.

The implants with F-modified surface differ from controls implants not only in their fluoride content but also in the roughness of their surfaces. These results raise the question on the fractional contributions of surface roughness and fluoride content on the proliferation of osteoblasts, as assessed by the BIC variable. Additional research is required to determine the relative contributions of the roughness of implant surface and its fluorine content to the osseointegration process.



Acknowledgements

We thank Bio-Eng. Pablo G. Risso, from the Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, Instituto de Física Rosario (CONICET) for advice and the use of the SEM and EDS equipments. To Eng. José Mc Donnell. Terapia Radiante Cumbres (Rosario) for advice in the analysis of digital images, and to Med. Vet. Fabián González and

Biotech. Patricia Lupión for their assistance in the rat surgery.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Recibido: septiembre 2016

Aceptado: marzo 2017

References

1. Ellingsen JE. Pretreatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone. *J Mater Sci Mater Med* 1995; 6:749-53.
2. Lau KH, Farley JR, Freeman TK, Baylink DJ. A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells: inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. *Metabolism* 1989; 38:858-68.
3. Caverzasio J, Palmer G, Bonjour JP. Fluoride: mode of action. *Bone* 1998; 22:585-9.
4. Jeschke M, Standke GJ, Scaronuscarona M. Fluoruroaluminate induces activation and association of Src and Pyk2 tyrosine kinases in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* 1998; 273:11354-61.
5. Ammann P, Rizzoli R, Caverzasio J, Bonjour JP. Fluoride potentiates the osteogenic effects of IGF-I in aged ovariectomized rats. *Bone* 1998; 22:39-43.
6. Susa M. Heterotrimeric G proteins as fluoride targets in bone (review). *Int J Mol Med* 1999; 3:115-26.
7. Lau KH, Goodwin C, Arias M, Mohan S, Baylink DJ. Bone cell mitogenic action of fluoruro aluminate and aluminium fluoride but not that of sodium fluoride involves upregulation of the insulin-like growth factor system. *Bone* 2002; 30:705-11.
8. US Department of Health Services. NIH Publication No. 86-23 revised ed. Bethesda, MD: NIH 1985.
9. Krasicka-Cydzik E, Kowalski K, Kaczmarek A. Anodic and nanostructural layers on titanium and its alloys for medical applications. *Mater Eng* 2009; 5:132
10. Maniatopoulos C, Rodriguez A, Deporter DA, Melcher AH. An improved method for preparing histological sections of metallic implants. *Int J Oral Maxifac Implants* 1986; 1:31-7.
11. Ferreira T, Rasband W. The imageJ user guide Version 1.43, Apr 2010. <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>
12. Snedecor GW. Statistical methods. The Iowa State University Press, Ames, 1956.
13. Unal I. Phosphate adsorption on titanium oxide studied by some electron spectroscopy. Diploma, Université de Geneva, Sept. 1999. Cited by Krasicka-Cydzik E., Kowalski K., Kaczmarek A. Anodic and nanostructural layers on titanium and its alloys for medical applications. *Mater. Eng.* 2009; 5:132.
14. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999; 20:2311-21.
15. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1977; 16:1-132.
16. Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histomorphometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res* 1998; 40:1-11.

17. Jansen JA, Wolke JGC, Swann S, van der Waerden JPCM, de Groot K. Application of magnetron-sputtering for producing ceramic coatings on implant materials. *Clin Oral Implants Res* 1993; 4:28-34.
18. Palmquist A, Lindberg F, Emanuelsson L, Brånemark R, Engqvist H, Thomsen P. Biomechanical, histological, and ultrastructural analyses of laser micro- and nano-structured titanium alloy implants: A study in rabbit. *J Biomed Mater Res* 2010; 92:1476-86.
19. Brånemark R, Emanuelsson L, Palmquist A, Thomsen P. Bone response to laser induced micro- and nano-size titanium surface features. *Nanomedicine* 2011; 7:220-7.
20. Chehroudi B, Ratkay J, Brunette DM. The role of implant surface geometry on mineralization in vitro and in vivo: a transmission and electronmicroscopic study. *Cells Mater* 1992; 2:89-104.
21. Cooper LF, Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part 2: in vitro studies. *J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13:163-74.
22. Andrade JD. Principles of protein adsorption. In: Andrade JD, editor. Surface and interfacial aspects of biomedical polymers. New York: Plenum Press, 1985. p. 1-80.
23. Lausmaa J. Mechanical, thermal, chemical and electrochemical surface treatment of titanium. 2001. In: Brunette DM, editor. Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications. Berlin: Springer, 1019.
24. Hall J, Lausmaa J. Properties of a new porous oxide surface on titanium implants. *Applied Osseointegration Research* 2000; 1:5-8.
25. Frojd V, Franke-Stenport V, Meirelles L, Wennerberg A. Increased bone contact to a calcium-incorporated oxidized commercially pure titanium implant: an in-vivo study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; 37:561-6.
26. Sul YT, Johansson C, Byon E, Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomaterials* 2005; 26:6720-30.
27. He F, Yang G, Zhao S, Cheng Z. Mechanical and histomorphometric evaluations of rough titanium implants treated with hydrofluoric acid/nitric acid solution in rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011; 26:115-22.
28. Bibby JK, Bubb NL, Wood DJ, Mummery PM. Fluorapatite-mullite glass sputter coated Ti6Al4V for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16:379-85.
29. Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A, Ellingsen JE. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials* 2006; 27:926-36.
30. Isa ZM, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford CM. Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006; 21:203-11.
31. Guo J, Padilla RJ, Ambrose W, De Kok IJ, Cooper LF. The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO₂ grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2007; 28:5418-25.
32. Kim CS, Sohn SH, Jeon SK, Kim KN, Ryu JJ, Kim MK. Effect of various implant coatings on biological responses in MG63 using cDNA microarray. *J Oral Rehabil* 2006; 33:368-79.
33. Jimbo R, Sawase T, Baba K, Kurogi T, Shibata Y, Atsuta M. Enhanced initial cell responses to chemically modified anodized titanium. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008; 10:55-61.



ACTUALIZACIONES / Reviews

THE ROLE OF UNDER-INVESTIGATED CONNEXINS IN MUSCULO-SKELETAL TISSUE: A BRIEF REVIEW WITH EMPHASIS ON BONE TISSUE

Rafael Pacheco-Costa,* Hannah M. Davis

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

Abstract

Connexins (Cxs) are a family of transmembrane proteins that form gap junctions and hemi-channels, which mediate cell-cell communication between neighboring cells and the respective extracellular milieu in different tissues. Most tissues and cell types throughout the body express one or more Cx proteins, highlighting its importance in regulating cell growth, differentiation, adhesion, migration, cell death and others. Moreover, Cx can propagate intracellular signals through its C-terminus domain, and thus function beyond a mere channel. Cx43 is the most highly expressed and most well studied Cx in bone and musculoskeletal tissues, although Cx40, Cx45, Cx46 and more recently, the Cx37 have been described in bone tissue, along with Cx26, Cx32 and Cx39 in other musculoskeletal tissues. Here, we discuss the basic structure of gap junctions and the role of the Cxs in musculoskeletal tissue, with special focus on Cx37.

Keywords: connexins, bone, Cx37, bone cells, gap junction.

Resumen

EL PAPEL DE LAS ESCASAMENTE INVESTIGADAS CONEXINAS EN EL TEJIDO MÚSCULO-ESQUELÉTICO: UNA BREVE REVISIÓN CON ÉNFASIS EN EL TEJIDO ÓSEO

Las conexinas (Cxs) son una familia de proteínas transmembrana que forman uniones en hendidura y hemicanales encargados de mediar la comunicación entre células vecinas y el respectivo medio extracelular en diferentes tejidos. La mayoría de los tejidos y células expresan una o más proteínas conexina, jugando un papel importante en la regulación de la proliferación celular, diferenciación, adhesión, migración y muerte celular, entre otras funciones. Además de actuar como un canal, las conexinas pueden propagar señales intracelulares a través del dominio C-terminal. La Cx43 es la conexina más expresada y mejor estudiada en el tejido óseo y el músculo, aunque las Cx40, Cx45, Cx46, y más recientemente Cx37, son también detectadas en el hueso.

* Dirección postal. Department of Anatomy and Cell Biology. Indiana University School of Medicine. 635 Barnhill Drive, MS-5035. Indianapolis, IN 46202. E-mail: pachecor@iupui.edu

A su vez la expresión de la Cx26, Cx32 y Cx39 ha sido observada en otros tejidos músculo-esqueléticos. En este manuscrito describimos la estructura básica de las uniones tipo gap y

el papel que las Cxs, y en especial la Cx37, tienen en tejidos músculo-esqueléticos.

Palabras clave: conexinas, hueso, Cx37, células óseas, uniones en hendidura.

Basic structure and functions of gap junctions

The plasma membrane has a variety of specialized structures that are responsible for functions at the cellular and molecular level. Among these different types of membrane specializations are the gap junctions, also known as *nexus* junctions, which are a cluster of membrane channels that provide a conduit for the passage of ions, such as Ca^{2+} , H^+ , Na^+ , K^+ and Cl^- and other small molecules (up to ~1.5 nm in diameter) from the cytoplasm of one cell to another.^{1,2} As a result, this type of specialization plays an important role in mediating communication between different tissues and cells. For example, in the heart, a conduction system is formed through gap junction connections, which allow for the propagation of electrical impulses.³

Findings of the last decade have revealed that gap junctions are encoded by the gene family, known as connexins (Cxs). Cxs are grouped into five subgroups (α , β , γ , δ , or ϵ) in relation to their sequence and cytoplasmic loop length and are named based on their predicted molecular weight (for example, Cx43 and Cx37 are ~43 and 37kDa in size, respectively).⁴

Gap junction channels are formed through the linkage of two connexon on the plasma membrane surface of adjacent cells, which are composed of six transmembrane proteins. These channels allow for direct cell-cell communication, since the two connexon evenly align and are closely associated, with only a narrow gap of 2-4 nm separating them (Figure 1A). Currently, more than 21 different Cx proteins have been identified, but only a few have been extensively studied.¹ A complex interaction among several types of Cxs

and between connexons provides a variable array of possible combinations, which modifies the affinity of the channel to certain ions (Figure 1B).

Depending on the ion concentration, the pH or extracellular signals, the connexon may be open or closed, thus regulating the activity of these molecules (Figure 1C).⁵ However, the mechanisms that regulate channel opening and closure are still unclear.

