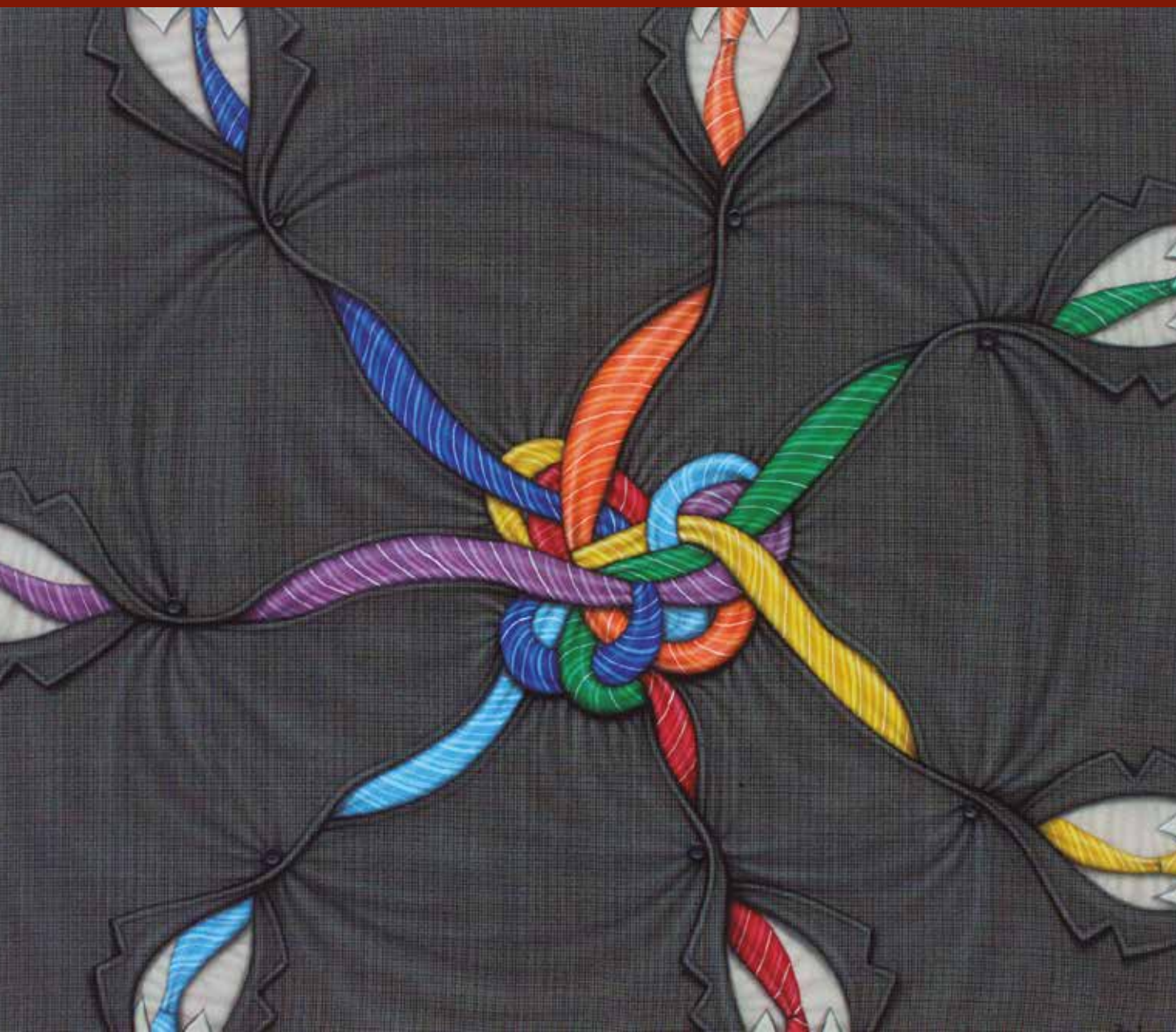


ACTUALIZACIONES EN OSTEOLÓGÍA

Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral

VOL. 10, N° 2 - mayo / agosto 2014

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

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLÓGÍA

Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.



Ernesto Bertani
En equipo, 1997
Acrílico sobre casimir, 100 x 120 cm
www.ernestobertani.com.ar
Agradecimiento a Colección Zurbaran,
Cerrito 1522, CABA (www.zurbaran.com.ar)

VOL. 10, Nº 2
mayo / agosto 2014
ISSN 1669-8975 (Print); ISSN 1669-8983 (Online)
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. 10, Nº 2

mayo / agosto 2014

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

www.osteologia.org.ar

Rosario (Santa Fe), Argentina

Aparición: cuatrimestral

Directora: 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.

Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral

PROPIETARIO: Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral

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

www.aaomm.org.ar / info@aaomm.org.ar

Actualizaciones en Osteología es el órgano científico de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Aceptará 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 (Artículos originales, Artículos de revisión, Comunicaciones Breves, Casuísticas, Consensos y Educación en Osteología, Controversias, Imágenes en Osteología, Editoriales, Cartas al Editor, Comentarios Bibliográficos, Sección Cultural).

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. 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. Asimismo, para la reproducción escrita del material de la revista se deberá solicitar la autorización pertinente.

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

Actualizaciones en Osteología is the scientific journal of the Argentina Association of Osteology and Mineral Metabolism (AAOMM). Accept for publication papers written in Spanish or English about clinical and experimental aspects within the osteology and mineral metabolism. The articles should be original, meet the uniform requirements for manuscript submission and be included in some sections of the journal (Original Articles, Review Articles, Short Communications, Case Reports, Consense Document and Osteology Education, Controversies, Images in Osteology, Editorials, Letters to Editor, Bibliographic Comments, Cultural Section).

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 texts of the articles in this journal without asking prior permission from the publisher or the author. 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. Also, for written reproduction a Journal authorization must be request.

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

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Publicación de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

DIRECTORA

Luisa Carmen Plantalech

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

DIRECTORES ASOCIADOS

Lucas R. M. Brun

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina. editor-asociado@osteologia.org.ar

Alfredo Rigalli

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina. Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). editor-asociado@osteologia.org.ar

SECRETARIA DE REDACCIÓN

María Lorena Brance

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

ASISTENTE COMITÉ EDITORIAL

Maela Lupo

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

CORRECTORA DE TEXTO

Prof. María Isabel Siracusa. maisasiracusa@yahoo.com.ar

CUERPO EDITORIAL

Alicia Bagur

Centro de Osteopatías Médicas Dr. Carlos Mautalen. Buenos Aires, Argentina.

Teresita Bellido

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

Ricardo Boland

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina. Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Haraldo Claus Hermberg

Servicio de Endocrinología y Metabolismo del Hospital Alemán. Buenos Aires, Argentina.

Adriana Dusso

Investigador Senior. Laboratorio de Nefrología Experimental. IRB Lleida (Instituto de Investigaciones Biomédicas de Lleida). Fundacion Privada Dr. Pifarré y Hospital Universitario Arnau de Vilanova. Facultad de Medicina. Universidad de Lleida. Lleida. España.

José Luis Ferretti

Director del Centro de Estudios de Metabolismo Fosfocálcico (CEMFoC). Hospital del Centenario. Rosario. Argentina. Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y del CIUNR.

Ana María Galich

Jefa de la Sección Osteopatías Metabólicas y Médica de planta del Servicio de Endocrinología del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Carlos Mautalen

Centro de Osteopatías Médicas Dr. Carlos Mautalen. Buenos Aires, Argentina.



José Luis Millán

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

Armando Negri

Profesor Escuela de Medicina Universidad del Salvador y Escuela de Postgrado Universidad del Salvador. Médico de Planta senior. Instituto de Investigaciones Metabólicas. Editor de la Revista Argentina de Osteología. Editor Asociado Revista de Nefrología Diálisis y Transplante.

Beatriz Oliveri

Sección Osteopatías Médicas, Hospital de Clínicas, UBA. Buenos Aires. Centro de Osteopatías Médicas Dr. Carlos Mautalen. Buenos Aires, Argentina. Investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Lilian I. Plotkin

Assistant professor, Department of Anatomy & Cell Biology Adjunct Professor. Indiana University School of Medicine. Indianapolis, USA.

