

# ACTUALIZACIONES EN OSTEOLÓGÍA

## Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral

VOL. 12, Nº 2 - mayo / agosto 2016

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



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

(Asociación Argentina de Osteología  
y Metabolismo Mineral)

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

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

# ACTUALIZACIONES EN OSTEOLÓGÍA

Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

---



Ricardo Carpani  
"Tango Pasión", 1993  
Boceto para telón. Grafito sobre papel 35 x 35 cm  
Agradecimiento: Doris Halpin de Carpani

**VOL. 12, Nº 2**  
mayo /agosto 2016  
ISSN 1669-8975 (*Print*); ISSN 1669-8983 (*Online*)  
[www.osteologia.org.ar](http://www.osteologia.org.ar)  
Rosario (Santa Fe), Argentina

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



# ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Publicación de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

**VOL. 12, Nº 2**

mayo / agosto 2016

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

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

Rosario (Santa Fe), Argentina

**Aparición:** cuatrimestral

**Editores responsables:**

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

## Perfil de la revista

Actualizaciones en Osteología es el órgano científico de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Actualizaciones en Osteología acepta para su publicación trabajos redactados en español o en inglés, que aborden aspectos clínicos o experimentales dentro de la osteología y el metabolismo mineral que puedan considerarse de utilidad e interés para nuestra comunidad científica. Dichos trabajos habrán de ser inéditos, cumplir los requisitos de uniformidad para el envío 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), 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), 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 (CE-MFoC). 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). Argentino.

**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. Patricia Mandalunis

**Tesorera**

Dra. María Diehl

**Vocales**

Dra. María Lorena Brance

Dra. Mirena Buttazzoni

Dra. Virginia Lezcano

Dra. María Pía Lozano

Dra. Ana María Marchionatti

Dra. Marcela Moran

Dra. Paula Rey

Dra. María Belén Zanchetta

# ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Vol 12, Nº 2, mayo / agosto 2016

## ÍNDICE

### EDITORIAL / Editorial

---

#### **Influencia de las variaciones genéticas en los niveles de 25-hidroxivitamina D**

*Influence of genetic variations of 25-hydroxyvitamin D levels*

Beatriz Oliveri

75

### ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

---

#### **Efectos *in vivo* del ranelato de estroncio sobre células progenitoras de médula ósea de ratas diabéticas**

*In vivo effects of strontium ranelate on bone marrow progenitor cells of diabetic rats*

Agustina Berenice Lino, Juan Manuel Fernández, María Silvina Molinuevo, Ana María Cortizo, Antonio Desmond McCarthy

78

#### **Validación posoperatoria en la selección asistida por computadora de aloinjertos de fémur distal**

*Postoperative assessment in computer assisted selection of femur osteoarticular allograft*

Federico Edgardo Milano, José Ignacio Albergo, Germán Luis Farfalli, Luis Alberto Aponte-Tinao, Miguel Ángel Ayerza, Domingo Luis Muscolo, Lucas Eduardo Ritacco

87

#### **La diabetes mellitus experimental produce aumento en la expresión de iNOS y altera la vía paracelular de la absorción intestinal de calcio**

*Experimental diabetes mellitus produces increased iNOS expression and alters the paracellular pathway of intestinal calcium absorption*

María Angélica Rivoira, Lucía Raquel Corball, Valeria Andrea Rodríguez

97

**ACTUALIZACIONES / Reviews**

---

**Guías para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la osteoporosis inducida por glucocorticoides en el adulto**

*Guidelines for the diagnosis, prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis in adults*

Oswaldo Daniel Messina, Luis Fernando Somma, María Inés Tamborenea, Graciela Edith Castelli, Augusto Martín Riopedre, Gustavo Lancioni, María Silvia Larroudé. Grupo de Estudio de la Sociedad Argentina de Osteoporosis (GE-OIC-SAO).

107

**Calcificación vascular en aterosclerosis: posibles funciones de macrófagos y micro-ARNs no codificantes**

*Vascular calcification in atherosclerosis: potential roles of macrophages and non-coding micro-RNAs*

Prabhatchandra Dube, Guillermo Vazquez

126

**CASUÍSTICAS / Case Reports**

---

**Tuberculosis osteoarticular y osificaciones heterotópicas: reporte de un caso**

*Heterotopic ossification and osteoarticular tuberculosis: case report*

Bárbara Braun, Ignacio Javier Gandino, María Eugenia Oregui, Alejandro Luis Cayetti, Sebastián Andrés Muñoz, Marta Gianni, José Luis Presas.

136

**Síndrome TAR en paciente adulto sin diagnóstico previo: presentación de un caso**

*TAR syndrome in an adult patient without previous diagnosis, a case report*

Carina Colombo Berra, Sebastián Bruera, Marilin Destéfano Hartman, Victoria Dupuy, Sabrina Bourgueuz, Elisa Novatti, Federico Baldoma, Mauro Tortolo, Juan Ferrer.

142

**CARTAS AL COMITÉ DE REDACCIÓN / Letters to the Editor**

---

**El manejo de la osteoporosis en pacientes tratados con bifosfonatos a largo plazo**

*The management of osteoporosis in patients with long term bisphosphonates treatment*

Ariel Sánchez

147

**INSTRUCCIONES PARA AUTORES / Authors Guidelines**

---

149

EDITORIAL / Editorial

## INFLUENCIA DE LAS VARIACIONES GENÉTICAS EN LOS NIVELES DE 25-HIDROXIVITAMINA D

Beatriz Oliveri\*

Laboratorio Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas-INIGEM (UBA-CONICET).  
Hospital de Clínicas José de San Martín.

A nivel mundial, y también en nuestro país, se ha documentado una alta prevalencia de deficiencia de vitamina D (VD),<sup>1</sup> lo que ha llevado a establecer recomendaciones y guías sobre dos temas controvertidos: cuáles son los niveles óptimos del marcador nutricional, la 25-hidroxitamina D (25OHD), y las dosis de VD requeridas.<sup>1-4</sup> Diferentes factores influyen en el estado nutricional de VD: edad, color de piel, variación estacional, latitud, índice de masa corporal (IMC), exposición solar, ingesta de VD, y solo un 25% de la variabilidad de los niveles de 25OHD interindividual se atribuyen a la latitud o la estación del año o la ingesta de VD.<sup>5</sup> Estudios en familias y en mellizos monocigóticos y dicigóticos sugieren que los factores genéticos pueden influir sustancialmente, estimando la herencia entre 50-70%.<sup>5</sup>

Paralelamente se observa una gran variabilidad en los niveles de 25OHD luego de administrar VD, asociada a diferencias en el tipo VD (D2 o D3), dosis, esquema de administración, índice de masa corporal (IMC), niveles basales de 25OHD, etc. En los últimos años se investigó si las variaciones de genes, implicados en la síntesis en piel de VD (a partir del 7-dehidrocolesterol [7DHC] por estímulo de la radiación ultravioleta B [UVB]), su transporte plasmático (por *vitamin D binding protein* [VDBP]), las hidroxilaciones sucesivas para su activación (25-hidroxilasa [CYP2R1] y 1 $\alpha$ ,25-hidroxilasa [CYP27B1]) o su degradación (24-hidroxilasa [CYP24R]), entre otros genes investigados, pueden influir en los niveles de 25OHD.<sup>5-13</sup>

Los estudios de asociación del genoma completo (*Genome-wide association study* [GWAS]) analizan todo el genoma, centrados en la búsqueda de asociación entre polimorfismos de nucleótido único (SNPs) con rasgos o enfermedades y estimación estadística del riesgo para desarrollarlos. El estudio SUNLIGHT (n=33.966)<sup>6</sup> observó una asociación significativa, en individuos de origen europeo, de los niveles de 25OHD con los SNP en los *loci* de los genes que codifican para la VDBP (GC) o cercanos a ellos, para la 7DHC reductasa (que transforma el 7DHC en colesterol [DHCR7]) y para la CYP2R1. Otra variante casi significativa fue el *locus* de la CYP24A1. Luego de ajustar por factores ambientales, la presencia de los tres alelos deletéreos validados duplicaba el riesgo de insuficiencia VD (25OHD <30 ng/ml) y aumentaba el riesgo de deficiencia severa (25OHD <10 ng/ml) (OR=1,43).

En el GWAS realizado por Ahn y col.<sup>7</sup> (n=6.722 sujetos de origen europeo), se encontraron asociaciones significativas con el gen GC y comprobaron niveles promedio de 25OHD meno-

\* Correo electrónico: [osteologia@hospitaldeclinicas.uba.ar](mailto:osteologia@hospitaldeclinicas.uba.ar)



res (-18,3%) en los portadores de dos copias de dicho alelo, comparados con los individuos con ninguna. La presencia de un alelo de riesgo casi duplicaba el riesgo de deficiencia severa de VD.

Algunos estudios efectuados en menor escala que los dos anteriores, en poblaciones asiáticas, americanas de origen africano e hispánicas, mostraron resultados controvertidos de las asociaciones de estos genes involucrados con la VD y los niveles 25OHD atribuyéndolos al número escaso de sujetos estudiados o a diferencias raciales.<sup>7-10</sup> En la población hispánica (*IRAS Family Study*)<sup>10</sup> se halló asociación significativa de 3 SNPs con los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub>D y no de 25OHD. El estudio de Batai y col. fue muy interesante,<sup>11</sup> pues incluyó adultos americanos de ascendencia africana (AA) y de ascendencia europea (AE). Comprobaron que los polimorfismos en los genes GC y en CYP2R1 fueron los que más contribuyeron a la varianza en los niveles de 25OHD. Sin embargo, los SNPs asociados con mayor fortaleza variaron por etnia. Diseñaron un score de riesgo de deficiencia de VD, utilizando los polimorfismos específicos por etnia, y comprobaron un riesgo en AA del 28,6% con un alelo de riesgo, que se incrementaba a 76% si poseían los 4 alelos. En cambio, los AE presentaban un riesgo de deficiencia menor: 9,1% sin alelos de riesgo y 42,9% con 4 alelos.

Otro interrogante es si estas variantes genéticas modifican los cambios de niveles de 25OHD ante diferentes ingestas de VD y/o exposición a la radiación ultravioleta (natural o artificial).

Engelman y col.<sup>12</sup> estudiaron un grupo de 1204 mujeres de origen caucásico y comprobaron la asociación de 2 SNPs del gen GC y 4 SNPs del gen CYP2R1 con los niveles de 25OHD. Observaron que en aquellas con ingesta de VD en el cuartilo mayor ( $\geq 670$  UID/día), el porcentaje de mujeres con niveles  $>20$  ng/ml de 25OHD variaba entre 100% y 62% de acuerdo con la presencia de 1 a 4 alelos de riesgo, respectivamente. Si poseían 3-4 alelos de riesgo, solo el 66% de las mujeres  $<70$  años y el 50% de las  $>70$  años alcanzaban niveles suficientes de 25OHD, con las ingestas recomendadas por el *Institute of Medicine*.<sup>3</sup> En conclusión, los individuos con más copias de los alelos de riesgo requerirían mayor ingesta de VD para alcanzar niveles suficientes de 25OHD.

El estudio "*vitamin D in genes*"<sup>13</sup> analizó el aumento de los niveles de 25OHD luego de una dosis artificial de UVB (4 sesiones de cuerpo entero en 10 días en invierno) y su asociación con SNPs de genes asociados a VD. Los individuos con 4 alelos de riesgo significativos de los genes CYP2R1 y GC versus aquellos sin ningún alelo, presentaban las menores concentraciones basales y el menor incremento de 25OHD luego de las sesiones de RUV (20% y 60%, respectivamente).

## Conclusiones

La presencia de determinados polimorfismos en los *loci* cercanos o en los genes que influyen en la síntesis de colesterol y VD, su metabolización y transporte se ha asociado con la variabilidad de los niveles de 25OHD. La composición de los SNPs puede ser diferente según la etnia y se requiere profundizar y ampliar el número de sujetos estudiados para su confirmación.

El riesgo de deficiencia de vitamina D aumentaría cuanto mayor es el número de alelos de riesgo validados que posee el individuo.

Esta variabilidad genética puede implicar incrementos diferentes de 25OHD, a la ingesta por dieta, suplementos de VD y/o a la exposición a radiación UVB. Esto sugiere que algunos individuos requerirían recomendaciones diferentes para un adecuado estado nutricional de VD.

La utilización de una dosis fija no asegura alcanzar determinados niveles de 25OHD, de allí la importancia de su determinación en la práctica clínica.

Estos estudios tendrían implicaciones en las recomendaciones de Salud Pública y en las guías de la práctica clínica, y en el futuro pueden dar origen, incluso, a potenciales *targets* para fármacos.

**Conflicto de intereses:** La autora declara no tener conflictos de intereses.

(Recibido: julio 2016.  
Aceptado: agosto 2016)

### Referencias

1. Sánchez A, Oliveri B, Mansur JL, Fradinger E. Guía práctica de la Federación Argentina de Sociedades de Endocrinología. Diagnóstico, prevención y tratamiento de la hipovitaminosis D. *Rev Arg Endocrinol Metab* 2013; 50:140-56.
2. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: What clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:53-8.
3. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:1911-30.
4. Mastaglia SR, Watson DZ, Oliveri B. Controversia sobre los niveles de vitamina D para la salud ósea propuestos por el Instituto de Medicina de Estados Unidos y la Comunidad Médica Internacional. *Actual Osteol* 2013; 9:207-16.
5. Berlanga Taylor AJ, Knight JC. An integrated approach to defining genetic and environmental determinants for major clinical outcomes involving vitamin D. *Mol Diagn Ther* 2014; 18:261-71.
6. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, et al. Common genetics determinants of vitamin D insufficiency; a genome wide association study. *Lancet* 2010; 376:180-8.
7. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet* 2010; 19:2739-45.
8. Lu L, Sheng H, Li H, et al. Associations between common variants in GC and DHCR7/NADSYN1 and vitamin D concentration in Chinese. *Hans Hum Gen* 2012; 131:505-12.
9. Hansen JG, Tang W, Hootman KC, et al. Genetic and environmental factors are associated with serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in older african americans. *J Nutr* 2015; 799-805.
10. Engelman CD, Meyers KJ, Ziegler JT, et al. Genome-wide association study on vitamin D concentrations in hispanic americans: the IRAS family study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 122:186-92.
11. Batai K, Murphy AB, Shah E, et al. Common vitamin D pathway gene variants reveal contrasting effects in african americans and European americans. *Hum Genet* 2014; 133: 1395-405.
12. Engelman CD, Meyers KJ, Iyengar SK, et al. Vitamin D intake and season modify the effects of the GC and CYP2R1 genes on 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Nutr* 2013; 143:17-26.
13. Nissen J, Vogel U, Ravn-Haren G, et al. Common variants in CYP2R1 and GC genes are both determinants of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations after UVB irradiation and after consumption of vitaminD<sub>3</sub>-fortified bread and milk during winter in Denmark. *Am J Clin Nutr* 2015; 101:218-27.



## ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

# EFFECTOS *IN VIVO* DEL RANELATO DE ESTRONCIO SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATAS DIABÉTICAS

Agustina Berenice Lino, Juan Manuel Fernández, María Silvina Molinuevo, Ana María Cortizo, Antonio Desmond McCarthy \*

Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (LIOMM). Calle 47 y 115, (1900) La Plata, Argentina.

### Resumen

La diabetes mellitus (DM) crónica se asocia con reducción en el contenido mineral óseo (osteopenia y osteoporosis). El objetivo de este trabajo fue evaluar la acción del ranelato de estroncio (RaSr) administrado por vía oral a animales control y diabéticos, sobre el potencial osteogénico de células progenitoras de médula ósea (CPMO). Dieciséis ratas Wistar macho jóvenes se dividieron en dos grupos: controles (C) y diabéticas (D) con destrucción parcial de células  $\beta$ -pancreáticas mediante inyecciones intraperitoneales consecutivas de nicotinamida y estreptozotocina. Siete días después de la inyección, cada grupo se subdividió: sin tratamiento, o tratadas oralmente con RaSr (625 mg/kg/día) durante seis semanas, luego de lo cual los animales fueron sacrificados. Las CPMO se obtuvieron de ratas de los cuatro grupos, por lavados del canal diafisario medular (húmero o fémur o ambos) y cultivo hasta confluencia en DMEM-10% FBS. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Luego las CPMO se replaquearon e incubaron en un medio osteogénico durante 14 días (fosfatasa alcalina [FAL] y colágeno tipo 1) o 21 días (mi-

neralización). Las CPMO del grupo C+RaSr mostraron un aumento significativo versus control en la proliferación (133%) y en la diferenciación osteogénica (colágeno 143%, FAL 168%, mineralización 117%). La DM (grupo D) disminuyó significativamente la proliferación y diferenciación osteoblástica de las CPMO. El tratamiento con RaSr (grupo D+RaSr) previno completamente estos efectos antiosteogénicos de la DM. Así, en nuestro modelo experimental *in vivo*, la DM disminuye el potencial osteogénico de CPMO, efecto que puede ser prevenido por un tratamiento oral con RaSr.

**Palabras clave:** diabetes mellitus, osteoporosis, ranelato de estroncio, células progenitoras de médula ósea, osteoblasto.

### Abstract

#### IN VIVO EFFECTS OF STRONTIUM RANELATE ON BONE MARROW PROGENITOR CELLS OF DIABETIC RATS

*Chronic diabetes mellitus (DM) is associated with a reduction in bone mineral content (osteopenia and osteoporosis). The object of this study was to evaluate the in vivo effect of*

\* Correo electrónico: [mccarthy@biol.unlp.edu.ar](mailto:mccarthy@biol.unlp.edu.ar)

*the anti-osteoporotic drug strontium ranelate (SrRa) administered orally to control and diabetic animals, on the osteogenic potential of bone marrow progenitor cells (BMPC). Sixteen young male Wistar rats were divided into two groups: control (C) and diabetic with partial beta-cell destruction via consecutive intra-peritoneal injections of nicotinamide and streptozotocin (D). Seven days post-injection, each group was sub-divided: without treatment, or oral treatment with SrRa (625 mg/kg/day) for six weeks, after which the animals were euthanised (groups C, C+SrRa, D, D+SrRa). BMPC were obtained from rats of all four groups by flushing of the diaphysary canal (humerus and/or femur). Adherent cells were then cultured until confluence in DMEM-10% FBS. Cell proliferation was evaluated with the MTT mitogenic bioassay. BMPC were replated and incubated in an osteogenic medium for 14 days (determination of alkaline phosphatase [ALP] and type-1 collagen) or 21 days (evaluation of mineralisation). BMPC from C+SrRa rats showed a significant increase versus control in proliferation (133%) and in osteogenic differentiation (collagen 143%, ALP 168%, mineralisation 117%). Induction of diabetes (group D) significantly decreased the proliferation and osteoblastic differentiation of BMPC. Treatment of diabetic animals with SrRa (group D+SrRa) completely prevented these anti-osteogenic effects of Diabetes. Thus, in our experimental in vivo model, Diabetes decreases the osteogenic potential of BMPC, an effect that can be prevented by oral treatment with strontium ranelate.*

**Key words:** *diabetes mellitus, osteoporosis, strontium ranelate, bone marrow progenitor cells, osteoblast.*

## Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una patología caracterizada por hiperglucemia persistente, que en nuestro país afecta al 7% de la población adulta. Desde hace aproxi-

madamente 20 años se ha asociado la DM crónica con alteraciones esqueléticas y del metabolismo fosfocálcico, con reducción en el contenido mineral óseo (osteopenia u osteoporosis), aumento en la incidencia de fracturas y disminución en la consolidación de las mismas.<sup>1,2</sup> Los efectos crónicos sistémicos de la DM están mediados en parte por la acumulación tisular de productos de glicación avanzada de proteínas (AGEs) y su unión a receptores específicos. En el hueso, los osteoblastos expresan al receptor RAGE, y su activación por AGEs acumulados en el colágeno induce una inhibición en la proliferación, diferenciación y mineralización osteoblástica.<sup>3</sup> Los osteoclastos también expresan el receptor RAGE.<sup>4</sup> En estas células, los AGEs pueden disminuir la capacidad de resorción del hueso.<sup>5,6</sup> En conjunto, estos resultados sugieren que las alteraciones esqueléticas asociadas con la DM se pueden deber a una disminución del recambio óseo, con una consiguiente acumulación de imperfecciones que incrementa así el riesgo de fracturas. Dichas fracturas serán difíciles de consolidar al estar deprimida la formación ósea osteoblástica. En estudios previos con ratas diabéticas hemos demostrado que esta patología induce efectos deletéreos sobre la microarquitectura de huesos largos, que se asocian con una disminución en el potencial osteogénico de células progenitoras de médula ósea (CPMO), mediado por un descenso en la relación Runx-2/PPAR- $\gamma$  y un incremento en la expresión de RAGE.<sup>7</sup>

El ranelato de estroncio (RaSr) es uno de los medicamentos disponibles para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusicas,<sup>8</sup> y se ha probado su eficacia en ambos sexos y en un amplio rango etario. En este fármaco, dos cationes de estroncio (principio activo) se asocian de manera estable con el ácido ranélico.<sup>9</sup> El RaSr se administra por vía oral, y en el hueso el estroncio se incorpora a la hidroxiapatita sustituyen-



do al calcio. El RaSr actúa *in vitro* de forma dual, incrementando la formación ósea mediada por osteoblastos y disminuyendo la resorción osteoclástica. Actúa en parte como agonista del receptor sensor de calcio (CaSR), molécula acoplada a proteínas G que es expresada en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.<sup>9</sup> En los osteoclastos, el reconocimiento del estroncio por el CaSR inhibe en forma directa la diferenciación osteoclástica e induce su apoptosis. En los osteoblastos, el estroncio también actúa vía CaSR, activando las MAPK y estimulando en forma directa la proliferación, diferenciación y mineralización osteoblástica, así como incrementando la relación OPG/RANKL. A su vez, este mayor cociente OPG/RANKL provoca indirectamente una reducción en el reclutamiento y actividad de osteoclastos. En estudios recientes *in vitro*, nuestro grupo demostró que el RaSr previene los efectos antiosteogénicos de los AGEs sobre osteoblastos en cultivo.<sup>10</sup>

En modelos de osteoporosis experimental *in vivo* se ha probado que el RaSr genera un aumento en la densidad mineral ósea (DMO) y una mejoría en la microarquitectura y resistencia a fracturas.<sup>11</sup> En seres humanos se ha demostrado la eficacia antifractura del RaSr, sostenida hasta 8 años.<sup>8</sup> Aunque en general es un fármaco bien tolerado, recientemente se lo ha asociado con eventos cardiovasculares adversos en población vulnerable,<sup>12</sup> por lo cual actualmente se encuentra en discusión su pertinencia para el tratamiento de osteopatías en pacientes con DM.

En este trabajo se evaluó el efecto *in vivo* del estroncio sobre células progenitoras de médula ósea (CPMO), en un modelo animal de DM por destrucción parcial de la masa de células  $\beta$  del páncreas. El estroncio se administró por vía oral como RaSr en ratas con DM o sin ella, para evaluar postratamiento su efecto sobre el potencial osteogénico de CPMO aisladas de la médula ósea de huesos largos.

## Material y métodos

### Animales y tratamientos

Se utilizaron ratas macho de tres meses de edad de la cepa WKAH/Hok (190-210 g), mantenidas en un bioterio climatizado de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, alimentadas con una dieta estándar y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la *Guía de manejo y uso de animales de laboratorio*,<sup>13</sup> bajo las condiciones establecidas en las normas bioéticas nacionales –Disposición ANMAT 6677/10– e internacionales –Código de Núremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones–. El protocolo fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de nuestra institución (Número de Protocolo 001-05-15). Se utilizaron 16 animales, los cuales fueron divididos inicialmente en 2 grupos: controles (C) y diabéticas con destrucción parcial de la masa de células  $\beta$  (D) por inyecciones intraperitoneales consecutivas de 75 mg/kg de nicotinamida y 60 mg/kg de estreptozotocina.<sup>14</sup> Luego de una semana, a los animales inyectados se les midió la glucemia para confirmar la inducción de diabetes. A continuación, cada grupo se subdividió en dos subgrupos de 4 animales cada uno: sin tratamiento farmacológico, o tratados con 625 mg/kg/día de ranelato de estroncio<sup>15</sup> en el agua de bebida (RaSr), durante 6 semanas. Este tiempo se definió en función de la duración de un ciclo de remodelado óseo en la rata, que es de 4 semanas. Así, finalmente quedaron definidos cuatro grupos experimentales: C, C+RaSr, D, D+RaSr. Al final de todos los tratamientos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia con xilazina y ketamina. Antes del sacrificio, en los grupos C y D se extrajo sangre bajo anestesia por punción de la vena cava inferior y se separó el suero por centrifugación. En el suero se evaluaron: glucosa (Wiener Lab, Argentina) e insulina (ELISA para insulina de rata, ALPCO, Estados Unidos).

### **Aislamiento y cultivo de CPMO**

Las CPMO se obtuvieron a partir de lavados del canal diafisario medular (húmero y/o fémur) de las ratas de los diferentes grupos experimentales, según la técnica descrita previamente.<sup>16</sup> Fueron cultivadas en un medio DMEM-10% FBS penicilina/estreptomicina (medio basal) a 37 °C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, hasta alcanzar la confluencia (10 días de cultivo). En algunos casos y para inducir su diferenciación osteoblástica, las CPMO fueron replaqueadas a baja densidad e incubadas con un medio basal adicionado con 50 µg/ml de ácido ascórbico y 25 mM de β-glicerofosfato.

### **Proliferación celular**

Para evaluar el efecto *in vivo* del RaSr sobre la capacidad de proliferación, las CPMO de todos los grupos fueron replaqueadas y cultivadas durante 2 horas y 1, 2, 3 y 6 días en medio basal. Para medir el crecimiento celular se empleó el método de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol (MTT), por la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial de células viables, en un compuesto coloreado de color azul (formazán). El formazán es detectado espectrofotométricamente a 570 nm luego de haberse provocado su disolución con dimetilsulfoxido (DMSO).<sup>17</sup>

### **Actividad de fosfatasa alcalina**

Luego de 14 días de diferenciación osteoblástica, la monocapa de células se lavó con PBS y se solubilizó en Tritón X100 al 0,1%. Una alícuota del extracto celular se usó para determinar proteínas por el método de Bradford. La actividad de fosfatasa alcalina se midió espectrofotométricamente utilizando p-nitrofenilfosfato (p-NPP) como sustrato. El p-nitrofenol (producto coloreado de la hidrólisis) se determinó por absorbancia a 405 nm luego de incubar la mezcla de reacción a 37 °C en *buffer* pH 10,4 durante un período de tiempo predeterminado.<sup>18</sup> Los resultados se muestran como nmol pNP/min mg proteína.

### **Producción de colágeno tipo 1**

Luego de 14 días de diferenciación osteoblástica, la producción de colágeno tipo 1 se determinó utilizando un microensayo colorimétrico mediante la técnica de Sirius Red: las células se fijaron con solución de Bouin (ácido pícrico: formaldehído 35%: ácido acético glacial 15:5:1) durante 1 hora. Se lavó la monocapa celular con ácido clorhídrico 0,1 N y se tiñó con una solución de Sirius Red por 1 hora. El material teñido se disolvió en 1 ml de hidróxido de sodio 0,1 N y se midió su absorbancia a 550 nm. Las medidas se interpolaron en una curva de calibración, expresando los resultados como µg de colágeno/mg de proteína.<sup>19</sup>

### **Mineralización**

Los depósitos de calcio extracelular (nódulos de mineralización) se evaluaron luego de 21 días de cultivo en el medio de diferenciación osteoblástico. Brevemente, la monocapa celular se fijó con formalina y se tiñó con rojo de alizarina S. Los depósitos de calcio teñidos se extrajeron con 1 ml de solución de hidróxido de sodio 0,1 N y la densidad óptica se midió a 548 nm.<sup>19</sup> Los resultados se expresan como µg Ca/mg proteína.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como la media±SEM. Las diferencias entre grupos fueron analizadas por el test de ANOVA (*one-way*) y el test de Tukey. Se utilizó el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

### **Resultados y discusión**

En este trabajo evaluamos el efecto de un tratamiento oral durante seis semanas con ranelato de estroncio (RaSr) en ratas controles y diabéticas, sobre el potencial osteogénico de CPMO obtenidas y cultivadas poseutanasia de los animales. Para la inducción de DM utilizamos un modelo de insulinopenia por destrucción parcial de la masa de célu-

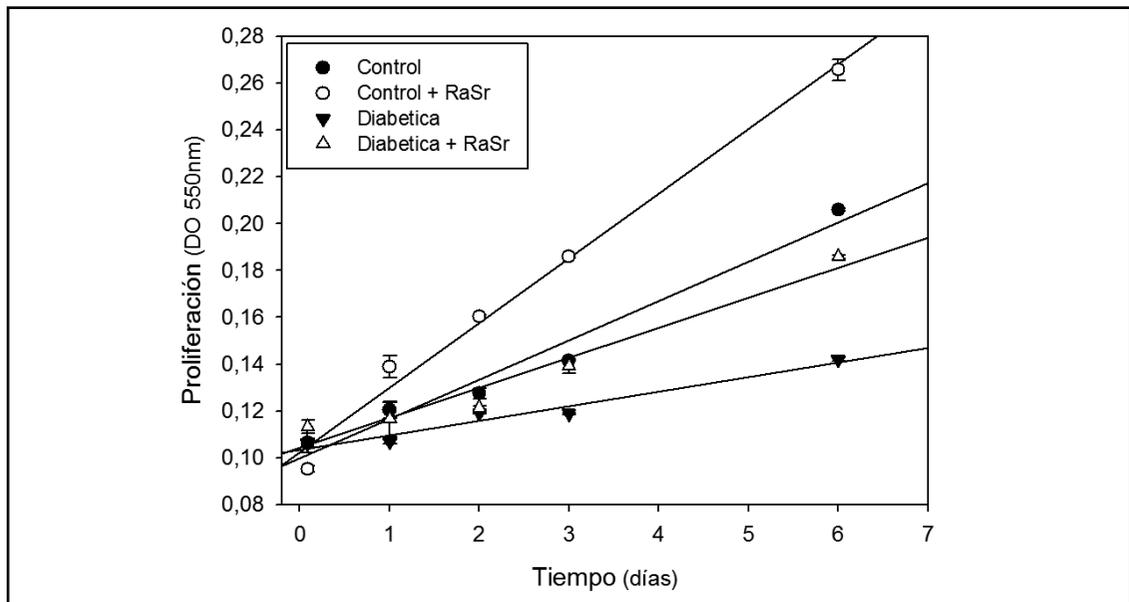


las  $\beta$  de los islotes del páncreas. En nuestro modelo de diabetes, la nicotinamida previene parcialmente la depleción de NAD inducida por la estreptozotocina sobre las células  $\beta$ , disminuyendo así su efecto tóxico.<sup>14</sup> La glucemia plasmática hallada fue de  $3,67 \pm 0,44$  g/l en el grupo D, versus  $1,46 \pm 0,15$  g/l en el grupo C. La insulinemia encontrada fue de  $1,31 \pm 0,15$  ng/ml (grupo C) y de  $0,27 \pm 0,15$  ng/ml (grupo D). El tratamiento oral con RaSr no modificó los valores de glucemia e insulinemia.