The composition and quantity of Cxs expressed on the cellular membrane is different in each cell type and might vary over time. Further, while Cxs are expressed in several tissues and cells, they are not expressed in the red blood cells, spermatozoids or differentiated skeletal muscles of adult vertebrates.⁶

The half-life of the intercellular gap junctions is only a couple of hours, upon which they then either fuse with the lysosome or are directed to the proteosomal pathway for degradation. However, even after internalization some Cxs can be recycled back to the membrane.⁷

In addition to the role of Cxs in facilitating the exchange of molecules through the formation of gap junctions; Cxs can also initiate and propagate biochemical signals through their different structural domains. Thus, functioning not only as a channel, but also as a scaffold, facilitating intracellular signaling (Figure 2).⁸ For example, opening of Cx43 hemichannels confers, at least in part, the anti-apoptotic effect mediated by bone antiresorptive bisphosphonates, mechanical stimulation and parathyroid hormone in osteoblastic cells.⁹ Furthermore, opening of these hemichannels in osteocytes allow the passage of prostaglandin E_2 (PGE_2), an important extracellular mediator for bone anabolism.¹⁰

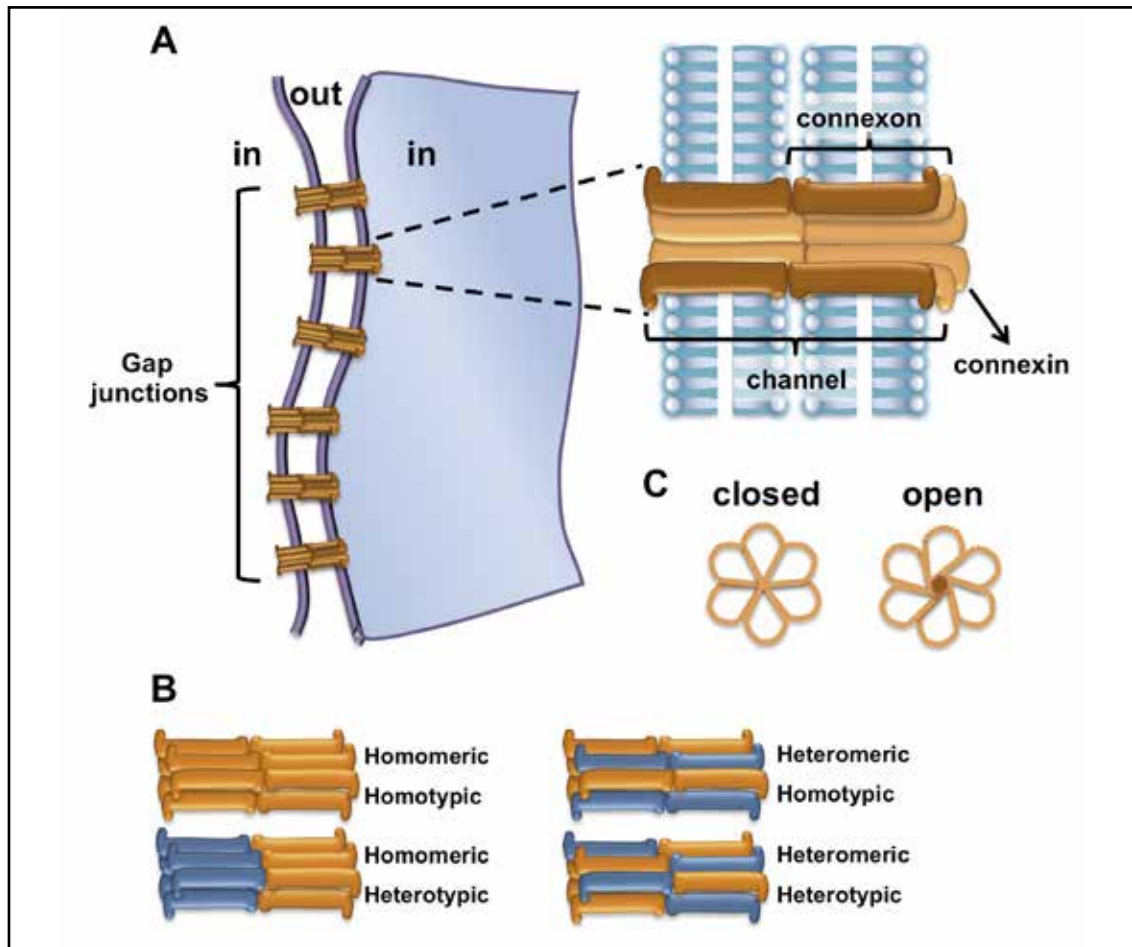


Figure 1. Schematic illustration of the gap junction structure and the complexity of the interaction between different subunits of connexins and connexons. A. Membranes of two neighboring cells forming a gap junction composed of a cluster of gap junction channels along the membrane, leaving a 2-4 nm gap. In detail, 6 connexins forming one connexon and establishing association with other connexon to form a channel. **B.** Top view of the gap junction closed and open. Schemes adapted from Biological Science, Prentice Hall; 2nd Edition (2005). **C.** Hemichannels/connexons can be formed by one (homomeric) or more types of connexins (heteromeric). Two homomeric or two heteromeric connexons for a functional gap junction are called homotypic channels whereas heterotypic channels are composed of different homomeric or heteromeric hemichannels. Scheme adapted from Kumar and Gilula (1996).²

Under-investigated connexins and their roles in bone metabolism

From the 21 different types of Cxs identified thus far, only a small number have been described in musculoskeletal tissue and, in particular, bone tissue.

Of these different Cxs, Cx43 was the first to be identified and is the most highly studied Cx in bone tissue. Mutations of the Cx43 gene are associated with occulodontodigital dysplasia (ODDD), a condition characterized by abnormalities that include weak enamel,

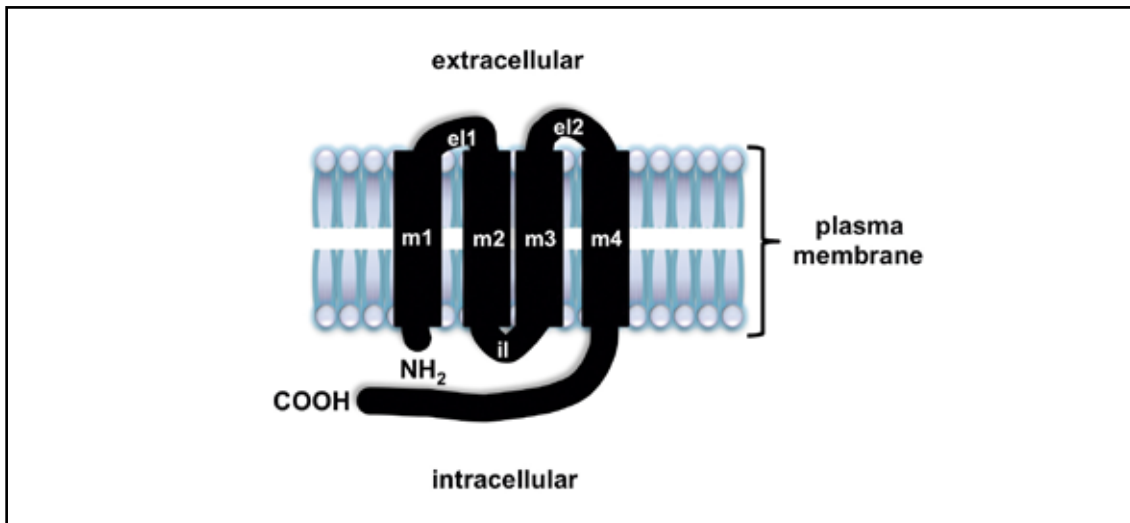


Figure 2. Schematic illustration of transmembrane domains of connexin protein. One connexin molecule originates four membrane domains (m1 to m4) with two extracellular loops (el 1 and el 2) and one intracellular (il). Also, connexin molecules have one amino (NH₂) and one carboxi (COOH) termini facing the cytoplasm. Cytoplasmic loop and COOH-terminus present variation in the sequence and length, whereas NH₂-terminus is highly conserved. Scheme adapted from Kumar and Gilula (1996).²

small or missing teeth, and early tooth loss and broad long bones.¹¹ It is estimated that approximately 1,000 people are affected worldwide; although the actual incidence is unknown since the majority of cases go undiagnosed.

Whereas Cx43 and Cx45 are expressed at the surface of plasma membrane,¹² Cx46 is retained in the perinuclear compartment that is similar to the trans-Golgi compartment of osteoblastic cells.¹³ However, why this Cx is retained in a specific site and what its role is in the osteoblasts is still to be investigated. Moreover, Cx45 and Cx43 are co-localized at appositional membranes and Cx45 functions as a dominant negative for Cx43 actions.^{14,15} Due to changes in permeability and relative expression, these proteins can alter the expression of bone matrix proteins such as osteocalcin and bone sialoprotein. Overexpres-

sion of Cx45 decreased dye transfer and of those matrix proteins aforementioned, whereas predominance of Cx43 had the opposite effect.^{16,17} Furthermore, Cx45 is involved in matrix production in the different stages of bone formation in chicken and abundantly expressed between transitions of preosteoblast to osteoblast.¹⁸ Despite this, characterization of the bone phenotype in Cx45 global knockout did not show gross abnormalities.¹⁷ On the other hand, this gap junction is essential for organization of blood vessels in embryos and mice with global deletion of Cx45 die between E9.5 and E10.5. However, the specific contribution of Cx45 and Cx46 in bone cells by using the Cre-loxP system has not been investigated yet.

Mice globally lacking Cx40 are viable; however, newborn mice and embryos exhibited defective axial and appendicular bone,



with abnormal rib development, lower limb malformations and delayed ossification in anklebones. This indicates the requirement of Cx40 in controlling bone development.¹⁹

Cx37, the last connexin reported in bone tissue, is described in a separate topic.

Cx37, the newly identified bone connexin

Mice with a global deletion of Cx37 are viable and do not display any external gross abnormalities; however, they exhibit impaired oocyte maturation and vascular endothelium architecture. Several studies provided convincing evidence that global Cx37 knockout mice lack terminally differentiated graafian follicles, resulting in female infertility due to lack of ovulation.²⁰⁻²² Since female mice are infertile, it is possible that they have altered levels of steroid hormones, especially estrogen, which could alter the bone metabolism. However, mounting evidence have shown that infertility caused by reduction in Cx37 occurs due to inability of the granulosa cells of the ovarian follicle to transport the molecules and hormones necessary for maturation, even when stimulated with gonadotropin.^{20,21}

Gene array studies demonstrated that GJA4, the gene that encodes the Cx37, is expressed in bone tissue, particularly in osteoblast and osteocytes. In addition, osteocytes exhibited 5-fold higher expression levels than osteoblasts,²³ showing that Cx37 is not restricted to vascular development and maturation of oocytes.