Rodolfo Puche

Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral. Cátedra de Química Biológica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina

Emilio Roldán

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

Ana Russo de Boland

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

Nori Tolosa de Talamoni

Laboratorio de Metabolismo Fosfocálcico y Vitamina D "Dr. Fernando Cañas". Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

Helena Salerni

Ex presidente de la Sociedad Argentina de Osteoporosis. Médica especialista en Osteopatías Médicas. División Endocrinología del Hospital Durand. Buenos Aires, Argentina.

Julio Ariel Sánchez

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

Eduardo Slatopolsky

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

José R. Zanchetta

Director de la Maestría de Osteología y Metabolismo Mineral de la Escuela de Posgrado de la Facultad de Medicina, Universidad del Salvador. Director del Instituto de Investigaciones Metabólicas (IDIM), Argentina.



**AUTORIDADES DE AAOMM
COMISIÓN DIRECTIVA 2014-2015**

Presidente

Dra. Virginia Massheimer

Vicepresidente

Dra. Cristina Tau

Secretaria

Dra. Susana Morelli

Tesorera

Dra. Maria Belén Rauschemberger

Vocales

Dra. Gabriela Diaz Barboza

Dra. Mirena Butazzoni

Dra. Lorena Brance

Dr. Adrián Campelo

Dr. Pablo Cutini

Dra. Virginia Lezcano

Dra. Graciela Santillán

Dra. Marisa Sandoval

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Vol 10, Nº 2, mayo / agosto 2014

ÍNDICE

EDITORIAL / Editorial

Relación médico-paciente en el tercer milenio

Physician-patient relationship in the third millennium

Francisco Maglio

115

Cafeína y salud ósea

Caffeine and bone health

Fernando D. Saraví

119

ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

El 17 β -estradiol y la testosterona protegen a las mitocondrias contra el estrés oxidativo en células del músculo esquelético

17 β -estradiol and testosterone protect mitochondria against oxidative stress in skeletal muscle cells

Anabela La Colla, Lucia Pronsato, Ana Carolina Ronda, Lorena Milanesi, Andrea Vasconsuelo*, Ricardo Boland

122

ACTUALIZACIONES / Reviews

Sarcopenia: enfoque clínico

Sarcopenia: clinical approach

Silvina Mastaglia, Carlos Mautalen

136

Niveles normales de vitamina D previenen/atenúan el envejecimiento cardiovascular, las enfermedades autoinmunes y el cáncer: ¿Realidad o ficción?

Normal vitamin D levels prevent/attenuate cardiovascular aging, autoimmune diseases and cancer: Fact or fiction?

Adriana S. Dusso

152

IMÁGENES EN OSTEOLOGÍA / Imaging in Osteology

Resorción ósea en un modelo experimental para evaluación de cementos endodónticos en la zona de la furca de molares de rata

Bone resorption in an experimental model for assessing of endodontic cements in the furcation area of rat molar teeth

Rubén A. Domínguez Pérez, Manuel López Rodríguez, Graciela Letechipia Vallejo

173

**Enfermedad de paget monostótica***Monostotic Paget disease*

María Lorena Brance 175

CONTROVERSIAS / Controversies

Uso de marcadores de remodelación ósea en la práctica clínica*Bone turnover markers in clinical setting*

María Josefina Pozzo 177

CASUÍSTICAS / Case Reports

Fractura vertebral dorsal secundaria a enfermedad de Paget*Spinal dorsal fracture secondary a Paget disease*Luis Agustín Ramírez Stieben, Pablo Caballini, Alexis Ostinelli, Cristian Díaz,
Pablo Toni, Mariana Negri, Domingo Cera 186**ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals**

**Raquitismo hipofosfatémico familiar y esporádico:
clínica y hallazgos moleculares***Familial and sporadic hypophosphatemic rickets: clinical and molecular findings*Guillermo Alonso, Luisa Plantalech, Rodolfo Guelman, Sergio Gonzalez,
María Redal, Hamilton Cassinelli, Titania Pasqualini 192**COMENTARIOS BIBLIOGRÁFICOS / Bibliographical Comments**

Romozumab in postmenopausal women with low bone mineral density*N Engl J Med 2014; 370:412-20*

León Schurman 206

SECCIÓN CULTURAL / Cultural Section

Scrimshaw*Scrimshaw*

Ariel Sánchez 209

CARTAS AL COMITÉ DE REDACCIÓN / Letters to the Editor

¿El mecanostato, un sistema autoregulado?

Haraldo Claus-Hermberg 210

Respuesta a la carta “¿El mecanostato, un sistema autoregulado?”

José Luis Ferretti, Gustavo Roberto Cointry, Ricardo Francisco Capozza 212

INSTRUCCIONES PARA AUTORES / Information for Authors

216

EDITORIAL / *Editorial*

RELACIÓN MÉDICO-PACIENTE EN EL TERCER MILENIO

Francisco Maglio*

Doctor en Medicina

Desde los tiempos hipocráticos, la relación médico-paciente siempre estuvo constituida como una díada donde una confianza (paciente) se encontraba con una conciencia (médico).

Actualmente, esa relación se ha transformado en otra díada, ahora compuesta por dos “cosufrientes” encerrados en un triángulo cuyos lados son el modelo médico hegemónico, la medicalización y la formación enfática.

Modelo médico hegemónico

No es la medicina como ciencia ni tampoco los médicos en sí, se trata de una categoría analítica descrita por Eduardo Menéndez¹ que es la articulación del poder de la medicina con otros poderes (político, ideológico, económico, etc.) cuyos dos objetivos principales son, por un lado, subordinar otros saberes (por eso es hegemónico) y, por otro, instrumentalizar una práctica médica biologicista, positivista, deshumanizada, mercantilista, ahistórica y asocial.

De acuerdo con este modelo, los conflictos sociales se convierten en patologías individuales que hay que “controlar”: las drogas, por ejemplo.

De tal manera, con un sistema de atención mercantilista que obliga a los médicos a no dedicar más de diez o quince minutos a cada consulta, se canjean quejas sociales por recetas (especialmente de psicofármacos, los medicamentos de mayor “consumo” en la Argentina).

Medicalización²

No es una función de la medicina sino un requisito del sistema para el control social.

Se apropia de áreas que no son propias de la medicina, o no totalmente propias, con funciones de normalidad, disciplinamiento y estigmatización para efectivizar el mencionado control social.

Un claro ejemplo son los llamados “factores de riesgo” para las enfermedades (tabaco, alcohol, etc.): si una persona los consumió, ella es la única responsable y constituye la “culpabilización” de la que, en verdad, es la víctima.

Dichos factores no siempre dependen de decisiones exclusivamente individuales; por el contrario, están condicionados por la cultura y estructurados por el mercado, como se evidencia claramente en la publicidad promocional de esos factores: cigarrillos, cervezas, etc.

Otro ejemplo es la medicalización de la sexualidad: se la “genitaliza” descontextualizándola de la historia y del complejo deseo-placer. Con sentido moral de estigmatización, las enfermedades de transmisión sexual se construyen como enfermedades de “transgresión moral”.

* Dirección electrónica: redaccion@osteologia.org.ar



El modelo médico hegemónico y la medicalización (como su instrumento) tienden a “naturalizar” la enfermedad y cuando algo se naturaliza, no se reflexiona, no se problematiza, no se cuestiona (“pobres hubo siempre”).

El final es que el Estado se desresponsabiliza de su función primordial que es el cuidado de la salud, en consecuencia, este entra en el mercado y la aplicación de las leyes del mercado en salud hace que los enfermos se vuelvan más enfermos.³

Formación enfática

Cuando a un profesional se lo de-forma en uno solo de los polos de la profesión, queda indefenso frente al otro.

Por ejemplo, en el caso de los abogados, la formación enfática se centraría solamente en el litigio, entonces un abogado no está preparado para actuar en la armonía.

Otro ejemplo, un militar de-formado solamente en la guerra se siente desorientado en la paz.

En el caso de la medicina, cuando un médico es de-formado solamente en la enfermedad no sabe qué hacer con la salud: es más, revisa a alguien y si no le encuentra nada, es “decepcionante”. Encerrado por la medicalización y con la presión (negativa) de la tecnología comienzan los exámenes complementarios y, si son negativos, se siguen pidiendo más y más.