Una vez obtenidas las CPMO, en primer lugar determinamos el efecto *in vivo* del RaSr sobre su proliferación basal (es decir, de las células cultivadas en un medio basal). Como puede observarse en la Figura 1, encontramos: a) un incremento en la capacidad de proliferación de las CPMO obtenidas de animales no diabéticos tratados con RaSr (grupo C+RaSr:  $128 \pm 2\%$  respecto de C,  $p < 0,001$ ) y una disminución en la proliferación de CPMO de ratas diabéticas (grupo D:  $67 \pm 3\%$  respecto

de C,  $p < 0,001$ ). Fundamentalmente, el tratamiento de animales diabéticos con RaSr (grupo D+RaSr) permitió recuperar la capacidad de proliferación de las CPMO a valores del control ( $91 \pm 3\%$  respecto de C, diferencia no significativa).

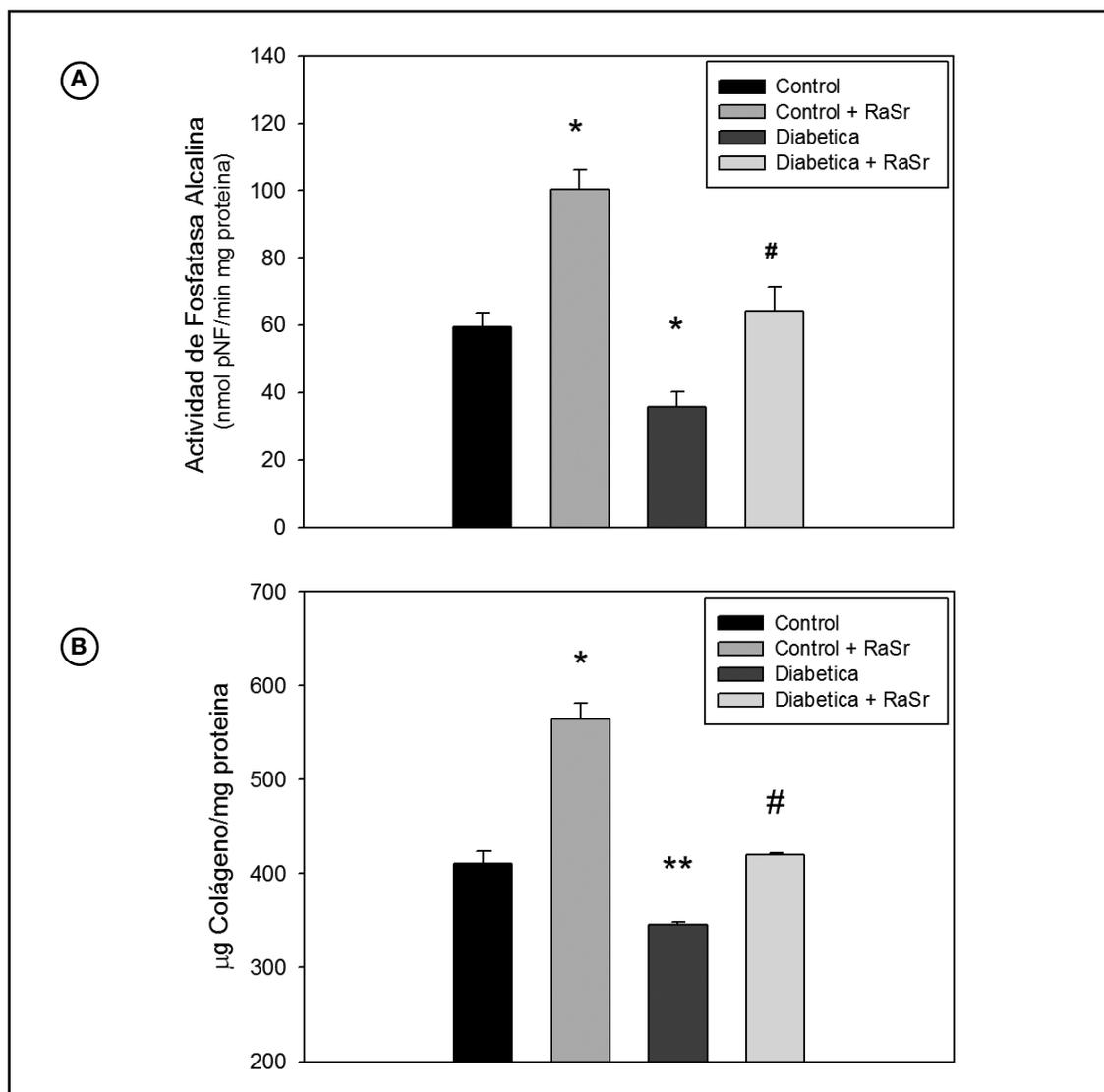
En una segunda etapa cultivamos las CPMO obtenidas de animales de los cuatro grupos en un medio basal adicionado con ácido ascórbico y  $\beta$ -glicerofosfato, con el objeto de inducir su diferenciación osteogénica *in vitro*. Estos cultivos fueron realizados durante 14 días (Figura 2A, actividad específica de FAL; Figura 2B, producción de colágeno de tipo 1) o durante 21 días (Figura 3, acumulación de nódulos extracelulares de hidroxapatita). Los resultados obtenidos fueron concordantes entre sí y, además, consistentes con los observados para la proliferación celular. Las CPMO del grupo C+RaSr mostraron un aumento significativo en la diferenciación osteogénica (colágeno 143% vs. C, FAL



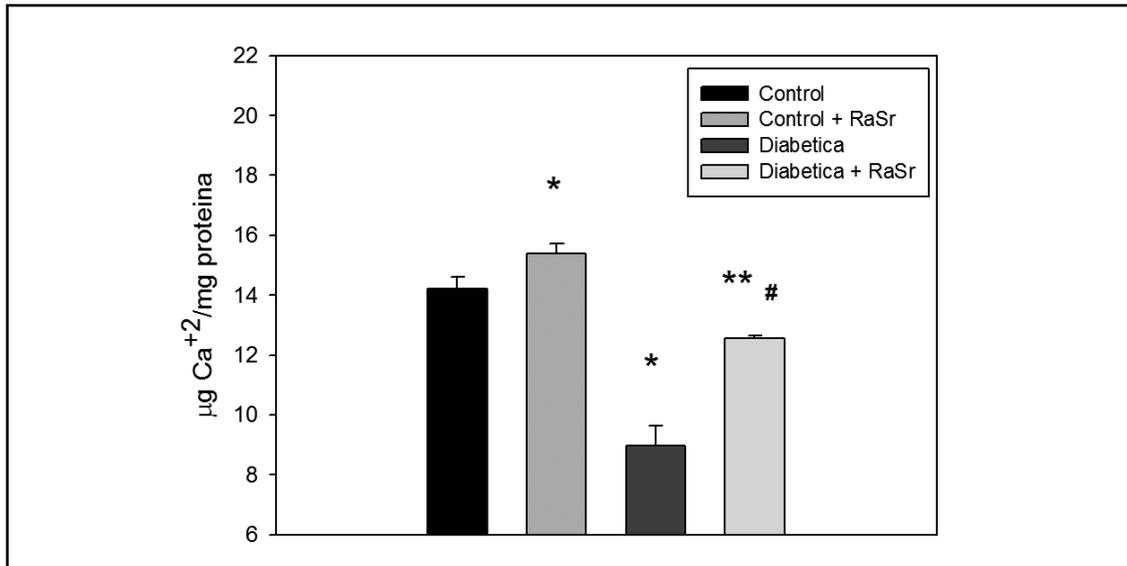
**Figura 1. Efectos de la diabetes y el tratamiento con ranelato de estroncio sobre la proliferación de células progenitoras de médula ósea (CPMO).** Se obtuvieron CPMO a partir de los cuatro grupos experimentales y se cultivaron en medio basal durante 2 horas y 1, 2, 3 y 6 días, evaluando el número de células viables mediante el ensayo de MTT. La proliferación celular se estimó a partir de la pendiente de las rectas obtenidas para cada grupo experimental.

168% vs. C, mineralización 117% vs. C). Por otro lado, la diabetes mellitus (grupo D) disminuyó significativamente la diferenciación osteoblástica de las CPMO (colágeno 83% vs. C, FAL 61% vs. C, mineralización 62% vs. C). El tratamiento con RaSr (grupo D+RaSr) previno significativamente estos efectos anti-osteoblásticos de la DM.

En estudios previos utilizando este mismo modelo *in vivo* de diabetes insulínopénica <sup>7</sup> demostramos un aumento de la expresión del receptor RAGE en las CPMO. En esta patología existe una acumulación de AGEs sobre el colágeno óseo, y así encontramos que la mayor interacción AGEs-RAGE inducía en las CPMO una disminución en la expresión del



**Figura 2. Efectos de la diabetes y el tratamiento con ranelato de estroncio sobre la diferenciación osteoblástica de células progenitoras de médula ósea (CPMO).** Las CPMO aisladas de los cuatro grupos experimentales fueron cultivadas durante 14 días en un medio de diferenciación osteoblástico. Al término de ese período, se determinó la actividad específica de fosfatasa alcalina (A) y la producción de colágeno tipo 1 (B). \*  $p < 0,05$  vs. grupo C; \*\*  $p < 0,01$  vs. grupo C; #  $p < 0,001$  vs. grupo D.



**Figura 3. Efectos de la diabetes y el tratamiento con ranelato de estroncio sobre la mineralización de células progenitoras de médula ósea (CPMO).** Las CPMO aisladas de los cuatro grupos experimentales fueron cultivadas durante 21 días en un medio de diferenciación osteoblástico. Al término de ese período, se determinó la formación de nódulos de mineralización extracelulares. \*  $p < 0,05$  vs. grupo C; \*\*  $p < 0,01$  vs. grupo C; #  $p < 0,001$  vs. grupo D.

factor de transcripción osteoblástico Runx-2 y un aumento en el factor proadipocítico PPAR- $\gamma$ , lo cual disminuyó su potencial osteogénico y provocó alteraciones deletéreas en la microarquitectura de huesos largos. En otro estudio reciente *in vitro* probamos que el ranelato de estroncio, en concentraciones similares a las que se han descrito en el plasma de mujeres posmenopáusicas en tratamiento antiosteoporótico con este fármaco, prevenía los efectos pro-inflamatorios y antiosteogénicos de los AGEs sobre osteoblastos en cultivo.<sup>10</sup>

Nuestras observaciones previas están de acuerdo con las del presente trabajo y sugieren que el estroncio puede inducir el compromiso de células osteoprogenitoras hacia el linaje osteoblástico y la formación de hueso, ejerciendo efectos directos sobre células óseas, aun en el contexto de la acumulación de AGEs inducida por DM. Específicamente,

en el presente trabajo hemos podido verificar en un modelo de diabetes con disminución en la reserva pancreática de insulina, que el tratamiento oral con ranelato de estroncio puede prevenir parcial o totalmente los efectos antiosteogénicos de dicha patología metabólica sobre CPMO.

El ranelato de estroncio se encuentra aprobado para su utilización en varios países incluida la Argentina (aunque no en los Estados Unidos). Sin embargo, a instancias del reciente reporte del Comité para la Evaluación de Riesgos en Farmacovigilancia Europeo (PRAC), a nivel global se han implementado cambios regulatorios en el uso de este medicamento. Ello implica su utilización actual solo para pacientes con osteoporosis severa para los cuales no sea posible un tratamiento antiosteoporótico alternativo, y adicionalmente que no posean contraindicaciones que incluyen: hipertensión no controlada, o ante-

cedentes previos o actuales de cardiopatía isquémica, enfermedad vascular periférica o enfermedad cerebrovascular.<sup>12</sup> Dado que la DM es un factor de riesgo cardiovascular, la indicación de este fármaco en el contexto de dicha patología debe evaluarse muy cuidadosamente.

En conclusión, en nuestro modelo experimental *in vivo*, la diabetes mellitus disminuye el potencial osteogénico de CPMO, efecto que puede ser prevenido por un tratamiento oral con ranelato de estroncio.

### Agradecimientos

Este trabajo fue subsidiado por la ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y

Tecnológica, PICT 2012-0053), por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires. ABL es becaria de la ANPCyT; JMF y MSM son miembros de la Carrera del Investigador del CONICET; AMC es miembro de la Carrera del Investigador de la CIC, y ADM es Profesor Adjunto con dedicación semiexclusiva de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

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

(Recibido: junio 2016.  
Aceptado: agosto 2016.)

### Referencias

1. Seino Y, Ishida H. Diabetic osteopenia: pathophysiology and clinical aspects. *Diabetes Metab Rev* 1995; 11:21-35.
2. Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52:1502-10.
3. McCarthy A, Etcheverry S, Bruzzone L, Lettieri G, Barrio D, Cortizo AM. Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biol* 2001;2:16.
4. Zhou Z, Immel D, Xi CX, et al. Regulation of osteoclast function and bone mass by RAGE. *J Exp Med* 2006; 203:1067-80.
5. Valcourt U, Merle B, Gineyts E, Viguier-Carrin S, Delmas PD, Garnero P. Non-enzymatic glycation of bone collagen modifies osteoclastic activity and differentiation. *J Biol Chem* 2007; 282:5691-703.
6. Gangoiti MV, Arnol V, Cortizo AM, McCarthy AD. Advanced Glycation Endproducts and Alendronate Differentially Inhibit early and Late Osteoclastogenesis in vitro. *J Diabetes Metab* 2013;4:6.
7. Tolosa MJ, Chuguransky SR, Sedlinsky C, et al. Insulin-deficient diabetes-induced bone microarchitecture alterations are associated with a decrease in the osteogenic potential of bone marrow progenitor cells: Preventive effects of metformin. *Diabetes Res Clin Pract* 2013; 101:177-86.
8. Reginster JY, Bruyère O, Sawicki A, et al. Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: results at 8 years. *Bone* 2009; 45:1059-64.
9. Marie PJ, Felsenberg D, Brandi ML. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporos Int* 2011; 22:1659-67.
10. Fernández JM, Molinuevo MS, Sedlinsky C, Schurman L, Cortizo AM, McCarthy AD. Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblastic cells via calcium channel



- activation. *Eur J Pharmacol* 2013; 706:41-7.
11. Ammann P. Strontium ranelate: a physiological approach for an improved bone quality. *Bone* 2006; 38(2 Suppl 1):15-8.
  12. Reginster JY, Brandi ML, Cannata-Andía J, et al. The position of strontium ranelate in today's management of osteoporosis. *Osteoporos Int* 2015; 26:1667-71.
  13. Guidelines on the handling and training of laboratory animals. In: The Biological Council of Animal Research and Welfare Panel. Potters Bar, England: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992.
  14. Tahara A, Matsuyama-Yokono A, Nakano R, Someya Y, Shibasaki M. Hypoglycaemic effects of anti-diabetic drugs in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced severely diabetic rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103:560-8.
  15. Bain SD, Jerome C, Shen V, Dupin-Roger I, Ammann P. Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. *Osteoporos Int* 2009; 20:1417-28.
  16. Molinuevo MS, Schurman L, McCarthy AD, et al. Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vitro and in vivo Studies. *J Bone Miner Res* 2010; 25:211-21.
  17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
  18. McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Cortizo AM. Effects of advanced glycation end-products on the proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem* 1997; 170:43-51.
  19. Cortizo AM, Sedlinsky C, McCarthy AD, Blanco A, Schurman L. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol* 2006; 536:38-46.

## ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

# VALIDACIÓN POSOPERATORIA EN LA SELECCIÓN ASISTIDA POR COMPUTADORA DE ALOINJERTOS DE FÉMUR DISTAL

Federico Edgardo Milano,<sup>1</sup> José Ignacio Albergo,<sup>2\*</sup> Germán Luis Farfalli,<sup>2</sup> Luis Alberto Aponte-Tinao,<sup>2</sup> Miguel Ángel Ayerza,<sup>2</sup> Domingo Luis Muscolo,<sup>2</sup> Lucas Eduardo Ritacco<sup>3</sup>

1. CINEOT, unidad asociada al CONICET, Buenos Aires, Argentina. 2. Sección Ortopedia Oncológica y Trasplantes óseos, Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina. 3. Unidad de Cirugía Asistida por Computadora, Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.

### Resumen

El objetivo de nuestro trabajo fue comparar dos grupos de pacientes tratados con trasplantes osteoarticulares del fémur distal en términos de evaluar: 1) el volumen del fémur distal del receptor y del trasplante, 2) la superficie articular de contacto del fémur distal del receptor y del trasplante, 3) el ángulo del valgo anatómico femoral del fémur distal del receptor y del trasplante. Materiales y métodos: se realizó una búsqueda retrospectiva entre 2002 y 2012 analizando a pacientes tratados con un trasplante osteoarticular de fémur distal. Se incluyó un total de 32 pacientes. Estos fueron divididos en dos grupos de acuerdo con el método de selección del trasplante: Grupo 1, conformado por 16 pacientes con trasplantes seleccionados mediante tomografía 2D y Grupo 2, 16 pacientes con trasplantes seleccionados a través de un método 3D. La evaluación fue realizada por un observador independiente y ciego para los dos grupos. Resultados: las diferencias en las pruebas de estimación de volumen y superficie articulares entre el donante y el receptor no fueron estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ). Sin embargo, la diferen-

cia entre los ángulos de valgo del fémur receptor y el fémur donante, seleccionados por el método 2D fue significativa ( $p<0,05$ ), mientras que la diferencia de estos ángulos en el método 3D no lo fue ( $p>0,05$ ). Conclusión: el método de selección de un aloinjerto, mediante la utilización de un banco de huesos virtual 3D para la reconstrucción con un trasplante osteoarticular de fémur distal, permite obtener una mejor alineación del miembro comparado con aquellos seleccionados solo con un método bidimensional.

**Palabras claves:** valoración posoperatoria, aloinjerto, fémur

### Abstract

#### POSTOPERATIVE ASSESSMENT IN COMPUTER ASSISTED SELECTION OF FEMUR OSTEOARTICULAR ALLOGRAFT

*The aim of our study was to compare two groups of patients treated with distal femur osteoarticular allograft in terms of: 1) the volume of the distal femur of the allograft and patient, 2) the articular surface contact, 3)*

\* Correo electrónico: [jose.albergo@hospitalitaliano.org.ar](mailto:jose.albergo@hospitalitaliano.org.ar)



*the anatomical femoral valgus angle. Material and methods: a retrospective review was performed between 2002 and 2012 and all patients with an osteo-articular allograft of the distal femur were analysed. A total of 32 patients were included in the study. Patients were divided into two groups according to the selection method of the allograft: Group 1, 16 patients with allograft selected by 2D (CT) and Group 2, 16 patients selected through a 3D method. The evaluation was done by an independent and blind observer. Results: the differences in terms of volume estimation and joint surface contact between the donor allograft and patient distal femur were not statistically significant ( $p>0.05$ ). However, the difference between the valgus angle showed significant differences between donor and patient femurs selected by the 2D method ( $p<0.05$ ) but no difference in the group of patients selected by 3D method ( $p>0.05$ ). Conclusion: the 3D method for allograft selection of the distal femur showed better results in limb alignment compared to 2D selection method.*

**Keywords:** postoperative assessment, femur, allograft

## Introducción

La cirugía de conservación de miembro permite reseccionar un sarcoma óseo con márgenes de seguridad oncológica, preservando la función del miembro.<sup>1</sup> La reconstrucción del defecto óseo articular luego de la resección de un tumor óseo maligno se puede conseguir mediante la utilización de implantes protésicos,<sup>2-8</sup> trasplantes óseos osteoarticulares<sup>9-12</sup> o por la combinación de ambos.<sup>13,14</sup>

Las ventajas de utilizar métodos biológicos como los trasplantes osteoarticulares incluyen la posibilidad de reinsertar ligamentos y tendones del paciente al tejido donante<sup>15</sup> restaurando la estabilidad y función de la rodilla y permitiendo la transmisión de carga a través de la superficie articular entre el paciente y el donante.

El seguimiento alejado de los trasplantes osteoarticulares nos ha demostrado que en aproximadamente un tercio de los pacientes se produce un desgaste progresivo de la articulación, generando dolor y limitación funcional. Una mejor congruencia y alineamiento articular influiría en la sobrevida a largo plazo de la articulación trasplantada reduciendo el riesgo de artrosis.<sup>16</sup>

El objetivo general de nuestro trabajo fue comparar dos grupos de pacientes tratados con trasplantes osteoarticulares del fémur distal: un primer grupo de pacientes con trasplantes seleccionados mediante la utilización de imágenes en 2D (tomografía) y un segundo grupo de pacientes con trasplantes seleccionados a través de la medición en un banco de huesos virtual en 3D. Para ello nos planteamos 3 objetivos específicos: 1) comparar la estimación de volumen del fémur distal del receptor y del trasplante. 2) comparar la superficie articular de contacto del fémur distal del receptor y del trasplante. 3) comparar el ángulo del valgo anatómico femoral del fémur distal del receptor y del trasplante.

## Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda retrospectiva en nuestra base de datos oncológica durante el período comprendido entre los años 2002 y 2012; un total de 42 pacientes tratados con un trasplante osteoarticular total de fémur distal posterior a una resección oncológica fueron seleccionados para este análisis. Se incluyeron en el estudio únicamente pacientes mayores de 10 años (para evitar el sesgo de selección de tamaño por crecimiento), tratados por un tumor óseo primario y reconstruidos con un trasplante osteoarticular total de fémur distal obtenido de un único banco de huesos y por el mismo equipo quirúrgico. La selección del trasplante en todos los casos fue realizada con tomografía 2D (durante el período 2002-2007) o mediante reconstrucción virtual 3D (durante el período 2008-2012). Los pacientes en los que se utilizaron aloinjertos medidos a través de radiografías simples fueron excluidos de la eva-

luación. Treinta y dos pacientes reunieron las condiciones para ser incluidos en el estudio y fueron divididos en dos grupos de acuerdo con el método de selección del trasplante utilizado: el Grupo 1, conformado por 16 pacientes con trasplantes seleccionados mediante la utilización de mediciones 2D (tomografía), y el Grupo 2, por 16 pacientes con trasplantes seleccionados a través de un método 3D utilizando herramientas de medición del banco de huesos virtual. Todos los pacientes fueron estudiados con radiografías posoperatorias de rodilla de frente. Los tres parámetros objetivos específicos fueron evaluados por un observador independiente y ciego para los dos grupos.

El trabajo contó con la aceptación por parte del Comité de Ética de Protocolos de Investigación (CEPI) de nuestra institución. No se requirió el consentimiento informado ya que todas las imágenes medidas en el estudio fueron utilizadas de forma anónima.

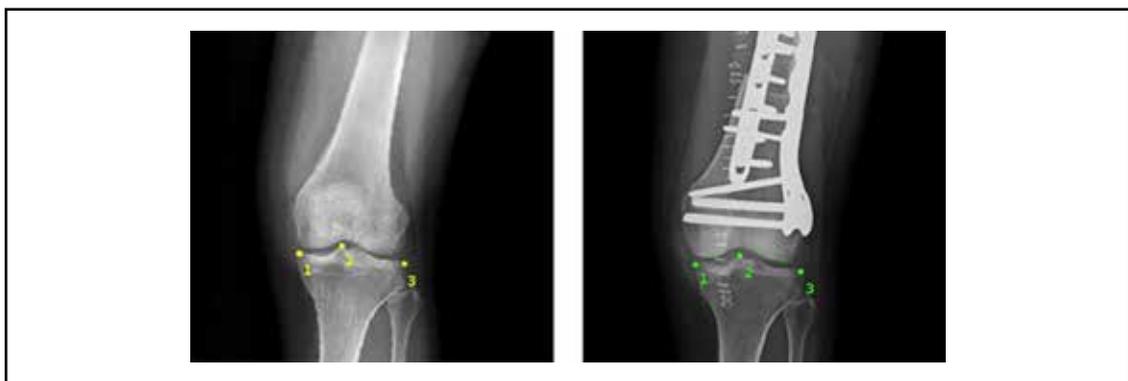
### **Escala de las imágenes para evaluar**

La adquisición radiográfica es proyectiva, lo cual –a diferencia de otras modalidades de adquisición de proyección múltiple como la tomografía computarizada basada en rayos X– genera imágenes cuya escala no es simple de establecer. Dos radiografías de un mismo objeto tomadas en momentos diferentes pueden generar proyecciones distintas, debido

a eventuales pequeñas variaciones en la distancia y posición entre la pantalla y el objeto. En el caso de una articulación, la situación es aún más compleja, puesto que el miembro del paciente puede ser acomodado en posturas levemente diferentes en cada adquisición.

Por esta razón, todas las radiografías preoperatorias fueron escaladas al tamaño de las radiografías posoperatorias. A su vez, las imágenes preoperatorias fueron registradas con las posoperatorias, esto es, fueron puestas en el mismo sistema de referencia, alineando las referencias anatómicas de las imágenes preoperatorias con las correspondientes referencias anatómicas posoperatorias. La tibia proximal, conservada en ambas imágenes, se utilizó para seleccionar puntos de referencia.

El proceso de registración se realizó por medio de un software a medida. Este permitió el ingreso de tres puntos de referencia seleccionados por el usuario en la imagen preoperatoria y sus tres puntos correspondientes en la imagen posoperatoria. Luego, el software estimó la transformación espacial de similaridad, esto es, una transformación que permite traslaciones, rotaciones y un escalado homogéneo, la cual aplicó a la imagen preoperatoria. De esta forma se obtuvo la mejor alineación entre cada punto de referencia preoperatorio y su correspondiente punto posoperatorio (Figura 1).



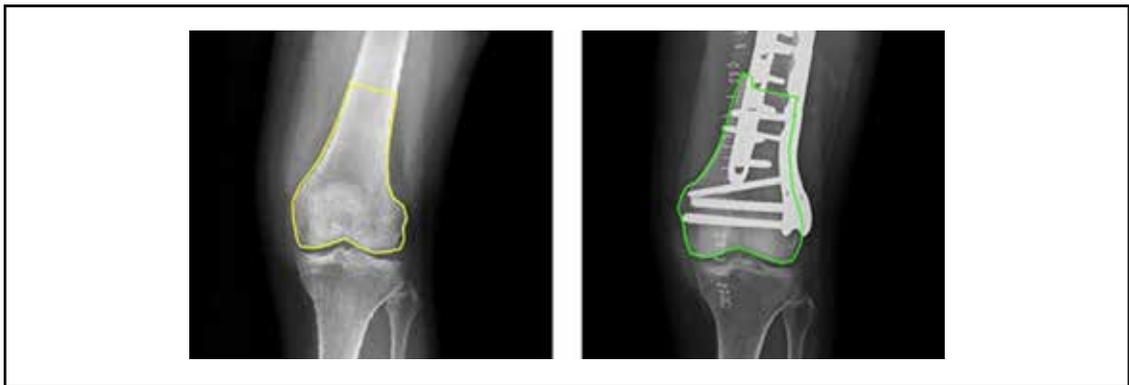
**Figura 1.** A la izquierda la radiografía preoperatoria con sus tres puntos de referencia. A la derecha la radiografía postoperatoria con sus correspondientes tres puntos luego de aplicado el proceso de registro. Puede apreciarse que la alineación entre la radiografía preoperatoria y la postoperatoria es aceptable.