The direct association between bone mass and Cx37 was described by Yamada et al. (2007) and colleagues.²⁴ This study showed that substitution of the proline amino acid with a serine at position 1019 in the regulatory C-terminus domain of the Cx37 protein leads to misfunction of the protein. Further, patients with this polymorphism in the male Japanese population exhibited increased bone mass.²⁴ Interestingly, women do not reproduce the same findings, suggesting that the effect of Cx37 is gender-dependent. However, more

studies are needed to address this discrepancy.

More recently, a study conducted in growing mice lacking Cx37 showed increased spinal and femoral bone mass density in males and females, although it was less pronounced in females when compared to males.²² In addition, this study demonstrated that the cellular basis of bone gain in Cx37-deficient mice is due to impairment on osteoclast formation.²²

Inhibition of gap junctions and hemichannels by heptanol, decreased the number of mature osteoclasts in several studies.^{15,25-27} Although, due to non-specificity of its blockage, the contribution of gap junctions and hemichannels to osteoclast formation is unclear. In addition, other types of pharmacological gap-junctional blockers, such as antiarrhythmic peptides, showed a decrease in the number of TRAP-positive multinucleated osteoclasts.²⁸ Blocking the Cx43 gap junction, results in a lower number of TRAP-positive cells.²⁵ However, pharmacological blockers are not specific for each type of Cx since they inhibit groups of Cxs, thus preventing the ability to observe the contribution of each individual Cx. Despite the increases in osteoclast precursor markers CD11b, CD14, and RANK in Cx37-deficient mice, mononuclear precursor fusion is partially inhibited, which in turn leads to a reduction in the number of mature osteoclasts. Consistent with these findings, gap junctions are expressed at higher levels in the early stages of differentiation from bone marrow precursor cells when compared to mature osteoclasts.²⁷ Furthermore, when Cx37 is absent, mice are predisposed to atherosclerosis due to an increase in the number and recruitment of monocyte-macrophages.²⁹ These pieces of evidence reveal the Cx37 is involved in facilitating cell adhesion.

In addition to effects of Cx37 associated to its channel activity, the C-terminus tail of the Cx37 is a substrate for GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3), more specifically at the 319 amino acid position.³⁰ GSK-3 β is involved

in Wnt/ β -catenin signaling and its inhibition is responsible for stabilization of β -catenin.³¹ Moreover, authentic osteocytes and bone lysates from Cx37-deficient mice and MLO-Y4 osteocytic cells silenced for Cx37 exhibited activation of Wnt/ β -catenin signaling (data not published). These pieces of evidence suggest that, by a mechanism not clearly understood, Cx37 might repress the Wnt/ β -catenin pathway and its absence leads to an increase in the accumulation of β -catenin and consequently contributes to high bone mass.

Although little work has been done to further understand the action of Cx37 in bone, this Cx has emerged as a potential candidate for the development of mimetic peptides, which could be used to selectively target osteoclast precursors and thus reduce bone resorption.

Connexins in other musculoskeletal tissues

Cartilage

Cartilage is an elastic connective tissue composed of collagen fibers, proteoglycans, and elastin fibers, which are produced by chondrocytes.

Studies have demonstrated the expression of various different Cxs in chondrocytes. In human primary costal and articular cartilage, chondrocytes express Cx32 and Cx46, as well as, Cx43 and Cx45, which form heterotypic channels, and modulate rapid Cx43 channel gating properties likely through Cx45 docking induced conformational changes.³² In addition, studies examining an animal model, in which Cx29 was replaced by the LacZ reporter; found that Cx29 is expressed in chondrocytes of the intercalated discs and in the epiphysis of developing bones.³³

Ligament

In ligaments, a fibrous avascular tissue composed of cells and extracellular matrix that connects bones or cartilage to one another, the expression of numerous Cxs has been

detected. Periodontal ligament fibroblasts (PDLFs) express a variety of different Cxs, including Cx32, Cx40, Cx43, and Cx45,³⁴⁻³⁷ which are differentially localized with Cx40/43 and Cx32/45 forming heteromeric channels. Immunohistochemical analysis observed punctuated expression of Cx40/43, suggesting these forms might exist in the membrane and primarily form gap junction channels, whereas Cx32/45 are ubiquitously expressed in all cells and are present in both the cytoplasm and the cell membrane.³⁴⁻³⁷ Previous work has demonstrated that Cx40 and Cx45 are involved in regulating the contractile function of PDLFs, while Cx43 may be involved in regulating their secretory function.³⁴⁻³⁷ Further, in cultured and intact human PDLFs, Cx43 was shown to be expressed only when cell-cell contact was established, whereas Cx32 was expressed in the cytoplasm regardless of whether there was cell-cell contact.³⁴⁻³⁷ Cx43 expression and gap junction channels were also detected in medial collateral ligaments.³⁴⁻³⁷

Tendon

Tendons are tough bands of fibrous connective tissue, made of collagen similar to ligaments, which connect muscles to bone and are capable of withstanding tension. Cx43, Cx32 and Cx26 expression has been detected in tendons;³⁸ and studies have demonstrated the essential role of gap junction intercellular communication in stimulating strain induced collagen synthesis by tenocytes.³⁹ In addition to their expression in human tendons, Cx43 and Cx32 have also been observed in sheep,⁴⁰ equine,⁴¹ and avian⁴² tendons. These two Cxs are differentially localized and are unable to form heteromeric channels.³⁹ Within the cellular rows, Cx32 is expressed between tenocyte bodies, whereas Cx43 is present both between cell bodies and at the regions where the lateral and longitudinal cellular processes connect.⁴² Further these two Cxs differentially modulate tenocyte collagen



secretion in response to mechanical stimulation, where Cx43 is inhibitory, while Cx32 is stimulatory.⁴²

Skeletal muscle

Skeletal muscle, a striated muscle tissue that is attached to bones by tendons, is made up of myofibers, which are formed through the activation, proliferation, and differentiation of myogenic satellite cells.^{43,44} During myogenesis, satellite cells proliferate into myocytes, which differentiate into myoblasts and then fuse to form myotubes. Following myotube maturation, completion of myogenesis results in a newly formed muscle myofiber.⁴⁵ All three myogenic cell types express Cx40, Cx43, and Cx45, whereas only myotubes express Cx39. Previous studies have demonstrated that in the absence of Cx43 or Cx45, differentiation is delayed both *in vitro* and *in vivo*, and removal of Cx43 leads to decreased myogenin expression, as well as, reduced cell fusion; suggesting that Cx43 plays a role in myoblast differentiation.⁴⁵⁻⁴⁷ On the other hand, Cx39, which does not form gap junction channels and may or may not form hemichannels, is involved in the muscle differentiation process, but not in the process of myogenic differentiation.⁴⁵ Further, myogenesis is enhanced in Cx39-deficient murine embryos and Cx43 expression is increased, suggesting that Cx43 may compensate for the loss of Cx39 during myogenesis and muscle regeneration.⁴⁶ These studies demonstrate the contribution of Cx proteins in myogenesis; however, it is

important to note that these studies do not distinguish between the specific roles of gap junction channels and hemichannels.⁴⁵

Cx39, Cx43 and Cx45 are expressed in denervated skeletal muscles of rodents and the deficient expression of Cx43 and Cx45 drastically prevents muscle atrophy.⁴⁸ These three Cxs are also expressed in muscles of mdx mice, a model of Duchenne disease and the deficiency of Cx43 and Cx45 in this model completely prevents cell apoptosis in mdx mice.⁴⁹

Conclusions

Little or nothing has been added to musculoskeletal field regarding other Cxs aside from Cx43. Despite a lack of studies that elucidate the role of Cxs in musculoskeletal tissue, Cx37 has emerged as a potential target candidate to develop new pharmacological therapies to target and inhibit its actions, which would lead to reduced bone resorption and preservation of bone mass.

Acknowledgements

The author are thankful to Dr. Gretel Pellegrini and Dr. Jesús Delgado-Calle for review in Spanish language.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Recibido: julio 2016.

Aceptado: septiembre 2016.

References

1. Goodenough DA, Paul DL. Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(1):a002576.
2. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996; 84:381-388.
3. Meens MJ, Kwak BR, Duffy HS. Role of connexins and pannexins in cardiovascular physiology. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72:2779-92.
4. Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. Gap junctions. *Compr Physiol* 2012; 2:1981-2035.

5. Muller DJ, Hand GM, Engel A, Sosinsky GE. Conformational changes in surface structures of isolated connexin 26 gap junctions. *EMBO J* 2002; 21:3598-607.
6. Saez JC, Martinez AD, Branes MC, Gonzalez HE. Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31:593-600.
7. Gilleron J, Carette D, Fiorini C et al. The large GTPase dynamin2: a new player in connexin 43 gap junction endocytosis, recycling and degradation. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43:1208-17.
8. Plotkin LI, Speacht TL, Donahue HJ. Cx43 and mechanotransduction in bone. *Curr Osteoporos Rep* 2015; 13:67-72.
9. Plotkin LI. Connexin 43 hemichannels and intracellular signaling in bone cells. *Front Physiol* 2014; 5:131.
10. Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, et al. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* 2005; 16:3100-6.
11. Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, et al. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 2003; 72:408-18.
12. Steinberg TH, Civitelli R, Geist ST, et al. Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *EMBO J* 1994; 13:744-50.
13. Koval M, Harley JE, Hick E, Steinberg TH. Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartment of osteoblastic cells. *J Cell Biol* 1997; 137:847-57.
14. Laing JG, Manley-Markowski RN, Koval M, Civitelli R, Steinberg TH. Connexin45 interacts with zonula occludens-1 and connexin43 in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2001; 276:23051-5.
15. Plotkin LI, Stains JP. Connexins and pannexins in the skeleton: gap junctions, hemichannels and more. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72:2853-67.
16. Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K, et al. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 1998; 9:2249-58.
17. Kruger O, Plum A, Kim JS, et al. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 2000; 127:4179-93.
18. Minkoff R, Rundus VR, Parker SB, Hertzberg EL, Laing JG, Beyer EC. Gap junction proteins exhibit early and specific expression during intramembranous bone formation in the developing chick mandible. *Anat Embryol (Berl)* 1994; 190:231-41.
19. Pizard A, Burgon PG, Paul DL, Bruneau BG, Seidman CE, Seidman JG. Connexin 40, a target of transcription factor Tbx5, patterns wrist, digits, and sternum. *Mol Cell Biol* 2005; 25:5073-83.
20. Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 1997; 385:525-9.
21. Goodenough DA, Simon AM, Paul DL. Gap junctional intercellular communication in the mouse ovarian follicle. *Novartis Found Symp* 1999; 219:226-35.
22. Pacheco-Costa R, Hassan I, Reginato RD, et al. High bone mass in mice lacking Cx37 due to defective osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 2014; 289:8508-20.
23. Paic F, Igwe JC, Nori R, et al. Identification of differentially expressed genes between osteoblasts and osteocytes. *Bone* 2009; 45:682-92.
24. Yamada Y, Ando F, Shimokata H. Association of candidate gene polymorphisms with bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men. *Int J Mol Med* 2007; 19:791-801.
25. Ilvesaro J, Tavi P, Tuukkanen J. Connexin-mimetic peptide Gap 27 decreases osteoclastic activity. *BMC Musculoskelet Disord* 2001; 2:10.
26. Ilvesaro J, Väänänen K, Tuukkanen J. Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *J Bone Min Res* 2000; 15:919-26.
27. Schilling AF, Filke S, Lange T, et al. Gap junctional communication in human osteoclasts in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2008; 12:2497-504.