Cuando no se sabe lo que se busca, no se entiende lo que se encuentra, de allí los resultados “falsos positivos” que no tienen nada que ver con la situación del “presunto” enfermo, en realidad un sano.

Cuando al principio definíamos esta nueva relación médico-paciente como “dos cosufrientes” nos referíamos a que, de seguir con este modelo y estas prácticas, un sano se definirá como un enfermo “insuficientemente estudiado”.

Un sano que se “siente” enfermo y un médico que no “acepta” la salud.

¿Cómo revertir esta situación?

La Medicina Antropológica⁴ como concepción holística del ejercicio profesional considera a las personas en general y a los pacientes en particular como seres bio-sómato-psico-sociales.

Desde esta concepción, la relación médico-paciente más que una sumatoria de consultas debe contextualizarse como un proceso, un “continuum”, con tres características fundamentales:

1. Empatía

Comprender al paciente “desde” el paciente, ya que en esta relación no hay una sola racionalidad, la médica; también tiene importancia la otra racionalidad, la del paciente, igualmente válida.

Para esta empatía es necesario el afecto. El paciente necesita ser querido (como cualquier persona) y además, que se lo demuestren.

Sin embargo, hay que evitar los extremos, ya que si desobjetivar al paciente nos lleva a nuestra despersonalización, el sobresubjetivar nos conduce a una desestructuralización.

En el primer caso nos convertimos en médicos-robot y en el segundo perdemos la objetividad.

Se trata de estar *con* el paciente sin ser el paciente.

2. Aceptación

Alude a la aceptación “moral”: interesarnos por lo que el paciente *hace* y no por lo que es.

La medicina debe señalar lo beneficioso y advertir sobre lo dañino, pero no debe obligar a lo primero ni condenar lo segundo.

La moral en medicina nos debe obligar a ser cada vez más justos con los pacientes pero no ser sus jueces.

3. Veracidad

No hay justificación ética para la mentira. No obstante, se debe considerar que así como el paciente tiene derecho a saber, hay ocasiones que tiene derecho a no saber y esto debe ser respetado (a menos que ese no saber dañe a terceros, por ejemplo, un análisis positivo para el VIH).

En todos los casos de severo pronóstico la verdad tiene que ser expresada en forma escalonada y soportable ya que es tan perjudicial una conspiración del silencio como un “encarnizamiento” informativo (a veces hay diagnósticos que son “fusilamientos”).

Para el ejercicio de este tipo de relación médico-paciente es necesario poseer ciertas virtudes. En primer lugar, la integridad, esto es, ser fieles a esa confianza que se entrega a una conciencia.

La otra virtud es la ecuanimidad. Todos los pacientes son iguales y debemos tratarlos en consecuencia. En palabras de Petrarca: “un médico ecuaníme es aquel que atiende al último de los siervos con la misma diligencia con que atiende al Papa”.⁵

La virtud del respeto: un paciente es ante todo una persona y como tal (en sentido kantiano) tiene dignidad y no precio, es un fin en sí mismo y no un medio, es sujeto y no objeto.

Sobre esta base, privilegiar la confidencialidad, la autonomía y la privacidad.

Cuando faltamos a la privacidad (por ejemplo, examinar a un paciente desnudándolo frente a terceros) “violamos” a los pacientes; violaciones simbólicas pero no por eso menos deletéreas.

Una forma de respetar al enfermo es escucharlo, estamos acostumbrados (mal acostumbrados) al “interrogatorio” y esta es una palabra muy connotada de autoritarismo y castigo. Para el imaginario social “interrogan los jueces, la policía y los médicos”. Los tres tenemos uniforme y los tres “internamos”, somos aliados tácticos, aunque no conscientes, del control social.

De allí que el hospital tiene una estructura “cuartelaria”: hay “pabellones”, “jefes de división”, hacemos “recorridos”, estamos de “guardia”, hay “cabas” y “cabos”, etc.

Hay que desestructurar el interrogatorio y convertirlo en un “escuchatorio”, valga el neologismo. Pero una escucha activa, esto es, ocuparnos y “preocuparnos” por lo que dice el enfermo, escuchar (no simplemente oír) sus palabras desde su propia perspectiva más que desde la nuestra.

A este tipo de escucha se refiere uno de los aforismos hipocráticos cuando afirma: “muchos pacientes se curan solamente con la satisfacción que les produce un médico que los escucha”.

Pero esta forma de escuchar debe ir más allá de lo biológico, debe interesarse por lo biográfico para conocer los proyectos de vida del enfermo.

Este conocimiento es fundamental porque se puede considerar que, en términos antropológicos, una persona se enferma cuando se ve interrumpido su proyecto de vida. En consecuencia, si la ayudamos en ese proyecto, además de curar la estamos “sanando”.

Todo lo mencionado puede resumirse en el epitafio del Dr. Trudeau del siglo XI d.C.: “Curar a veces, aliviar a menudo, confortar siempre”. Pero confortar no es simplemente la “palmadita” en el hombro, a veces esto se parece más a lástima.



Confortar, en el sentido antropológico, es comprometerse a ayudar al enfermo en la búsqueda del significado de su sufrimiento, porque cuando se tiene una idea sobre ese significado se deja de sufrir; quizá siga el dolor, pero solamente el físico y para este tenemos los analgésicos.

Este acompañar al paciente en esa búsqueda del sentido de su sufrir es nuestro gran compromiso, el arte supremo de la medicina; pero acompañarlo en la búsqueda de su propio significado, no del nuestro.

Dicho significado nos permitirá conocer el modo como el paciente simboliza su enfermedad y, en consecuencia, actuar con la “eficacia simbólica” completando y enriqueciendo la eficacia biológica.

En síntesis, desde Hipócrates hemos estado *al lado* del paciente; llegó la hora de estar *del lado* del paciente.

(Recibido: abril 2014.

Aceptado: abril 2014)

Referencias

1. Menéndez E. Modelo médico hegemónico, crisis socio-económica y estrategias de acción en el sector salud. *Cuadernos Médicos Sociales* N° 33, Rosario, 1985.
2. Conrad P. *Deviance and Medicalization*. Ohio: Merrill Publish, 1985.
3. Chomsky N. *Política y cultura a finales del siglo XX*. Barcelona: Ariel, 1994.
4. Meeroff M. *Medicina Antropológica*. Buenos Aires: Asociación Médica Argentina, 1992.
5. Petrarch. *Encyclopaedia Britannica*. Vol 17, pág.752, 1969.

EDITORIAL / Editorial

CAFEÍNA Y SALUD ÓSEA

Fernando D. Saraví^{1, 2*}

1. Servicio de Densitometría Clínica, Escuela de Medicina Nuclear, Mendoza; 2. Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

En *Actualizaciones en Osteología* 2014; 10(1):20-36 se ha publicado un artículo sobre el efecto de la ingesta materna de cafeína durante el embarazo y la lactancia sobre la osificación endocondral de las crías. En él, Sena Reis y cols. informan efectos adversos con todas las dosis estudiadas, con una intensidad dependiente de la dosis. Puede, entonces, ser oportuno esbozar el estado actual del conocimiento acerca de la relación entre xantinas y salud ósea.

Las xantinas –en particular la cafeína– son el grupo de fármacos estimulantes del sistema nervioso central y modificadores de los mecanismos de transducción de señales en el acoplamiento de algunas hormonas a su receptor, cuyo consumo está más difundido en el mundo.

Se sabe que la cafeína reduce la absorción intestinal de calcio y aumenta su excreción urinaria. Aunque algunos investigadores no han hallado efecto adverso sobre el hueso en animales,¹ otros sugieren que la cafeína aumenta la osteoclastogénesis.² Dada la coexistencia de una alta prevalencia de osteoporosis y un elevado consumo de cafeína en muchas poblaciones, desde hace décadas existe preocupación por un posible efecto deletéreo de la cafeína sobre la salud ósea.

Como en otras áreas de la investigación médica en general, y de la osteología en particular, la demostración de la existencia de efectos significativos es complicada por numerosos factores de confusión –como la ingesta de calcio– y el empleo de diferentes indicadores; en el caso que nos ocupa, por ejemplo, de la densidad mineral ósea *versus* el riesgo de fracturas.