### **Estimación del volumen**

En una radiografía no es posible estimar un volumen absoluto, pero por medio del cálculo de una superficie preoperatoria y una superficie posoperatoria es posible estimar el volumen relativo entre la anatomía preoperatoria y la anatomía luego de la reconstrucción. Para ello, utilizando un software a medida, se delineó cada par de radiografías –preoperatoria

y posoperatoria– con un polígono cerrado. La superficie de dicho polígono es un estimador proporcional del volumen de interés. Puesto que el proceso de registro permitió visualizar ambas radiografías superpuestas fue posible establecer el plano de corte en la radiografía preoperatoria tomando como base la información visible en la radiografía posoperatoria. En la Figura 2 puede verse un caso delineado.

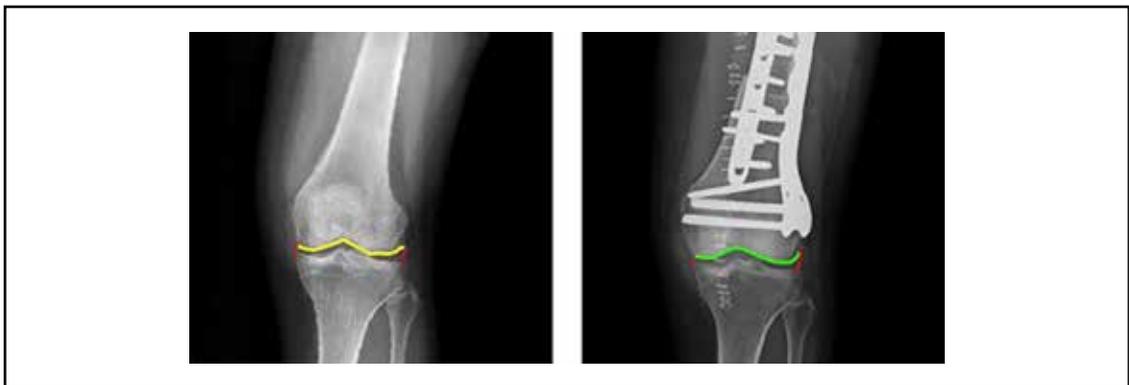


**Figura 2.** A la izquierda la radiografía preoperatoria con un polígono cerrado. A la derecha la radiografía postoperatoria delineada; observar que en esta imagen es posible detectar la superficie de corte.

### **Estimación de la superficie de contacto articular**

La restricción mencionada en el caso de la estimación del volumen aplica también a la estimación de la superficie articular. Así es como esta superficie se estima por el

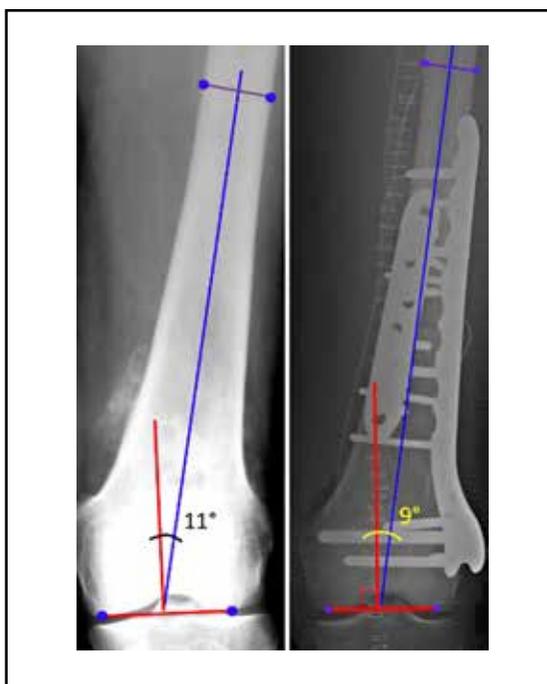
contorno lineal delimitado por la proyección de los límites de la tibia, líneas rojas en la Figura 3. La longitud del camino poligonal que describe el contorno distal del fémur es proporcional a la superficie de contacto articular.



**Figura 3.** La líneas rojas representan los límites de la tibia, proyectados sobre el fémur distal para delimitar la estimación lineal de la superficie de contacto.

### Estimación del valgo

El ángulo de valgo fue medido en cada radiografía preoperatoria y posoperatoria. Si bien el ángulo no varía con la escala de la imagen ni con su posición relativa, la medición fue realizada utilizando el software a medida antes mencionado, luego de haber registrado las imágenes (Figura 4).



**Figura 4.** Medición del eje anatómico del fémur preoperatorio (izquierda) y postoperatorio (derecha).

### Pruebas estadísticas

Las pruebas estadísticas fueron diseñadas para comparar los dos grupos de casos, aquellos elegidos por el método tomográfico (2D) y los elegidos por el método tridimensional (3D).

La estimación del volumen fue normalizada obteniendo la razón entre el volumen estimado posoperatorio y el volumen estimado preoperatorio. La misma operación de normalización fue aplicada a la estimación de la superficie de contado. Una vez obtenidas las razones de volumen/superficie de ambos

grupos, se probó la normalidad de estos por medio de la prueba de Shapiro-Wilk.<sup>17</sup> La posible diferencia entre ambos grupos fue evaluada por una prueba t de Student-Welch.<sup>18</sup>

### Resultados

Las pruebas de las estimaciones de los volúmenes y superficies articulares entre el donante y el receptor no contaron con suficiente evidencia para asegurar que la diferencia entre ambos grupos fueran significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1).

Sin embargo, la diferencia entre los ángulos de valgo del fémur receptor y el fémur donante, seleccionados por el método 2D, fue significativa ( $p < 0,05$ ), mientras que la diferencia de estos ángulos en el método tridimensional no resultó significativo ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2).

### Discusión

Aproximadamente el 50% de los tumores óseos primarios se localizan alrededor de la rodilla, y el fémur distal, particularmente, es el hueso más afectado.<sup>19</sup> En las últimas décadas, los avances en los métodos de diagnóstico y en los tratamientos adyuvantes han hecho que la cirugía de conservación de miembro sea hoy en día el tratamiento de elección para la mayoría de los tumores óseos malignos o localmente agresivos.<sup>20</sup> Un gran número de opciones reconstructivas han sido descritas en la literatura con el fin de solucionar los grandes defectos óseos posteriores a resecciones oncológicas, incluyendo reconstrucciones biológicas, protésicas o combinaciones de ambas, tales como las aloprótesis.<sup>2-8,15,21</sup> Beneficios y desventajas de cada uno de estos procedimientos han sido ampliamente descritos. Sin embargo, el mejor método de reconstrucción posterior a una resección oncológica del fémur distal sigue en discusión y generando controversias.

Si bien el uso de tejidos y órganos de donantes para trasplante está muy difundido, la utilización de huesos ocupa un lugar biológico privilegiado debido a que solo se emplea



**Tabla 1.** Serie completa de pacientes incluidos en el estudio. Los valores de estimación de volumen y superficie, están expresados a modo de relación tomando el preoperatorio como valor de referencia.

Caso	Volumen relativo	Superficie de contacto relativa	Valgo (°)		Grupo
			Preoperatorio	Postoperatorio	
1	1,20	0,93	9,16	7,39	2
2	1,05	1,04	3,79	8,19	1
3	0,82	1,01	7,25	2,86	2
4	1,08	1,17	8,16	5,33	2
5	0,91	1,05	10,49	7,27	2
6	0,99	1,10	8,55	11,49	2
7	1,18	0,90	10,89	12,62	2
8	0,96	0,97	4,50	10,11	1
9	1,24	1,00	7,44	7,33	1
10	0,78	0,95	1,52	4,01	1
11	1,08	0,89	4,65	11,6	1
12	1,14	1,18	12,69	10	2
13	1,00	0,93	4,52	6,45	2
14	0,92	0,86	3,03	15,85	1
15	0,87	0,97	3,49	7,45	2
16	0,87	0,90	0,35	4,52	1
17	1,18	1,03	2,55	7,88	1
18	0,96	1,12	9,21	14,88	1
19	1,02	0,88	5,27	9,35	2
20	0,90	1,13	9,94	11,84	1
21	1,16	1,01	4,21	7,74	1
22	1,01	0,98	10,00	5,56	2
23	1,15	0,93	15,22	3,74	2
24	0,80	0,93	6,36	6,78	2
25	0,86	1,04	2,39	8,89	2
26	0,95	1,06	6,50	8,4	1
27	0,87	0,71	2,37	4,57	1
28	0,72	1,13	7,73	7,23	2
29	0,77	0,93	5,61	12,31	1
30	0,88	1,07	5,43	10,63	1
31	1,16	1,02	0,87	11,32	1
32	0,97	1,09	5,14	2,92	2

**Tabla 2.** Comparación pre y posoperatoria del ángulo valgo en los grupos estudiados.

	Valgo preoperatorio (promedio)	Valgo posoperatorio (promedio)	p
Grupo 1 Tomografía 2D	4.49°	9.44°	<0,05
Grupo 2 Banco virtual 3D	7.95°	7.20°	ns

su estructura (sin células viables) evitando o limitando fenómenos de respuesta inmunológica. Es decir, solo se trasplanta su andamiaje y esto resulta particularmente beneficioso en reconstrucciones óseas masivas.

Las reconstrucciones biológicas con trasplantes osteoarticulares del fémur distal tienen ventajas claras sobre las endoprótesis: 1) permiten reconstruir las estructuras ligamentarias y tendinosas restaurando la biomecánica y la estabilidad de la articulación; 2) brindan la posibilidad de restituir *stock* óseo luego de grandes resecciones oncológicas, de vital importancia en pacientes jóvenes y con buen pronóstico; 3) la reconstrucción del aparato extensor ofrece mejores resultados funcionales en términos de extensión activa.<sup>15,21,22</sup> La transmisión homogénea de carga a través de la superficie articular entre el paciente y el donante así como mediante una precisa alineación del miembro y superficies de contacto, resultan factores importantes para lograr buenos resultados a largo plazo.<sup>16</sup> En el año 2005 evaluamos nuestra primera serie de 80 trasplantes osteoarticulares del fémur distal seguidos por un promedio de 82 meses y observamos que la sobrevida del trasplante fue del 78% a 5 años y que el 71% preservó la articulación original. Sin embargo, en un porcentaje de pacientes se observó un deterioro articular en los estudios radiográficos, con su consiguiente correlación clínica de dolor y reducción del rango de movilidad.<sup>23,24</sup> Dicho deterioro articular responde, posiblemente, a factores mecánicos de la articulación reconstruida, relacionados con la congruencia articular, la estabilidad obtenida, la precisión en la coaptación articular entre el donante y el receptor y el eje anatómico del miembro reconstruido con una precisa alineación.

La congruencia anatómica entre el donante y el receptor y su alineación son los factores más influyentes en la durabilidad a largo plazo de los trasplantes osteoarticulares.<sup>16,23,24</sup> Varios estudios anatómicos de especímenes humanos extraídos de pacientes trasplanta-

dos con articulaciones no congruentes y no alineadas mostraron signos prematuros de desgaste articular en comparación con aquellos con una articulación más estable y congruente.<sup>16</sup> Una selección inadecuada del hueso que se va a trasplantar, en cuanto a su forma y tamaño, o un desequilibrio en el eje del aloinjerto trasplantado puede generar alteraciones tanto en la movilidad articular como en la distribución de las cargas, originando fracturas articulares y degeneración temprana del cartílago. Por lo tanto, determinar el tamaño, la forma y el eje del aloinjerto y su correlación con el receptor es un punto crucial para el éxito de la reconstrucción a largo plazo de trasplantes osteoarticulares en articulaciones de carga tales como la rodilla. La evolución de la tecnología ha hecho que dispongamos de nuevas técnicas de diagnóstico e imágenes para poder estudiar mejor tanto a los pacientes como los trasplantes óseos. Al programar una cirugía reconstructiva de rodilla con aloinjerto, la tomografía ofrece mejores datos que la radiografía para seleccionar el hueso donante apropiado que ofrezca la mayor congruencia articular.<sup>25</sup> Los cortes tomográficos axiales de donante y receptor permiten comparar similitudes y diferencias. La posibilidad de disponer de un sistema virtual en tres dimensiones que nos permita estudiar la totalidad de hueso en sus diferentes planos así como sus ejes anatómicos y compararlo por superposición con el hueso del paciente constituye una valiosa herramienta para los cirujanos ortopédicos en cirugía oncológica. Si bien nuestro estudio no ha demostrado diferencias significativas en lo que respecta a estimación de volumen y superficie entre los dos métodos (2D y 3D), debemos señalar que la diferencia en el ángulo de valgo femoral ha resultado mejor en aquellos pacientes seleccionados a través de la plataforma 3D virtual. Es de destacar que el eje anatómico del miembro inferior, evaluado a nivel de la articulación femorotibial es un factor determinante para restaurar una biomecánica más



fisiológica en las rodillas reconstruidas. Poder reproducir el eje del hueso resecado en el aloinjerto que se trasplantará de una manera más precisa, respetando la angulación que presentaba y por consiguiente el eje completo del miembro, posiblemente influya en la biomecánica y en la supervivencia articular a largo plazo. Posteriores seguimientos de los pacientes reconstruidos con estos métodos de selección donante-receptor permitirán determinar si se traducen en disminuciones del desgaste articular.

El éxito de una reconstrucción osteoarticular con un aloinjerto no depende solo de un único factor.<sup>9-12</sup> Son múltiples las causas que pueden provocar falla del mismo: la mala alineación articular y del miembro obtenida con la reconstrucción osteoarticular, la inestabilidad articular por una reconstrucción deficiente de las partes blandas, alteraciones significativas en la relación del tamaño y congruencia articular entre trasplante y receptor que originen un desgaste prematuro, o la exigencia a la que es sometida la reconstrucción por parte del paciente.<sup>9-12,21,22</sup> El objetivo es minimizar al máximo las posibles causas de falla, para lograr reconstrucciones que perduren por largos períodos de tiempo.

Este estudio tiene ciertas limitaciones. En primer lugar, el diseño metodológico retrospectivo. Segundo, el número de pacientes incluidos en cada grupo. Tercero, si bien se usó un observador ciego para la medición de todas las imágenes, el hecho de no contar con un coeficiente de reproductibilidad interobservador representa una limitación. En cuarto lugar, la selección del donante fue realizada

con métodos bidimensionales y tridimensionales, pero la evaluación posoperatoria se realizó con radiografías en un plano. En quinto lugar, el grupo tiene cierta heterogeneidad inherente en términos de diagnóstico, edad, sexo y características antropomórficas de los pacientes. Por último la selección de los trasplantes está sujeta a la disponibilidad de estos en el banco de hueso al momento de la cirugía, lo cual constituye una variable no controlada. Sin embargo, es el primer estudio comparativo de dos métodos alternativos para la selección de trasplantes osteoarticulares que incluye la herramienta de planeamiento virtual en tres dimensiones.

### Conclusiones

El método de selección de un aloinjerto, mediante la utilización de un banco de huesos virtual 3D para la reconstrucción con un trasplante osteoarticular de fémur distal, permite obtener una mejor alineación del miembro comparado con aquellos seleccionados con un método bidimensional. Las diferencias en la estimación en relación con la superficie articular obtenida y la relación de volumen no fueron significativas entre ambos grupos. Es necesario desarrollar técnicas tridimensionales para evaluar resultados posoperatorios y obtener mayor precisión en las mediciones.

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

Recibido: junio 2016.

Aceptado: agosto 2016.

## Referencias

1. Li X, Zhang Y, Wan S, et al. A comparative study between limb-salvage and amputation for treating osteosarcoma. *J Bone Oncol* 2016; 5:15-21.
2. Bickels J, Wittig JC, Kollender Y, et al. Reconstruction of the extensor mechanism after proximal tibia endoprosthesis replacement. *J Arthroplasty* 2001; 16:856-62.
3. Brien EW, Terek RM, Healey JH. Allograft reconstruction after proximal tibial resection for bone tumors: An analysis of function and outcome comparing allograft and prosthetic reconstructions. *Clin Orthop* 1994;303:116-27.
4. Grimer RJ, Carter SR, Tillman RM, et al. Endoprosthesis replacement of the proximal tibia. *J Bone Joint Surg Br* 1999; 81:488-94.
5. Myers GJC, Abudu AT, Carter SR, Tillman RM, Grimer RJ. Endoprosthesis replacement of the distal femur for bone tumours: Long-term results. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89:521-26.
6. Natarajan MV, Sivaseelam A, Rajkumar G, Hussain SHJ. Custom megaprosthesis replacement for proximal tibial tumours. *Int Orthop* 2003; 27:334-7.
7. Unwin PS, Cannon SR, Grimer RJ, Kemp HB, Sneath RS, Walker PS. Aseptic loosening in cemented custom-made prosthetic replacements for bone tumors of the lower limb. *J Bone Joint Surg Br* 1996; 78:5-13.
8. Wu C-C, Chia-Chun W, Henshaw RM, Tamir P, Squires MH, Malawer MM. Implant design and resection length affect cemented endoprosthesis survival in proximal tibial reconstruction. *J Arthroplasty* 2008; 23:886-93.
9. Clohisy DR, Mankin HJ. Osteoarticular allografts for reconstruction after resection of a musculoskeletal tumor in the proximal end of the tibia. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76:549-54.
10. Hornicek FJ Jr, Mnaymneh W, Lackman RD, Exner GU, Malinin TI. Limb salvage with osteoarticular allografts after resection of proximal tibia bone tumors. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 352:179-86.
11. Mankin HJ, Gebhardt MC. The use of frozen cadaveric allografts in the management of patients with bone tumors of the extremities. *Orthop Clin North Am* 1987; 18:275-89.
12. Muscolo DL, Ayerza MA, Aponte-Tinao LA. Massive allograft use in orthopedic oncology. *Orthop Clin North Am* 2006; 37:65-74.
13. Donati D, Colangeli M, Colangeli S, Di Bella C, Mercuri M. Allograft-prosthetic composite in the proximal tibia after bone tumor resection. *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466:459-65.
14. Biau DJ, Dumaine V, Babinet A, Tomeno B, Anract P. Allograft-prosthesis composites after bone tumor resection at the proximal tibia. *Clin Orthop Relat Res* 2007; 456:211-7.
15. Muscolo DL, Ayerza MA, Aponte-Tinao LA, Ranalletta M. Use of distal femoral osteoarticular allografts in limb salvage surgery. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88:305-21.
16. Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allografts: a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83:971-86.
17. Shapiro SS, Wilk MB. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* [Oxford University Press, Biometrika Trust] 1965; 52:591-611.
18. Welch BL. The generalization of Student's' problem when several different population variances are involved. *Biometrika* [Oxford University Press, Biometrika Trust]; 1947; 34:28-35.
19. Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. *Cancer* 1995; 75:203-10.
20. Bielack SS, Smeland S, Whelan JS, et al. Methotrexate, doxorubicin, and cisplatin (MAP) plus maintenance pegylated interferon alfa-2b versus MAP alone in patients with resectable high-grade osteosarcoma and good histologic response to preoperative MAP: First results of the EURAMOS-1 good response randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2015; 33:2279-87.
21. Albergó JI, Gaston CL, Aponte-Tinao LA, et al. Proximal tibia reconstruction after bone tumor resection: are survivorship and outcomes of endoprosthesis replacement and osteoarticular allograft similar? *Clin Orthop*



- Relat Res* 2016 [In Press] doi:10.1007/s11999-016-4843-y.
22. Campanacci L, Manfrini M, Colangeli M, Alí N, Mercuri M. Long-term results in children with massive bone osteoarticular allografts of the knee for high-grade osteosarcoma. *J Pediatr Orthop* 2010; 30:919-27.
  23. Muscolo DL, Ayerza MA, Aponte-Tinao LA. Survivorship and radiographic analysis of knee osteoarticular allografts. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 373:73-9.
  24. Muscolo DL, Ayerza MA, Aponte-Tinao LA, Ranalletta M. Use of distal femoral osteoarticular allografts in limb salvage surgery. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87:2449-55.
  25. Velán O, Aponte Tinao LA, Muscolo DL, Ayerza M. Trasplantes de fémur distal: planeamiento preoperatorio por tomografía computada. *Rev Argent Radiol* 2004; 68:245-50.

ARTÍCULOS ORIGINALES / *Originals*

## LA DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL PRODUCE AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE iNOS Y ALTERA LA VÍA PARACELULAR DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO

María Angélica Rivoira, Lucía Raquel Corball, Valeria Andrea Rodríguez\*

Laboratorio "Dr. Fernando Cañas", Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, INICSA (CONICET-Universidad Nacional de Córdoba).

### Resumen

Previamente hemos demostrado que la diabetes mellitus tipo 1 experimental (D.m.1) inducida por estreptozotocina (STZ) produce estrés oxidativo intestinal en las primeras etapas de la enfermedad, lo que conduce a la inhibición de la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$ , alterando la vía transcelular del transporte del catión. El objetivo de este trabajo fue estudiar la vía paracelular del transporte del  $\text{Ca}^{+2}$  y analizar si la D.m.1 induce estrés nitrosativo a nivel duodenal. Se utilizaron ratas Wistar machos a las que se inyectaron 60 mg STZ/kg de peso corporal; se sacrificaron a los 30 días postratamiento. Se determinó la expresión génica y proteica de claudina 2 y 12, proteínas involucradas en el transporte paracelular del  $\text{Ca}^{+2}$ . En la mucosa duodenal se determinó el contenido de óxido nítrico (NO) y la expresión proteica de óxido nítri-

co sintasa inducible (iNOS). Los resultados revelaron que la expresión génica de claudina 2 en las ratas diabéticas fue más del doble en comparación con la de los controles, mientras que la expresión génica de claudina 12 fue similar en ambos grupos. La expresión proteica de claudina 2 y 12 aumentó en las ratas diabéticas. El contenido de NO fue similar en ambos grupos; sin embargo, la expresión proteica de iNOS fue mayor en las ratas diabéticas en comparación con la de las ratas controles. En conclusión, la D.m.1 experimental se acompaña de estrés oxidativo y de aumento en la expresión proteica de iNOS, alterándose la vía paracelular de absorción de  $\text{Ca}^{+2}$  como un mecanismo compensatorio.

**Palabras clave:** diabetes mellitus, vía paracelular, iNOS.

\* Pabellón Argentina, 2do. Piso, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina. Correo electrónico: [valerod2003@yahoo.com.ar](mailto:valerod2003@yahoo.com.ar)



## Abstract

### **EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS PRODUCES INCREASED iNOS EXPRESSION AND ALTERS THE PARACELLULAR PATHWAY OF INTESTINAL CALCIUM ABSORPTION**

We have previously shown that experimental type 1 diabetes mellitus (D.m.1) produced by streptozotocin (STZ) in rats causes intestinal oxidative stress in the early stages of the disease, which leads to the inhibition of intestinal  $\text{Ca}^{2+}$  absorption, altering the transcellular  $\text{Ca}^{2+}$  pathway. The aim of this work was to study the paracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pathway and analyze if D.m.1 induces duodenal nitrosative stress. The animals were assigned to two groups: 1) control rats, and 2) STZ-induced diabetic rats (60 mg/kg b.w.). Rats were sacrificed 30 days after induction of diabetes. The gene and protein expression of claudin 2 and 12, proteins involved in paracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pathway, was determined as well as the nitric oxide (NO) content and protein expression of iNOS in rat duodenum mucosa. The results revealed that claudin 2 expression was more than double in diabetic rats compared to control rats at 30 days, while the gene expression of claudin 12 was similar in both groups. The protein expression of claudin 2 and 12 increased in the diabetic rats. NO content was similar in both groups, but the iNOS protein expression was enhanced in diabetic rats. To conclude, the experimental type 1 D.m.1 is accompanied by duodenal oxidative stress, increase iNOS protein expression and alteration of the paracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pathway as a compensatory mechanism.

**Key words:** diabetes mellitus, paracellular pathway, iNOS.

## Introducción

La diabetes mellitus (D.m.) comprende un grupo de patologías metabólicas que cursan

con hiperglucemia crónica derivada de un defecto en la secreción o en la función de la insulina. Se conoce que la D.m. puede agravar la deficiencia ósea en pacientes con osteopenia u osteoporosis e incluso desencadenar osteoporosis secundaria.<sup>1</sup> La D.m. tipo 1 (D.m.1) comienza en la niñez o en la juventud, generalmente por destrucción autoinmunitaria de la célula  $\beta$  pancreática, lo cual ocasiona secreción insuficiente de insulina con hiperglucemia crónica. Tanto los hombres como las mujeres con D.m.1 presentan disminución de la masa ósea en cadera, cuello femoral y columna, que lleva a mayor incidencia de fracturas.<sup>2-4</sup> Los mecanismos por los cuales la D.m. disminuye la masa ósea aún no se han dilucidado completamente. Se ha sugerido que la disminución en la absorción de  $\text{Ca}^{+2}$  podría desempeñar un rol importante en la desmineralización del paciente diabético.<sup>1</sup>

Un mejor conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad ósea en pacientes con D.m. puede tener un notable impacto en su prevención y tratamiento. Para ello es fundamental el conocimiento de la absorción intestinal del  $\text{Ca}^{+2}$ , ya que la única puerta de entrada del catión al organismo es el intestino. El estudio de la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  en un modelo de D.m. tipo 1 experimental es, por esta razón, de sumo interés.

La absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  depende de muchos factores tales como la biodisponibilidad del catión, y de otros factores nutricionales, la modulación por hormonas calciotrópicas y las condiciones fisiopatológicas del individuo. El 90% del  $\text{Ca}^{+2}$  se absorbe en el intestino delgado pero la velocidad de absorción es mayor en el duodeno, uno de los sitios en los que la vitamina D ejerce su principal acción favoreciendo la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  por la vía transcelular. Esta vía comprende 3 etapas: 1) entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a nivel del borde en cepillo de los enterocitos, mediada a través de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$ , conocidos como TRPV5 y TRPV6 (receptor de potencial transiente de vanilloide 5 y 6), 2) desplazamien-

to del catión desde un polo hacia el otro de la célula, vía unión a calbindina  $D_{9k}$  ( $CB_{9k}$ ) en mamíferos o a calbindina  $D_{28k}$  ( $CB_{28k}$ ) en aves y 3) salida de  $Ca^{+2}$  por la membrana basolateral de los enterocitos mediante activación de la  $Ca^{+2}$ -ATPasa y del intercambiador  $Na^{+}/Ca^{+2}$ . Sin embargo, cuando el contenido de  $Ca^{+2}$  en la luz intestinal es elevado y el sistema de transporte activo se satura, una proporción creciente del  $Ca^{+2}$  es captada por difusión pasiva (vía paracelular). Esta vía es regulada por el epitelio, especialmente a nivel de las "uniones estrechas" entre los enterocitos. Dichas uniones son dominios especializados de membrana, constituidos por proteínas de la familia de las ocludinas y claudinas (CLDN), que aseguran la permeabilidad selectiva de iones y moléculas a través del epitelio.<sup>5,6</sup>

Hay evidencias de que la homeostasis del  $Ca^{+2}$  se altera en la D.m.<sup>7</sup> Varios estudios llevados a cabo en pacientes diabéticos mostraron aumento en la excreción urinaria del catión y disminución de los niveles circulantes de  $1,25(OH)_2D_3$ .<sup>8,9</sup> A pesar de que los animales diabéticos desarrollan hiperplasia intestinal,<sup>10</sup> presentan disminución de la absorción del catión.<sup>11</sup> El balance neto del  $Ca^{+2}$  es levemente negativo o normal, debido al incremento de la ingesta del  $Ca^{+2}$  ligada a la hiperfagia y a mecanismos compensatorios tales como hiperparatiroidismo secundario y marcada desmineralización ósea.<sup>12</sup> Nyomba y col.<sup>13</sup> demostraron correlación entre la disminución en la captación duodenal del  $Ca^{+2}$  que presentan ratas machos BB (biomodelo espontáneo de ratas diabéticas) y la disminución en la concentración de  $CB_{9k}$  y de sus sitios de unión en el duodeno. Los autores hallaron bajos niveles plasmáticos de proteínas que ligan  $Ca^{+2}$  y aumento en la fracción libre de  $1,25(OH)_2D_3$ , lo que indica cierta resistencia a la vitamina D.

Se ha comprobado que la D.m. inducida por estreptozotocina (STZ), antibiótico que produce destrucción selectiva de las células  $\beta$ , desencadena estrés oxidativo en diversos órganos y sistemas,<sup>14,15</sup> entre ellos el intesti-

no.<sup>16-18</sup> Los estudios de nuestro laboratorio demostraron que el estrés oxidativo puede alterar la expresión de genes y proteínas involucrados en el transporte transcelular y paracelular de  $Ca^{+2}$ , disminuyendo la absorción intestinal del catión.<sup>19,20</sup> Lee y col.<sup>21</sup> detectaron incremento en los niveles de ARNm de proteínas transportadoras de  $Ca^{+2}$  (TRPV5, TRPV6,  $CB_{28k}$  y TRPM6 –receptor de potencial transiente de melastatina 6–) en el riñón de ratas diabéticas después de 15 días de la inyección intraperitoneal de STZ. Este incremento en la expresión génica se acompañó de aumento en la expresión proteica de TRPV5 y  $CB_{28k}$  renal. La aplicación de insulina logró revertir completamente la hipercalcemia y las alteraciones moleculares concomitantes.