28. Kylmaoja E, Kokkonen H, Kauppinen K, et al. Osteoclastogenesis is influenced by modulation of gap junctional communication with antiarrhythmic peptides. *Calcif Tissue Int* 2013; 92:270-81.
29. Wong CW, Christen T, Roth I, et al. Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. *Nat Med* 2006; 12:950-4.
30. Morel S, Burnier L, Roatti A, et al. Unexpected role for the human Cx37 C1019T polymorphism in tumour cell proliferation. *Carcinogenesis* 2010; 31:1922-31.
31. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 2013; 19:179-92.
32. Asmar A, Barrett-Jolley R, Werner A, Kelly R, Jr., Stacey M. Membrane channel gene expression in human costal and articular chondrocytes. *Organogenesis* 2016; 12:94-107.
33. Eiberger J, Kibschull M, Strenzke N, et al. Expression pattern and functional characterization of connexin29 in transgenic mice. *Glia* 2006; 53:601-11.
34. Kato R, Ishihara Y, Kawanabe N, et al. Gap-junction-mediated communication in human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 2013; 92:635-40.
35. Yamaoka Y, Sawa Y, Ebata N, Ibuki N, Yoshida S. Cultured periodontal ligament fibroblasts express diverse connexins. *Tissue Cell* 2002; 34:375-80.
36. Chi SS, Rattner JB, Sciore P, Boorman R, Lo IK. Gap junctions of the medial collateral ligament: structure, distribution, associations and function. *J Anat* 2005; 207:145-54.
37. Yamaoka Y, Sawa Y, Ebata N, Ibuki N, Yoshida S, Kawasaki T. Double expressions of connexin 43 and 32 in human periodontal ligament fibroblasts. *Tissue Cell* 2000; 32:328-35.
38. Maeda E, Ohashi T. Mechano-regulation of gap junction communications between tendon cells is dependent on the magnitude of tensile strain. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 465:281-6.
39. Young NJ, Becker DL, Fleck RA, Goodship AE, Patterson-Kane JC. Maturation alterations in gap junction expression and associated collagen synthesis in response to tendon function. *Matrix Biol* 2009; 28:311-23.
40. Russo V, Mauro A, Martelli A, et al. Cellular and molecular maturation in fetal and adult ovine calcaneal tendons. *J Anat* 2015; 226:126-42.
41. Stanley RL, Fleck RA, Becker DL, Goodship AE, Ralphs JR, Patterson-Kane JC. Gap junction protein expression and cellularity: comparison of immature and adult equine digital tendons. *J Anat* 2007; 211:325-34.
42. Waggett AD, Benjamin M, Ralphs JR. Connexin 32 and 43 gap junctions differentially modulate tenocyte response to cyclic mechanical load. *Eur J Cell Biol* 2006; 85:1145-54.
43. Ishido M, Kasuga N. Characteristics of the localization of connexin 43 in satellite cells during skeletal muscle regeneration in vivo. *Acta Histochem Cytochem* 2015; 48:53-60.
44. Araya R, Eckardt D, Riquelme MA, Willecke K, Saez JC. Presence and importance of connexin 43 during myogenesis. *Cell Commun Adhes* 2003; 10:451-6.
45. Saez JC, Cisterna BA, Vargas A, Cardozo CP. Regulation of pannexin and connexin channels and their functional role in skeletal muscles. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72:2929-35.
46. von MJ, Wulf V, Willecke K. Spatiotemporal expression of connexin 39 and -43 during myoblast differentiation in cultured cells and in the mouse embryo. *Cell Commun Adhes* 2006; 13:55-60.
47. von MJ, Wulf V, Matern G, Willecke K. Connexin39 deficient mice display accelerated myogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Exp Cell Res* 2011; 317:1169-78.
48. Cea LA, Cisterna BA, Puebla C, et al. De novo expression of connexin hemichannels in denervated fast skeletal muscles leads to atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110:16229-34.
49. Cea LA, Puebla C, Cisterna BA, et al. Fast skeletal myofibers of mdx mouse, model of Duchenne muscular dystrophy, express connexin hemichannels that lead to apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73:2583-99.

Abierta la inscripción

Carrera de Especialista en OSTEOLÓGÍA

La Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral y el Instituto Universitario Hospital Italiano anuncian la reciente habilitación de la Carrera de Especialista en Osteología por el Ministerio de Educación.

(Resolución Ministerial N°1554, 22 de junio de 2015)

Directora: Dra. Luisa Plantalech

Secretaria: Dra. Ana María Galich

Comité Científico: Dr. Luis Catoggio, Dra. Patricia Feinstein-Day, Dra. Diana González, Dra. Patricia Mandalunis, Dr. Armando Negri, Dra. Titania Pasqualini, Dra. Susana Zeni.

REQUISITOS: ser médicos acreditados en residencias o sistema de becas de las siguientes especialidades: Clínica Médica, Reumatología, Endocrinología y/o Nefrología.

- **Carga horaria:** 3408 horas. Duración: 2 años
- **Modalidad:** presencial seis horas diarias (8 a 14 hs.)
- **Actividad asistencial:** trabajo en consultorios externos y sala de internación
- **Actividad teórica:** ateneos y seminarios
- **Lugar de cursada:** Sección Osteopatías Metabólicas, Servicio de Endocrinología, Hospital Italiano de Buenos Aires.

CONTENIDOS:

1) Enfermedades del Metabolismo Mineral

Metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. Mineralización ósea I. Hipercalcemia, hiperparatiroidismo, hipocalcemia e hipoparatiroidismo, hipovitaminosis D (raquitismo y osteomalacia), hiperfosfatemia (enfermedad renal crónica). Calificaciones vasculares. Hipofosfatemia (raquitismos). Litiasis renal.

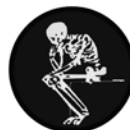
2) Enfermedades del Metabolismo Óseo I: Osteopatías Fragilizantes

Remodelación Ósea I. Mineralización ósea II. Osteoporosis: causas, tipos de osteoporosis, métodos diagnósticos, tratamiento. Osteoporosis secundarias. Guías de diagnóstico y tratamiento. Osteogénesis Imperfecta, Osteoporosis Juvenil. Osteoporosis en el niño crónicamente enfermo.

3) Enfermedades del Metabolismo Óseo II: Dipsias, tumores, enfermedades sistémicas con infiltración ósea, edema, enfermedades óseas esclerosantes

Displasia Fibrosa, Enfermedad Ósea de Paget, Necrosis ósea vascular, Edema óseo, Sudeck, Osteoporosis regional migratriz, Mastocitosis, Enfermedad de Gaucher, Metástasis óseas, Tumores primarios. Remodelado óseo II. Osteoesclerosis, Esclerostosis, Picnodisostosis, Osteopatía striata. Mineralización ósea III: Hipofosfatemia, Miositis osificantes, Calificaciones heterotrópicas.

J. D. Perón 4190, primer piso, C.A.B.A.
(+54 11) 4959 - 0200 Int. 5324
Lunes a viernes de 9 a 13 a 14 a 17 hs.
posgrado@hospitalitaliano.org.ar



A.A.O.M.M
Asociación Argentina de Osteología
y Metabolismo Mineral



Instituto Universitario
Hospital Italiano



A.A.O.M.M.
Asociación Argentina de Osteología
y Metabolismo Mineral



Curso Superior Universitario de **OSTEOLOGÍA** 2017



DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES ÓSEAS METABÓLICAS

Curso universitario anual presencial y trabajo en campus virtual

Directoras: Dra. Luisa Plantalech (HIBA) - Diana Gonzalez (AAOMM)

Coordinadora: Dra. María Diehl (HIBA-AAOMM)

Fechas de inicio y finalización: Marzo a Diciembre 2017

Carga horaria: 140 hs.

Dirigido a: Médicos internistas, de familia, ginecólogos, endocrinólogos, reumatólogos, geriatras, nefrólogos, pediatras, fisiatras, ortopedistas, especialistas en medicina del deporte, médicos veterinarios, odontólogos, bioquímicos, kinesiólogos, nutricionistas, farmacéuticos y otros profesionales de carreras afines.

CONTENIDOS



MÓDULO I: ENFERMEDADES DEL METABOLISMO MINERAL Y ÓSEO

Metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. Mineralización ósea. Remodelado óseo. Hipercalcemia, hiperparatiroidismo, hipocalcemia e hipoparatiroidismo, hipovitaminosis D (raquitismo y osteomalacia), hiperfosfatemia (Enfermedad renal crónica). Hipofosfatemia (raquitismos). Calcificaciones ectópicas. Litiasis renal. Enfermedad de Paget. Displasias óseas. Metástasis óseas. Tumores primarios del hueso. Enfermedades óseas esclerosantes.

MÓDULO II: ENFERMEDADES ÓSEAS FRAGILIZANTES, INFILTRATIVAS Y ESCLEROSANTES.

Osteoporosis: posmenopáusica, premenopáusica, senil, secundarias, inducida por corticoides. Tratamiento de la osteoporosis: bifosfonatos, teriparatida, denosumab, estroncio, nuevas drogas. Osteogénesis Imperfecta. Necrosis ósea vascular, Edema óseo, Sudeck. Mastocitosis, Enfermedad de Gaucher. Osteoesclerosis. Osteoporosis en situaciones espaciales: SIDA, cirugía bariátrica, enfermedad intestinal, trasplante de órganos.