El café, el té, el mate y, desde hace algún tiempo, las denominadas *energy drinks* son las bebidas populares con mayores concentraciones de cafeína. La ingesta total depende de la sumatoria del volumen ingerido de cada una de estas bebidas por la respectiva concentración de cafeína. Por esta razón, se ha estimado que, en nuestro país, la principal fuente de cafeína en adultos es el mate, seguida por el café y el té. En niños de hasta 10 años, las gaseosas y el chocolate son la principal fuente de metilxantinas. La importancia del mate y del café crece a partir de los 11 años.³

Un significativo factor de confusión en relación con el posible efecto de las xantinas sobre la salud ósea se relaciona con el hecho de que las bebidas más consumidas que contienen xantinas también contienen concentraciones variables de polifenoles y otros compuestos orgánicos que poseen un efecto favorable sobre la salud ósea. Por tanto, es probable que dichos compuestos atenúen, cancelen o hasta reviertan los supuestos efectos adversos de las xantinas.⁴

* Dirección postal: Escuela de Medicina Nuclear, Garibaldi 405, Mendoza M5500CJI, República Argentina.
Correo electrónico: fernando.saravi@hotmail.es



En este sentido, diversos estudios indican que el té (negro o verde) no perjudica la salud ósea y, de hecho, tiene un efecto favorable.^{5, 6} Otro tanto parece ocurrir con el mate,⁷ aunque en este caso se requieren más estudios. En el caso del café, un metanálisis reciente de diez estudios prospectivos, que colectivamente incluyeron más de 200.000 participantes, indica que el consumo de café se asocia con un riesgo leve pero significativamente mayor de fracturas dependiente de la dosis, especialmente en mujeres.⁸

En cambio, otro estudio realizado en Suecia, cuyos participantes tenían una edad promedio de 72 años, halló que un consumo de café elevado (cuatro tazas/día o más) se asoció con menor densidad mineral ósea del fémur proximal en los varones, pero no en las mujeres.⁹ Entre los participantes con mayor consumo, el efecto negativo sobre la masa ósea fue superior en aquellos con genotipo de citocromo CYP1A2 que metabolizaban más rápidamente la cafeína. Esto plantea la posibilidad –que merece ser estudiada– de que el efecto negativo observado no se deba a la cafeína en sí misma, sino a uno o más de sus metabolitos.

Por otra parte, la cafeína mostró un efecto favorable en un conocido modelo de menopausia. Folwarczna y cols. administraron oralmente 20 mg/kg de cafeína o dieta sin cafeína a ratas adultas intactas u ovariectomizadas. No hallaron efectos sobre el hueso en las ratas intactas, pero en las ratas ovariectomizadas observaron que la administración de cafeína durante 4 semanas se asoció con una atenuación del efecto adverso de la deprivación de estrógeno, tanto en la mineralización como en la estructura y en la resistencia mecánica del hueso.¹⁰

Otro aspecto para considerar es el umbral de dosis. Las investigaciones que hallaron efecto adverso de la cafeína sobre la salud ósea indican una relación dosis-respuesta. Las autoras del estudio citado al principio, publicado en *Actualizaciones en Osteología*, emplearon dosis de cafeína de 25 mg/kg, 50 mg/kg y 100 mg/kg administradas a las ratas preñadas y durante la lactancia. En una persona de 60 kg, la menor de las dosis citadas correspondería a 1500 mg de cafeína, es decir casi 2 litros de café de filtro por día. Afortunadamente, es poco probable que una mujer embarazada alcance semejante nivel de consumo, por aficionada que sea a las bebidas que contienen xantinas. En nuestro país, el percentilo 95 de ingesta de cafeína no alcanza a 90 mg/día en menores de 10 años, ni supera 750 mg/día en adolescentes y adultos.³

Es posible que los animales² o seres humanos en desarrollo sean más susceptibles a los efectos adversos de la cafeína, pero conviene notar que en una extensa y detallada revisión dedicada a los riesgos de la cafeína para la reproducción y el desarrollo, se concluye que: “Las cantidades moderadas e incluso altas de bebidas y comidas que contienen cafeína no aumentan los riesgos de malformaciones congénitas, aborto espontáneo ni retardo del crecimiento”.¹¹

En resumen, aunque no se ha dicho la última palabra (si es que esto fuera realmente posible en ciencia) y el tema merece nuevas investigaciones, el estado actual del conocimiento apoya la idea de que, en la mayoría de los casos, el temor a un efecto adverso de las xantinas sobre la salud ósea se ha exagerado. Desde luego, es probable que el consumo excesivo pueda ser perjudicial, en particular en individuos con bajo consumo de calcio, genéticamente predisuestos, o en etapas tempranas del desarrollo.

Conflicto de intereses

El autor declara no tener conflictos de intereses.

(Recibido: mayo 2014.

Aceptado: julio 2014)

Referencias

1. Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, et al. Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone* 2001; 28:332-6.
2. Liu SH, Chen C, Yang RS, Yen YP, Yang YT, Tsai C. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *J Orthop Res* 2011; 29:954-60.
3. Olmos V, Bardoni N, Ridolfi AS, Villaamil-Lepori EC. Caffeine levels in beverages from Argentina's market: application to caffeine intake assessment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2009; 26:275-81.
4. Dew TP, Day AJ, Morgan MRA. Bone mineral density, polyphenols and caffeine: a reassessment. *Nutr Res Rev* 2007; 20: 89-105.
5. Devine A, Hodgson JN, Dick IM, Prince RL. Tea drinking is associated with benefits on bone density in older women. *Am J Clin Nutr* 2007; 86:1243-7.
6. Shen CL, Yeh JK, Cao JJ, Wang JS. Green tea and bone metabolism. *Nutr Res* 2009; 29:437-56.
7. Conforti AS, Gallo ME, Saraví FD. Yerba Mate (*Ilex paraguarensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. *Bone* 2012; 50:9-13.
8. Liu H, Yao W, Zhang W, Zhou J, Wu T, He C. Coffee consumption and risk of fractures: a meta-analysis. *Arch Med Sci* 2012; 8:776-83.
9. Hallström H, Melhus H, Glynn A, Lind L, Syvänen AC, Michaëlsson K. Coffee consumption and CYP1A2 genotype in relation to bone mineral density of the proximal femur in elderly men and women: a cohort study. *Nutr Metab* 2010; 7:1-9.
10. Folwarczna J, Pytlik M, Zych M, et al. Favorable effect of moderate dose caffeine on the skeletal system of ovariectomized rats. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57:1772-84.
11. Brent RL, Christian MS, Diener RM. Evaluation of the reproductive and developmental risks of caffeine. *Birth Defects Res B* 2011; 92:152-87.



ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

17 β -ESTRADIOL AND TESTOSTERONE PROTECT MITOCHONDRIA AGAINST OXIDATIVE STRESS IN SKELETAL MUSCLE CELLS

Anabela La Colla, Lucia Pronsato, Ana Carolina Ronda, Lorena Milanesi, Andrea Vasconsuelo*, Ricardo Boland

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. San Juan 670, 8000 Bahía Blanca, Argentina

Summary

We have previously shown that testosterone (T) and 17 β -estradiol (E2) protect C2C12 muscle cells against apoptosis induced by hydrogen peroxide (H₂O₂). Since we also showed the presence of estrogen and androgen receptors in mitochondria, this work was focused on the effects of both steroids on this organelle, which result in cellular survival. Specifically, we evaluated the actions of T and E2 on the mitochondrial membrane potential with JC-1 dye and on the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) by the calcein-acetoxymethylester (AM)/cobalt method, using fluorescence microscopy and flow cytometry. We demonstrated that T and E2 prevent MPTP opening and the loss of mitochondrial membrane potential induced by H₂O₂. In addition, it was observed that H₂O₂ increase voltage-dependent anion channel (VDAC) protein expression levels and induce translocation of Bax to mitochondria. However, in the presence of the steroids Bax

translocation was abrogated suggesting that members of the Bcl-2 family may be regulated by E2 and T. The observed effects triggered by E2 and T were reflected on mitochondrial morphology. Microscopic analysis of C2C12 cells and primary cultures of mouse skeletal muscle, with Janus Green and Mitotracker staining revealed a protective effect of the steroids against oxidative stress damage which included mitochondrial redistribution and pyknosis of the organelle.