El mantenimiento del estado redox en el intestino es esencial para una óptima absorción intestinal de  $Ca^{+2}$ . En este laboratorio se ha demostrado que niveles normales de glutatión (GSH) intracelular son importantes para mantener una absorción intestinal de  $Ca^{+2}$  apropiada.<sup>19,20,22,23</sup> Hemos demostrado también que, en ratas diabéticas tratadas con STZ, el estrés oxidativo intestinal se produce a principios de las etapas de desarrollo de la D.m.1, lo que conduce a la inhibición de la absorción intestinal de  $Ca^{+2}$ . Ciertos mecanismos adaptativos dependientes del tiempo provocan un incremento de expresión de las proteínas implicadas tanto en la vía transcelular como paracelular de transporte del catión, normalizándose así la absorción intestinal de  $Ca^{+2}$  y el estado redox duodenal. La inyección de insulina restaura el estado redox y la absorción intestinal de  $Ca^{+2}$  sin mejorar los niveles séricos de metabolitos de la vitamina D.<sup>24</sup>

A lo largo del intestino, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) es más abundante en células del epitelio intestinal que en otros tipos celulares (macrófagos, células del músculo liso y fibroblastos).<sup>25</sup> En el duodeno, iNOS es una enzima clave para la producción de óxido nítrico (NO) y desempeña un papel impor-



tante en la integridad de la mucosa intestinal bajo condiciones fisiológicas.<sup>26</sup> En pacientes y ratas diabéticas se encuentra afectada la producción de NO, el cual media la respuesta inmune y los procesos inflamatorios.<sup>27</sup> Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la vía paracelular del transporte del  $\text{Ca}^{+2}$  y analizar si la D.m.1 genera estrés nitrosativo duodenal en ratas diabéticas inducidas con STZ después de 30 días de administración.

## Materiales y métodos

### Animales

Se emplearon ratas Wistar machos de 2 meses de edad, las cuales fueron alimentadas con una dieta comercial normal (Gepsa ratón-rata, Pilar, Buenos Aires, Argentina). Los animales se criaron durante 8 semanas en un bioterio con luz artificial a 25 °C y con un fotoperíodo de luz-oscuridad de 12 horas, respectivamente. Alcanzados los 2 meses de edad, se dividieron aleatoriamente en dos grupos: 1) controles y 2) tratados con una inyección única intraperitoneal de STZ en una dosis de 60 mg/kg de peso corporal, disuelta en *buffer* citrato 100 mM (pH 4,5). Estos grupos se estudiaron 30 días después del tratamiento. Los controles se inyectaron solo con vehículo. Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y el duodeno se extrajo inmediatamente, el cual se lavó con solución fisiológica fría y se utilizó para todas las determinaciones. Los protocolos experimentales siguieron la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Se hicieron todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados y su sufrimiento.

### Reactivos

Todos los reactivos químicos fueron adquiridos en Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, EE.UU.), a menos que se indique lo contrario.

### Mediciones séricas

Se determinó la glucosa en suero (glicemia enzimática AA). Se consideraron diabéticas aquellas ratas con glucemias superiores a 250 mg/dl.<sup>28</sup> Se midió calcemia (Ca-Color AA), fosfatemia (fosfatemia UV-AA) y creatinina usando los kits comerciales del Wiener Lab (Rosario, Argentina), hemoglobina glicosilada ( $\text{HbA}_{1c}$ ) (Glycohemoglobin Reagent®, Teco Diag., CA, USA) e insulina (Rat insulin®, Millipore, MA, EE.UU.).

### Expresión génica a través de PCR en tiempo real

El aislamiento de ARN total de mucosa intestinal se realizó con el reactivo TRIZOL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). La concentración de ARN y la pureza se determinaron por espectrofotometría. La amplificación cuantitativa se realizó en un termociclador (Stratagene termociclador PCR cuantitativa Mx 3000P®, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.). La mezcla de amplificación (volumen total: 25  $\mu\text{l}$ ) contenía: 0,5  $\mu\text{g}$  de ARN, 0,3  $\mu\text{mol/l}$  de cada cebador, 0,4  $\mu\text{l}$  de colorante de referencia, 1  $\mu\text{l}$  de transcriptasa inversa (RT)/RNasa y 12,5  $\mu\text{l}$  de 2X Brilliant IISYBR QRT-PCR® (Stratagene, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.). Se utilizó el siguiente protocolo: 1 ciclo a 50 °C durante 30 min; 1 ciclo a 95 °C durante 10 min; 40 ciclos de la siguiente manera: desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 60 s y extensión a 72 °C durante 30 s. La cantidad de productos de PCR formados en cada ciclo se evaluó sobre la base de la fluorescencia SYBR Green. Las lecturas de emisiones ciclo a ciclo de fluorescencia fueron controladas y cuantificadas por el método de DDCT.<sup>29</sup> La cantidad de números de copias de ARNm de cada gen se normalizó con respecto a la de *gadh*. Las secuencias de los cebadores de los genes estudiados se enumeran a continuación: *claudin 2* FW 5' – GCTGCTGAGGGTAGAAT-

GA – 3' y RV 5' – GCTCGCTTGATAAGTGTCC – 3' (107 pb); *claudin 12* FW 5' – CCTTCA-AGTCTTCGGTGCC – 3' y RV 5' – CAGGAG-GATGGGAGTACAG – 3' (100 pb); *gapdh* FW 5' – AGTCTACTGGCGTCTTCAC – 3' y RV 5' – TCATATTTCTCGTGGTTCAC – 3' (133 pb).

### **Expresión proteica por Western blot**

Se determinaron las expresiones proteicas de CLDN 2, CLDN 12 e iNOS. Los homogeneizados de mucosa duodenal de rata se prepararon con *buffer* de lisis RIPA (SDS 1%, Tritón X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, PMSF 1mM y NaF 1 mM). La suspensión se centrifugó. Después, las proteínas (100 µg) se desnaturalizaron durante 5 min a 95 °C y se separaron mediante electroforesis en minigeles de SDS-poliacrilamida al 12% (P/V).<sup>30</sup> Los geles que contienen las proteínas separadas se sumergieron en el tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mmol/l, glicina 192 mmol/l, SDS 0,05% P/V y metanol 20% V/V).<sup>31</sup> Las membranas de nitrocelulosa (0,45 µm) se bloquearon durante 1,5 h con 2% P/V de leche sin grasa en solución Tris-salina 0,5 mol/l y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario específico en dilución 1:1000 en cada caso. Los anticuerpos fueron: anti-CLDN 2 anticuerpo monoclonal (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EE.UU.), anti-CLDN 12 anticuerpo policlonal (H-49® Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.), anti-NOS2 anticuerpo policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.). Después de tres lavados, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado a 37 °C durante 1 hora. A continuación, estas se lavaron tres veces y se añadió la estreptavidina peroxidasa-conjugada (Histostain-SP kit®, Invitrogen CA, EE.UU.). La detección se realizó usando 3,3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno. El anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (clon 71.1 GAPDH-Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), se utilizó para detectar GAPDH como un marcador para normalizar la expresión relativa de las

otras proteínas. Las intensidades de las bandas se cuantificaron usando un sistema de imágenes Capturer EC3®, software LaunchVisionworks con el fin de obtener la expresión relativa de las proteínas.

### **Cuantificación de los niveles de NO**

Se determinaron como el total de nitrato/nitrito utilizando el reactivo de Griess<sup>32</sup> con la modificación del reemplazo de ZnSO<sub>4</sub> para la precipitación de las proteínas del sobrenadante del homogeneizado.<sup>33</sup> La absorbancia se midió a 540 nm. Se realizó una curva estándar con nitrato de sodio (1-10 µM). Los datos se expresaron en µmol NO/mg de proteína.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza a una vía (ANOVA) seguido del test de Bonferroni para comparaciones múltiples *post hoc*. Se utilizó el software SPSS 22.0 como programa de análisis (SPSS Inc. Chicago, ILL, EE.UU.). Las diferencias se consideraron significativas con un valor de  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

### **Características generales del modelo de D.m. por inducción con STZ**

En la Tabla 1 pueden observarse las características de los animales con D.m. 1 experimental después de 30 días de la administración de STZ, en comparación con las de las ratas controles. Como era de esperarse, la glucemia aumentó alrededor de 3 veces en las ratas diabéticas con respecto a la de las ratas controles, mientras que la insulina disminuyó notoriamente en las ratas diabéticas. Los valores de HbA<sub>1c</sub> fueron un 50% mayor en las ratas diabéticas que en las controles. Las ratas diabéticas presentaron glucosuria. Los niveles de calcemia, fosfatemia y creatinina resultaron similares en ambos grupos.



**Tabla 1.** Valores en suero de ratas controles y diabéticas de 30 días posinducción.

	Control	D.m.1
<b>Glucemia (mg/dl)</b>	145 ± 13	453 ± 12*
<b>Insulina (ng/ml)</b>	1,73 ± 0,21	0,30 ± 0,11*
<b>HbA<sub>1c</sub> (%)</b>	8,90 ± 0,50	11,85 ± 0,81 <sup>§</sup>
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,73 ± 0,20	0,72 ± 0,18
<b>Calcemia (mg/dl)</b>	9,50 ± 0,03	9,45 ± 0,02
<b>Fosfatemia (mg/dl)</b>	5,73 ± 0,20	5,80 ± 0,15

Los datos representan las medias±EE. C: control; D.m.1: ratas con diabetes tipo 1. \*p<0,001 vs. controles; <sup>§</sup>p<0,01 vs. controles. Glucemia, creatinina, calcemia, fosfatemia y HbA<sub>1c</sub>: n=12 para cada grupo experimental; insulina: n=4.

#### **Efecto de la D.m.1 sobre la expresión duodenal de claudina 2 y 12**

Se analizaron las expresiones génicas de *cldn 2* y *12*, proteínas presumiblemente implicadas en la vía paracelular de la absorción intestinal de Ca<sup>+2</sup>, en ambos grupos experimentales. Los resultados revelaron que la expresión génica de *cldn 2* en las ratas diabéticas fue más del doble en comparación con la de los controles, mientras que la expresión génica de *cldn 12* fue similar en ambos grupos. La expresión proteica de CLDN 2 y CLDN 12, aumentó a los 30 días posinducción (Tabla 2).

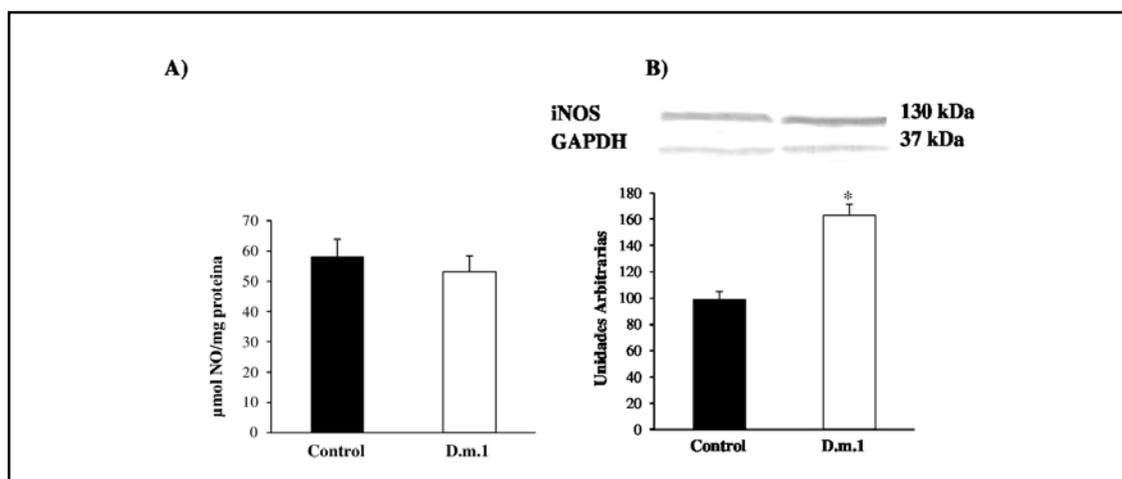
#### **Estrés nitrosativo en mucosa duodenal de ratas diabéticas**

Con el propósito de estudiar si el estrés nitrosativo estaba involucrado en las alteraciones observadas en la D.m.1, se determinó en mucosa duodenal el contenido de NO y la expresión proteica de óxido iNOS. El contenido de NO fue similar en ambos grupos. Sin embargo, la expresión proteica de iNOS fue mayor en las ratas diabéticas en comparación con la de las ratas controles (Figura 1).

**Tabla 2.** Expresión génica y proteica de claudina 2 y 12 de ratas controles y diabéticas de 30 días posinducción.

	<i>cldn 2</i>	<i>cldn 12</i>	CLDN 2	CLDN 12
<b>Control</b>	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,10	80,3 ± 4,0	74,0 ± 3,9
<b>D.m.1</b>	2,55 ± 0,43*	0,93 ± 0,08	155,0 ± 4,0*	163,0 ± 8,5*

Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de ARNm de *cldn 2* y *12* normalizados con respecto al gen *gapdh* (unidades arbitrarias) y expresión proteica por Western blots, presentados como porcentaje de la expresión de GAPDH (unidades arbitrarias). Los datos representan las medias±EE. n=6 para cada grupo experimental. \*p < 0,001 vs. control. D.m.1: ratas con diabetes tipo 1.



**Figura 1. A.** Contenido de óxido nítrico (NO) en mucosa duodenal de ratas control y diabéticas 30 días posinducción. **B.** Análisis densitométrico cuantitativo de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en ratas control y diabéticas 30 días posinducción. Los datos representan medias  $\pm$  EE (n=6). \*p<0,001 vs. control.

## Discusión

Varios estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la D.m.1 provocada por STZ se acompaña de inhibición de la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  debido, al menos en parte, a la generación de estrés oxidativo, como lo revela la disminución del contenido de glutatión intestinal, el aumento de anión superóxido y la mayor actividad de catalasa. Esta inhibición es transitoria, afecta la vía transcelular y desencadena una adaptación fisiológica tendiente a normalizar el proceso de absorción del  $\text{Ca}^{+2}$  y el estado redox del enterocito.<sup>24</sup>

El mecanismo molecular de la vía paracelular de la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  no está totalmente dilucidado.<sup>34</sup> Aparentemente CLDN 2 y 12 participarían en la formación de poros para el paso del catión.<sup>35</sup> Nuestros resultados demuestran que las expresiones proteicas de estas proteínas aumentan en las ratas diabéticas en comparación con las de las ratas control. También la expresión génica de *cldn 2* en las ratas diabéticas aumenta. Dado que hemos demostrado previamente que las proteínas involucradas en la vía transcelular de la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$

aumentan su expresión como un mecanismo compensatorio ante la disminución de la absorción del catión<sup>24</sup>, es probable que el aumento de las proteínas de la vía transcelular no sea suficiente para restaurar la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  y, por lo tanto, la vía paracelular es inducida.

La hiperglucemia produce incremento de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS/RNS), y es una de las posibles causas de las complicaciones crónicas asociadas a la diabetes.<sup>36,37</sup> Los cambios redox inducidos por la hiperglucemia, el daño del ADN, la oxidación de proteínas y la peroxidación de lípidos alteran las funciones celulares por medio de la activación de vías clave de traducción de señales.<sup>38,39</sup> En la diabetes también se produce una acentuada expresión de citoquinas proinflamatorias como consecuencia del aumento de los niveles de ROS/RNS, lo cual se acompaña con incremento de las actividades de Akt, ERK1/2 y un aumento de la acumulación de 8-OHdG en el ADN.<sup>38</sup>

Kuloglu y col.<sup>40</sup> demostraron un aumento en la expresión de iNOS en riñón de ratas diabéticas en relación directa con la severidad de la enfermedad. Otros autores encontraron



resultados similares en músculo liso vascular, aunque la posible causa y consecuencia de la inducción de iNOS permanece aún en discusión.<sup>41</sup> Nosotros observamos un incremento en la expresión proteica de iNOS en mucosa duodenal, aunque sin modificaciones en la producción de NO en ratas diabéticas en comparación con la de las ratas controles. La cantidad de NO producido por acción de iNOS depende de muchos factores, entre ellos la disponibilidad de sustrato y de cofactores. La arginina se puede transformar en sustrato limitante en situaciones de enfermedad; además la arginasa puede competir con la iNOS por la arginina<sup>42</sup>; esto podría ser tal vez una de las causas de falta de cambios en

los niveles de NO observados a los 30 días después de la inducción con STZ.

### Agradecimientos

Este trabajo se realizó, en parte, con fondos del Subsidio AAOMM-Convocatoria 2014 para Investigadores Jóvenes (Directora: Dra. María Angélica Rivoira).

### Conflicto de interés

Los autores manifiestan no tener conflicto de interés.

Recibido: julio 2016.

Aceptado: agosto 2016.

### Referencias

1. Wongdee K, Charoenphandhu N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes* 2011; 2:41-8.
2. Soto N, Pruzzo R, Eyzaguirre F, et al. Bone mass and sex steroids in postmenarcheal adolescents and adult women with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2011; 25:19-24.
3. Jackuliak P, Payer J. Osteoporosis, fractures, and diabetes. *Int J Endocrinol* 2014; 2014:820615.
4. Loureiro MB, Ururahy MA, Freire-Neto FP, et al. Low bone mineral density is associated to poor glycemic control and increased OPG expression in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 103:452-7.
5. Pérez AV, Picotto G, Carpentieri AR, Rivoira MA, Peralta López ME, Tolosa de Talamoni NG. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. *Digestion* 2008; 77: 22-34.
6. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, et al. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca<sup>2+</sup> absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 2008; 19:1912-21.
7. Wood RJ, Allen LH, Bronner F. Regulation of calcium metabolism in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol* 1984; 247:120-3.
8. Raskin P, Stevenson MR, Barilla DE, Pak CY. The hypercalciuria of diabetes mellitus: its amelioration with insulin. *Clin Endocrinol* 1978; 9:329-35.
9. Svoren BM, Volkening LK, Wood JR, Laffel LM. Significant vitamin D deficiency in youth with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr* 2009; 154:132-4.
10. Zhao J, Nakaguchi T, Gregersen H. Biomechanical and histomorphometric colon remodelling in STZ-induced diabetic rats. *Dig Dis Sci* 2009; 54:1636-42.

11. Schneider LE, Schedl HP. Diabetes and intestinal calcium absorption in the rat. *Am J Physiol* 1972; 223:1319-23.
12. Schneider LE, Hargis GK, Schedl HP, Williams GA. Parathyroid function in the alloxan diabetic rat. *Endocrinology* 1974; 95:749-52.
13. Nyomba BL, Verhaeghe J, Thomasset M, Lissens W, Bouillon R. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. I. Abnormal vitamin D metabolism and impaired active intestinal calcium absorption. *Endocrinology* 1989; 124:565-72.
14. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010; 107:1058-70.
15. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011; 50:567-75.
16. Bhor VM, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:89-97.
17. Shirpoor A, Ansari MH, Salami S, Pakdel FG, Rasmi Y. Effect of vitamin E on oxidative stress status in small intestine of diabetic rat. *World J Gastroenterol* 2007; 13:4340-4.
18. Rajani Kanth V, Uma Maheswara Reddy P, Raju TN. Attenuation of streptozotocin-induced oxidative stress in hepatic and intestinal tissues of Wistar rat by methanolic-garlic extract. *Acta Diabetol* 2008; 45:243-51.
19. Marchionatti AM, Perez AV, Diaz de Barboza GE, Pereira BM, Tolosa de Talamoni NG. Mitochondrial dysfunction is responsible for the intestinal calcium absorption inhibition induced by menadione. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780:101-7.
20. Rodríguez V, Rivoira M, Marchionatti A, Pérez A, Tolosa de Talamoni N. Ursodeoxycholic and deoxycholic acids: A good and a bad bile acid for intestinal calcium absorption. *Arch Biochem Biophys* 2013; 540:19-25.
21. Lee CT, Lien YH, Lai LW, Chen JB, Lin CR, Chen HC. Increased renal calcium and magnesium transporter abundance in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Kidney Int* 2006; 69:1786-91.
22. Tolosa de Talamoni N, Marchionatti A, Baudino V, Alisio A. Glutathione plays a role in the chick intestinal calcium absorption. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1996; 115:127-32.
23. Rivoira MA, Marchionatti AM, Centeno VA, Diaz de Barboza GE, Peralta López ME, Tolosa de Talamoni NG. Sodium deoxycholate inhibits chick duodenal calcium absorption through oxidative stress and apoptosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2012; 162:397-405.
24. Rivoira M, Rodríguez V, López MP, Tolosa de Talamoni NG. Time dependent changes in the intestinal Ca<sup>2+</sup> absorption in rats with type I diabetes mellitus are associated with alterations in the intestinal redox state. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852:386-94.
25. Feng A, Zhou G, Yuan X, Huang X, Zhang Z, Zhang T. Inhibitory effect of baicalin on iNOS and NO expression in intestinal mucosa of rats with acute endotoxemia. *PLoS One* 2013; 8:e80997.
26. Alican I, Kubes P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol* 1996; 270:G225-37.
27. Maciel FR, Punaro GR, Rodrigues AM, et al. Immunomodulation and nitric oxide restoration by a probiotic and its activity in gut and peritoneal macrophages in diabetic rats. *Clin Nutr* 2015; doi: 10.1016/j.clnu.2015.07.018.
28. Amaral S, Mota P, Lacerda B, Alves M, Pereira M, Oliveira P, Ramalho-Santos J. Testicular mitochondrial alterations in untreated streptozotocin-induced diabetic rat. *Mitochondrion* 2009; 9:41-50.
29. Kenneth JL, Schmittgen TP. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* 2001; 25:402-8.
30. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
31. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide



- gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad. Sci U. S. A.* 1979; 76:4350-4.
32. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5:62-71.
  33. Arab HH, Salama SA, Eid AH, Omar HA, Arafa SA, Maghrabi IA. Camel's milk ameliorates TNBS induced colitis in rats via down regulation of inflammatory cytokines and oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2014; 69:294-302.
  34. Fleet JC, Schoch RD. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2010; 47:181-95.
  35. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, et al. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent  $Ca^{2+}$  absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 2008; 19:1912-21.
  36. Kumar P, Swain MM, Pal A. Hyperglycemia-induced inflammation caused down-regulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in murine macrophages is mediated by oxidative-nitrosative stress-dependent pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; 73:82-98.
  37. Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone* 2009; 45:35-8.
  38. Kumar P, Rao GN, Pal BB, Pal A. Hyperglycemia-induced oxidative stress induces apoptosis by inhibiting PI3-kinase/ Akt and ERK1/2 MAPK mediated signaling pathway causing downregulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 53:302-19.
  39. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010; 107:1058-70.
  40. Kuloglu T, Aydin S. Immunohistochemical expressions of adropin and inducible nitric oxide synthase in renal tissues of rats with streptozotocin-induced experimental diabetes. *Biotech Histochem* 2014; 89:104-10.
  41. Douglas DT. Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief over view of the interplay between oxygen and nitric oxide. *Redox Biology* 2015; 5:225-33.

## ACTUALIZACIONES / Reviews

# GUÍAS PARA EL DIAGNÓSTICO, LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS INDUCIDA POR GLUCOCORTICOIDES EN EL ADULTO

Oswaldo Daniel Messina,<sup>1</sup> Luis Fernando Somma,<sup>2</sup> María Inés Tamborenea,<sup>3</sup> Graciela Edith Castelli,<sup>4</sup> Augusto Martín Riopedre,<sup>1</sup> Gustavo Lancioni,<sup>5</sup> María Silvia Larroude.<sup>6\*</sup>

Grupo de Estudio de la Sociedad Argentina de Osteoporosis (GE-OIC-SAO).

1. Servicio de Reumatología del Hospital Argerich. 2. Servicio de Reumatología del Hospital Municipal de Luján. 3. Centro de Urología de Buenos Aires. 4. Miembro del Departamento Médico de Pfizer. 5. Médico Reumatólogo miembro de la Sociedad Argentina de Reumatología. 6. Servicio de Reumatología del Hospital César Milstein.

## Resumen

La osteoporosis inducida por glucocorticoides (OIC) es la causa más común de osteoporosis secundaria. La pérdida ósea se produce en forma temprana, en los primeros meses siguientes a la introducción de los glucocorticoides (GC), dependiendo de la dosis diaria. La patogénesis es multifactorial y el principal efecto deletéreo es la inhibición de la formación ósea. Los GC inducen fracturas por fragilidad ósea, especialmente en la columna vertebral, y esto genera incapacidad funcional. En los últimos años se han publicado algunas guías internacionales elaboradas por consenso para la prevención y el tratamiento de la OIC. La Sociedad Argentina de Osteoporosis designó a un grupo de trabajo para elaborar una guía propia y actualizada para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la OIC (GE-OIC-SAO).

**Palabras clave:** osteoporosis, glucocorticoides, osteoporosis inducida por corticoides, fracturas por fragilidad.

## GUIDELINES FOR THE DIAGNOSIS, PREVENTION AND TREATMENT OF GLUCOCORTICOID-INDUCED OSTEOPOROSIS IN ADULTS

### Abstract

*Glucocorticoid-induced osteoporosis (GIO) is the most common cause of secondary osteoporosis. It occurs early, with rapid bone loss in the first few weeks after the initiation of the treatment, with a rate that is dependent mainly on the daily dose. While the pathogenesis is multifactorial, the highest inhibitory effect occurs on bone formation. Glucocorticoids induce fragility fractures, especially in spine, generating functional disability. In recent years, there have been some international guidelines developed by consensus for the prevention and treatment of GIO. The Argentinean Osteoporosis Society appointed a working group to prepare a national guide updating the diagnosis, prevention and treatment of GIO.*

**Keywords:** osteoporosis, glucocorticoids, glucocorticoid-induced osteoporosis, fragility fracture.

\* Correo electrónico: [mariasilvia.larroude@gmail.com](mailto:mariasilvia.larroude@gmail.com)



## Introducción

La osteoporosis inducida por corticoides (OIC) es la causa más común de osteoporosis (OP) secundaria y se asocia con un alto grado de deterioro estructural óseo, particularmente a nivel del hueso trabecular.<sup>1,2</sup>

Los glucocorticoides (GC) son ampliamente utilizados en enfermedades reumatólogicas, respiratorias, alérgicas, hematólogicas, neoplásicas y en el trasplante de órganos, por sus efectos antiinflamatorios e inmunosupresores; pero tienen alta probabilidad de ocasionar osteoporosis, por lo que es fundamental el diagnóstico temprano, la prevención y el tratamiento de esta enfermedad.<sup>1</sup>

La pérdida ósea es más acelerada durante los primeros meses de iniciado el tratamiento con GC; se estima en 10-20% en hueso trabecular durante los primeros 6 meses y continúa la merma a un ritmo del 2% por año, mientras que en hueso cortical la disminución es del 2-3% en el primer año, y se advierte un descenso más lento en los años siguientes.<sup>2</sup>

La prevalencia de uso de GC orales representa el 0,5 al 0,9% de la población (65% sexo femenino) y se incrementa al 2,7% en mujeres mayores de 50 años.<sup>2</sup>

No existe una dosis "segura" de GC ni hay acuerdo sobre cuál es el tiempo mínimo libre de efectos deletéreos para utilizarlos con certeza.

El riesgo de fracturas depende de la dosis de GC. El uso de prednisona 2,5 mg/día aumenta el riesgo relativo (RR) en 1.55, en dosis de 2,5-7,5 mg/día es 2.59 y en dosis mayores llega a 5.18.<sup>3</sup>

La densidad mineral ósea (DMO) en los pacientes que reciben GC no puede valorarse con los parámetros establecidos para los pacientes no usuarios de GC como la osteoporosis posmenopáusicas: a igual DMO, los pacientes con GC tienen mayor riesgo de fractura.<sup>3,4</sup>

Existen diferentes fármacos para el tra-

tamiento de la OIC, pero lo ideal es utilizar los GC en la menor dosis efectiva durante el menor tiempo posible y asociados a otras drogas que permitan disminuir su dosis de acuerdo con la patología de base.

Debido a la alta frecuencia en el uso de los GC y el aumento de la morbilidad y mortalidad, varias sociedades científicas del mundo han desarrollado guías para la prevención y tratamiento de este tipo de osteoporosis. Sin embargo no existe un consenso unificado.

El objetivo de la Sociedad Argentina de Osteoporosis a través de su grupo de estudio (GE-OIC-SAO) fue elaborar una guía práctica para el diagnóstico y el tratamiento de la OIC.