Informes e Inscripción:

Departamento de posgrado del Instituto Universitario del Hospital Italiano
Tel. 4959-0200. Int. 5324 / 5026 - posgrado@hospitalitaliano.org.ar

CASUÍSTICAS / Case Reports

HIPERCALCEMIA HIPOCALCIÚRICA FAMILIAR EN UNA PACIENTE CON MUTACIÓN DEL RECEPTOR DE CALCIO: FORMA ATÍPICA DE PRESENTACIÓN Y TRATAMIENTO CON CINACALCET

María Belén Bosco,^{1*} María Diehl,¹ Ana María Galich,¹ Víctor Jäger,¹ Eduardo Massaro,² Luisa Plantalech¹

1. Sección Osteopatías, Servicio de Endocrinología y Medicina Nuclear, 2. Sección Cabeza y Cuello, Servicio de Cirugía del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Resumen

El hiperparatiroidismo familiar y la hipercalcemia hipocalciúrica familiar (HHF) constituyen un subgrupo heterogéneo de trastornos con herencia mendeliana, que representan en conjunto el 5% de las causas de hipercalcemia PTH dependiente. La HHF se asocia con mutaciones del gen del receptor sensor de calcio (*CaSR*). Esta entidad se manifiesta, en la mayoría de los casos, con la presentación asintomática y familiar de hipercalcemia e hipocalciuria y valores elevados o normales de hormona paratiroidea (PTH).

Los avances en la biología molecular han contribuido al diagnóstico, evaluación del fenotipo de cada entidad y elección del tratamiento.

Se describe el caso de una paciente con hipercalcemia estudiada a partir de una tumoración de cuello asociada con una glándula paratiroides quística. Luego de un exhaustivo proceso diagnóstico se halló en el estudio genético una mutación inactivante en el gen *CaSR*. Teniendo en cuenta la presencia de la relación clearance calcio/clearance creatinina <0,01 y la falta de respuesta al tratamiento quirúrgico, se consideró la entidad de HHF con forma de presentación atípica.

La paciente, sin tratamiento, presentaba un progresivo incremento de la calcemia luego de la cirugía de las glándulas paratiroides, que no se controló con el uso de bifosfonatos y evolucionó con episodios de mareos y desmayos frecuentes sin causa neurológica o cardiovascular detectada. Por lo tanto, se inició el tratamiento con cinacalcet, con el cual se obtuvo una buena respuesta terapéutica: descenso de la calcemia y mejoría de la sintomatología luego de un año de su comienzo.

El cinacalcet es una herramienta terapéutica de importancia en estos raros casos de HHF.

Palabras clave: hipercalcemia hipocalciúrica familiar, receptor sensor de calcio, cinacalcet.

Abstract

FAMILIAL HYPOCALCIURIC HYPERCALCEMIA IN A PATIENT WITH CALCIUM-SENSING RECEPTOR MUTATION: ATYPICAL CLINICAL PRESENTATION AND TREATMENT WITH CINACALCET

Familial hyperparathyroidism including familial hypocalciuric hypercalcemia (FHH) is an heterogeneous subgroup of disorders with Mendelian inheritance, that account for

* E-mail: maria.bosco@hospitalitaliano.org.ar



5% of PTH dependent hypercalcemia. FHH is associated with mutations of the calcium receptor (CaSR) gene. This entity is manifested by hypercalcemia with hypocalciuria and high or normal levels of parathyroid hormone (PTH) generally asymptomatic and with familial presentation.

Advances in molecular biology have contributed to the diagnosis, evaluation of the phenotype of each entity and the choice of treatment.

We describe a patient with hypercalcemia diagnosed following the finding of a neck tumor associated with cystic parathyroids. After an exhaustive diagnostic process, an inactivating mutation in the CaSR gene was found. Considering the presence of a ratio

clearance calcium / clearance creatinine <0.01 and the lack of response to surgical treatment, HHF entity with atypical presentation was considered.

The patient exhibited progressive increase in serum calcium following parathyroid surgery, which was not controlled with the use of bisphosphonates and evolved into episodes of frequent dizziness and fainting, without neurological or cardiovascular causes. Treatment with cinacalcet was initiated, with a good therapeutic response. The use of cinacalcet is a useful therapeutic tool in these rare cases of FHH.

Keywords: familial hypocalciuric hypercalcemia, calcium sensing receptor, cinacalcet.

Introducción

La hipercalcemia hipocalciúrica familiar (HHF) y la neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (MEN 1) representan el 2% de las causas de hipercalcemia familiar asociada a un exceso de hormona paratiroidea.¹

La HHF es de herencia autosómica dominante y genéticamente heterogénea, con amplia variación en la presentación clínica. En general, las manifestaciones son leves o asintomáticas y se expresan en varios miembros de una familia; su forma clásica se caracteriza por presentar hipercalcemia leve a moderada, niveles de hormona paratiroidea (PTH) normales o ligeramente elevados y calciuria baja. La cirugía de las glándulas paratiroideas no resuelve esta entidad. A su vez, se describió en cada tipo de HHF un gran espectro de presentaciones clínicas. La HHF se asocia con mutaciones inactivantes del receptor sensor de calcio (CaSR); se describen también mutaciones en otros genes involucrados en la modulación de la síntesis y secreción de PTH.¹

El CaSR es un receptor acoplado a la proteína G y desempeña un papel clave en la

homeostasis del calcio extracelular; se encuentra en las glándulas paratiroideas y en el riñón. La pérdida de la función del receptor se manifiesta por el incremento de la síntesis y secreción de PTH y aumento de la reabsorción renal de calcio y, en consecuencia, mayores niveles de calcemia e hipocalciuria.

La HHF tipo 1 (OMIM #145980) es la forma más común; se observa en el 60% de los casos y se debe a una mutación con pérdida de función del gen CaSR (cromosoma 3 q.21.1).^{1,2} En ella se describieron también mutaciones con pérdida de función en otros dos genes: el gen *GNA11* y el *AP2S1*, que codifican para la proteína G alpha11 y la subunidad sigma 1 del complejo adaptador 2, como causantes del HHF tipo 2 (OMIM #145981) y 3 (OMIM #600740), respectivamente. La proteína G alpha 11 está relacionada con la señalización intracelular del CaSR en la secreción de PTH, mientras que *AP2S1* es crucial en la endocitosis mediada por clatrina de proteínas de la membrana plasmática en la célula paratiroidea.²⁻⁷

Las mutaciones inactivantes del receptor de calcio no son exclusivas de la HHF: se

verificaron también en el hiperparatiroidismo neonatal grave y leve-moderado (mutaciones homocigotas autosómicas recesivas o heterocigotas) y en el hiperparatiroidismo familiar aislado.^{7,8}

El cinacalcet es un modulador alostérico del CaSR que aumenta la sensibilidad al calcio extracelular y disminuye la síntesis y secreción de PTH. Su uso fue aprobado por la FDA de los Estados Unidos para el tratamiento del hiperparatiroidismo en pacientes con enfermedad renal crónica y de la hipercalcemia en pacientes con carcinoma paratiroideo.⁹ Por otra parte, en el año 2008 fue aceptado por la Agencia Europea de Medicamentos, para el tratamiento de la hipercalcemia en pacientes con hiperparatiroidismo primario persistente (HPTP) posparatiroidectomía o cuando hay dificultades o contraindicaciones para la cirugía.⁹⁻¹³

Los moduladores alostéricos como el cinacalcet se unen con el receptor de calcio pero no activan ni inhiben al receptor de forma directa sino que potencian o atenúan la regulación fisiológica por sus ligandos endógenos, como el calcio iónico.^{9,13} Este agonista tiene un sitio de unión con el receptor de calcio en el dominio 7 transmembrana del CaSR.¹⁴ Con este principio se propuso su empleo para corregir defectos en la homeostasis del calcio relacionados con mutaciones inactivantes del CaSR, como es el caso de la HHF. Sin embargo, existen reportes aislados de casos y la experiencia terapéutica en estos pacientes es limitada.¹⁰⁻¹²

Se presenta el caso clínico de una mujer de 18 años con una tumoración en cuello. Luego de un exhaustivo estudio se arribó al diagnóstico de HHF tipo 1, confirmado por el análisis genético, y se indicó el uso de cinacalcet con buena respuesta terapéutica durante un año de seguimiento.

Caso clínico

Una paciente de 18 años consulta por presentar una tumoración en el cuello de re-

ciente aparición. Refiere como antecedente cierto retraso madurativo-afectivo; completó los estudios secundarios; se desconoce su historia familiar; es hija adoptiva.

En el examen físico se palpa una tumoración laterocervical derecha de casi 3 cm.

La ecografía cervical describe una lesión quística posteroinferior derecha de 30 mm en el sitio de la glándula paratiroides. La punción de esta confirma ese origen por la medición de PTH > 2000 pg/ml en líquido de aguja. Coincide con la presencia de hipercalcemia (Ca) 11,5/12,9 (8,5-10,5) mg/dl, hipofosfatemia 1,5/2,5 (2,5-4,5) mg/dl, elevación de PTH 275,6 (15-68) pg/ml, con niveles adecuados de 25OH vitamina D (> 30) ng/ml, calciuria 115 (50-200) mg/24 horas. La ecografía renal no mostraba litiasis y la densitometría ósea era normal.

Se decide realizar la cirugía de la masa laterocervical. En el acto quirúrgico se reseca el tumor visible inferior derecho, sin obtenerse cambios en la PTH luego de su extirpación; se continúa la exploración y, luego de la resección de tres y media glándulas paratiroides, se obtiene un descenso adecuado de PTH intraquirúrgica (178,2 pg a 37,5 pg). La anatomía patológica confirma la presencia de hiperplasia en dos de éstas con degeneración quística visible en una de ellas; en las restantes (una glándula completa y el fragmento de la otra), el estudio es normal.

A pesar de la cirugía, la paciente persiste con hipercalcemia en niveles de 12,5/11,9 mg/dl (Figura 1) con PTH 89/79 pg/ml (Figura 2). Se descartan paratiroides supernumerarias en estudios de imágenes, incluyendo PET con 11C-metionina. También se excluyeron las neoplasias endocrinas múltiples (MEN 1 y 2) y el hiperparatiroidismo asociado con tumores de mandíbula (HPT-JP), mediante el estudio de efectores clínicos: mediciones de otros sistemas hormonales, radiografías, ecografías e historia clínica.