Keywords: estradiol; testosterone; skeletal muscle cell; mitochondria

Resumen

EL 17 β -ESTRADIOL Y LA TESTOSTERONA PROTEGEN A LAS MITOCONDRIAS CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

En trabajos previos demostramos que la testosterona (T) y el 17 β -estradiol (E2) protegen a las células musculares C2C12 de la

* Dirección Postal: Dra. Andrea Vasconsuelo. Depto. Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670. 8000 Bahía Blanca, Argentina. Correo electrónico: avascon@criba.edu.ar

apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Conjuntamente evidenciamos la existencia de receptores de estrógenos y andrógenos en las mitocondrias. El presente trabajo se ha centrado en caracterizar los efectos de ambos esteroides en esta organela, que conducen a la supervivencia celular. Específicamente, se evaluaron las acciones de T y E2 sobre el potencial de membrana mitocondrial con el colorante JC-1 y sobre el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP) mediante el método de calceína/acetoximetil éster (AM)/cobalto, utilizando microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Demostramos que T y E2 previenen la apertura del MPTP y la pérdida de potencial de membrana mitocondrial inducidas por H_2O_2 . Además, observamos que el H_2O_2 aumenta los niveles de expresión proteica del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) e induce la translocación de Bax a mitocondria. Sin embargo, en presencia de las hormonas la translocación de Bax fue inhibida lo cual sugiere que los miembros de la familia Bcl-2 pueden ser regulados por E2 y T. Los eventos moleculares desencadenados por E2 y T a nivel mitocondrial se reflejaron en la morfología de las organelas. El análisis microscópico de las células C2C12 y cultivos primarios de músculo esquelético de ratón, mediante tinciones con verde de Jano y Mitotracker reveló un efecto protector de los esteroides contra el daño por estrés oxidativo inhibiendo la redistribución y picnosis mitocondrial.

Introduction

Sarcopenia refers to the decline in muscle mass and strength with age¹. This pathology leads to a significant impairment in the ability to carry out normal daily functions, increasing the risk of falls and fractures, resulting in loss of independence.² Although the molecular mechanisms responsible for muscle fiber loss and atrophy have not been completely

clarified, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis play important roles in age-dependent muscle atrophy.³⁻⁵ These cellular events have been associated to the age-related decrease in androgen and estrogen levels, which have also been postulated as a direct cause of sarcopenia.⁶ In agreement with these observations, it has been shown that human skeletal muscle contains both estrogen (ERs) and androgen receptors (AR).⁷⁻⁹

Although apoptosis may occur via several mechanisms, mitochondria are the most important regulatory centers for programmed cell death¹⁰. In response to oxidative stress, they are extensively damaged in aged skeletal muscle of humans and rodents, releasing cytochrome c into the cytosol, a key step during apoptosis.^{11,12} In previous studies, it was shown that physiological concentrations of 17β-estradiol (E2) and testosterone (T) prevent apoptosis in skeletal muscle, activating signaling cascades and in turn abolishing the typical cytochrome c release.¹³⁻¹⁵ Although several models have been proposed to explain cytochrome c release from mitochondria, opening of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) has gained significance. This event is generally associated with the organelle membrane potential ($\Delta\Psi_m$).¹⁶ Under normal physiological conditions, the mitochondrial inner membrane is impermeable to all, except for a few selected metabolites and ions. However, under stress conditions, the MPTP can be opened in the mitochondrial inner membrane allowing the free passage of any molecule smaller than 1.5 kDa.^{17,18} MPTP comprises the voltage-dependent anion channel (VDAC), the adenine nucleotide translocator (ANT) and cyclophilin D in association with other proteins.¹⁹⁻²¹ It has been shown that Bax and Bak can directly open VDAC to induce cytochrome c release in a liposome system.²²⁻²⁵ Moreover, it has been proven using VDAC-deficient yeast



mitochondria that this channel is required for apoptotic $\Delta\psi_m$ loss as well as for the release of cytochrome c.²³ It has also been reported that ANT may be a functional target of Bax.^{21,25}

Although we have demonstrated that E2 and T exert antiapoptotic effects in the C2C12 murine skeletal muscle cell line,^{13-15,26} the knowledge of the molecular mechanisms underlying the antiapoptotic action of both hormones has not been fully elucidated. Here, we propose that these steroids protect skeletal myoblasts regulating mitochondrial events. To test this hypothesis, in the present work, we investigate the effects of E2 and T on specific mitochondrial parameters, which in turn regulate apoptosis in C2C12 skeletal myoblasts.

Materials and methods

Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:200) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Testosterone and 17 β -estradiol were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Anti-beta tubulin (1:1000) and anti-Bax (1:1000) antibodies were obtained from Thermo Fisher Scientific, Inc. (Rockford, IL, USA). VDAC antibody (1:1000) was obtained from Cell Signalling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA). Calcein AM (Calcein acetoxymethyl ester) and MitoTracker Red were purchased from Invitrogen. 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylben-zimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) was obtained from Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA). The ECL blot detection kit and protein molecular weight markers were provided by GE Healthcare Lifescience- Amersham (Pittsburgh, PA; USA). All the other reagents used were of analytical grade.

Cell culture and treatment

C2C12 murine skeletal muscle cells were cultured in growth medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated

(30 min, 56°C) fetal bovine serum (FBS), 1% nystatin and 2% streptomycin. Cells were incubated at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂ in air. Cultures were passaged every 2 days with fresh medium. Under these conditions C2C12 myoblasts resemble the activated satellite cells that surround the mature myofibers and proliferate and differentiate participating in the repair of the tissue when a cellular injury exists. The assays were performed with 70-80% confluent cultures (120,000 cells/cm²) which were previously starved with medium without serum for 30 min. Treatments were carried out adding 10⁻⁸ M 17 β -estradiol, 10⁻⁹ M testosterone or vehicle (control: 0.001% isopropanol) during 60 min before induction of apoptosis with 0.5 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) for 4 h. Unless otherwise noted, cells were cultured to 50% of confluence in chamber-slides for microscopy.

Janus Green staining

The supravital Janus Green colorant is a water-soluble dye that is absorbed by the whole cell, staining it in a blue-greenish coloration (oxidative state). Nevertheless, this tint disappears in the cytoplasm a few minutes later due to the reductive properties of the cytosol, except in the mitochondria, where it is seen as little dots, as a consequence of the oxidative environment of the organelle which maintains the Janus Green colorant in its oxidative state (blue-greenish coloration).^{27,28} Janus Green staining can indirectly indicate mitochondrial dysfunction, since any rupture/disruption of the mitochondrial membrane cause release of their content to the cytosol inducing colorant oxidation in the cytoplasm. After treatments, the cells were incubated with 0.1 % Janus Green in serum-free medium (1:2, v/v) during 30 min at 37°C. Cells were examined by bright field microscopy.

MitoTracker Red staining

After treatments, coverslips with adherent cells were stained with MitoTracker Red,

which was prepared in dimethyl sulfoxide and then added to the cell culture medium at a final concentration of 1 μmol/L. After 15 to 30 min incubation at 37°C, the cells were washed with PBS (pH 7.4, 8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 0.24 g/L KH₂PO₄, 1.44 g/L Na₂HPO₄) and fixed with methanol at -20 °C for 30 min.

Cells were examined using a fluorescence microscope (NIKON Eclipse Ti-S) equipped with standard filter sets to capture fluorescent signals. Images were collected using a digital camera. Additionally, samples were analyzed with a confocal scanning laser microscopy (Leica TCS SP2 AOBS microscope), using a 63X objective.

Immunocytochemistry

Semi-confluent monolayers were fixed as before. After fixation, cells were rinsed three times with PBS and non-specific sites were blocked for 1 h in PBS 2% BSA. Cells were incubated with appropriate primary antibodies overnight at 4°C. The primary antibodies were recognized by fluorophore-conjugated secondary antibodies. Finally, the stained cells were analyzed with a conventional fluorescence microscope or confocal scanning laser microscopy. The specificity of the labeling techniques was proven by the absence of labeling when the primary or the secondary antibodies were omitted.