## Epidemiología

La OIC constituye la causa más frecuente de osteoporosis secundaria debido a su amplio uso en medicina. Las indicaciones más habituales de tratamiento con GC son las enfermedades musculoesqueléticas (67,1%), las pulmonares obstructivas (15,7%), las inflamatorias del intestino y el trasplante de órganos.<sup>5</sup>

Se estima que un 3% de la población adulta mundial y un 4,6% de las mujeres posmenopáusicas reciben GC en forma prolongada.<sup>6,7</sup>

Existe un riesgo aumentado y significativo de fractura en pacientes que reciben GC; esta afirmación se ha observado en múltiples estudios con dosis mínimas de 2,5 mg/día por vía oral de prednisona o sus equivalentes; se advierte un incremento de riesgo de fracturas  $\geq 5$  veces con dosis superiores a 7,5 mg/día en los primeros 3 a 6 meses de iniciado el tratamiento.<sup>8</sup> En pacientes que reciben 5 mg/día de GC, el riesgo aumenta 20% y en aquellos con 20 mg/día se incrementa al 60%. Algunos autores afirman que la dosis acumulativa también se correlaciona con el riesgo aumentado de fractura.<sup>8</sup>

Las fracturas vertebrales son las más frecuentes, tal vez por su mayor componente de tejido trabecular.<sup>5</sup>

Al evaluar otras variables predisponentes para desarrollar fracturas por fragilidad como edad, sexo y enfermedad de base, se halló que el RR de fractura fue independiente de estas variables.<sup>9</sup>

Un metanálisis que incluyó 7 investigaciones de cohortes mostró una clara asociación entre el uso previo de GC y el riesgo de fracturas. Se estimó un riesgo relativo de fractura de cadera de 4,42 (IC 95%: 1,26-15,49) a los 50 años y de 2,48 (1,58-3,89) a los 85 años.<sup>4</sup> Hay evidencias de que el riesgo aumentado de fractura disminuye después de un año de suspendido el tratamiento con GC.<sup>8,10</sup>

La DMO en pacientes que reciben GC en dosis de  $\geq 7,5$  mg/día de prednisona durante 3 meses es significativamente menor que la

DMO de los sujetos de igual edad y sexo. Se ha observado una disminución del 9,2% en columna lumbar; 11,5% en cadera y 2,2% en radio distal.<sup>5,11</sup> La pérdida ósea es mayor en el hueso trabecular que en el cortical.<sup>6</sup>

Se ha hallado también una correlación entre dosis acumulativa y disminución de la DMO en columna en varios estudios, aunque permanece en discusión el umbral de dosis que produce efecto negativo sobre el hueso.<sup>12</sup>

No existen datos concluyentes sobre los GC inhalados: algunos autores señalan que las dosis menores de 400  $\mu$ g/día de dipropionato de beclometasona o equivalente no presentan efectos adversos relevantes; sin embargo, dosis mayores de 800  $\mu$ g/día pueden producir cambios en la DMO.<sup>13</sup>

#### **CONCLUSIÓN:**

**Los pacientes tratados con una dosis  $\geq 5$  mg/día de prednisona o equivalentes, durante 3 meses o más tiempo, incrementan el riesgo de presentar fracturas con predominio vertebral.**

**Esta población requiere una evaluación clínica y es pasible de tratamientos para la prevención de OIC.**

#### **Fisiopatología de la osteoporosis inducida por corticoides**

La acción de los GC en el esqueleto tiene efectos directos sobre las células óseas, el metabolismo mineral y otros sistemas, los que a su vez interactúan con el hueso. La dosis y el tiempo del tratamiento con GC son los factores determinantes de esas alteraciones.<sup>1</sup>

Los GC inhiben la absorción intestinal de calcio (AIC) por diferentes mecanismos que son parcialmente independientes de la vitamina D; se ha descrito la presencia de factores postranscripcionales en el transporte del calcio a través de la mucosa intestinal y

de la membrana basolateral, que mejora con la restricción de sodio y el aporte de suplementos de calcio.<sup>14,15</sup>

La excreción urinaria de calcio de ayuno está aumentada en sujetos normales que reciben GC durante un breve período, antes de evidenciarse un aumento de hormona paratiroidea (PTH). Esto puede deberse a un brusco aumento en la carga filtrada de calcio, por rápida disminución de la formación ósea y reducción de la captación de calcio por el hueso recién formado o por un efecto directo de los GC en el riñón. El aumento de la calciuria en los pacientes que reciben GC en forma prolongada se atribuye a la movili-



zación esquelética del calcio y a la disminución de la reabsorción tubular, que ocurre a pesar de un aumento de los niveles de PTH constatado en algunos casos.<sup>16</sup>

La disminución de la AIC y el aumento de su excreción urinaria conducen a un balance cálcico negativo. Los GC inducen fosfaturia y disminución de la reabsorción tubular de fósforo (RTP).<sup>17,18</sup>

Si bien en algunos trabajos se asoció el uso de GC con un aumento de los niveles de PTH, esto no se ha observado en forma regular.<sup>19,20</sup>

Los niveles de 25(OH) vitamina D suelen ser normales. La administración a corto plazo de GC en sujetos normales ha mostrado incrementar los valores de 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Otros trabajos sobre el tratamiento a largo plazo con GC no encontraron dichos cambios.<sup>21</sup>

Los GC bloquean la secreción de hormona luteinizante (LH) en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), inhiben la acción de la hormona foliculoestimulante (FSH) y reducen la producción de esteroides sexuales tanto en mujeres como en varones, lo que determina un estado de hipogonadismo.<sup>22</sup>

Un efecto catabólico de los GC sobre el músculo incrementa el riesgo de caídas y contribuye al riesgo de fractura. La miopatía se produce por proteólisis de las miofibrillas, que está mediada por la activación de los lisosomas y las enzimas ubiquitín-proteasas.<sup>23</sup>

En el hueso, a nivel celular, los GC afectan a los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos. Los primeros estudios histomorfométricos mostraron que la disminución de la formación es la principal causa de pérdida de masa ósea. Hay una marcada disminución de la superficie osteoide, así como del índice de aposición mineral y del grosor de la trabécula. La cantidad total de hueso reemplazado en cada ciclo de remodelación está disminuida en un 30%.<sup>24</sup>

Los GC tienen efectos directos sobre los osteoblastos, inhiben el reclutamiento de los

precursores, disminuyen la replicación e incrementan su apoptosis, y acorta la vida media. Se observa baja producción del factor de crecimiento insulino-símil 1 (IGF-1) y de las proteínas transportadoras, de la prostaglandina E<sub>2</sub> y del factor transformador del crecimiento beta (TGF-β). Disminuye la síntesis de colágeno tipo I, la osteocalcina y la formación de las proteínas no colágenas.<sup>25-27</sup>

Los GC actúan modulando la síntesis y secreción de la PTH, de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D, de las prostaglandinas y de los factores de crecimiento del osteoblasto.<sup>22,26,27</sup>

La diferenciación de las células estromales a osteoblastos (y su maduración) está alterada y su diferenciación deriva hacia el linaje de los adipocitos. Los efectos anabólicos y catabólicos de los GC en hueso estarían en parte mediados por la regulación de la expresión de las proteínas del Wnt y sus inhibidores en osteoblastos maduros.<sup>28-31</sup>

La resorción ósea se ve afectada en forma temprana; se observa estimulación de la expresión del receptor de activación del ligando del factor NF-kb (RANKL) y del factor estimulante de colonias (CSF-1) con disminución de la expresión de la osteoprotegerina por el osteoblasto y las células estromales, lo que incrementaría la osteoclastogénesis.<sup>32,33</sup>

Los osteocitos son los mecanosensores y desempeñan un papel en la reparación del microdaño. Los GC afectan la función del osteocito e inducen la apoptosis generando una alteración de las propiedades biomecánicas del hueso.<sup>34</sup>

El número de osteocitos apoptóticos está aumentado debido a la activación de la caspasa 3, defecto que es acumulativo e irreparable.<sup>29</sup> Otros fenómenos asociados a la disfunción de este grupo de células es el aumento de la autofagia de los osteocitos y la disrupción de la red osteocitaria. Estos cambios podrían explicar el empeoramiento de las propiedades biomecánicas y la fortaleza ósea que se observa antes de la pérdida de la densidad mineral ósea.<sup>1,34-37</sup>

### **CONCLUSIÓN:**

**Los GC tienen efectos directos e indirectos sobre el esqueleto al ejercer su acción sobre las células osteoblásticas, osteoclasticas y osteocíticas y en múltiples sistemas: actúan sobre el eje gonadal, la absorción intestinal y la excreción urinaria de calcio y la musculatura. Estos efectos deletéreos incrementan la fragilidad ósea. Es de importancia clínica prevenir la rápida acción de los GC sobre el esqueleto en los primeros 3 a 6 meses de tratamiento.**

### **Clínica y diagnóstico**

La osteoporosis es un padecimiento “silencioso” que avanza sin producir síntomas hasta que ocurre una fractura. Las fracturas más frecuentes en la OIC son las vertebrales, que pueden manifestarse por dolor dorsolumbar agudo, intenso, que se exacerba con los movimientos y cambios de posición, o ser asintomáticas; por lo tanto, estos pacientes requieren un estudio diagnóstico completo para realizar el tratamiento adecuado.

El GE-OIC-SAO considera que todo paciente que inicie o reciba GC en dosis  $\geq 5$  mg/día por más de 3 meses deberá ser estudiado y se indicarán medidas preventivas o un oportuno tratamiento. Existen dos situaciones de intervención:

1. Pacientes que inician un tratamiento con GC (prevención primaria).
2. Pacientes que en el momento de la consulta ya están recibiendo GC (prevención secundaria).

Se sugiere el siguiente protocolo de estudio:

#### **1- Historia clínica completa**

Consignar los datos habituales con especial atención en los siguientes ítems:

- Enfermedad que motivó el uso de los GC, el tiempo y las dosis utilizadas.
- Tratamientos que recibe en la actualidad.
- Valoración de los factores de riesgo para la osteoporosis: bajo peso, historia parental de fractura de cadera, tabaquismo, al-

coholismo, uso de altas dosis de GC, dosis acumulativas de GC, uso de pulsos de GC intravenosos, disminución de la densidad mineral ósea que exceda el cambio mínimo significativo.<sup>38-40</sup>

- Examen físico completo que incluya el peso y la talla.
- Considerar el sexo y la edad de los pacientes y categorizar en mujeres premenopáusicas (por la probabilidad de embarazo) o posmenopáusicas y varones jóvenes o adultos mayores (edad  $>$  o  $<$  de 50 años).

#### **2- Laboratorio**

Se solicitarán análisis clínicos generales y del metabolismo óseo y fosfocálcico: calcio, fósforo y creatinina en sangre y orina de 24 horas, niveles de 25(OH) vitamina D, un marcador de formación ósea (fosfatasa alcalina total e isoforma ósea) y uno de resorción ósea como el telopéptido C (CTX) o la desoxipiridinolina urinaria (D pyr), determinación de PTH sérica y de LH y FSH, estradiol (mujeres premenopáusicas y perimenopáusicas) y testosterona ante la posibilidad de hipogonadismo, hormona estimulante tiroidea (TSH), eritrosedimentación (ERS) y proteinograma.

Ante la sospecha de causas secundarias de OP como enfermedad celíaca, artritis reumatoide, hipogonadismos, etc., solicitar el laboratorio correspondiente. Estas pruebas deben repetirse por lo menos cada 6 meses o de acuerdo con el criterio clínico durante el periodo de la terapia esteroidea.<sup>38,39</sup>



### 3- Radiología

Se realizarán radiografías de columna dorsal y lumbar anteroposterior y lateral con foco en D7 y L3, respectivamente. Se evaluará la presencia de fracturas según el método semi-cuantitativo de Genant mediante la medición de la altura vertebral en el sector anterior, medio o posterior. Se considera fractura de grado I o leve cuando se constata una reducción del 20 al 25%, grado II o moderada, ante un descenso del 25 al 40% y grado III o severa cuando se verifica más del 40% de disminución de altura del cuerpo vertebral en alguno de sus diámetros.

También puede utilizarse la medición de fractura vertebral por morfometría mediante la densitometría ósea, método conocido como *vertebral fracture assessment (VFA)*.

En OIC, las fracturas más frecuentes son las dorsales inferiores, lumbares altas, radio distal y fémur proximal.<sup>39,40</sup>

### 4- Densitometría por absorciometría dual de rayos X

Los corticoides afectan la calidad ósea más allá de su efecto sobre la densidad ósea. Los umbrales de T-score y Z-score para DMO no han sido establecidos para los pacientes que reciben GC (opinión de expertos).<sup>38,40,41</sup>

Los valores de corte determinados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para OP posmenopáusica no se aplican en la OIC en razón de los cambios estructurales que los GC inducen rápidamente sobre la microarquitectura ósea y que son independientes de la DMO.<sup>2,42</sup>

La DMO de la columna es un predictor significativo de nuevas fracturas en pacientes con GC; por cada reducción del T-score, el riesgo relativo de fracturas es del 1.85 (95% CI: 1,06-3,21).<sup>41</sup>

Existen diferentes posturas en distintas sociedades científicas sobre la utilización de la densitometría y el valor de corte de T-score y Z-score empleado para considerar el tratamiento de la OIC. Algunas sociedades científicas

como la *International Osteoporosis Foundation (IOF)* y la *European Calcified Tissue Society (ECTS)* consideran como punto de corte un T-score de  $\leq -1,5$  o la utilización de la herramienta de cálculo de fractura FRAX. Otras entidades como la *American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR)* no contempla el valor de T-score en mujeres posmenopáusicas y varones  $> 50$  años, pero sí reconoce la importancia del Z-score  $\leq -2$  como alerta para indicar tratamiento en mujeres premenopáusicas y varones  $< 50$  años, y también llama la atención sobre una importante disminución de la DMO relacionada con el uso de GC. Otras sociedades como el *American College of Rheumatology (ACR)* no consideran importante la DMO para la intervención (Consenso 2010).<sup>39-44</sup>

No está pautado cada cuánto tiempo repetir la medición de la DMO en los pacientes que reciben dosis elevadas de GC (1 mg/kg/día), en pulsos o luego de trasplante de órganos.

### 5- Trabecular bone score (TBS)

El TBS es una nueva técnica basada en la medición de texturas de niveles de gris (píxeles) en la columna lumbar mediante las imágenes de DXA; valora la microarquitectura ósea. Un valor bajo de TBS se asocia con aumento de fracturas independientemente de los factores de riesgo y la DMO. Existen algunos reportes acerca de esta nueva herramienta en OIC. Pero se requieren más estudios para considerar su uso en la decisión terapéutica de pacientes en tratamiento con GC.<sup>44</sup>

### 6- FRAX: midiendo el riesgo de fractura

Es una herramienta desarrollada por la OMS basándose en factores de riesgo para osteoporosis a fin de calcular la probabilidad de riesgo absoluto de fractura a 10 años.<sup>45</sup>

El FRAX debe utilizarse en pacientes posmenopáusicas y hombres  $> 50$  años, pero no es apropiado para mujeres premenopáusicas y hombres  $< 50$  años.<sup>42</sup>

El FRAX para OIC se divide de acuerdo con el riesgo de fractura osteoporótica mayor en:<sup>40,42,45</sup>

- Bajo riesgo de fractura: menos del 10%.
- Medio riesgo de fractura: entre el 10 y 20%.
- Alto riesgo de fractura: mayor del 20%.

**Limitaciones del FRAX:** el tratamiento con GC es ingresado como una variable dicotómica y la dosis media capturada por el FRAX es de 2,5 a 7,5 mg/día de prednisona o sus equivalentes; por lo tanto, la probabili-

dad de fractura está subestimada con dosis mayores de 7,5 mg/día y sobrestimada con valores menores de 2,5 mg/día.

El FRAX no especifica la dosis o duración del tratamiento con GC, utiliza solamente la DMO de cadera, por lo tanto podría subestimar el riesgo de fractura vertebral.<sup>40-48</sup>

Para remediar algunas de estas limitaciones, el cálculo del FRAX en pacientes en tratamiento con GC se debe ajustar por un índice de acuerdo con la dosis utilizada (Tabla 1).<sup>47</sup>

**Tabla 1.** Ajuste del riesgo de fractura medido por FRAX en mujeres posmenopáusicas y hombres mayores de 50 años, de acuerdo con la dosis de corticoides (Modificado de Kanis y col., ref. 47).

Tipo de riesgo	Dosis equivalente prednisona (mg/día)	Ajuste del riesgo medido por FRAX
<b>Riesgo absoluto de fractura de cadera</b>	< 2,5	35% menos
	2,5-7,5	No ajuste
	> 7,5	20% más
<b>Riesgo absoluto de fractura mayor por fragilidad</b>	< 2,5	20% menos
	2,5-7,5	No ajuste
	> 7,5	15% más

Las guías ACR en el año 2010 recomiendan el uso de FRAX para pacientes posmenopáusicas y hombres > 50 años, valorar la DMO de acuerdo con los factores de riesgo, mientras que la IOF y la ECTS proponen valorar la DMO y el FRAX según las normativas de cada país.<sup>40,42</sup>

El GE-OIC-SAO considera útil la medición de la DMO. Recomienda intervenir con medidas terapéuticas en mujeres posmenopáusicas y hombres > de 50 años con un T-score  $\leq -1,5$  y en mujeres premenopáusicas

y varones < 50 años con un Z-score  $\leq -2$ . Además reconoce la importancia del descenso de masa ósea. Aconseja una segunda medición de DMO a los 6 meses de iniciado el tratamiento y posteriormente, cada 12 meses.

El FRAX es un auxiliar muy valioso que, adaptado a las dosis de GC, permite establecer un riesgo absoluto a 10 años de fracturas mayores y de cadera, y es útil para determinar criterios de intervención terapéutica.



#### RECOMENDACIÓN:

En todos los pacientes que inician o están tratados con GC en dosis  $\geq 5$  mg día de prednisona o sus equivalentes por más de 3 meses se recomienda:

- Realizar la historia clínica completa que incluya los factores de riesgo de fractura.
- Solicitar el laboratorio general y específico óseo, cada 6 meses y radiografías de columna dorsal y lumbar de perfil para valorar las fracturas vertebrales una vez por año.
- Medir la DMO por DXA, considerando un umbral de intervención terapéutica al T-score de  $\leq -1,5$  en mujeres posmenopáusicas y hombres  $> 50$  años y al Z-score  $\leq -2$  en mujeres premenopáusicas y hombres  $< 50$  años una vez por año.
- Utilizar el cálculo de la herramienta FRAX en pacientes posmenopáusicas y hombres mayores de 50 años.

#### Tratamiento

Los GC son muy utilizados para diversas patologías, en dosis bajas asociados a otros inmunosupresores o en dosis muy elevadas para manejar situaciones de riesgo de vida del paciente (vasculitis, nefropatías, neumonitis o lupus, etc.).

Las dosis y regímenes tienen efectos terapéuticos mediados por acciones genómicas y no genómicas ejercidos a través de receptores citosólicos de GC o membranas biológicas; el mecanismo de acción deletéreo se genera de acuerdo con el porcentaje inhibitorio de los receptores de los GC y están implicados en los efectos adversos, pero existe una gran variación interindividual. En el año 2002, el grupo de trabajo *The European League Against Rheumatism* consensuó la terminología de dosis de GC basado en su mecanismo de acción genómico y no genómico y los posibles efectos adversos en:

- Dosis baja  $\leq 7,5$  mg de GC vía oral diarios (prednisona o sus equivalentes), porque esta dosis ocupa menos del 50% de receptores de GC.
- Dosis media:  $> 7,5$  mg de GC vía oral diarios pero  $< 30$  mg diarios; esta dosis ocupa más del 50% de receptores pero menos del 100%.
- Dosis alta:  $> 30$  mg de GC vía oral dia-

rios pero  $< 100$  mg de GC diarios; esta dosis satura los receptores de GC en forma dosis-dependiente.

- Dosis muy altas:  $> 100$  mg diarios de GC con una saturación del 100% de receptores.
- Pulsos de GC dosis  $\geq 250$  mg de GC diarios por uno o pocos días.<sup>49</sup>

Sin embargo, el GE-OIC-SAO propone indicar medidas terapéuticas con dosis de 5 mg/día de prednisona o equivalentes teniendo en cuenta que con esas dosis se incrementa el riesgo de fractura en un 20%.<sup>3,8</sup>

Considera de importancia que los médicos informen a los pacientes sobre los eventos adversos de los GC para prevenir sus complicaciones a nivel óseo cuando se utilizan dosis  $\geq 5$  mg diarios por vía oral.<sup>5,8,39,40,48,50</sup>

#### Tratamiento farmacológico

En las siguientes páginas desarrollaremos las evidencias sobre los distintos fármacos evaluados en estudios destinados al tratamiento o prevención de OIC y los criterios de intervención presentados por otras sociedades científicas así como nuestra opinión para los pacientes que se encuentran en tratamiento con GC.

#### Calcio y vitamina D

El tratamiento con calcio y vitamina D (VD) combinados son eficaces para disminuir la

pérdida ósea en pacientes usuarios de GC comparado con el tratamiento exclusivo de calcio o placebo. Los estudios señalan un efecto positivo sobre la DMO (3,2%), pero no se ha demostrado que se reduzca el riesgo de fractura en OIC.<sup>39, 48, 50</sup>

No existe evidencia sobre la ventaja del uso de calcitriol o alfacalcidol en vez de la vitamina D<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>. Todas las guías internacionales reconocen la necesidad de una adecuada suplementación de calcio y de vitamina D.

El *Institute of Medicine* (EE.UU.) recomienda el uso de calcio en dosis de 1200 a 1500 mg de calcio elemental por día, preferentemente con la dieta; si es necesario, mediante suplementos. En pacientes tratados con inhibidores de la bomba de protones es preferible utilizar citrato de calcio.<sup>39,42,48,50</sup>

En relación con las dosis de vitamina D se recomiendan 800 a 1000 UI por día. Los pacientes deben tener un adecuado nivel de VD  $\geq$  30 ng/ml. Para aquellos con niveles  $\leq$  30 ng/ml se recomiendan dosis mayores hasta alcanzar los niveles deseados e indicar las dosis de mantenimiento sugeridas.<sup>39,42,48,50,51</sup>

## **Drogas antiresortivas**

### **1- Bisfosfonatos (BF)**

Todas las guías publicadas recomiendan el uso de BF como drogas de primera elección y algunas hacen especial mención a su uso en mujeres premenopáusicas y el riesgo potencial de trastornos fetales durante el embarazo.

Sin embargo, no hay una evidencia concreta de que los tratamientos con BF para OIC tengan igual respuesta biológica que en la osteoporosis posmenopáusica (OPM). La alta prevalencia de comorbilidades puede influenciar la eficacia terapéutica, generando una inadecuada respuesta al tratamiento para la osteoporosis.

La aprobación de los fármacos para OIC se basa en estudios controlados contra placebo (etidronato, alendronato, y risedronato vs. placebo) o de no inferioridad con BF (zole-

dronato vs. risedronato, teriparatida vs. alendronato, teriparatida asociada a estrógenos vs. estrógenos, teriparatida vs. risedronato) en dosis y regímenes que han sido eficaces para disminuir el riesgo de fractura en la OPM. El objetivo primario de estos estudios en OIC ha sido el incremento de la DMO, pero no el riesgo de fractura.<sup>48</sup>

Estos datos no son extrapolables a las mujeres premenopáusicas, cuyo riesgo de fractura es mucho menor; los datos sobre prevención de fracturas no están disponibles.<sup>46</sup>

Existe poca información sobre el tratamiento de OIC en hombres. Dos estudios proveen datos alentadores sobre el uso de zoledronato, risedronato y teriparatida en esta población.<sup>48,50</sup>

En la mayoría de las investigaciones, la población de mujeres posmenopáusicas predomina en relación con la de los hombres y las mujeres premenopáusicas.

Los BF han sido evaluados y se consideran de primera elección para la mayoría de los pacientes. El alendronato, el risedronato y el zoledronato han sido aprobados por organismos regulatorios como la *Food and Drug Administration* (FDA) y por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para el tratamiento de OIC, y el risedronato y el zoledronato para la prevención.<sup>25,46,48,50</sup> Estas drogas han demostrado reducir la pérdida ósea en la columna y la cadera, pero no fueron diseñadas para evaluar el riesgo de fracturas. Sin embargo, en el análisis de subgrupos, se observó la reducción del riesgo de fractura vertebral (alendronato y risedronato).<sup>39,48,50</sup> La disminución de fracturas no vertebrales, entre ellas la fractura de cadera, no ha sido demostrada. La mayoría de los estudios de OIC tienen corta duración: de 12 a 24 meses.<sup>24,48,50</sup> (Tabla 2).

En un estudio *post hoc* realizado por Roux y col. se evaluó a mujeres premenopáusicas y se demostró que el zoledronato aumentó la DMO en cadera en forma significativa comparado con el risedronato.<sup>52</sup>



**Tabla 2.** Bisfosfonatos y teriparatida en pacientes con OIC. Efectos sobre la DMO y fracturas incidentes (Adaptado de Rizzoli y col., ref. 50).

Droga	Autor	n sexo	Indicación	Duración	Resultado
Alendronato versus Placebo	Saag 1998	477 ♂ y ♀	Prevención y tratamiento	12 meses	Aumentó la DMO en columna y previno la pérdida ósea en cadera. Tendencia a reducir fracturas.
Alendronato versus Placebo	Adachi 2001	208 ♀ y ♂	Prevención y tratamiento	24 meses	Aumentó la DMO en columna y previno la pérdida ósea en cadera. Redujo incidencia de fracturas vertebrales.
Risedronato versus Placebo	Cohen 1999	224 ♂ y ♀	Prevención	12 meses	Previene la pérdida de la DMO en columna y cadera. Tendencia a reducción de incidencia de fractura.
Risedronato versus Placebo	Reid 2000	290 ♀ y ♂	Tratamiento	12 meses	Incrementa la DMO en columna y cadera. Tendencia a reducción de incidencia de fractura.
Risedronato versus Placebo	Wallach 2000	518 ♂ y ♀	Prevención y tratamiento	12 meses	Previene la pérdida de la DMO en columna y cadera. Reducción de incidencia de fractura vertebral.
Zoledronato versus Risedronato	Reid 2000	545 ♀ y ♂	Tratamiento	12 meses	Aumento de la DMO en columna y cadera mayor con zoledronato. Baja incidencia de fractura en ambos grupos.
Zoledronato versus Risedronato	Reid 2000	288 ♂ y ♀	Prevención	12 meses	Aumento de la DMO en columna y cadera con zoledronato estable con risedronato.
Zoledronato versus Risedronato	Sambrook 2012	152 ♂	Tratamiento	12 meses	Mayor incremento de la DMO en columna con zoledronato. Baja incidencia de fractura en ambos grupos.
Zoledronato versus Risedronato	Sambrook 2012	78 ♂	Prevención	12 meses	Aumento de la DMO en columna con zoledronato, estable con risedronato.
Teriparatida versus Alendronato	Saag 2007	428: 277♀ PM 68♀ PreM 83 ♂	Tratamiento	18 meses	Aumento de la DMO en columna y cadera mayor con teriparatida. Reducción de incidencia de fractura con teriparatida.
Teriparatida versus Alendronato	Langdahl 2012	377 227♀ PM 67 ♀ preM 83 ♂	Tratamiento	18 meses	Aumento de la DMO en todos los grupos de pacientes en columna lumbar.
Teriparatida versus Risedronato	Gluer 2013	92 ♂	Tratamiento	18 meses	Aumento de la DMO en columna mayor con teriparatida, y en cadera aumento solo con teriparatida. Tendencia a reducir la incidencia de fractura con teriparatida.

\*Los estudios incluyeron a mujeres premenopáusicas (♀PreM), posmenopáusicas (♀PM) y hombres (♂).

De acuerdo con los diferentes estudios publicados sobre los BF se concluye:

- El tratamiento con alendronato aumenta la DMO en la columna y en el trocánter y mantiene la DMO en el cuello femoral. En un estudio de extensión reduce las fracturas vertebrales. La dosis recomendada es de 10 mg/día o 70 mg semanales por vía oral para las mujeres posmenopáusicas y para los hombres > 50 años con osteoporosis. Se recomienda una dosis de 35 mg/semanales por vía oral en las mujeres premenopáusicas.<sup>25,39,48,50</sup>

- El uso de risedronato aumenta la DMO y reduce el riesgo de fractura. La dosis recomendada para la prevención o el tratamiento es de 5 mg diarios o 35 mg semanales por vía oral.<sup>24,39,48,50</sup>

- El zoledronato fue más eficaz en el incremento de la DMO comparado con otros BF. No hubo diferencias al evaluar ambas drogas en la disminución del riesgo de fractura. La dosis recomendada de zoledronato para la prevención o el tratamiento es de 5 mg anuales intravenosos en personas con adecuada función renal (filtrado glomerular > 35 ml/min).<sup>24,39,48,50</sup>

Existen otras drogas que no han sido aprobadas por los organismos regulatorios para la OIC, pero han sido reportadas como eficaces, por ejemplo el ibandronato y el pamidronato, que en diversos estudios clínicos han mostrado eficacia en el mantenimiento de la DMO.<sup>48,50</sup>

## 2- Denosumab

Esta droga antiresortiva es un anticuerpo monoclonal contra RANKL que todavía no ha sido aprobado para la OIC. En un estudio de fase II en pacientes con artritis reumatoidea tratados con denosumab se observó el incremento de la DMO de la columna y de la cadera.<sup>53</sup> La sociedad ASBMR sugiere que esta droga es una opción en el tratamiento de mujeres premenopáusicas que planifican embarazo en razón de su vida media corta. Se sugiere evitar el embarazo intratratamiento, pues los efectos fetales son muy deleté-

reos.<sup>41,46</sup> Faltan aún estudios para validar este tratamiento.