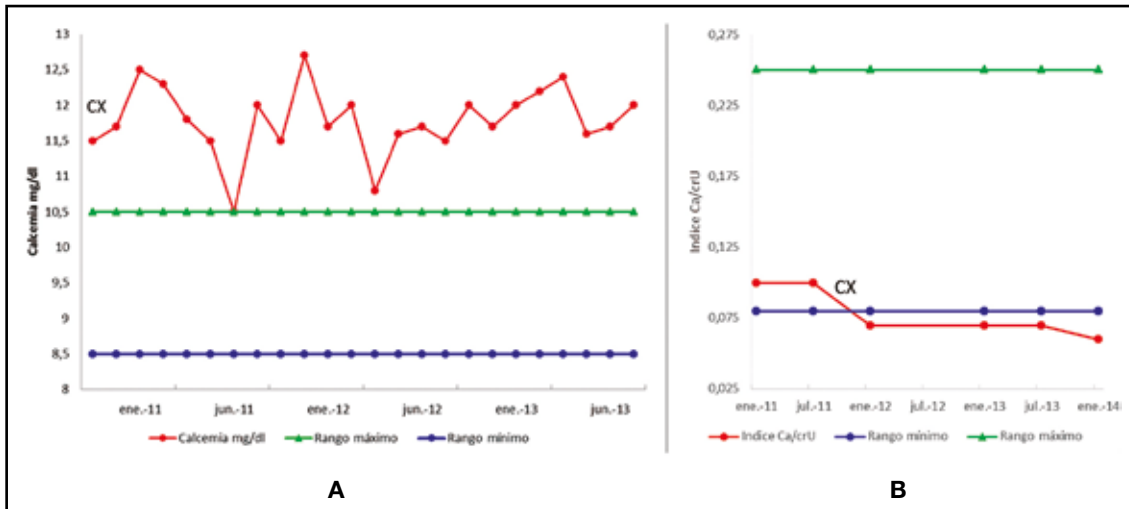


Figura 1. Evolución de la calcemia (A) e índice calcio/creatinina urinario (B) precirugía y poscirugía de paratiroides en una paciente con mutación del CaSR asociada con HHF tipo 1. Cx: cirugía

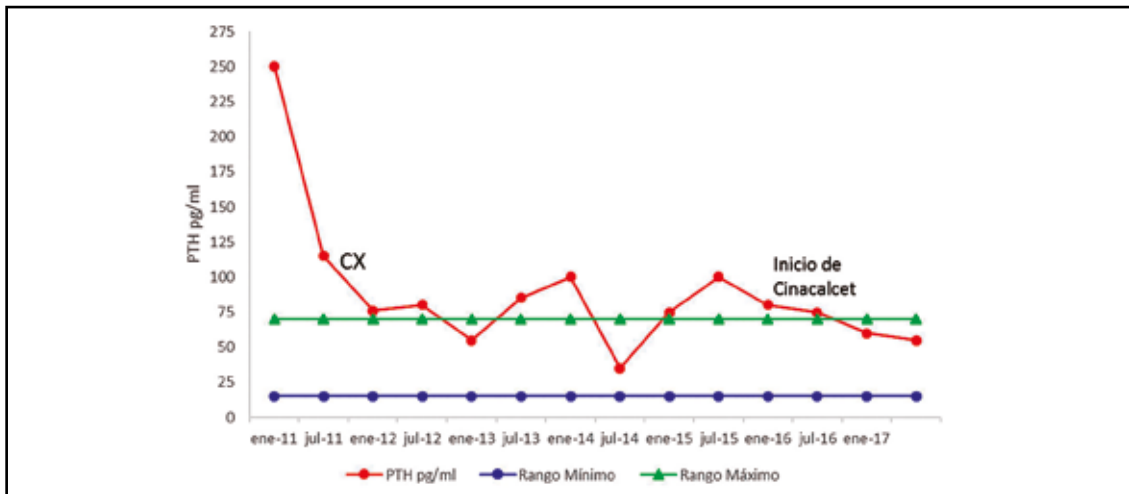


Figura 2. Niveles de PTH en una paciente con mutación inactivante del CaSR asociada con HHF tipo 1, precirugía y poscirugía de paratiroides y tratamiento con cinacalcet. Cx: cirugía

En su evolución se constatan hipercalcemia y niveles de magnesio en suero normales altos (2,5 mg%, 2,3 mg%); se observa baja excreción urinaria de calcio determinado por el índice calciuria/creatininuria = 0,06; la relación de la clearance de calcio/clearance de creatinina (RCCC) = 0,005 y el RCCC pre-quirúrgico 0,003 (este analizado en forma retrospectiva), datos sugerentes del diagnóstico de HHF, por lo que –ante tal sospecha y la falta

de datos familiares– se solicita el estudio genético del gen *CaSR*, buscando mutaciones relacionadas con esta entidad.

Se realizó el estudio molecular por amplificación de ADN de una muestra de sangre periférica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el análisis por secuenciación bidireccional directa de los exones 2 a 7 y un mínimo de 10 pb de la secuencia de intrones. El estudio genético halló una mutación R185Q

en heterocigosis en el exón 4 del gen *CaSR* expresada a nivel de la proteína, por reemplazo del codón arginina por glutamina en la posición del aminoácido 185 (c.554 G>A).

La paciente presentaba valores de calcio sérico aumentado (valor máximo Cap= 12,8 mg/dl), que no descendía con la toma de comprimidos ni infusiones de bifosfonatos, y

además episodios de mareos, sudoración y desmayos frecuentes, que alteraban su calidad de vida, sin una causa cardiovascular ni neurológica atribuible a pesar de exhaustivas evaluaciones.

Luego de una revisión de la experiencia de varios autores, se inició el tratamiento con comprimidos de cinacalcet 30 mg diarios (Tabla 1).

Tabla. Revisión de publicaciones sobre el uso de cinacalcet según genotipo y presentación fenotípica en pacientes con hipercalcemia hipocalciúrica familiar e hiperparatiroidismo neonatal. Modificado de Mayr B y col.¹⁰

Fenotipo Genotipo	N pacientes	Edad años/días	Motivo de tratamiento	Dosis de cinacalcet	Reacción adversa	Referencias
FHH1 (CASR)						
R220W/wt	5	35-52	pancreatitis/parestesias/OP	30-60 mg	No	25-27
R220Q/wt	1	6	depósitos cálcicos timpánicos	30 mg	No	28
C568Y/wt	1	22	pancreatitis	60 mg	No	29
C582R/wt	1	44	HPTp	60 mg	No	30
G613R/wt	1	53	vértigo/constipación	30 mg	No	26
F809L/wt	1	26	psicosis/OP	30 mg	No	31
T972M/wt	1	68	HPTp	90 mg	hipotensión náuseas	32
FHH3 (AP2S1)						
R15C/wt	1	nr	hipercalcemia	30-60 mg	No	33
R15H/wt	1	nr	hipercalcemia	30-60 mg	No	33
R15L/wt	2	2	hipercalcemia	60 mg	No	33-34
NHPT (CASR)						
R185Q/wt	3	7 d	hipercalcemia	variable	No	35-36
R185Q/wt	1	2 d	hipercalcemia	0,4 mg/kg	hipercalcemia	37

FHH= familiar hipercalcemia hypocalciuric; FHH1 = vinculada a mutaciones del receptor de calcio; FHH3 = se adscribe a alteraciones del complejo AP2S1; NHPT (*CaSR*) = neonatal hyperparathyroidism vinculado a mutaciones de receptor de calcio; wt: wild type; nr: sin registro; OP: osteoporosis, HPTp: hiperparatiroidismo primario.

La paciente presentó descenso de la calcemia (10,6-10 mg/dl) y de la PTH (78-55 pg/ml) y mejoría del cuadro clínico con buena tolerancia a la medicación, sin mostrar hasta el momento, luego de un año de

iniciado el tratamiento, ninguna reacción adversa al cinacalcet. Presenta además niveles de calciuria dentro de parámetros normales desde que se instauró el cinacalcet (Figura 3).

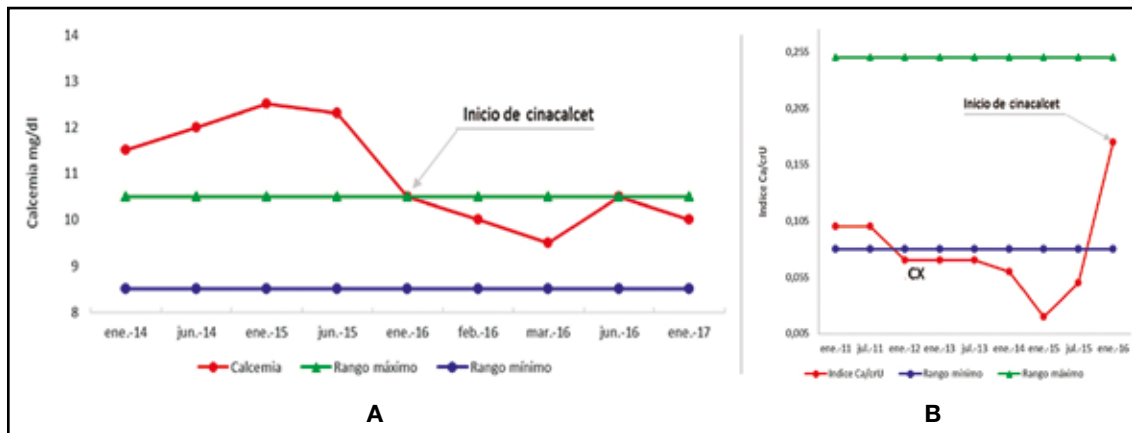


Figura 3. Niveles de calcemia (A) e índice calcio/creatinina urinario (B) pretratamiento y postratamiento con cinacalcet 30 mg en una paciente con una mutación inactivante del *CaSR* asociada con HHF tipo 1.

Discusión

Se describe el caso clínico de una paciente con un tumor quístico de paratiroides palpable, cuyos valores de calciuria se encontraban, en un principio, en el límite inferior del rango normal. Luego de disminuir la masa paratiroidea tras la cirugía, la calciuria fue en descenso y orientó el diagnóstico de HHF1 de presentación atípica.

Se interpretó, en primera instancia, como un cuadro de hiperparatiroidismo primario, por la presencia de tumor, elevados niveles de calcemia y PTH. Posteriormente se consideró la entidad HHF teniendo en cuenta la persistencia de la hipercalcemia, a pesar de la resección de 3 ½ glándulas paratiroides, niveles circulantes de la PTH en rangos más moderados, calciurias bajas con RCCC menor de 0,01 y niveles de magnesio sérico normales altos, sin patología demostrable a nivel óseo ni renal. El estudio genético del receptor de calcio fue solicitado porque se desconocían antecedentes de su familia biológica. Se halló la mutación R185Q en el exón 4 del receptor de calcio.