Western blot analysis

Cells from 70-80% confluent cultures (120,000 cells/cm²) were lysed using a buffer made of 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.2 mM Na₂VO₄, 2 mM EDTA, 25 mM NaF, 1 mM PMSF, 20 μg/ml leupeptin and 20 μg/ml aprotinin. Lysates were collected by aspiration and centrifuged at 12,000 x g during 15 min. The protein content of the supernatant was quantified by the Bradford procedure²⁹. Then lysate proteins dissolved in Laemmli³⁰ sample buffer (30 μg; ca. 2,000,000 cells) were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and

electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Relative migration of unknown proteins was determined by comparison with molecular weight colored markers (Amersham). Membranes were blocked 1 h at room temperature in PBS-T buffer (PBS 0.1% Tween-20) containing 5% dry milk. Membranes were incubated with different primary antibodies overnight at 4°C, and then repeatedly washed with PBS-T prior incubation with PBS-T containing 1% dry milk with peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Next, membranes were visualized using an enhanced chemiluminiscent technique (ECL) according to the manufacturer's instructions. Relative migration of unknown proteins was determined by comparison with molecular weight colored markers (Amersham). Relative quantification of Western blot signals was performed using Image J software (NIH, USA). For reprobing with other antibodies, the membranes were incubated in stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS and 50 mM mercaptoethanol) for 30 min at 55°C, washed 10 min in PBS-T and then blocked and blotted as described above.

Subcellular fractionation

C2C12 monolayers were scrapped and homogenized in ice-cold Tris-EDTA-sucrose (TES) buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 250 mM sucrose, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 20 mg/ml leupeptin, 20 mg/ml aprotinin, 20 mg/ml trypsin inhibitor) using a Teflon-glass hand homogenizer. Total homogenate free of debris was used in order to obtain the different fractions. The nuclear pellet was obtained by centrifugation at 300 g during 15 min. The supernatant was further centrifuged at 10,000 g for 30 min to pellet mitochondria. The remaining solution was called mitochondrial supernatant. Pellets were re-suspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.2 mM Na₂VO₄, 2 mM EDTA, 25 mM NaF,



1 mM PMSF, 20 mg/ml leupeptin, and 20 mg/ml aprotinin). Protein concentration of the fractions was estimated by the method of Bradford²⁹, using BSA as standard and Western blot analysis were performed as described above. Cross contamination between fractions was assessed by immunoblots using antibodies against lamin B and COX (complex IV), nuclear and mitochondrial markers, respectively.

Flow cytometry

Mitochondria are critical organelles involved in cell death.³¹ During this process, the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) collapses.³² Therefore, to determine the role of T and E2 against mitochondrial dysfunction induced by H_2O_2 , we evaluated the $\Delta\psi_m$ in 10,000 C2C12 cells using the JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide) mitochondrial transmembrane potential detection kit from Becton-Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA) with flow cytometry. Cells with functional mitochondria incorporate JC-1 leading to the formation of JC-1 aggregates, which show a red spectral shift resulting in higher levels of red fluorescence emission (FL-2 channel), and green monomers (detectable in FL1 channel). Cells with collapsed mitochondria contain mainly green JC-1 monomers and exhibit fluorescence in the green end of the spectrum³³. Then, apoptotic cells, showing primarily green fluorescence, are easily differentiated from healthy cells that show red and green fluorescence. The assays were performed with 70-80% confluent cultures in 10 cm plates. After treatments, cells were trypsinized, harvested, and incubated with JC-1 probe in 5 ml polystyrene round-bottom tubes (Becton-Dickinson Biosciences), according with manufacturer's specifications, for 15 min at 37°C. Cells were then washed twice and analyzed in a FACS Calibur flow cytometer (excitation wavelength of 488 nm).

Measurement of MPTP opening

We assessed the MPTP opening using the calcein-AM/cobalt method.³⁴ Calcein-AM is an anionic, esterified fluorochrome that enters to the cells freely and labels cytoplasmic as well as mitochondrial regions following esterase removal of the AM group. Because cobalt ions enter to the cytoplasm but do not readily pass through the mitochondrial membrane, mitochondria can be specifically identified by the cobalt quenching of cytoplasmic, but not mitochondrial, calcein fluorescence. In consequence, MPTP opening can be recognized by a decrease of mitochondrial calcein fluorescence³⁴. Briefly, 70–80% confluent cultures in 10 cm (flow cytometry) or 3 cm (microscopy) plates were loaded for 30 min with 1 mM calcein-AM at 37°C in DMEM medium. The cytosolic and nuclear calcein fluorescence was quenched using 1 mM $CoCl_2$. After attainment of quenching, cells were washed twice with warm DMEM without serum. Following the corresponding treatments, cells were examined by fluorescence microscopy. Image quantification was performed by measuring the fluorescence intensity profiles (in arbitrary units) using the Image J software 1.41.

Statistical analysis

Statistical treatment of the data was performed using the Student's t-test.³⁵ Data are shown as means \pm standard deviation (SD) from three independent experiments. The data were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

17β -estradiol and testosterone preserve mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in C2C12 muscle cells exposed to H_2O_2

We investigated the role of T and E2 against mitochondrial dysfunction induced by H_2O_2 , evaluating the $\Delta\psi_m$ in C2C12 cells. Myoblasts were starved during 30 min, incubated with 10^{-8} M E2, 10^{-9} M T or vehicle during 1 h prior to induction of apoptosis with 0.5 mM H_2O_2 during 4 h. Figure 1 shows that the percentage

of depolarized cells increased in cultures treated with H₂O₂ compared with control/T or E2-treated cultures, while the incubation with T or E2 prior to H₂O₂ exposure was capable of reducing the percentage of depolarized cells.

17 β -estradiol and testosterone regulate MPTP opening in C2C12 muscle cells

As mentioned before, mitochondria play a crucial role in apoptosis, releasing several apoptosis-inducing factors into the cytoplasm. This process requires the increase of outer mitochondrial membrane permeability, which probably depends on the activation of MPTP. This activation can be associated to $\Delta\psi_m$ loss¹⁶. To evaluate the effects of E2 and T on MPTP function in C2C12 cells, we used a cobalt quenched calcein-AM method. C2C12 cell cultures, loaded with calcein-AM/CoCl₂, were incubated with E2, T or vehicle isopropanol (control) before induction of

apoptosis with H₂O₂ (4 h). The cells were then analyzed by microscopy as described in Materials and Methods. As shown in Figure 2 by microscopical analysis, the treatment with H₂O₂ resulted in a significant decrease on the calcein fluorescence intensity due to CoCl₂ quenching as a result of MPTP opening (from $\sim 87.5 \pm 12.6\%$ in control, to $\sim 28 \pm 10.2\%$ in H₂O₂ condition). However, when the cells were previously treated with T (Figure 2A) or E2 (Figure 2B), the fluorescence was diminished to a lesser extent (remaining $\sim 70\%$ of fluorescent cells for both hormones), implying a protective role of the steroids over this pore.