## Drogas anabólicas

La única droga anabólica aprobada para la OIC es la teriparatida (FDA y ANMAT). Su eficacia es mayor en relación con los BF en cuanto al aumento de la DMO.

La teriparatida produce efectos esqueléticos anabólicos y logra incrementar en forma más eficaz los valores de la DMO de la columna y de la cadera, comparada con el alendronato. No se ha demostrado la reducción de fracturas; sin embargo, en un subanálisis hay cierta evidencia radiológica de reducción de nuevas fracturas.<sup>42</sup>

La dosis indicada es de 20 µg diarios subcutáneos, con una duración máxima de 24 meses. Está contraindicada en adultos jóvenes con epífisis abiertas o en pacientes que han recibido radiación o tengan una patología neoplásica.<sup>38,39,42,44</sup>

Luego de esta revisión se puede considerar que tanto las drogas antiresortivas como las anabólicas carecen de evidencia sobre su eficacia en la reducción del riesgo de fractura, porque los trabajos no han sido diseñados para tal fin y mostraron una tendencia a la reducción de incidencia de fracturas, probablemente por la corta duración de los estudios y el bajo número de pacientes analizados.

## Tratamiento no farmacológico

La vertebroplastia percutánea es un método invasivo pero es una opción que mejora el dolor y la movilidad. Esta intervención tiene como complicación nuevas fracturas, en vértebras cercanas a la cementada, por lo que en OIC se recomienda precaución y valoración de riesgo/beneficio para cada paciente.<sup>44</sup>

## Guías internacionales

Varias sociedades de diferentes países han realizado recomendaciones para el manejo de la OIC, de las cuales consideraremos las propuestas de la ACR, ASBMR y IOF-ECTS (Tabla 3).



**Tabla 3.** Guía para el tratamiento de la osteoporosis inducida por corticoides según sociedades científicas internacionales (Modificado de Rizzoli y col., ref. 50).

Sociedades	Año	Pacientes	Intervención GC/tiempo	Intervención: fracturas, DMO, FRAX
<b>ACR</b>	2010	♀PM y ♂ > 50 años ♀PreM sin embarazo potencial y ♂ < 50 años ♀PreM con embarazo potencial	≥ 7,5 mg/día ≥ 3 meses ≥ 5 mg/día ≥ 3 meses ≥ 7,5 mg/día ≥ 3 meses	FRAX Fractura
<b>ASBMR</b>	2011	♀PM y ♂ > 50 años ♀PreM y ♂ < 50 años	< 7,5 mg/día ≥ 3 meses > 7,5 mg/día ≥ 3 meses	FRAX Z-score ≤ -2.0 Fracturas prevalentes
<b>IOF/ ECTS</b>	2012	♀PM y ♂ ≥ 50 años ♀PreM y ♂ > 50 años	≥ 7,5 mg/día o ≥ 70 años GC por más de 3 meses	Fractura por fragilidad o T-score ≤ -1,5 o FRAX ajustado por dosis Fractura por fragilidad
<b>National Osteoporosis Foundation</b>	2014	♀PM y ♂ ≥ 50 años		Fractura por fragilidad o T-score ≤ -2.5 o T-score entre -1 y -2.5 + FRAX > 20% para fracturas mayores o > 3 % para fractura de cadera

En general todas las entidades están de acuerdo sobre las modificaciones del estilo de vida, la implementación de menor exposición de GC y durante el menor tiempo posible y la suplementación de calcio y vitamina D.

Una consideración especial merecen las mujeres premenopáusicas y los hombres < 50 años ya que existen datos limitados. El riesgo de fractura en esta etapa de la vida es más bajo, pero el relacionado con los GC es aún desconocido. La ASBMR recomienda usar la medición de la DMO y la intervención terapéutica cuando el Z-score es ≤ -2, o si existe una disminución significativa de esta. Los expertos de la ASBMR y de la ACR, IOF-ECTS coinciden en iniciar un tratamiento para OIC cuando hay fracturas por

fragilidad. Las guías de estas sociedades sugieren tener precaución con el uso de fármacos “osteoaactivos” en mujeres en edad fértil.

La ACR recomienda prescribir BF en mujeres jóvenes con fracturas por fragilidad, mientras que la ASBMR sugiere usar teriparatida como alternativa en mujeres con posibilidad de futuro embarazo para evitar el posible efecto tóxico de los BF acumulados en el esqueleto.<sup>41,42</sup>

Los pacientes jóvenes tratados con GC sin fractura constituyen un tema de debate. Las sociedades científicas coinciden en que hay una evidencia limitada y debe prevalecer el juicio clínico del médico para la indicación de tratamiento.

La población que requiere GC recibe muchos fármacos, por lo cual la indicación médica de la terapia protectora ósea frecuentemente es poco considerada. Por otra parte la adherencia del paciente en ese contexto suele estar disminuida.

Existen controversias sobre la duración del tratamiento para OIC; teniendo en cuenta que el riesgo de fractura disminuye al suspender el GC, algunas guías sugieren finalizar el tratamiento con fármacos osteoactivos si la DMO del paciente es normal y no tiene riesgo de fractura.<sup>46</sup>

Hay situaciones que no están contempladas dentro de las diferentes guías internacionales, tales como los pulsos intravenosos de GC o las dosis elevadas diarias durante el primer mes de tratamiento. En esas situaciones, la valoración y el juicio clínico del médico tratante decidirán la intervención y el proceder a largo plazo.

### **Recomendaciones para el tratamiento de la OIC del GE-OIC-SAO**

Luego de valorar las diferentes evidencias sobre tratamientos y las guías de las sociedades científicas, recomendamos los siguientes criterios de intervención:

A- En todos los pacientes que inicien o reciban tratamiento con GC en dosis  $\geq 5$  mg diarios durante 3 meses o más tiempo, considerar la evaluación mediante historia clínica, nutricional, análisis bioquímicos, densitometría ósea y FRAX, como se estableció en páginas previas.

B- Siempre que se indique tratamiento con GC, evaluar la dosis, el tipo de GC y la vía de administración.

C- Se debe considerar sexo y edad de los pacientes: mujeres premenopáusicas (probabilidad de embarazo) o posmenopáusicas, y varones jóvenes o adultos mayores (edad mayor o menor de 50 años).

En todos los pacientes que comienzan o continúan con terapia con GC debemos considerar:

### **Medidas generales**

- Usar la menor dosis posible de GC.
- Indicar fármacos que permitan disminuir la dosis de GC de acuerdo con la patología de base.
- Evaluar el riesgo de caídas, especialmente en los pacientes mayores.
- Modificar los estilos de vida con una dieta balanceada; evitar el tabaco, el abuso de alcohol; tener una buena ingesta de calcio y de vitamina D, y seguir una dieta hiposódica.

- Indicar actividad física tal como ejercicios de carga, ejercicios en agua, fortalecimiento muscular, ejercicios aeróbicos de bajo impacto.<sup>39,46,49</sup>

Se recomienda indicar calcio y vitamina D en las siguientes dosis:

- Calcio: 1000 a 1200 mg/diarios por dieta o suplemento.
- Vitamina D: 800 a 1000 UI diarias si los valores de 25(OH) vitamina D son superiores a los 30 ng/ml. Indicar dosis superiores hasta lograr niveles satisfactorios con valores descendidos de 25(OH) vitamina D.

### **Tratamiento farmacológico**

El GE-OIC-SAO considera conveniente intervenir, en consonancia con otras sociedades, distinguiendo según sexo y edad y estatus vital (premenopausia o posmenopausia) y propone:

#### **Recomendación 1**

Todos los pacientes que presenten fracturas vertebrales deberán recibir tratamiento con drogas "osteoactivas" para evitar nuevas fracturas desde el comienzo de uso de los GC, independientemente de la dosis recibida, la edad, el sexo y el valor de DMO.

#### **Recomendación 2**

**Mujeres posmenopáusicas y varones > 50 años tratados con GC prednisona o sus equivalentes por vía oral más de 3 meses (Tabla 4).**



En aquellos pacientes tratados con GC < 5 mg diarios con un valor de T-score por DXA < 0 > -1,5 y con un riesgo absoluto de fractura bajo medido por FRAX, se indicará tratamiento con calcio y vitamina D.

- Si el valor de FRAX es de mediano riesgo, se adicionará un BF: alendronato o risedronato. Se aconseja también utilizar también zoledronato con FRAX de alto riesgo.

- El criterio de dosis de prednisona ( $\geq 5$  mg/día) prevalecerá en la indicación sobre los umbrales determinados por la DMO y el riesgo de fractura calculado por FRAX. Se considera indicar tratamiento si:

- T-score > -1,5 con un FRAX de mediano riesgo absoluto de fracturas: agregar alendronato o risedronato.

- T-score > -1,5 con FRAX que indica alto riesgo absoluto de fracturas: ídem anterior, o zoledronato o teriparatida.

- T-score < -1,5 con bajo y mediano riesgo por FRAX: se usará alendronato o risedronato aun con FRAX de bajo riesgo absoluto. Si se observa FRAX con un riesgo moderado o alto, indicar zoledronato o teriparatida.

- Fracturas vertebrales o no vertebrales con cualquier dosis de GC: indicar BF orales o intravenosos o teriparatida (Tabla 4).

**Tabla 4.** Indicaciones de tratamiento en pacientes posmenopáusicas y hombres > 50 años, según GE-OIC-SAO.

Dosis de prednisona o equivalentes DMO (T-score)	FRAX* Riesgo bajo	FRAX* Riesgo mediano	FRAX* Riesgo alto
<b>GC <math>\leq 5</math> mg/día + de 3 meses</b>	T-score > -1,5	Calcio y VD Alendronato Risedronato	Calcio y VD Alendronato Risedronato Zoledronato
	T-score < -1,5	Alendronato Risedronato	Alendronato Risedronato Zoledronato
<b>GC <math>\geq 5</math> mg/día + de 3 meses</b>	T-score > -1,5	Calcio y VD Alendronato Risedronato	Calcio y VD Alendronato Risedronato Zoledronato Teriparatida
	T-score < -1,5	Calcio y VD Alendronato Risedronato	Calcio y VD Alendronato Risedronato Zoledronato Teriparatida
Fracturas vertebrales y no vertebrales con cualquier dosis de GC	Calcio y VD Zoledronato Teriparatida Alendronato Risedronato	Calcio y VD Zoledronato Teriparatida Alendronato Risedronato	Calcio y VD Zoledronato Teriparatida Alendronato Risedronato

\* FRAX: riesgo absoluto de fractura a 10 años.

**Mujeres premenopáusicas y varones < de 50 años tratados con GC prednisona o sus equivalentes por vía oral más de 3 meses** (Tabla 5).

En estos pacientes el tratamiento es individualizado; se debe considerar la presencia o ausencia de fracturas y el deseo de embarazo.

- En los pacientes con dosis  $\leq 5$  mg diarios con un Z-score en la DXA de columna lumbar y/o fémur proximal  $\geq -2$  sin riesgo de fractura con deseo de embarazo, asegurar aporte de calcio y vitamina D así como mantener niveles de 25OH vitamina D superiores a 30 ng/ml.
- En los pacientes con dosis  $\leq 5$  mg diarios

con un Z-score en la DXA de columna lumbar y/o fémur proximal  $\leq -2$  con riesgo de fractura sin deseo de embarazo, asegurar aporte de calcio y vitamina D, mantener niveles de 25OH vitamina D superiores a 30 ng/ml y adicionar BF o teriparatida. Y si tiene posibilidades potenciales de embarazo, considerar también teriparatida.

- En los pacientes que reciben dosis  $\geq 5$  mg diarios con un Z-score en la DXA de columna lumbar y/o fémur proximal  $\geq -2$  o con descenso de la DMO sin riesgo de fractura prevalentes y sin potencial de embarazo, asegurar el aporte de calcio y vitamina D necesario

**Tabla 5.** Indicaciones de tratamiento en pacientes premenopáusicas y hombres < 50 años, según GE-OIC-SAO.

**Todos los pacientes recibirán calcio y vitamina D.**

Dosis prednisona o equivalentes DMO Z-score	Sin fractura	Con fractura
<b>GC <math>\leq 5</math> mg/día + de 3 meses en ♀ con potencial de embarazo Z-score <math>\geq -2</math></b>	Evidencia limitada Criterio clínico	Alendronato Risedronato Zoledronato Teriparatida
<b>GC <math>\leq 5</math> mg/día + de 3 meses en ♀ sin potencial de embarazo y ♂ &lt; 50 años Z-score <math>\geq -2</math></b>	Evidencia limitada Criterio clínico	Alendronato Risedronato Zoledronato Teriparatida
<b>GC <math>\geq 5</math> mg/día + de 3 meses en ♀ con potencial de embarazo Z-score <math>\leq -2</math> o descenso de DMO</b>	Alendronato Risedronato Teriparatida	Alendronato Risedronato Zoledronato Teriparatida
<b>GC <math>\geq 5</math> mg/día + de 3 meses en ♀ sin potencial de embarazo y ♂ &lt; 50 años Z-score <math>\leq -2</math> o descenso de DMO</b>	Alendronato Risedronato	Alendronato Risedronato Zoledronato Teriparatida



para mantener niveles de 25(OH) vitamina D superiores a 30 ng/ml. Considerar el uso de BF (alendronato, risedronato).

- En varones y mujeres premenopáusicas con fracturas por fragilidad inducida por GC, independientemente del grado de DMO, considerar BF orales o zoledronato y, si existe el deseo de embarazo, considerar el uso de teriparatida.

- El GE-OIC-SAO considera que aún no existe suficiente evidencia para recomendar el uso de denosumab.

### **Recomendación 3**

**Situaciones especiales: tratamiento de la OIC asociada a pulsos intravenosos de GC o con dosis orales de GC prescritas durante un tiempo inferior a 3 meses.**

Estas situaciones son una preocupación reflejada en las guías de algunas sociedades científicas. Indicar una recomendación resulta difícil, ya que la evidencia es pobre; por lo tanto, el tratamiento de estos pacientes queda a criterio del médico tratante.

Sin embargo, el GE-OIC-SAO sugiere estas medidas de orientación:

- 1- Aporte de calcio y vitamina D en las dosis indicadas anteriormente.

- 2- Iniciar un tratamiento con BF oral o intravenoso o en casos muy especiales, considerar también teriparatida sin esperar los 3 meses, porque la alteración de la microarquitectura ósea es anterior a la disminución de la densidad ósea, especialmente en la población mayor de 50 años.

### **Conclusiones finales**

El GE-OIC-SAO alerta sobre la importancia de iniciar en forma rápida el tratamiento preventivo de la osteoporosis inducida por glucocorticoides para mantener la integridad ósea y una buena calidad de vida de pacientes con otras patologías. Propone una guía de intervención considerando dosis de GC, duración del tratamiento, edad, sexo y estado vital del paciente. Sugiere no demorar la indicación de un fármaco “osteactivo” porque el deterioro en la arquitectura ósea que producen los GC es solo parcialmente reversible.

En este artículo se vierten ideas que guían a los profesionales en las tomas de decisiones. Sin embargo, estas no superan el criterio que el médico se forma ante cada paciente. Los profesionales de la Sociedad Argentina de Osteoporosis que consensuaron y redactaron esta Guía dan recomendaciones que quedan a discreción y bajo la responsabilidad del médico tratante en su aplicación.

### **Conflicto de intereses:**

Daniel O. Messina ha recibido honorarios como disertante de Lilly, GSK, Servier. Investigador Clínico de Amgen, Pfizer, Roche. Graciela Edith Castelli es PIH Cluster Medical Lead for Inflammation and Immunology, Pfizer. María Silvia Larroudé ha recibido honorarios como disertante de Genzyme, Shire, Pfizer, Lilly, Abbie y Bristol. El resto de los autores no declaran conflictos de interés.

Recibido: septiembre 2015.

Aceptado: agosto 2016.

## Referencias

1. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int* 2007; 18:1319-28.
2. Overman RA, Yeh JY, Deal CL. Prevalence of oral glucocorticoid usage in the United States: a general population perspective. *Arth Care Res* 2013; 65:294-8.
3. Van Staa TP, Laan RF, Barton IP, Cohen S, Reid DM, Cooper C. Bone density threshold and other predictors of vertebral fracture in patients receiving oral glucocorticoid therapy. *Arthritis Rheum* 2003; 48:3224-9.
4. Kanis JA, Johansson H, Oden A, et al. A meta-analysis of prior corticosteroid use and fracture risk. *J Bone Miner Res* 2004; 19:893-9.
5. Van Staa TP, Leufkens HGM, Cooper C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2002; 13:777-87.
6. McDonough AK, Curtis JR, Saag KG. The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. *Current Opinion in Rheumatology* 2008; 20:131-7.
7. Diez-Pérez A, Hooven FH, Adachi JD, et al. Regional difference in treatment for osteoporosis. The global longitudinal study of osteoporosis in women (GLOW). *Bone* 2011; 49:493-8.
8. Van Staa TP, Leufkens HGM, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Fractures and oral corticosteroids: relationship to daily and cumulative dose. *Rheumatology* 2000; 39:1383-9.
9. Lane NE, Pressman AR, Star VL, Cummings SR, Nevitt MC. Rheumatoid arthritis and bone mineral density in elderly women. *J Bone Miner Res* 1995; 10:257-63.
10. Van Staa TP, Leufkens HGM, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res* 2000; 15:993-1000.
11. McKenzie R, Reynolds JC, O'Fallon A, et al. Decreased bone mineral density during low dose glucocorticoid administration in a randomised-placebo controlled trial. *J Rheumatology* 2000; 27:2222-5.
12. Laan RFJM, van Riel PLGM, Van de Putte LBA, et al. Low-dose prednisone induces rapid reversible axial bone loss in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1993; 119:963-8.
13. Van Staa TP, Leufkens HGM, Cooper C. Use of inhaled corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res* 2001; 16:581-8.
14. Reid IR, Ibbertson HK. Calcium supplements in the prevention of steroid-induced osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 1986; 44:287-90.
15. Kiemberg DV, Baerg RD, Gershon E, Graudusius RT. Effect of cortisone treatment on the active transport of calcium by the small intestine. *J Clin Invest* 1971; 50:1309-21.
16. Suzuki Y, Ichikawa Y, Saito E, Homma M. Importance of increased urinary calcium in the development of secondary hyperparathyroidism of patients under glucocorticoid therapy. *Metabolism* 1983; 32:151-6.
17. Luket BP, Adams JS. Calcium and phosphorus homeostasis in man. Effect of corticosteroids. *Arch Intern Med* 1976; 136:1249-53.
18. Gram J, Junker P, Nielsen HK, Bollerslev J. Effects of short-term treatment with prednisolone and calcitriol on bone and mineral metabolism in normal men. *Bone* 1998; 23:297-302.
19. Rubin MR, Bilezikian JP. The role of parathyroid hormone in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis. A re-examination of the evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:4033-41.
20. Manelli F, Bossono S, Bugari G, et al. Chronic glucocorticoid treatment alters the spontaneous pulsatile parathyroid hormone (PTH) secretory pattern in humans. *Proceedings of the 83<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society*, Denver, CO. 2001:125 (Abstract OR 42-6).
21. Bikle DD, Halloran BP, Fong L, Steinbach L, Shellito J. Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:456-61.



22. Montecucco CC, Caporali R, Caprotti P, Notario A. Sex hormones and bone metabolism in postmenopausal rheumatoid arthritis treated with two different glucocorticoids. *J Rheumatology* 1992; 19:1895-9.
23. Van Staa TP. The pathogenesis, epidemiology and management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2006; 79:129-37.
24. Dempster DW. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999; 4:137-41.
25. Clarke BL. Corticosteroid induced osteoporosis. An update for dermatologists. *Am J Clin Dermatol* 2012; 13:167-90.
26. Canalis EM, Delaney AM. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Ann NY Acad Sci* 2002; 966:73-81.
27. Pereira RMR, Delany AM, Canalis E. Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone* 2001; 28:484-90.
28. Ton FN, Gunawardene SC, Lee H, Neer RM. Effects of low-dose prednisone on bone metabolism. *J Bone Miner Res* 2005; 20:464-70.
29. Compston J. Management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6:82-8.
30. Mak W, Shao X, Dunstan CR, Seibel MJ, Zhou H. Biphasic glucocorticoid-dependent regulation of Wnt expression and its inhibitors in mature osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 2009; 85:538-45.
31. Hayashi K, Yamaguchi T, Yano S, et al. BMP/Wnt antagonists are upregulated by dexamethasone in osteoblasts and reversed by alendronate and PTH: potential therapeutic targets for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379:261-6.
32. Sciaudone M, Gazzero E, Priest L, Delany AM, Canalis E. Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology* 2003; 144:5631-9.
33. Canalis E. Clinical review 83. Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3441-7.
34. Pereira RC, Delany AM, Canalis E. Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression. *Bone* 2002; 30:685-91.
35. Lane NE, Yao W, Balooch M, et al. Glucocorticoid treated mice have localized changes in trabecular bone material properties and osteocyte lacunar size that are not observed in placebo-treated or estrogens-deficient mice. *J Bone Min Res* 2006; 21:466-76.
36. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. *J Clin Invest* 1998; 102:274-82.
37. Xia X, Kar R, Gluhak-Heinrich J, et al. Glucocorticoid-induced autophagy in osteocytes. *J Bone Miner Res* 2010; 25:2479-88.
38. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on glucocorticoid induced osteoporosis. Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid induced osteoporosis. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1496-503.
39. Briot K, Roux C. Glucocorticoid induced osteoporosis. *RMD Open* 2015; 1(1):e000014.
40. Grossman JM, Gordon R, Ranganath VK, et al. American College of Rheumatology 2010 Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010; 62:1515-26.
41. Hansen KE, Wilson HA, Zapalowski C, et al. Uncertainties in the prevention and treatment of glucocorticoid induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2011; 26:1989-996.
42. Lekamwasam S, Adachi JD, Agnusdei D, et al. A framework for the development of guidelines for the management of glucocorticoid induced osteoporosis. *Osteoporos Int* 2012; 23:2257-76.
43. Brance ML, Plantalech L. Osteoporosis inducida por corticoides: análisis de las guías internacionales de prevención y tratamiento. *Actual Osteol* 2013; 9:14-27.
44. Harvey NC, Glüer CC, Binkley N, et al. Trabecular bone score (TBS) as a new complementary

- approach for osteoporosis evaluation in clinical practice: A consensus report of a European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) Working Group. *Bone* 2015; 78:216-24.
45. Leib ES, Saag KG, Adachi JD, et al. FRAX(®) Position Development Conference Members Official Positions for FRAX(®) clinical regarding glucocorticoids: the impact of the use of glucocorticoids on the estimate by FRAX(®) of the 10 year risk of fracture from Joint Official Positions Development Conference of the International Society for Clinical Densitometry and International Osteoporosis Foundation on FRAX(®). *J Clin Densitom* 2011; 14:212-9.
46. Van Staa TP, Laan RF, Barton IP, Cohen S, Reid DM, Cooper C. Bone density threshold and other predictors of vertebral fracture in patients receiving oral glucocorticoid therapy. *Arthritis Rheum* 2003; 48:3224-9.
47. Kanis JA, Johansson H, Oden A, McCloskey EV. Guidance for the adjustment of FRAX according to the dose of glucocorticoids. *Osteoporos Int* 2011; 22:809-16.
48. Whittier X, Saag K. Glucocorticoid induced osteoporosis. *Rheum Dis Clin N Am* 2016; 42:177-89.
49. Buttgerit F, da Silva JAP, Boers M, et al. Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment regimens: current questions and tentative answers in rheumatology. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:718-22.
50. Rizzoli R, Biver E. Glucocorticoid induced osteoporosis: who to treat with what agent? *Nat Reviews Rheum* 2015; 11:98-109.
51. Holick MF. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-81.
52. Roux C, Reid DM, Devogelaer JP, et al. Post hoc analysis of a single IV infusion of zoledronic acid versus daily oral risedronate on lumbar spine bone mineral density in different subgroups with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Osteoporos Int* 2012; 23:1083-90.
53. Dore RK, Cohen SB, Lane NE, et al. Denosumab RA study Group 2010. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in patients with rheumatoid arthritis receiving concurrent glucocorticoids or bisphosphonates. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:872-5.



## ACTUALIZACIONES / Reviews

# VASCULAR CALCIFICATION IN ATHEROSCLEROSIS: POTENTIAL ROLES OF MACROPHAGES AND NON-CODING MICRO-RNAs

Prabhatchandra Dube, Guillermo Vazquez\*

*Department of Physiology and Pharmacology, and Vascular Physiology Program, Center for Hypertension and Personalized Medicine, University of Toledo College of Medicine and Life Sciences, Health Science Campus, 3000 Transverse Dr., Toledo, Ohio 43614 USA.*

### Abstract

Coronary heart disease, a leading cause of death in western societies, is caused by the presence of atherosclerotic plaques in the coronary arteries. Calcification is a frequent complication of atherosclerotic plaques, and often a contributing factor to their instability and rupture. Endothelial cells, smooth muscle cells and plaque macrophages, all contribute to the calcification process, which is reminiscent of that underlying bone formation. In particular, the role of macrophages in calcification has long been recognized, but whether or not distinct macrophage subsets –v.g., M1 or inflammatory, and M2 or anti-inflammatory– have specific functions in osteogenic signaling within the context of plaque calcification remains poorly understood. Over the past few years, accumulated evidence has revealed novel roles of non-coding micro-RNAs (miRNAs) in atherorelevant functions of macrophages and in mechanisms linked to macrophage divergence into different subtypes. In this article we discuss some salient findings on potential roles of miRNAs in vascular calcification,

with focus on those miRNAs that have also been associated to macrophage differentiation, and speculate on their potential relation to M1 and M2 macrophages in the context of calcification of atherosclerotic plaques.

**Key words:** atherosclerosis; vascular calcification; macrophage diversity; non-coding micro-RNAs

### Resumen

## CALCIFICACIÓN VASCULAR EN ATEROSCLEROSIS: POSIBLES FUNCIONES DE MACRÓFAGOS Y MICRO-ARNs NO CODIFICANTES

La enfermedad cardíaca coronaria, principal causa de muerte en occidente, es causada por la presencia de placas ateroscleróticas en las arterias coronarias. La presencia de depósitos de calcificación es una complicación frecuente de la placa, y puede contribuir a la inestabilidad y ruptura de la misma. El proceso de calcificación de la placa es similar al que ocurre en hueso, y contribuyen al mismo, mecanismos dependientes de células endote-

\* Dirección postal: 3000 Transverse Dr., UTHSC Mail stop 1008, Toledo OH 43614 USA.  
Correo electrónico: [Guillermo.Vazquez@utoledo.edu](mailto:Guillermo.Vazquez@utoledo.edu).

liales, células musculares lisas y macrófagos, células que están presentes en todas las etapas de desarrollo de la placa aterosclerótica. El rol de los macrófagos en la calcificación de la placa se conoce desde hace tiempo, pero la contribución de los distintos tipos de macrófagos –por ejemplo, M1 o tipo inflamatorio, y M2 o tipo anti-inflamatorio- a mecanismos de señalización osteogénica en dicho contexto aún no se conoce. Recientemente varios trabajos experimentales han revelado la existencia de nuevos roles de micro-ARNs no codificantes (miRs) en varias funciones de los macrófagos que son de relevancia en el proceso aterogénico, como así también en mecanismos relacionados a la diferenciación de macrófagos en subtipos específicos. En este artículo discutimos algunos de los hallazgos más importantes sobre posibles nuevos roles de miRs en calcificación vascular, poniendo énfasis en aquellos miRs que han sido también asociados a la diferenciación de macrófagos, y especulamos acerca de su posible relación con macrófagos M1 y M2 en el contexto de la calcificación de la placa aterosclerótica.