La confirmación de la HHF está determinada, en primera instancia, por el RCCC < 0,01 y la búsqueda de mutaciones del *CaSR*,

por secuenciación del gen.^{1,6,7,15} Para algunos autores, la presencia familiar de la patología omitiría el estudio genético y se indicaría en casos de RCCC entre 0,01-0,02, en casos índices de HPTP familiar, en casos atípicos sin familiares para investigar (como esta paciente) y en infantes o niños < 10 años en quienes el HPT neonatal y la HHF son causas comunes de hipercalcemia PTH-dependiente.¹⁴

El diagnóstico diferencial de la HHF debe realizarse con el HPTP asintomático con valores normales circulantes de vitamina D. Teniendo en cuenta que la mutación del *CaSR* incrementa la reabsorción tubular de calcio, los niveles de calciuria, el índice calcio/creatinina urinario y especialmente la RCCC son los parámetros discriminatorios por excelencia entre ambas patologías. El estudio de Christensen y col. comparó estos distintos índices de excreción de calcio entre pacientes con HHF e HPTP asintomático y demostró que el RCCC es el parámetro más sensible; el punto de corte en ese estudio fue de RCCC < 0,0115 con una especificidad diagnóstica de 0,88 y una sensibilidad de 0,80, lo que determina una imbricación aproximada del 10% de ambas patologías.¹⁶

La discriminación diagnóstica entre HHF e

HPTP es muchas veces difícil pero de suma importancia pues evita cirugías innecesarias en la primera entidad.

Los casos típicos de HHF 1 reportados en la literatura son distintos del descrito aquí.^{1,7,15} Esta entidad también es conocida como hipercalcemia familiar “benigna”,¹ ya que las manifestaciones clínicas relacionadas con ella son infrecuentes y esta población desarrolla una vida normal. Hasta el momento, en relación con la HHF 1, no se han reportado –a nuestro entender– casos de tumoración cervical palpable asociada con paratiroides quística, como el de la paciente que presentamos, que pone en duda el diagnóstico clásico de esta enfermedad.

El diagnóstico diferencial se realiza con el HPT neonatal, el HPT familiar aislado y algunos casos de HPT esporádico.^{8,17-19}

El HPT neonatal clásico descrito es el grave con mutaciones homocigotas del *CaSR*; sin embargo, se describieron también formas heterocigotas, por herencia paterna, por mutaciones *de novo*, con fenotipos diversos. La mutación R185Q que presenta nuestra paciente ha sido descrita en esta entidad. En nuestro caso clínico desconocemos si la familia biológica tiene HHF y, en presencia de la mutación R185Q, corresponde especular si no se trata de un HPT neonatal, heterocigota con fenotipo leve. No obstante, cabe destacar que en el HPT neonatal se presenta con alteraciones óseas, renales y neurológicas, que no muestra esta paciente.^{10,18,20}

En el HPTP familiar aislado con mutaciones del *CaSR* se observó la presencia de hipercalcemia, o normocalciuria, litiasis, osteoporosis e hipercalcemia. Se describe en esos pacientes hiperplasia leve y difusa en las glándulas paratiroides y resolución posquirúrgica del cuadro clínico.¹⁷ Por otra parte Frank-Raue y col. demostraron la mutación *CaSR* en 8 de 134 pacientes operados por HPTP, 4 casos eran HHF y los restantes HPTP por presencia de un adenoma. La cirugía benefició a estos pacientes.¹⁹ A diferencia de lo que ocurre en

el HPT familiar aislado o esporádico, nuestra paciente persistió con la hipercalcemia asociada a PTH, sin observarse problemas óseos o renales.

Otra posible diferencia hay que establecerla con el cuadro asociado de HHF e HPTP. Se han descrito pacientes con ambas entidades en casos aislados o miembros de familias. La cirugía verificó la presencia de un adenoma de paratiroides; los síntomas clínicos mejoraron pero se observó persistencia de hipercalcemia leve, PTH normal o ligeramente elevada e hipocalciuria en el posoperatorio. En estos pacientes se comprobaron mutaciones del *CaSR* y se consideró la coexistencia de dos patologías.^{21,22}

El estudio anatomopatológico de nuestra paciente mostró dos glándulas paratiroides normales y dos con hiperplasia de las células principales, una de ellas quística. No se encontró adenoma como los referidos en la literatura de pacientes con ambas patologías (HPTP y HHF). A diferencia de esos casos, no se advirtió descenso de la calcemia a rangos más leves o moderados. Sin embargo, se objetivó disminución de los niveles de PTH compatibles con HHF que se adscribe a la resección de 3 ½ glándulas paratiroides. La hipercalcemia sin modificaciones posquirúrgica incrementa nuestra sospecha de HHF; se presume un papel principal de la reabsorción del calcio urinario y otros mecanismos menos conocidos como la acción ósea y la modulación de la secreción de calcitonina por el *CaSR* independiente de la PTH.⁸

La clásica descripción de la patología de las glándulas paratiroides del HHF realizada en pacientes operados o en autopsias corresponde a leve hiperplasia difusa o a glándulas normales.²³ Pero no se describió hiperplasia asociada a quistes. Especulamos que es una manifestación más grave de HHF a nivel de las glándulas paratiroides, aunque no podemos descartar otras mutaciones genéticas somáticas asociadas.

Por lo expuesto, consideramos que la pa-



ciente tiene una presentación atípica y grave de la entidad denominada HHF, pero desconocemos si presenta una mutación *de novo* o si su carácter es hereditario.

El estudio molecular de esta rara entidad, cuya prevalencia es de 2 a 3 casos cada 100.000 personas, confirma el diagnóstico, permite el asesoramiento genético y evalúa la correlación entre el genotipo y el fenotipo.¹

La mutación que presenta la paciente, R185Q en heterocigosis en el exón 4 del gen *CaSR* (c.554 G>A), se publicó asociada con el fenotipo de HHF1, así como también en el HPT neonatal. En este tipo de mutación se observa hipercalcemia más elevada por una importante acción inhibitoria negativa del receptor de calcio con la mutación R185Q sobre el normal.^{10,20}

En nuestro medio, Sarli y col. observaron una mutación similar en una mujer adulta asintomática con hipocalciuria e hipercalcemia con valores elevados; no se observaron alteraciones genéticas en familiares de primer grado y se consideró una mutación *de novo*.²⁴

En la HHF de tipo 1 y 3 y en el HPT neonatal se reportó el uso de cinacalcet como opción terapéutica para pacientes con importante sintomatología: pancreatitis, vértigo, psicosis, calcificaciones del tímpano, síndrome hipercalcémico²⁵⁻³⁷ (Tabla 1).

Se prescribió esta medicación a nuestra paciente porque presentaba pérdidas de conocimiento e hipercalcemia elevada, que se subsanaron con el tratamiento. Por falta de medicación, en un breve período, reaparecieron los síntomas, asociados a un incremento de la calcemia (datos no mostrados), razón por la cual sostenemos que la prescripción es eficaz y suponemos que debe recibirla por tiempo prolongado. La mutación que presenta la paciente en el exón 4 codifica una parte de la región extracelular de la proteína; esta mutación no impide la acción del cinacalcet que se une al *CaSR* en la región transmembrana.

La dosis de cinacalcet en adultos tiene una variación de 30-90 mg. En las comunicacio-

nes se describen mejoría clínica y de laboratorio desde el inicio del tratamiento.²⁵⁻³⁷ Los efectos adversos fueron náuseas, hipotensión e hipocalcemia,^{32,37} que mejoraron luego del descenso de la dosis de cinacalcet. El mayor tiempo de uso publicado es de tres años, con buena respuesta.²⁵⁻³⁷ Se desconocen complicaciones a largo plazo y pérdida de efecto de la medicación.

Por lo expuesto, acorde con estas publicaciones y la experiencia en la paciente aquí presentada, el cinacalcet podría sugerirse como la primera opción terapéutica en pacientes con HHF 1 o 3 e hipercalcemia sintomática. Los pacientes tienen significativa mejoría del cuadro desde el inicio del tratamiento, algunos de ellos con reacciones adversas que fueron revertidas tras el descenso de la dosis de cinacalcet.^{32,37}

Conclusión

Se destaca la variabilidad de la presentación fenotípica y genotípica en los pacientes con HHF.

Esta entidad se sospecha por la presencia de hipercalcemia con PTH anormalmente elevada e hipocalciuria expresada por la relación clearance de calcio/clearance de creatinina < 0,01 y se debe diferenciar de otras entidades como el HPT primario asintomático, el HPT familiar aislado y el HPT neonatal de forma leve.

La paciente aquí presentada tenía manifestaciones atípicas de HHF 1 (hipercalcemia elevada, hiperplasia quística de la glándula paratiroides). No se resolvió su cuadro clínico con la cirugía. El tratamiento con cinacalcet mejoró su sintomatología inespecífica y descendió la calcemia.

La indicación quirúrgica no se aconseja como tratamiento, excepto en casos especiales; sin embargo, en la actualidad, el uso de cinacalcet es eficaz en pacientes sintomáticos y se propone como primera opción.

Ampliar el conocimiento sobre esta entidad poco común es importante a nivel asistencial

y de investigación. Dada la escasa frecuencia de la enfermedad, proponemos establecer bases de registros de pacientes, para que el aporte recíproco permita esclarecer zonas oscuras de esta patología.

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

Se obtuvo el consentimiento escrito de la paciente quien autoriza la publicación.

Recibido: febrero 2017.

Aceptado: abril 2017.