VDAC and Bax are involved in H₂O₂-induced apoptosis in C2C12 muscle cells

The MPTP pore is a large multiprotein complex, primarily composed of the adenine nucleotide transporter (ANT), cyclophilin D, and VDAC.^{18,36,37,38} The VDAC has been

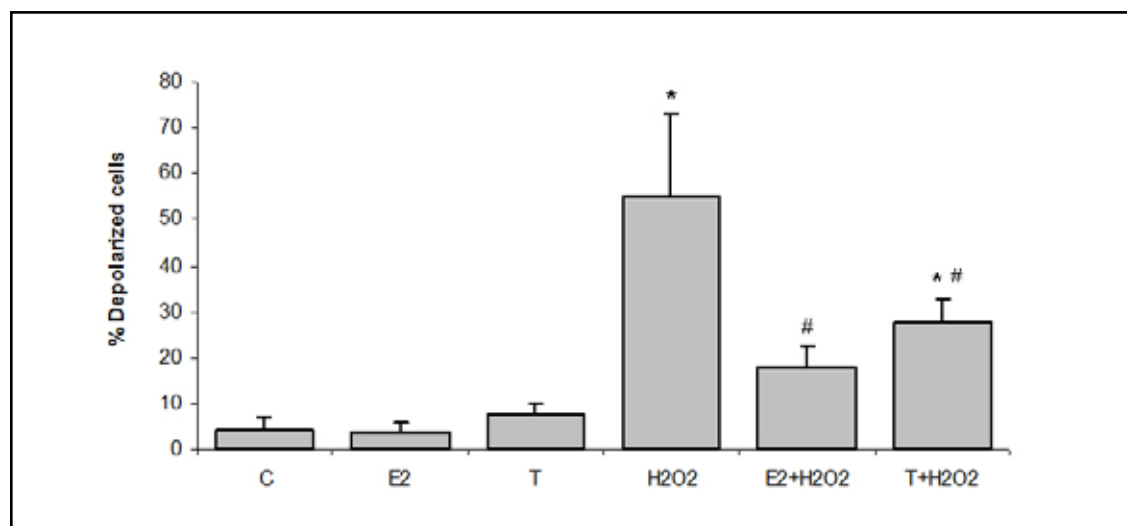


Figure 1. 17 β -estradiol and testosterone inhibit the mitochondrial membrane potential loss elicited by H₂O₂ in C2C12 muscle cells. Cultures were serum-starved during 30 min and then treated as described in Materials and Methods. C: 0.001% isopropanol; E2: 10⁻⁸ M 17 β -estradiol; T: 10⁻⁹ M testosterone; H₂O₂: 0.5 mM H₂O₂; E2+H₂O₂: 10⁻⁸ M 17 β -estradiol + 0.5 mM H₂O₂; T+H₂O₂: 10⁻⁹ M testosterone + 0.5 mM H₂O₂. Then, cells were stained *in vivo* with JC-1 followed by flow cytometry analysis (Materials and Methods). Percentages of depolarized cells from three independent experiments are shown. Averages \pm S.D. are shown. *p<0.05 with respect to the control. #p<0.05 with respect to the H₂O₂.



involved in mitochondrial-dependent cell death by forming part of the permeability pore.^{39,40} In the present work we investigated the expression of VDAC protein after treatment with H₂O₂ during different time intervals (15 min – 4 h). As shown in Figure 3, VDAC protein levels increased in a time-dependent fashion. It has been shown that Bax translocates to mitochondria and interacts with VDAC.²⁴ Moreover, apoptosis can be associated with translocation of cytosolic Bax to mitochondria.⁴¹ In order to evaluate the participation of Bax in the mitochondrial effects studied above, we analyzed by Western blot its localization in skeletal muscle cells after treatments. C2C12 muscle cells were starved for 30 min, followed by incubation with 0.5 mM H₂O₂ at different times (1, 3, and 4 h) or with 10⁻⁸ M E2 or vehicle during 1 h prior to the induction of apoptosis with 0.5 mM H₂O₂

during 4 h. Then mitochondrial and cytosolic fractions were obtained to perform immunoblot assays. It was observed that H₂O₂ treatment induced time-dependent Bax translocation to mitochondria in C2C12 cells (Figure 4 A), which was more evident after 3 h of induction of apoptosis. However, pretreatment with E2 inhibited Bax translocation (Figure 4 B). A similar protective effect was detected when cells were pretreated with T (data not shown).

17 β -estradiol and testosterone protect mitochondrial morphology in skeletal muscle cells

Mitochondrial morphology was evaluated to ascertain whether the molecular events described above affect it. To this end, microscopic analysis was performed with Janus Green and Mitotracker staining of C2C12 cells and primary cultures of mouse

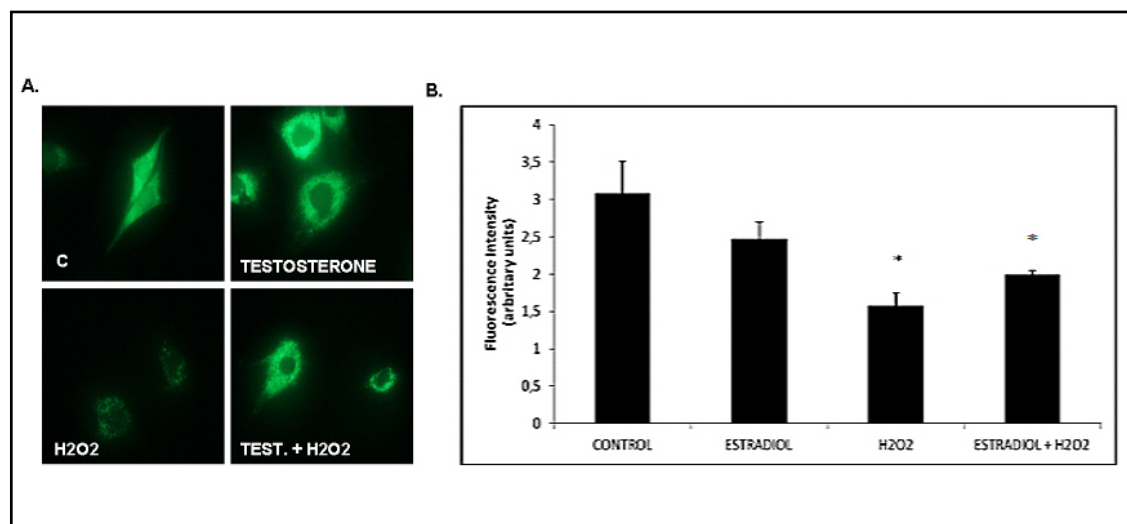


Figure 2. 17 β -estradiol and testosterone prevents H₂O₂-induced MPTP opening in C2C12 skeletal myoblasts. Cells loaded with calcein-AM/CoCl₂ (Methods) were incubated with C: 0.001% isopropanol; E2: 10⁻⁸ M 17 β -estradiol; T: 10⁻⁹ M testosterone; H₂O₂: 0.5 mM H₂O₂; E2+H₂O₂: 10⁻⁸ M 17 β -estradiol + 0.5 mM H₂O₂; T+H₂O₂: 10⁻⁹ M testosterone + 0.5 mM H₂O₂ as described in Materials and Methods. MPTP opening was analyzed using a fluorescence microscope. **(A)** Representative image of experiments performed with T. **(B)** Quantification of the fluorescence from the experiments performed with E2. Experiments were repeated at least three times with essentially identical results. Averages \pm S.D. are given. Image quantification was performed using the Image J 1.46 software.

skeletal muscle, as described in Materials and Methods. C2C12 cell line and cells from primary cultures were incubated with H₂O₂, E2, T or vehicle isopropanol (control) or treated with each hormone prior to induction of apoptosis with 0.5 mM H₂O₂ (4h). Figure 5 shows the results obtained with E2, which were similar to those obtained with T (data not shown). C2C12 cells and primary cultures (columns 1 and 2, respectively) were stained with Mitotracker. In panel B, cells exposed to H₂O₂ (4h) showed mitochondria that were clustered

around the nucleus losing its characteristic “spider web” or uniform cytosolic distribution while in panel A cells treated with the hormone showed a uniform cytoplasmic distribution. In addition, mitochondria of cells treated with the apoptosis inducer were piknotic and smaller. These alterations could be prevented when the skeletal muscle cells were incubated with E2 (10⁻⁸M, 1h) prior to induction of apoptosis. Moreover, functional changes of mitochondria were evaluated using supravital Janus Green staining. Column 3 shows that C2C12 cells