**Palabras clave:** aterosclerosis; calcificación vascular; subtipos de macrófagos; micro-ARNs no codificantes.

## **1. Coronary artery disease and atherosclerosis.**

Coronary heart disease (CHD) is the number one cause of death in the United States and other western societies.<sup>1</sup> The major cause of CHD is atherosclerosis, a chronic arterial disease that has a dominant inflammatory component.<sup>2,3</sup> The clinical expression of CHD includes chest pain –angina pectoris-, myocardial infarction and/or thromboembolic events, all of which are directly related to the molecular and cellular characteristics of the atherosclerotic plaque. For instance, plaques that cause critical arterial stenosis underlie ischemic manifestations, whereas rupture

of unstable, vulnerable plaques usually derives in acute thromboembolic events.<sup>4,5</sup> One of the reasons why CHD has such a high impact on morbidity and mortality rates is because atherosclerosis is also the most frequent vascular complication of a number of metabolic disturbances, such as obesity, metabolic syndrome, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease.<sup>6</sup>

Atherogenesis, the process that mediates plaque formation and growth, implies an intricate interaction between arterial resident cells, such as smooth muscle cells, endothelial cells and monocyte-derived macrophages, and a myriad of cytokines and inflammatory mediators that lodge in the plaque.<sup>7</sup> Desirable goals in the clinical management of atherosclerosis include minimizing plaque formation –in at risk individuals- or, in patients with established atherosclerosis, the reduction of plaque progression, improving the stability of potentially vulnerable plaques, and/or stimulating plaque regression. Calcification is a frequent complication of advanced atherosclerotic plaques, and depending on its extent and distribution within the lesion, it generally contributes to plaque instability and rupture.<sup>8,9</sup> Whereas existing therapies – v.g., aggressive lipid lowering with statins- are somewhat successful in promoting plaque regression or preventing plaque development in individuals at risk, specific strategies to improve plaque stability by, for instance, reducing plaque calcification, are non-existent. In recent years, experimental evidence has revealed important functions of non-coding micro-RNAs (miRs) in different aspects of atherosclerosis, such as the regulation of components of the reverse cholesterol transport system,<sup>10,11</sup> modulation of macrophage differentiation (reviewed by us in<sup>12</sup>) and vascular calcification. In this article we discuss some of the salient findings regarding miRs and vascular calcification, with focus on those miRs that have also been linked to processes mediating macrophage



differentiation (see for instance <sup>12</sup>), and speculate on their potential relevance to the functions of M1 or inflammatory, and M2 or anti-inflammatory macrophage subsets in the context of calcification of atherosclerotic plaques.

## 2. Calcification in atherosclerotic plaques.

Calcification is a frequent complication of advanced atherosclerotic plaques, and depending on its extent *-i.e.*, micro or nodular calcification- and how it is distributed within the anatomy of the plaque *-i.e.*, cap shoulders, cap itself, necrotic area- it may represent a contributing factor to plaque instability and rupture. <sup>4,8</sup> The mechanisms that underlie vascular calcification are to a great extent reminiscent of those mediating bone formation, and calcified tissue found in atherosclerotic plaques is indeed indistinguishable, from a histological perspective, from bone. Bone related proteins such as Runt-related transcription factor-2 (Runx2), bone morphogenetic protein 2 (BMP2), osteoprotegerin, matrix gla protein, osteopontin, among others, are present in calcified plaques, and they fulfill most of the functions they would in a bone microenvironment. <sup>13</sup> For example, BMP2, which belongs to the family of bone morphogenetic proteins (BMPs), a group of polypeptides in the transforming growth factor (TGF)- $\beta$  superfamily, is a strong inducer of the differentiation of pre-osteoblasts into osteoblasts, mostly through activation of transcriptional factors required for bone formation. <sup>14</sup> One of these factors, Runx-2, is a master regulator of osteoblast differentiation and strongly activated downstream of BMP2 signaling. This mechanism is critical for BMP2 to induce endochondral bone formation in extra skeletal sites *in vivo*. <sup>15</sup> These processes also take place in the plaque environment, but the exact source of BMP2 is not fully defined and may include more than one cell type.

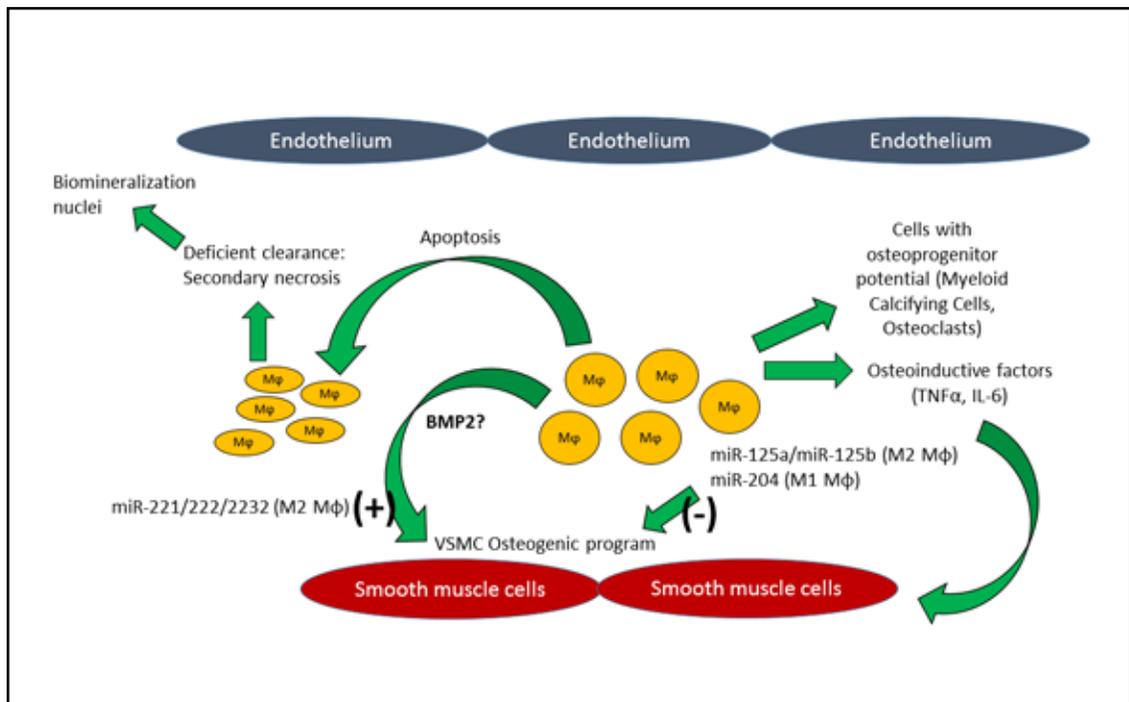
A key characteristic of vascular calcification

in atherosclerosis is its predominantly intimal location, which distinguishes plaque calcification from that occurring in other chronic pathologies with an inflammatory vascular component *-i.e.*, chronic kidney disease- in which calcification is mostly found in the tunica media and is mainly subsequent to passive mineral deposition. At the cellular level plaque calcification involves an intricate interplay between endothelial cells, smooth muscle cells, and immune cells recruited to the vessel wall from circulation, most notably monocyte-derived macrophages. <sup>16-18</sup> Indeed, whereas vascular smooth muscle cells have been traditionally envisaged as the culprit of the osteogenic program behind vessel calcification, current evidence also supports key roles of endothelial cells and macrophages in this process. <sup>16-18</sup> A prominent mechanism by which macrophages induce calcification is by contributing to activation of the osteogenic program in vascular smooth muscle cells, specifically through the release of cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) or IL-6. <sup>17,18</sup> Macrophages can also de-differentiate into osteoclast-like cells which then contribute to the osteogenic process in the vessel by resorbing calcified mineral. <sup>17</sup> An additional mechanism may depend on the balance between accumulation of apoptotic macrophages and their clearance from the plaque through efferocytosis, a process key in the modulation of cellularity of early lesions and necrosis in advanced plaques. <sup>19-21</sup> Apoptotic bodies have an important nucleation capacity for the passive deposition of calcified mineral, and thus it is possible that, at least in the advanced lesion setting, the contribution of dying macrophages to the growth of the necrotic core through secondary necrosis may add to biomineralization of the matrix in the plaque (see Figure 1 for a summary of potential macrophage-related calcification mechanisms).

Despite the role of plaque macrophages in calcification being well-recognized, the

macrophage population in the plaque setting is diverse, and current knowledge on the specific roles of macrophage subsets in osteogenic signaling within the context of vascular calcification is poor. This is particularly important in the context of calcification of atherosclerotic plaques, as the M1 or inflammatory, or classically activated, and the M2 or anti-inflammatory, or alternatively activated macrophage types are dominant throughout all stages of plaque

development.<sup>12,22</sup> The potential impact of macrophage diversity in mechanisms of plaque calcification, and for that matter, in most atherorelevant processes, is often ignored. Acknowledging this is of importance, as it may lead to definitions in the development of alternative therapeutic strategies in the clinical management of atherosclerosis and other vascular diseases with an inflammatory nature.



**Figure 1.** This figure summarizes some of the mechanisms by which macrophages (Mφ) likely contribute to calcification of the atherosclerotic plaque. Under the influence of local cytokines and growth factors, macrophages can trans-differentiate into cells with osteoprogenitor potential (myeloid calcifying cells) or osteoclasts, which are key to the osteogenic process. Macrophages can also secrete osteoinductive factors (TNFα, IL-6) which may act on the vascular smooth muscle cell to induce an osteogenic program. Studies from the authors' laboratory suggest that bone morphogenetic protein-2 (BMP2) is constitutively produced by macrophages, which may represent an alternative pro-osteogenic mechanism in the plaque setting. In advanced atherosclerotic plaques, deficient clearance of apoptotic macrophages leads to secondary necrosis; necrotic debris can then serve as nuclei of biomineralization. Finally, some miRNAs that have been associated to regulation of osteogenic processes have also been identified in polarized M1 or M2 macrophages (indicated in parentheses; see text for details). The potential of these macrophage-derived miRNAs to stimulate (+) or inhibit (-) plaque calcification is yet to be demonstrated in animal models.



### 3. Macrophage diversity in the atherosclerotic plaque.

It is well documented that macrophage subsets exist in atherosclerotic plaques of humans and animal models, predominantly the M1 and the M2 types.<sup>22-27</sup> *In vitro*, the differentiation of naïve macrophages –usually bone marrow-derived- into the M1 or M2 types can be readily achieved by exposing the cells to, respectively, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) or interleukins 4 or 13 (IL4, IL13).<sup>24,28</sup> However, considering the myriad of stimuli to which macrophages are exposed in the plaque environment, this is a simplistic approach in a very controlled *in vitro* setting. This is why definitive evidence for the existence of fully divergent phenotypes in atherosclerotic plaques is still lacking. In this context, the growing number of studies applying deep transcriptomic analysis to plaque macrophages isolated from lesions by laser capture microdissection (LCM) is rapidly advancing our knowledge of the phenotypic signatures of plaque macrophages and how these compare to those observed *in vitro*.<sup>29,30</sup>

In atherosclerosis the relative abundance of M1 and M2 macrophages tends to increase as the disease progresses, although these two types co-exist throughout all stages of the disease and is likely that intermediate phenotypes are also present.<sup>24,27</sup> Whether the relative abundance of M1 and M2 macrophages in different stages of plaque development correlate with the extent and nature –i.e., active vs. passive mineral deposition- of plaque calcification remains to be investigated. In this context, the application of RNA-seq analysis to interrogate the whole transcriptome of polarized macrophages should lead to identification of specific signatures of M1 and M2 macrophages, helping to shape and understand transcriptome pathways and potential molecular players with specific functions in vascular calcification. Although from a more canonical biochemical/cell biology approach, recent efforts started to shed light on potential functions of M1 or

M2 macrophages in processes of relevance to vascular calcification. For example, evidence on potentially divergent roles of polarized macrophages in osteogenic signaling was recently provided by a study aimed at examining whether M1 and M2 macrophages differ in their ability to regulate the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells *in vitro*.<sup>31</sup> Although a stronger osteogenic effect was observed for M2 macrophages compared to M1 cells, the authors attributed this effect to the pro-regenerative cytokines tumor growth factor- $\beta$  and vascular endothelial growth factor produced by M2 macrophages,<sup>31</sup> with, surprisingly, no consideration given to macrophage-derived bone morphogenetic proteins. *In vitro* studies from our laboratory suggest that a mechanism exists in M1, but not M2 macrophages by which constitutive secretion of BMP2 drives an autocrine action that maintains the activation of a BMP2 receptor/SMAD1/5 signaling axis, which in turn accounts for constitutive expression of both BMP2 and Runx-2 (Dube and Vazquez, unpublished observations). Whereas the ability of macrophages from human and murine origin to produce BMP2 has been known for quite some time,<sup>32</sup> their ability to stimulate the osteogenic program in vascular smooth muscle cells has been attributed to the release of TNF $\alpha$  and IL6 by plaque macrophages.<sup>18,31</sup> Thus, on a speculative basis, constitutive BMP2 secretion by M1 macrophages may represent a novel osteogenic mechanism in the plaque setting. All these findings await validation in animal models of atherosclerosis.

### 4. Micro-RNAs, macrophage subsets and plaque calcification.

MicroRNAs (miRs) constitute a large family of small non-coding RNA molecules (~22 nucleotides) that can regulate gene expression at the post-transcriptional level by binding to the 3'-untranslated region (3'UTR) of target mRNAs, which results in repression of the

expression of that particular mRNA.<sup>33</sup> There is an impressive amount of evidence in support of functions of miRs in different molecular and cellular processes of atherosclerosis, with their roles in the regulation of components of the reverse cholesterol transport system in macrophages being one of the most studied thus far.<sup>10,11,34,35</sup> Recent studies also highlight observations on potential roles of miRs in vascular calcification, mostly focusing on their impact on the osteogenic capacity of smooth muscle cells. Below, we discuss some salient findings on miRs and vascular calcification and their potential relation to specific macrophage subsets in the context of calcification in the setting of atherosclerosis (and see Figure 1). The focus is on those miRs that have also been associated to processes that mediate macrophage differentiation into the M1 or M2 phenotypes. The rationale behind this selection lies on the fact that macrophages can secrete miRs packaged into exosomes –membranous nanovesicles–, which then act in a paracrine manner on neighbor cells<sup>(36-38)</sup>. We thus speculate that in the plaque setting macrophage-derived miRs with recognized roles in mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification, may act in a paracrine manner on plaque smooth muscle cells to influence their osteogenic program.

Mir-125b has been known to be involved in osteoblastic differentiation, but its specific effect on vascular calcification has been unclear. Goettsch *et al.*<sup>39</sup> examined the effects of miR-125b in osteogenic transformation of vascular smooth muscle cells from human coronary artery, and found that expression of miR-125b was reduced when these cells were exposed to osteogenic medium.<sup>39</sup> Notably, expression of miR-125b was inversely correlated with mineralized matrix deposition, in agreement with the observation that suppressing endogenous miR-125b promoted osteogenic transdifferentiation. This effect occurred mostly at the expense of upregulation of the osteoblast transcription

factor SP7 (osterix), a target of miR-125b. Of importance, calcified atherosclerotic plaques in apolipoprotein e knockout (apoeko) mice had reduced levels of miR-125b compared to non-calcified lesions, in line with a negative regulation of calcification processes by miR-125b.<sup>39</sup> In line with these findings, a miR-125b/Ets1 axis has recently been linked to regulation of transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells in high-phosphate medium.<sup>40</sup> Overexpression of miR-125b inhibited, while its downregulation promoted the phenotypic transition of smooth muscle cells and calcification, through a mechanism that involved miR-125b-dependent repression of Ets1.<sup>40</sup>

The close relative of miR-125b, miR-125a, has been associated to regulation of osteoclastogenesis. The differentiation of CD14<sup>+</sup> peripheral blood mononuclear cells induced by macrophage colony stimulating factor and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL), was shown to be markedly reduced or promoted by, respectively, overexpression or downregulation of miR-125a, through a mechanism that involved miR-126a-mediated targeting of TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), which acts as a signaling element in the RANKL/RANK/NFATc1 pathway.<sup>41</sup>

Interestingly, microarray analysis of miR profiles in bone marrow-derived macrophages from Balb/c mice showed that expression of miR-125b-5p is significantly higher in M2 compared to M1 macrophages.<sup>42</sup> In addition, studies in bone marrow-derived macrophages from C57BL/6 mice showed that stimulation of Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 favors expression of miR-125a-5p, whereas miR-125b-5p, which has the same seed sequence as miR-125a-5p, was downregulated.<sup>43</sup> This and the studies above illustrate the fact that sequence context outside the seed region can also affect miR expression and their binding to targets. Macrophages overexpressing miR-125a-5p



differentiate readily to the M2 phenotype, whereas knockdown of miR-125a-5p promotes M1 differentiation.<sup>43</sup> In the plaque setting macrophages are exposed to a variety of stimuli that induce endoplasmic reticulum (ER) stress, and both TLR2 and TLR4 are key within the signaling associated to the ER stress response in macrophages.<sup>44</sup> It is tempting to speculate that under regressive plaque conditions, where M2 macrophage abundance increases, release of upregulated miR125a to the environment may favor calcification regression by interfering with osteoclastogenic mechanisms.

Eigsti *et al.*<sup>45</sup> who found that during the transition monocyte-to-macrophage, IL4 –an M2 inducer– promoted the expression of miR-222. Recent miR-microarray analysis in smooth muscle cells revealed that after an extended period of time in culture the expression of miR-222 and its close relative miR-221 are downregulated, and this was positively correlated with lack of an osteogenic phenotype.<sup>46</sup> However, transfection of smooth muscle cells with miR-221/miR-222 mimics resulted in increased calcium deposition, and this was associated to changes in activity of the ectonucleotide phosphodiesterase 1 (Enpp1) and Pit-1 expression. The conclusion was made that these miRs modulate smooth muscle cell-mediated calcification by promoting cellular inorganic phosphate and pyrophosphate levels.<sup>46</sup>

MiR-223, a critical factor in osteoclastogenesis, is markedly upregulated in vascular smooth muscle cells exposed to high phosphate environment and in aortic plaques from apoE0 mice with vascular calcification.<sup>47</sup> Interestingly, miR-223 is highly specific of IL4-induced M2 macrophages, and has indeed been shown to be transferred by microvesicles into naïve macrophages to promote M2-like differentiation.<sup>37</sup> It remains to be determined if such paracrine mechanism also operates in the plaque setting and whether macrophage-derived miR-223 can be transferred to vascu-

lar smooth muscle cells to induce the osteogenic program.

Expression of miR-204 has been found to be negatively correlated with osteoblastic differentiation of mouse aortic vascular smooth muscle cells.<sup>48</sup> Whereas high phosphate environment suppressed miR-204 expression, overexpression of miR-204 decreased Runx-2 levels and alleviated high-phosphate induced calcification of smooth muscle cells. *In vivo*, administration of miR-204 mimetics to mice markedly attenuated vitamin D<sub>3</sub>-induced vascular calcification.<sup>48</sup> Interestingly, miR-204 levels are increased in M1 macrophages –induced with lipopolysaccharide plus IFN $\gamma$ – compared to M2 cells.<sup>42</sup> Thus, M1-dependent secretion of miR-204 may attenuate osteoblastic differentiation of precursor cells in the plaque by repressing Runx2-dependent osteogenic signaling in plaque smooth muscle cells.

## 5. Concluding remarks.

Calcification of atherosclerotic plaques adds to the complexity of the mechanisms mediating plaque growth and instability. Much progress has been made in understanding molecular and cellular mechanisms that underlie plaque calcification, which to a great extent recapitulate the processes that mediate bone formation. Macrophages have long been recognized as key cellular components of vascular calcification, but their role has been for the most part attributed to the release of cytokines and/or their capacity to contribute as osteoclast-like cells to the osteogenic process. The diversity of the macrophage population in the plaque setting obliges to explore the potentially divergent roles of polarized macrophages in osteogenic signaling. As discussed above, some recent studies have begun to provide evidence to help us understand such conundrum.

Interestingly, a number of miRs that have been associated to specific macrophage subsets have also emerged as potential

regulators of distinctive processes in the osteogenic mechanisms mediating plaque calcification. Whether these miRs can be secreted by distinct macrophage subsets and act in a paracrine manner on plaque smooth muscle cells to influence specific aspects of their osteogenic program is an attractive mechanism that merits investigation. Additional studies on the transcriptome of plaque macrophages are also needed to further our knowledge of subset-specific miRs and their potential link to calcification relevant events. *In vivo* validation of such miRs may lead to identification of potential therapeutic

targets to manipulate macrophage and/or smooth muscle cell osteogenic components to prevent or ameliorate plaque calcification.

#### Acknowledgments

This work was supported by NIH grant R01HL111877 (G.V.) and University of Toledo College of Medicine and Life Sciences.

**Conflict of interests** The authors declare no conflicts interest.

(Recibido: junio 2016.

Aceptado: julio 2016)

#### References

1. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016; 133:447-54.
2. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:2045-51.
3. Lu H, Daugherty A. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2014; 25:157-8.
4. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J* 2013; 34:719-28.
5. Schwartz SM, Galis ZS, Rosenfeld ME, Falk E. Plaque rupture in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:705-13.
6. Chen Y, Xu M, Wang T, et al. Advanced fibrosis associates with atherosclerosis in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* 2015; 241:145-50.
7. Vazquez G, Solanki S, Dube P, Smedlund K, Ampem P. On the roles of the transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) channel in endothelium and macrophages: Implications in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 2016; 898:185-99.
8. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:C13-8.
9. Rosenfeld ME, Averill MM, Bennett BJ, Schwartz SM. Progression and disruption of advanced atherosclerotic plaques in murine models. *Curr Drug Targets* 2008; 9:210-6.
10. Canfran-Duque A, Ramirez CM, Goedeke L, Lin CS, Fernandez-Hernando C. microRNAs and HDL life cycle. *Cardiovasc Res* 2014; 103:414-22.
11. Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNA control of high-density lipoprotein metabolism and function. *Circ Res* 2014; 114:183-92.
12. Vazquez G. Micro-RNAs and macrophage diversity in atherosclerosis: new players, new challenges...new opportunities for therapeutic intervention? *Biochem Biophys Res* 2015; 3:202-6.
13. Fukumoto S. [Vascular Calcification - Pathological Mechanism and Clinical Application - . Regulation of mineral metabolism



- and mineralization by FGF23]. *Clin Calcium* 2015; 25:687-91.
14. Sanchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, Ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone* 2015; 80:43-59.
  15. Lowery JW, Pazin D, Intini G, et al. The role of BMP2 signaling in the skeleton. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2011; 21:177-85.
  16. Shin V, Zebboudj AF, Bostrom K. Endothelial cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells. *J Vasc Res* 2004; 41:193-201.
  17. Byon CH, Sun Y, Chen J, et al. Runx2-upregulated receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in calcifying smooth muscle cells promotes migration and osteoclastic differentiation of macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31:1387-96.
  18. Deuell KA, Callegari A, Giachelli CM, Rosenfeld ME, Scatena M. RANKL enhances macrophage paracrine pro-calcific activity in high phosphate-treated smooth muscle cells: dependence on IL-6 and TNF-alpha. *J Vasc Res* 2012; 49:510-21.
  19. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:36-46.
  20. Gautier EL, Huby T, Witztum JL, et al. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation* 2009; 119:1795-804.
  21. Tano JY, Lee RH, Vazquez G. Macrophage function in atherosclerosis: potential roles of TRP channels. *Channels (Austin)* 2012; 6:141-8.
  22. Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage Diversity and Polarization in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29:1419-23.
  23. Gautier EL, Yvan-Charvet L. Understanding macrophage diversity at the ontogenic and transcriptomic levels. *Immunol Rev* 2014; 262:85-95.
  24. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; 122:787-95.
  25. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:709-21.
  26. Johnson JL, Newby AC. Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20:370-8.
  27. Gordon S, Mantovani A. Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes. *Eur J Immunol* 2011; 41:2470-2.
  28. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 2010; 5:e8852.
  29. Feig JE, Fisher EA. Laser capture microdissection for analysis of macrophage gene expression from atherosclerotic lesions. *Methods Mol Biol* 2013; 1027:123-35.
  30. Trogan E, Choudhury RP, Dansky HM, Rong JX, Breslow JL, Fisher EA. Laser capture microdissection analysis of gene expression in macrophages from atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99:2234-9.
  31. Gong L, Zhao Y, Zhang Y, Ruan Z. The Macrophage Polarization Regulates MSC Osteoblast Differentiation in vitro. *Ann Clin Lab Sci* 2016; 46:65-71.
  32. Champagne CM, Takebe J, Offenbacher S, Cooper LF. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone* 2002; 30:26-31.
  33. Dalmay T. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. *Essays Biochem* 2013; 54:29-38.
  34. Hennessy EJ, Moore KJ. Using microRNA as an alternative treatment for hyperlipidemia and cardiovascular disease: cardio-miRs in the pipeline. *J Cardiovasc Pharmacol* 2013; 62:247-54.
  35. Aranda JF, Madrigal-Matute J, Rotllan N, Fernández-Hernando C. MicroRNA modulation of lipid metabolism and oxidative stress in cardiometabolic diseases. *Free Radic Biol Med* 2013; 64:31-9.
  36. Wang JJ, Wang ZY, Chen R, et al. Macrophage-secreted exosomes delivering miRNA-21 inhibitor can regulate BGC-823 cell proliferation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16:4203-9.

37. Ismail N, Wang Y, Dakhllallah D, et al. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 2013; 121:984-95.
38. McDonald MK, Tian Y, Qureshi RA, et al. Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain. *Pain* 2014; 155:1527-39.
39. Goettsch C, Rauner M, Pacyna N, Hempel U, Bornstein SR, Hofbauer LC. miR-125b regulates calcification of vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 2011; 179:1594-600.
40. Wen P, Cao H, Fang L, et al. miR-125b/Ets1 axis regulates transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells in a high-phosphate environment. *Exp Cell Res* 2014; 322:302-12.
41. Guo LJ, Liao L, Yang L, Li Y, Jiang TJ. MiR-125a TNF receptor-associated factor 6 to inhibit osteoclastogenesis. *Exp Cell Res* 2014; 321:142-52.
42. Zhang Y, Zhang M, Zhong M, Suo Q, Lv K. Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. *Int J Mol Med* 2013; 31:797-802.
43. Banerjee S, Cui H, Xie N, et al. miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation. *J Biol Chem* 2013; 288:35428-36.
44. Seimon TA, Obstfeld A, Moore KJ, Golenbock DT, Tabas I. Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103:19794-9.
45. Eigsti RL, Sudan B, Wilson ME, Graff JW. Regulation of activation-associated microRNA accumulation rates during monocyte-to-macrophage differentiation. *J Biol Chem* 2014; 289:28433-47.
46. Mackenzie NC, Staines KA, Zhu D, Genever P, Macrae VE. miRNA-221 and miRNA-222 synergistically function to promote vascular calcification. *Cell Biochem Funct* 2014; 32:209-16.
47. Rangrez AY, M'Baya-Moutoula E, Metzinger-Le Meuth V, et al. Inorganic phosphate accelerates the migration of vascular smooth muscle cells: evidence for the involvement of miR-223. *PLoS One* 2012; 7:e47807.
48. Cui RR, Li SJ, Liu LJ, et al. MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res* 2012; 96:320-9.



## CASUÍSTICAS / Case Reports

# TUBERCULOSIS OSTEOARTICULAR Y OSIFICACIONES HETEROTÓPICAS: REPORTE DE UN CASO

Bárbara Braun,<sup>1</sup> Ignacio Javier Gandino,<sup>2\*</sup> María Eugenia Oregui,<sup>1</sup> Alejandro Luis Cayetti,<sup>3</sup> Sebastián Andrés Muñoz,<sup>1</sup> Marta Gianni,<sup>1</sup> José Luis Presas.<sup>1</sup>

1. Servicio de Clínica Médica-División "A", Hospital General de Agudos Juan A. Fernández. 2. Sección Reumatología, Servicio Clínica Médica, Hospital Italiano de Buenos Aires. 3. Servicio de Reumatología, Instituto de Rehabilitación Psicosfísica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

### Resumen

La osificación heterotópica es una condición patológica que conduce al desarrollo de hueso en el tejido blando. En la piel se denomina osteoma cutis. Estas lesiones se clasifican en primarias o secundarias. Las causas secundarias constituyen el 85% y son consecuencia de enfermedades inflamatorias, infecciones, tumores, traumatismos, lesiones de médula espinal y cirugías. Si bien la osificación heterotópica es benigna e infrecuente, puede ser una enfermedad debilitante que, asociada a dolor y rigidez, provoque mayor comorbilidad en relación con la enfermedad que la desencadenó. Comunicamos el caso de un paciente que padeció osteoma cutis asociado a tuberculosis osteoarticular.

**Palabras clave:** tuberculosis, osteoarticular, osificación heterotópica.

### Abstract

#### **HETEROTOPIC OSSIFICATION AND OSTEOARTICULAR TUBERCULOSIS: CASE REPORT**

Heterotopic ossification is a pathologic condition that leads bone formation in soft tissue. In particular, osteoma cutis, which can be primary or secondary, occurs when ossification is found in the skin. Secondary lesions account 85% of the cases described and they are by inflammatory diseases, infections, tumors, traumas, spinal cord lesions and surgeries. Whereas heterotopic ossification is benign and rare, it may result in wasting sickness that in combination with pain and stiffness, adding comorbidity to the disease that triggers. We report here a patient suffering osteomas cutis and osteoarticular tuberculosis.

**Key words:** tuberculosis, osteoarticular, heterotopic ossification.

\* Dirección postal: Sección Reumatología, Servicio Clínica Médica, Hospital Italiano de Buenos Aires. Perón 4190. Buenos Aires, Argentina. CP 1181.