Referencias

1. Arnold A, Marx S J. Familial Primary Hyperparathyroidism (Including MEN, FHH, and HPT-JT). In: Clifford Rosen (ed). Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 8th edition. Iowa: Wiley-Blackwell; 2013. pp. 553-61.
2. Canadian Genetic Diseases Network. CASRdb - Calcium Sensing Receptor Database. Calcium-Sensing Receptor; (2003 DeBelle-CASRdb) CASR mutations at <http://www.casrdb.mcgill.ca>. (acceso diciembre 2016)
3. Hannan FM, Nesbit MA, Zhang C, et al. Identification of 70 calcium-sensing receptor mutations in hyper- and hypo-calcaemic patients: evidence for clustering of extracellular domain mutations at calcium-binding sites. *Hum Mol Genet* 2012; 21:2768-78.
4. Hendy GN, D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L. Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat* 2000; 16:281-96.
5. Hovden S, Rejnmark L, Ladefoged SA, Nissen PH. AP2S1 and GNA11 mutations – not a common cause of familial hypocalciuric hypercalcemia. *Eur J Endocrinol* 2017; 176:177-85.
6. Nesbit MA, Hannan FM, Howles SA, et al. Mutations in AP2S1 cause familial hypocalciuric hypercalcemia type 3. *Nat Genet* 2012; 45:93-7.
7. Vargas-Poussou R, Mansour-Hendili L, Baron S, et al. Familial hypocalciuric hypercalcemia types 1 and 3 and primary hyperparathyroidism: similarities and differences. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101:2015-3442.
8. Brown E. Disorders of the calcium-sensing receptor: Familia hypocalciuric hypercalcemia and autosomal dominant hypocalcemia. In: Rosen C, Mulder J (editors). Up-To-Date Wolters Kluwer. pp. 1-19 (accessed on may 2017).
9. Sensipar® (cinacalcet) tablets. U.S. prescribing information. (Amgen Inc. 2008) http://www.sensipar.com/professional/pdf/sensipar_pi.pdf.
10. Mayr B, Schnabel D, Dörr HG, Schöfl C. Genetics in Endocrinology: Gain and loss of function mutations of the calcium-sensing receptor and associated proteins: current treatment concepts. *Eur J Endocrinol* 2016; 174:R189-R208.
11. Alon US, Van de Voorde RG. Beneficial effect of cinacalcet in a child with familial hypocalciuric hypercalcemia. *Pediatr Nephrol* 2010; 25:1747-50.
12. Tundidor Rengel D, Torres Grajales JL, Oriola J, Ferrer J, Webb S M. Cinacalcet en el manejo de hipercalcemia secundaria a mutación en el receptor sensor del calcio. *Endocrinol Nutr* 2013; 60:40-1.
13. Marcocci C, Chanson P, Shoback D, et al. Cinacalcet reduces serum calcium concentrations in patients with intractable primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:2766-72.
14. Jensen A, Bräuner-Osborne H. Allosteric



- modulation of the calcium sensing receptor. *Curr Neuropharmacol* 2007; 5:180-6.
15. Christensen SE, Nissen PH, Vestergaard P, Mosekilde L. Familial hypocalciuric hypercalcaemia: a review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011; 18:359-70.
 16. Christensen SE, Nissen PH, Vestergaard P, et al. Discriminative power of three indices of renal calcium excretion for the distinction between familial hypocalciuric hypercalcaemia and primary hyperparathyroidism: a follow-up study on methods. *Clin Endocrinol* 2008; 69:713-20.
 17. Warner J, Epstein M, Sweet A, et al. Genetic testing in familial isolated hyperparathyroidism: unexpected results and their implications. *J Med Genet* 2004; 41:155-60.
 18. Pearce S, Trump D, Wooding C, et al. Calcium sensing Receptor mutations in Familial Bening Hypercalcemia and Neonatal Hyperparathyroidism. *J Clin Invest* 1995; 96:2683-92.
 19. Frank-Raue K, Leidig-Bruckner G, Haag C, et al. Inactivating calcium-sensing receptor mutations in patients with primary hyperparathyroidism *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; 75:50-5.
 20. Bai M, Pearce SH, Kifor O, et al. In vivo and in vitro characterization of neonatal hyperparathyroidism resulting from a de novo, heterozygous mutation in the Ca²⁺-sensing receptor gene: normal maternal calcium homeostasis as a cause of secondary hyperparathyroidism in familial benign hypocalciuric hypercalcemia. *J Clin Invest* 1997; 99:88-96.
 21. Forde HE, Hill AD, Smith D. Parathyroid adenoma in a patient with familial hypocalciuric hypercalcaemia. *BMJ Case Rep* Published online, 2014 Oct 15; doi: 10.1136/bcr-2014-206473.
 22. Brachet C, Boros E, Tenoutasse S, et al. Association of parathyroid adenoma and familial hypocalciuric hypercalcaemia in a teenager. *Eur J Endocrinol* 2009; 161:207-10.
 23. Law WM Jr, Carney JA, Heath H 3rd. Parathyroid glands in familial benign hypercalcemia (familial hypocalciuric hypercalcemia). *Am J Med* 1984; 76:1021-6.
 24. Sarli M, Fradinger E, Zanchetta J. Hypocalciuric hypercalcemia due to de novo mutation of the calcium sensing receptor. *Medicina (B Aires)* 2004; 64:337-9.
 25. Festen-Spanjer B, Haring CM, Koster JB, Mudde AH. Correction of hypercalcaemia by cinacalcet in familial hypocalciuric hypercalcaemia. *Clin Endocrinol* 2008; 68:324-25.
 26. Rasmussen AQ, Jorgensen NR, Schwarz P. Clinical and biochemical outcomes of cinacalcet treatment of familial hypocalciuric hypercalcemia: a case series. *J Med Case Rep* 2011; 5:564.
 27. Scharla SH, Lempert UG. Coincidence of familial hypocalciuric hypercalcemia and parathyroid adenoma: therapeutic effect of cinacalcet. In 52 Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie(DGE). Gießen, Germany, 2009.
 28. Alon US, Van de Voorde RG. Beneficial effect of cinacalcet in a child with familial hypocalciuric hypercalcemia. *Pediatr Nephrol* 2010; 25:1747-50.
 29. Gunganah K, Grossman A, Druce M. Recurrent pancreatitis in a patient with familial hypocalciuric hypercalcaemia treated successfully with cinacalcet. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* 2014; 14005 Doi: 10.1530/EDM-14-0050.
 30. Letz S, Elbelt U, Strasburger CJ, et al. CaST mutants disrupting the disulfide bond between C582 and C568 in the cysteine-rich domain of the CaSR do not act as dominant negative mutants. *Exp Clin Endocr Diab* 2014; 122:P038.
 31. Timmers HJ, Karperien M, Hamdy NA, de Boer H, Hermus AR. Normalization of serum calcium by cinacalcet in a patient with hypercalcaemia due to a de novo inactivating mutation of the calcium-sensing receptor. *J Intern Med* 2016; 260:177-82.
 32. Mastromatteo E, Lamacchia O, Campo MR, et al. A novel mutation in calcium-sensing receptor gene associated to hypercalcemia and hypercalciuria. *BMC Endocr Disord* 2014; 14:81.

33. Howles SA, Hannan FM, Babinsky VN, et al. Cinacalcet is an Effective Therapy for Familial Hypocalciuric Hypercalcemia Type 3 (FHH3) Caused By AP2S1 Mutations. In ENDO 2015 –The Endocrine Society’s 97th Annual Meeting –Signaling, pp Poster Board SAT-293. San Diego, CA; 2015. pp. 290-309.
34. Tenhola S, Hendy GN, Valta H, et al. Cinacalcet treatment in an adolescent with concurrent 22q11.2 deletion syndrome and FHH3 caused by AP2S1 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100:2515-8.
35. Reh CM, Hendy GN, Cole DE, Jeandron DD. Neonatal hyperparathyroidism with a heterozygous calcium-sensing receptor (CASR) R185Q mutation: clinical benefit from cinacalcet. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:E707-E712.
36. Fisher MM, Cabrera SM, Imel EA. Successful treatment of neonatal severe hyperparathyroidism with cinacalcet in two patients. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep* 2015; 15:00-40.
37. Gannon AW, Monk HM, Levine MA. Cinacalcet monotherapy in neonatal severe hyperparathyroidism: a case study and review. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:7-11.



CARTAS AL COMITÉ DE REDACCIÓN / Letter to the Editor

PREVALENCIA DE OSTEOPOROSIS EN MUJERES ARGENTINAS POSTMENOPÁUSICAS.

Sra. Directora,

En la Argentina y en base a estudios realizados en la Capital Federal pero en número limitado de mujeres, se consideraba que la prevalencia de osteoporosis es de 25%.¹

Un reciente trabajo informa los hallazgos de la evaluación densitométrica por DXA en dos sitios anatómicos (columna lumbar y fémur proximal) en 5.448 mujeres de más de 50 años de edad residentes en la ciudad de Buenos Aires, Argentina.² El estudio se realizó entre 2012 y 2014 y se invitó a las participantes mediante aviso periódico. Utilizando el clásico criterio de la OMS 18,7% de las mujeres estudiadas tenían osteoporosis en uno u otro sitio. Si se consideraba solo la densidad mineral ósea (DMO) del cuello femoral, la prevalencia de osteoporosis era baja hasta la edad de 70 años, aumentando después. Por el contrario, considerando la DMO lumbar la tasa de osteoporosis era relativamente alta hasta los 70 años, nivelándose después. Si se tomaba en cuenta el valor de DMO en la cadera total, la prevalencia de osteoporosis aumentaba marginal y no significativamente (+0,7%). Los autores hacen notar que

si se estudiara la población femenina de esta franja etaria solo con densitometría de cadera, el diagnóstico de osteoporosis quedaría oculto en la mitad de las mujeres, de ahí la importancia de efectuar la evaluación densitométrica en ambos sitios. La tasa de prevalencia de osteoporosis es semejante a la reportada en la población blanca de los Estados Unidos y Canadá. Este artículo mereció una nota editorial en el mismo número de la revista.³

El importante trabajo que comentamos corrige hacia abajo esa estimación, y brinda una sólida base para orientar futuros estudios epidemiológicos y para evaluar el impacto económico de la osteoporosis, en la actualidad y en el futuro.⁴

Dr. Ariel Sánchez*

Centro de Endocrinología.
Rosario. Argentina

Conflictos de interés: El autor declara no tener conflictos de interés.

Recibido: Julio 2016

Aceptado: Agosto 2016

Referencias

1. Schurman A, Bagur A, Claus-Hermberg H, et al. Guías 2012 para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la osteoporosis. *Medicina (B Aires)* 2013; 73:55-74.
2. Mautalen C, Schianchi A, Sigal D, et al. Prevalence of osteoporosis in women in Buenos Aires based on bone mineral density at the lumbar spine and femur. *J Clin Densitom* 2016; 19:471-6.
3. Gupta SK. Editorial: Prevalence of osteoporosis in women in Buenos Aires based on bone mineral density at the lumbar spine and femur. *J Clin Densitom* 2016; 19:405-6.
4. Spivacow FR, Sánchez A. Epidemiology, costs, and burden of osteoporosis in Argentina, 2009. *Arch Osteoporos* 2010; 5:1-6. Epidemiología y costos financieros de la osteoporosis en la Argentina, 2009. *Actual Osteol* 2010; 6:184-93 (doble publicación).

* Correo electrónico: asanvir@gmail.com

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. 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 negra. 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. 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.

Impreso en Graphic Team
graphicteam@ciudad.com.ar
CUIT: 20-21825110-3

Tirada: 1.000 ejemplares

Derecho Nacional de Derecho de Autor
Exp N° 5289263 (16-05-2016)