Correo electrónico: [ignacio.gandino@hospitalitaliano.org.ar](mailto:ignacio.gandino@hospitalitaliano.org.ar)

## Introducción

En los últimos años se observó un resurgimiento de la tuberculosis (TBC) en el mundo, y debido a esto, los casos de TBC extrapulmonar han aumentado. Los principales factores predisponentes de este fenómeno son las personas ańosas, los menores de 15 años, los inmunocomprometidos, los infectados por HIV, los pacientes con tratamiento inmunosupresor y las enfermedades sistémicas debilitantes como la desnutrición.<sup>1,2</sup> La TBC osteoarticular constituye entre el 2% y el 10% de las formas de TBC; el compromiso vertebral, las caderas y las rodillas son los sitios más afectados. Solo la mitad de estos pacientes sufren la forma pulmonar.<sup>3</sup> Tres microorganismos prevalecen: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium bovis*. Sin lugar a dudas, el primero es el más frecuente.<sup>1</sup> La TBC osteoarticular, en países desarrollados, afecta más a personas mayores de 55 años, mientras que en inmigrantes es más común en individuos más jóvenes (20-35 años).<sup>4</sup>

La osificación heterotópica es una condición patológica que conduce al desarrollo de hueso en tejido blando en respuesta a lesión, inflamación o enfermedad genética.<sup>5-8</sup> Fue descrita por primera vez por Wilchens en 1858.<sup>6</sup> Los sitios más frecuentemente comprometidos son los músculos, tendones y ligamentos.<sup>7</sup> El hueso formado es laminar y es característica la elevación de la fosfatasa alcalina dos a tres semanas después de haber comenzado el proceso de osificación.<sup>8</sup> Las manifestaciones clínicas que refieren los pacientes son síntomas inespecíficos, como eritema, aumento de temperatura local, dolor y fiebre.<sup>8</sup>

El objetivo de este artículo es describir una manifestación clínica infrecuente en una enfermedad de alta prevalencia como es la TBC.

## Caso clínico

Un paciente masculino de 35 años sin antecedentes de relevancia consultó por dolor e impotencia funcional de cadera y codo

izquierdos de 9 meses de evolución. En los últimos 30 días agregó fiebre vespertina. Al examen físico presentaba dolor, tumefacción, calor e impotencia funcional en ambas articulaciones; el codo izquierdo mostraba una región fluctuante periarticular con secreción de material blanquecino (Figura 1). A la palpación, la piel exhibía placas duro pétreas en muñecas, codos, región escapular, hombros, regiones inguinales y flanco derecho. Se realizó el laboratorio convencional, que informó la eritrosedimentación de 105 mm/h, la proteína C reactiva elevada y el hepatograma con la fosfatasa alcalina normal. El calcio, el fósforo, la hormona paratiroidea y la vitamina D se observaron dentro de los parámetros normales. Las radiografías revelaron calcificaciones generalizadas y destrucción articular en la cadera y el codo izquierdo (Figuras 2 y 3). La biopsia de las lesiones duro pétreas evidenció osificaciones heterotópicas. El examen directo de la secreción blanquecina constató bacilos por tinción de Ziehl Nielsen y el cultivo determinó la presencia del *Mycobacterium tuberculosis*. Durante su internación inició el tratamiento con fármacos antituberculosos, se realizó el drenaje quirúrgico del material caseoso de la cadera y el codo y se efectuó exéresis de la cabeza femoral y la cúpula radial. Evolucionó sin fiebre y con mejoría del dolor. Finalmente fue externado.

## Discusión

Las calcificaciones y osificaciones cutáneas (calcinosis cutis y osteoma cutis, respectivamente) tienen condiciones asociadas y procesos patogénicos similares.<sup>5</sup> La etiopatogenia de estos fenómenos no está del todo dilucidada, y la literatura tampoco resulta clara acerca de estas entidades al superponer ambos fenómenos. Se postula que un desencadenante, como una lesión, una cirugía o una enfermedad sistémica, provocaría la liberación de mediadores celulares como las prostaglandinas y la proteína ósea morfogenética (BMP). Estos mediadores tendrían como fina-



**Figura 1.** Codo izquierdo con secreción de material blanquecino (caseum) en un paciente con tuberculosis osteoarticular.



**Figura 2.** Osificaciones periarticulares y destrucción de cadera izquierda en un paciente con tuberculosis osteoarticular.



**Figura 3.** Osificaciones periarticulares en codo izquierdo asociadas a TBC.

lidad reclutar células mesenquimáticas pluripotentes estimulándolas a que se diferencien en condrocitos y en osteoblastos, con la consiguiente formación de las osificaciones.<sup>5,7,8</sup> Las Tablas 1 y 2 muestran las clasificaciones de ambos fenómenos.

El osteoma cutis puede ser primario o secundario. Ambos son infrecuentes. El primario se subclasifica en osteodistrofia hereditaria de Albright y la no asociada a esta entidad. Con respecto a las causas secundarias, estas constituyen el 85% de las osificaciones cutáneas.<sup>5</sup> Son consecuencia de enfermedades inflamatorias (esclerosis sistémica, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis), infecciones (sífilis, abscesos, algunos parásitos), tumores (metástasis, carcinoma basocelular), traumatismos, lesiones de médula espinal y cirugías (artroplastias).<sup>5,8,9</sup>

En el caso particular de la asociación de TBC pulmonar y extrapulmonar con osificaciones heterotópicas existen algunos reportes que vinculan estos fenómenos.<sup>10-18</sup>

Nos parece importante destacar que, si bien la osificación heterotópica es benigna e infrecuente, puede convertirse en una enfermedad debilitante que lleve al dolor y a la rigidez, determinando de esta manera una mayor comorbilidad en relación con la enfermedad que la desencadenó.<sup>8</sup> Aún cuando nuestro paciente recibió el tratamiento para la TBC con buena respuesta, no es irrelevante mencionar que la limitación articular que sostuvo después del tratamiento quirúrgico derivó en postración y una gran discapacidad funcional. Más aún, la recurrencia de las osificaciones es algo frecuente después de su remoción quirúrgica.<sup>19</sup>

Se han propuesto la radioterapia y los antiinflamatorios no esteroides como potenciales tratamientos que podrían limitar el proceso que conduce a la osificación por su efecto inhibitorio de las prostaglandinas.<sup>19,20</sup> Sin embargo, su eficacia no ha sido totalmente comprobada. Los estudios futuros podrán aportar mayor conocimiento sobre este fenómeno para poder atenuarlo o prevenirlo.

**Tabla 1.** Clasificación de las osificaciones cutáneas.

---

Primario:

- a) Osteodistrofia hereditaria de Albright
- b) No asociado a osteodistrofia hereditaria de Albright
  - 1. Osteomas múltiples miliares de la cara
  - 2. Osteoma solitario
  - 3. Osteoma diseminado
  - 4. Osteoma en placas

Secundario:

- a) Enfermedades inflamatorias (esclerosis sistémica, dermatomiositis, lupus eritematoso sistémico)
  - b) Infecciones (acné severo, sífilis tardía)
  - c) Tumores (epitelioma basocelular, epitelioma de Malherbe o pilomatricoma, histiocitomas)
  - d) Cicatrices
- 

Adaptado de Fazeli P, Harvell J, Jacobs MB. Osteoma cutis (cutaneous ossification). [Ref.5]

**Tabla 2.** Clasificación de las calcificaciones cutáneas.

---

Distrófica:

- 1. Esclerosis sistémica
- 2. Paniculitis
- 3. Ehlers Danlos
- 4. Neoplasias cutáneas
- 5. Traumatismos
- 6. Infecciones

Metastásica:

- 1. Enfermedad renal crónica
- 2. Sarcoidosis
- 3. Osteodistrofia hereditaria de Albright
- 4. Neoplasias
- 5. Pseudohiperparatiroidismo

Idiopática:

- 1. Nódulos calcificados subepidérmicos
- 2. Calcificaciones idiopáticas del escroto
- 3. Calcinosis tumoral
- 4. Heteroplasia ósea progresiva

Iatrogénica:

- Tratamientos con compuestos cálcicos
- 

Adaptado de Fazeli P, Harvell J, Jacobs MB. Osteoma cutis (cutaneous ossification). [Ref.5]



Por otro lado, también es controvertido el reemplazo total de cadera en pacientes con TBC activa. El principal problema radica en la TBC latente residual. Algunos investigadores refieren que la probabilidad de reactivación es de hasta 10 o 20 años después del reemplazo<sup>21-24</sup> y para otros es una posibilidad que siempre está presente. En dos pequeñas series no se evidencia reactivación pero se pone énfasis en la necesidad de un debridamiento minucioso a fin de evitar este fenómeno.<sup>23,25</sup> Muchos autores sugieren realizar antibioterapia preoperatoria 1 a 3 meses antes de la cirugía. La antibioterapia posquirúrgica es esencial para controlar la infección.<sup>23,25,26</sup> La Organización Mundial de la Salud (OMS) re-

comienda un tratamiento por 6 meses para la TBC extrapulmonar,<sup>27</sup> mientras que los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) proponen 6 a 9 meses.<sup>28</sup> Todavía queda mucho por investigar debido a que los estudios son limitados por ser series de pocos pacientes, con cortos períodos de seguimiento, retrospectivos y sin criterios diagnósticos y terapéuticos estandarizados.<sup>29</sup>

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

(Recibido: enero 2016.

Aceptado: julio 2016.)

## Referencias

1. Watts HG, Lifeso MR. Current concepts review-tuberculosis of bones and joints. *J Bone Joint Surg. Am* 1996; 78:288-99.
2. Malavia AN, Kotwal PP. Arthritis associated with tuberculosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003; 17:319-43.
3. Garcia S, Combalia A. Unusual locations of osteoarticular tuberculosis. *Arch Orthop Traum Surg* 1997; 115:321-3.
4. Pigrau Serrallach C, Rodríguez Pardo D. Bone and joint tuberculosis. *Eur Spine J* 2013; 22:556-66.
5. Fazeli P, Harvell J, Jacobs MB. Osteoma cutis (cutaneous ossification). *West J Med* 1999; 171:243-5.
6. Roy PE, Tchou PK. Osteoma Cutis. *Can Med Assoc J* 1967; 97:81-3.
7. Medici D, Olsen BR. The role of endothelial-mesenchymal transition in heterotopic ossification. *J Bone Miner Res* 2012; 27:1619-22.
8. Zychowicz ME. Pathophysiology of heterotopic ossification. *Orthop. Nurs* 2013; 32:173-7.
9. Azriel Mira S, Martínez Díaz-Guerra G, Jódar Gimeno E, Hawkins Carranza YF. Calcificaciones y osificaciones ectópicas. *Rev Esp Enferm Metab Óseas* 2001; 10:168-72.
10. Coskun O, Safaz I. Heterotopic ossification in a patient with tuberculous meningoencephalitis. *Inter Med* 2008; 47:2195-6.
11. Chow LT, Shum BS, Chow WH, Tso CB. Diffuse pulmonary ossification--a rare complication of tuberculosis. *Histopathology* 1992; 20:435-7.
12. Busilacchi A, Bottegoni C, Gigante A. Arthroscopic management of heterotopic ossification of the subscapularis tendon in a patient with tuberculosis: a case report. *J Shoulder Elbow Surg* 2012; 21:e1-5.
13. Chen Y, Lu XH, Yang LL, Chen DY. Ossification of ligamentum flavum related to thoracic kyphosis after tuberculosis: case report and review of the literature. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009; 34:E41-4.
14. Buchanan WM. Ossification of a tuberculoma of cerebellum: report of a case. *Cent Afr J Med* 1969; 15:224-6.
15. Adoni A, Polliac A. Heterotopic bone formation in tuberculous salpingitis. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 104:918-9.
16. Dolchuk NZ. [Pathologic ossification in tuberculosis of bones and joints]. *Probl Tuberc* 1966; 44:29-33.
17. Corti A, Alfieri G. [Unusual case of osseous

- metaplasia in a fallopian tube affected by a tuberculous process]. *Ann Ostet Ginecol Med Perinat* 1964; 86:163-71.
18. Selekler K, Erbenji A, Sariba O, Onol B. Giant calcified and ossified midbrain tuberculoma. Case report. *J Neurosurg* 1983; 58:133-5.
  19. Vanden Bossche L, Vanderstraeten G. Heterotopic ossification: a review. *J Rehabil Med* 2005; 37:129-36.
  20. Jayasundara JASB, Punchihewa GL, de Alwis DS, Renuka MDS. Short-term outcome after resection of neurogenic heterotopic ossification around the hips and elbow following encephalitis. *Singapore Med J* 2012; 53:e97.
  21. Johnson R, Barnes KL, Owen R. Reactivation of tuberculosis after total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1979; 61:148-50.
  22. Jupiter JB, Karchmer AW, Lowell JD, Harris WH. Total hip arthroplasty in the treatment of adult hips with current or quiescent sepsis. *J Bone Joint Surg Am* 1981; 63:194-200.
  23. Kim YH, Han DY, Park BM. Total hip arthroplasty for tuberculous coxarthrosis. *J Bone Joint Surg Am* 1987; 69:718-27.
  24. Hardinge K, Cleary J, Charnley J. Low-friction arthroplasty for healed septic and tuberculous arthritis. *J Bone Joint Surg Br* 1979; 61:144-7.
  25. Yoon TR, Rowe SM, Santosa SB, Jung ST, Seon JK. Immediate cementless total hip arthroplasty for the treatment of active tuberculosis. *J Arthroplasty* 2005; 20:923-6.
  26. Tuli SM (ed). Tuberculosis of the Skeletal System (Bones, Joints, Spine and Bursal Sheaths). 2nd ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers; 1997.
  27. World Health Organization. Tuberculosis: global tuberculosis control report 2009.
  28. American Thoracic Society, Centers for Disease Control, Prevention/Infectious Diseases Society of America. Treatment of tuberculosis. MMWR Recommendations and Reports June 20, 2003/52(RR11):1-77.
  29. Neogi DS, Yadav CS, Ashok Kumar, Khan SA, Rastogi S. Total Hip Arthroplasty in Patients with Active Tuberculosis of the Hip with Advanced Arthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2010; 468:605-12.



## CASUÍSTICAS / Case Reports

# SÍNDROME TAR EN PACIENTE ADULTO SIN DIAGNÓSTICO PREVIOS: PRESENTACIÓN DE UN CASO

Carina Colombo Berra,<sup>1\*</sup> Sebastián Bruera,<sup>1</sup> Marilin Destéfano Hartman,<sup>1</sup> Victoria Dupuy,<sup>2</sup> Sabrina Bourquez,<sup>2</sup> Elisa Novatti,<sup>2</sup> Federico Baldoma,<sup>2</sup> Mauro Tortolo,<sup>2</sup> Juan Ferrer.<sup>2</sup>

1. Consultorios de Endocrinología y Metabolismo Óseo, Hospital Alejandro Gutiérrez, Venado Tuerto, Argentina. 2. Servicio de Clínica Médica, Hospital Alejandro Gutiérrez, Venado Tuerto, Argentina.

### Resumen

El síndrome TAR (*Thrombocytopenia with Absent Radius*) es una patología congénita autosómica recesiva infrecuente, caracterizada por trombocitopenia con aplasia de radio bilateral. Incluye malformaciones esqueléticas, renales, hematológicas y cardíacas. Su base genética todavía no está clara. Presentamos el caso de una paciente sin diagnóstico previo de síndrome TAR que llega a la consulta, tras haber sido evaluada por varios profesionales médicos, para el diagnóstico y el tratamiento de trastornos hematológicos, que finalmente estuvieron asociados a su síndrome congénito. **Palabras clave:** trombocitopenia, aplasia radial.

### Abstract

**TAR SYNDROME IN AN ADULT PATIENT WITHOUT PREVIOUS DIAGNOSIS, A CASE REPORT.**

*Thrombocytopenia with Absent Radius (TAR) is a rare autosomic recessive disease characterized by thrombocytopenia and*

*bilateral radial aplasia, which includes skeletal, hematologic, renal and cardiac abnormalities. The genetics bases of this syndrome remain unclear. We report here a patient without a previous diagnosis of TAR syndrome who was seen in the clinic, after being evaluated by several medical professionals for diagnosis and treatment of blood disorders, which eventually were associated with the congenital syndrome.*

**Key words:** *thrombocytopenia, radial aplasia.*

El síndrome TAR es una rara condición genética, autosómica recesiva, que se caracteriza por agenesia radial bilateral asociada a trombocitopenia amegacariocítica. Además, suelen estar presentes malformaciones en miembros inferiores, cardiovasculares, neurológicas, gastrointestinales y vasculares. En general, es una patología de reporte pediátrico y neonatal, ya que se diagnostica a temprana edad.<sup>1</sup>

El síndrome TAR o trombocitopenia con aplasia de radio se encuentra descrito en el catálogo MacKusick de síndromes polimalfor-

\* Dirección postal: Hospital Alejandro Gutiérrez. Gutiérrez 55, Venado Tuerto, Argentina.  
Correo electrónico: [pellegrinoberra@cevt.com.ar](mailto:pellegrinoberra@cevt.com.ar)

mativos congénitos bajo el número 274000. Se describe como una trombocitopenia de menos de 100.000 plaquetas, ausencia o hipoplasia del radio bilateral, desviación radial de las manos, hipoplasia de los huesos carpianos, aplasia o hipoplasia del cúbito, acortamiento del húmero, luxación de la cadera, torsión tibial, subluxación de las rodillas, luxación de la rótula, anomalías de las vértebras y las costillas, hipoplasia del maxilar, micrognatia, tetralogía de Fallot, anomalías de dermatoglifos, comunicación interauricular, aplasia del húmero, hipoplasia de los huesos largos de los miembros inferiores, tetrafocomielia, retraso mental, glaucoma, *nevus flameus*, estrabismo, sindactilia, anomalías renales, paladar hendido y atresia de duodeno.<sup>1</sup> También se describe baja talla, braquicefalia o microcefalia, hipoplasia de omóplatos e hipertelorismo.

Como se ha referido, representa una forma de herencia autosómica recesiva, con muy pocos casos de transmisión vertical no muy claros entre padre e hijo, o tío y sobrino. El riesgo de repetición entre hermanos es de un 25%. La relación mujer-hombre es 7:5, ligeramente superior para mujeres.<sup>1</sup>

La primera descripción de ausencia de radio con trombocitopenia fue realizada en 1956 por Gross y cols. en hermanos. Posteriormente se buscó diferenciar con el síndrome de Fanconi. En 1969 se describieron cuatro hermanas portadoras del cuadro y Hall y cols. lo denominaron mediante el acrónimo TAR (*Thrombocytopenic with Absent Radius*). Desde entonces se han descrito en la literatura médica más de cien casos.<sup>2</sup>

Presentamos un caso de síndrome TAR en una paciente adulta, hasta el momento no diagnosticada como tal, con alteraciones hematológicas asociadas.

### Caso clínico

Se trata de una paciente de sexo femenino, de 35 años, que es derivada a nuestro nosocomio por advertirse un recuento leucocitario elevado y trombocitopenia asociada a

gonalgia de días de evolución. Entre sus antecedentes refería aplasia congénita bilateral de radio. Evaluada en el examen físico, se observaron antebrazos hipoplásicos, con desviación lateral de ambas manos (Figuras 1 y 2).



**Figura 1.** Paciente con síndrome TAR; presenta antebrazos hipoplásicos, con desviación lateral de ambos brazos.



**Figura 2.** Paciente con síndrome TAR, que presenta desviación lateral de ambas manos.

Presentaba dolor espontáneo al movimiento activo y pasivo de ambas rodillas y dolor a la flexión de ambas caderas, pero sin signos de flogosis. Mostraba también múltiples lesiones petequiales difusas.



En el laboratorio de ingreso se obtuvo un recuento leucocitario de 32 000 glóbulos blancos con 70% de neutrófilos sin formas inmaduras, y trombocitopenia de 53 200 plaquetas, con agregación normal; con glucemia, función renal, eritrosedimentación y ionograma normales, así como el resto de la analítica solicitada, dentro de la cual constaban parámetros de fosfatasa alcalina, calcemia y fosfatemia normales.

Se realizaron radiografías de ambos miembros superiores con ausencia bilateral de radios, hipoplasia cubital bilateral y fusión de cuarto y quinto metacarpiano derecho, en tanto que en los miembros inferiores solo se visualizaron signos incipientes de gonartrosis (Figuras 3 y 4). El resto de las imágenes óseas no presentó alteraciones. No se realizó evaluación por densitometría ósea.

Se completaron los estudios con ecografía abdominal y renal, y evaluación cardiológica sin registrar alteraciones.

La trombocitopenia y la leucocitosis se interpretaron como parte del mismo síndrome, y se decidió no adoptar ninguna conducta tera-

péutica sobre dichas alteraciones; la paciente fue externada totalmente asintomática y con valores de glóbulos rojos y plaquetas similares a su ingreso.

Reingresó meses después de haber cursado un embarazo totalmente normal, y con un recién nacido sin evidencias de ser portador del síndrome. En relación con su familia refirió progenitores sanos, un tío materno con diagnóstico de pie *bot* y el resto sin alteraciones. Actualmente se le realizan controles periódicos, sin ninguna manifestación agregada.

### Discusión

Si bien el síndrome TAR es un cuadro de fácil sospecha por presentar alteraciones morfológicas groseras, como la aplasia bilateral de radio, es una entidad de poca difusión entre los médicos clínicos debido a que habitualmente constituye un síndrome de afectación neonatal y pediátrica. Nuestra paciente presentaba una trombocitopenia de larga data a la cual agregó leucocitosis marcada que la motivó a recorrer múltiples localidades para ser evaluada por diferentes médicos, requi-



**Figura 3.** Radiografía de mano y antebrazo derecho de la paciente con síndrome TAR donde, se aprecia claramente la fusión metacarpiana y la ausencia de radio.



**Figura 4.** Radiografía de mano y antebrazo derecho de la paciente con síndrome TAR: se observa la desviación de manos.

riendo exámenes complementarios por sospecharse un trastorno oncohematológico; esto provocó gastos económicos, ausentismo laboral y una situación de estrés innecesarios para ella, todas cuestiones que pueden ser evitadas con el conocimiento del síndrome.

Entre los diagnósticos diferenciales para plantear se menciona la anemia de Fanconi, que presenta trombocitopenia, anemia, aplasia de radios y aplasia o hipoplasia de pulgares; el síndrome de Holt Oran donde se advierte ausencia de pulgares con aplasia radial; la focomelia y el síndrome de Roberts con malformaciones óseas y orgánicas varias, entre otras. De hecho, durante muchos años, los pacientes con el síndrome TAR eran considerados variantes de la anemia de Fanconi.<sup>3,5</sup>

Como se mencionó previamente, no está claramente definida su base genética, si bien se cuenta con publicaciones que refieren una microdelección cromosómica en el cromosoma 1q21.1, referida en al menos 30 pacientes portadores de este síndrome. También, en algunos casos, se ha presentado como una herencia parental; pero en otros, aproximadamente un treinta por ciento, como una mutación *de*

*novo*, requiriendo que además de la citada alteración cromosómica se manifieste alguna otra falla. Otro dato para tener en cuenta es que la alteración hereditaria puede provenir tanto de la línea materna como de la paterna. Actualmente se está focalizando la atención en genes más conocidos y asociados a esta patología (entre ellos el más repetido es el RBM8A, que desempeñaría un papel crucial en el desarrollo embrionario) y en otros como el PIAS3 y el Lix1L, cuyo rol se relacionaría con el fenotipo particular de estos pacientes y con el medio ambiente cromosómico.<sup>6-10</sup>

Describimos este caso con la finalidad de reportar un síndrome infrecuente, que es desconocido en la población adulta. La gran diversidad de trastornos clínicos, imagenológicos y analíticos que presenta induce la investigación de alteraciones totalmente esperables para estos individuos.

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

(Recibido: diciembre 2015.

Aceptado: junio 2016.)

## Referencias

1. Joaquín S, Casas J. Síndrome TAR. En: Ayuntamiento de Barcelona (eds). Catálogo de síndromes polimalformativos congénitos con anomalías oculares. Barcelona: Instituto Municipal de Salud Pública, 2010. p. 131-2.
2. Martínez-Frías L, Bermejo-Sánchez E, García García M, et al. Estudio epidemiológico del síndrome de trombocitopenia con aplasia de radio en España. *An Esp Pediatr* 1998; 49:619-23.
3. Shaw S, Oliver R. Congenital hypoplastic thrombocytopenia with skeletal deformities in siblings. *Blood* 1959; 14:374-7.
4. Schnur RE, Eunpu DL, Zackai EH. Thrombocytopenia with absent radio in a boy and his uncle. *Am J Med Genet* 1987; 28:117-23.
5. Busel JB, Kuter DJ, Sekeres MA, et al. Study of AMG531 in thrombocytopenic patients with low risk myelodysplastic syndrome. Uptodate including extended treatment. *Blood* 2007; Ash Annual Meeting Abstracts: 110-250.
6. Tassano E, Gimelli S, Divizia MT, et al. Thrombocytopenia-absent radius (TAR) syndrome due to compound inheritance for a 1q21.1 microdeletion and a low frequency noncoding RBM8A SNP. A new familial case. *Molecular Cytogenetics* 2015; 8:87.



7. Klopocki E, Schulze H, Strauss G, et al. Complex inheritance pattern resembling autosomic recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet* 2007; 80:232-40.
8. Albers CA, Newbury-Ecob R, Ouwehand WH, Ghevaert C. New Insights into the genetics basis of TAR (thrombocytopenia-absent radius) syndrome. *Cur Opin Genet Dev* 2013; 23:316-23.
9. Albers CA, Paul DS, Schulze H, et al. Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *NAT Genet* 2012; 44:435-9.
10. Houeijeh A, Andrieux J, Saugier-veber P, et al. Trombocytopenia-absent radius (TAR) syndrome: A clinical genetic series of 14 further cases. Impact of the associated 1q21.1 deletion on the genetic counseling. *Eur J Med Gen* 2011; 54:471-7.

## CARTAS AL COMITÉ DE REDACCIÓN / *Letters to the Editor*

# EL MANEJO DE LA OSTEOPOROSIS EN PACIENTES TRATADOS CON BIFOSFONATOS A LARGO PLAZO

Sra. editora, agradeceré se publique esta carta de interés para la comunidad médica.

Los bifosfonatos (BF) son los medicamentos más comúnmente utilizados para la osteoporosis. Están en uso desde hace 4 décadas.<sup>1</sup> En los últimos años se ha tomado conocimiento de algunas complicaciones que pueden aparecer después del tratamiento prolongado con BF. Un informe reciente de la Asociación Americana para la Investigación Ósea y Mineral (ASBMR) proporciona una guía sobre la duración de la terapia con BF desde una perspectiva de riesgo-beneficio, y me parece útil que los lectores de *Actualizaciones en Osteología* conozcan someramente dicho artículo.<sup>2</sup> A continuación transcribo el resumen en castellano:

Dos ensayos proporcionaron pruebas para el uso de BF a largo plazo. En el *Fracture Intervention Trial Long-term Extension* (FLEX), las mujeres posmenopáusicas que recibieron alendronato durante 10 años tuvieron menos fracturas vertebrales clínicas que las que cambiaron a placebo después de 5 años. En la extensión del estudio HORIZON, las mujeres que recibieron 6 inyecciones anuales de ácido zoledrónico tuvieron menos fracturas vertebrales morfométricas en comparación con las cambiadas a placebo después de 3 años. La baja densidad mineral ósea en cadera (T-score entre -2 y -2.5 en el FLEX y por debajo de -2.5

en la extensión del HORIZON) predijo una respuesta beneficiosa a la terapia continuada. Por lo tanto, el Grupo de Trabajo sugiere que, después de 5 años de BF por vía oral o de 3 años con BF intravenosos, debe reevaluarse el riesgo. En las mujeres con alto riesgo, por ejemplo las de mayor edad, las que tienen un bajo T-score en cadera o un puntaje indicativo de alto riesgo de fractura, las que han tenido una fractura osteopórtica mayor previa, o que han sufrido una fractura durante la terapia, debe considerarse la continuación del tratamiento durante un máximo de 10 años (por vía oral) o de 6 años (por vía intravenosa), con evaluación periódica. El riesgo de fractura femoral atípica, pero no osteonecrosis de la mandíbula, claramente aumenta con la duración del tratamiento con BF, pero estos eventos infrecuentes se ven compensados por la reducción del riesgo de fracturas vertebrales en pacientes de alto riesgo. Para las mujeres que no tienen alto riesgo de fractura después de 3 a 5 años de tratamiento con BF, se puede recomendar un descanso del fármaco durante 2 o 3 años. El enfoque sugerido para el uso de BF a largo plazo se basa en pruebas limitadas, solo considera la reducción de fracturas vertebrales en mujeres posmenopáusicas en su mayoría blancas y no reemplaza la necesidad de juicio



clínico. Puede aplicarse a hombres y a pacientes con osteoporosis inducida por glucocorticoides, con algunas adaptaciones. Es poco probable que los ensayos futuros proporcionen datos para la formulación de recomendaciones definitivas.

**Dr. Ariel Sánchez**  
Centro de Endocrinología.  
Rosario. Argentina.

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

Recibido: junio 2016.  
Aceptado: agosto 2016.

#### Referencias

1. Fleisch H. Bisphosphonates - History and experimental basis. *Bone* 1987; 8:S23-8.
2. Adler RA, El-Hajj Fuleihan G, Bauer DC, et al. Managing osteoporosis in patients on long-term bisphosphonate treatment: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 2016; 31:16-35.

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

## AUTHOR GUIDELINES

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **POLÍTICAS EDITORIALES**

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

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

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

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

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

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

## **EDITORIAL POLICIES**

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

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

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

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

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

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)