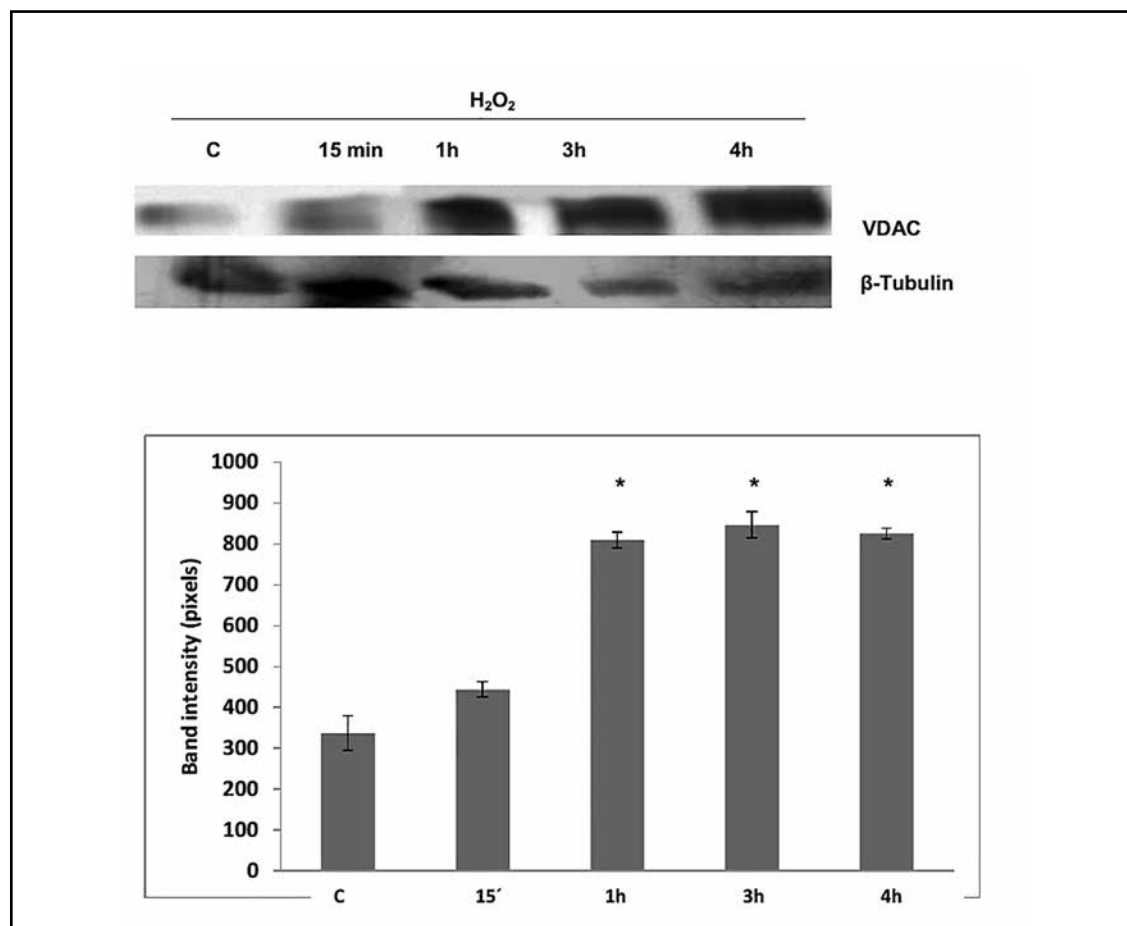


Figure 3. H₂O₂ increases VDAC expression in C2C12 skeletal myoblasts. C2C12 cells were incubated with vehicle (control) or 0.5 mM H₂O₂ during the times indicated, as described in Materials and Methods. Lysates were subject to SDS-PAGE and probed for the expression of VDAC by Western blot analysis. The blots are representative of three independent experiments with comparable results. *p<0.05 with respect to the control.



exposed to H₂O₂ (panel B) exhibited a darker blue-greenish coloration in all the cytoplasm when compared to E2-treated cells (panel A) whereas mitochondria appear as little blue-greenish dots with cytoplasmic distribution and around the nucleus. These results indicate that the rupture of mitochondrial membrane induced by H₂O₂ caused the release of its content into the cytoplasm, inducing the oxidation of the colorant.²⁸ This effect was not observed when C2C12 cells

were preincubated with the hormone prior to H₂O₂ treatment (panel C).

Discussion

Although the classical site of action of estrogens and androgens is the nucleus, it has been demonstrated that these hormones also target at mitochondria.^{42,43} This organelle is not only the powerhouse of the cell, but also participates in a large number of signal transduction pathways for a wide variety of

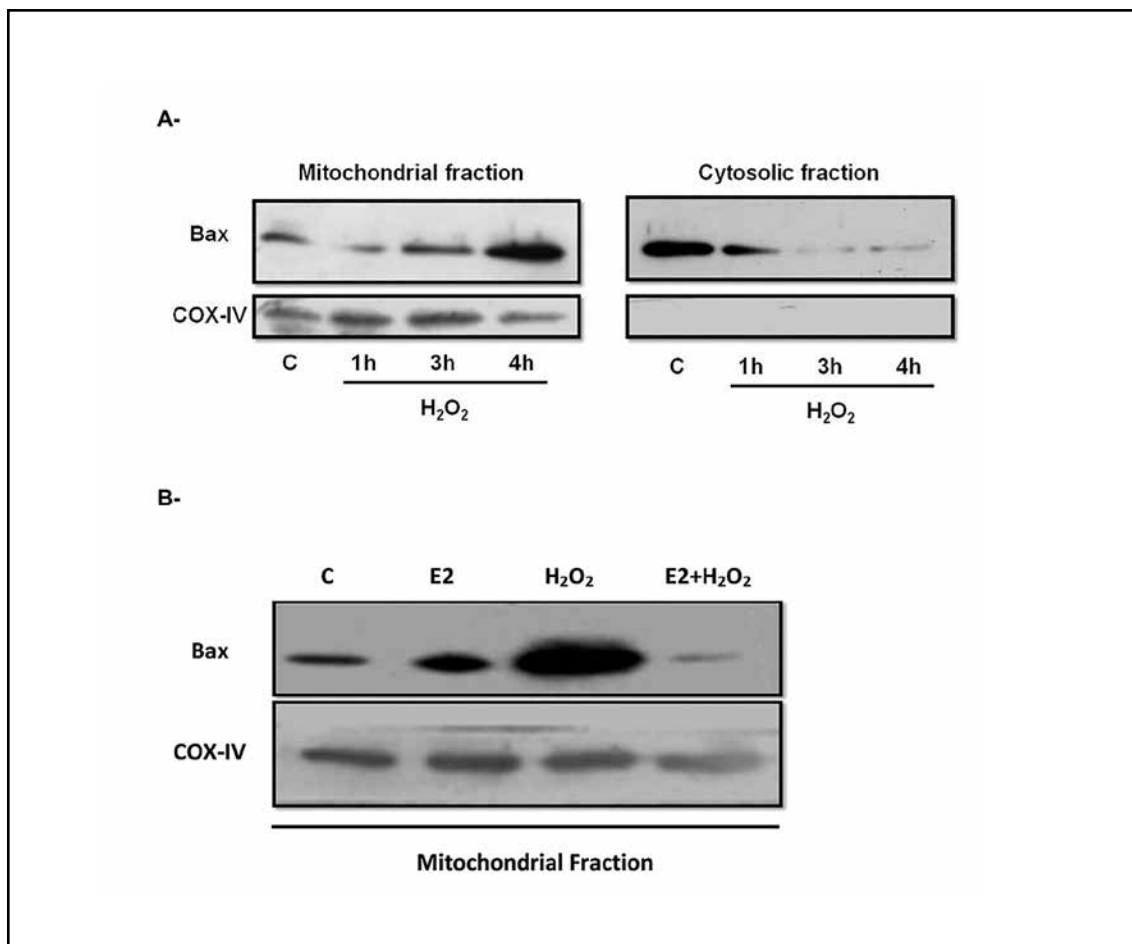


Figure 4. E2 inhibits H₂O₂-induced Bax translocation to mitochondria in C2C12 muscle cells.

(A) C2C12 cells were incubated with vehicle (control) or 0.5 mM H₂O₂ during the times indicated, or (B) with E2: 10⁻⁸ M 17 β -estradiol; H₂O₂: 0.5 mM H₂O₂; E2+H₂O₂: 10⁻⁸ M 17 β -estradiol + 0.5 mM H₂O₂; as described in Materials and Methods. Lysates were obtained following different treatments and then subject to subcellular fractionation. Enriched mitochondrial and cytosolic fractions were used to perform Western blots assays and probed for Bax translocation. Experiments were repeated at least three times with essentially identical results.

biologically active molecules. Moreover, it could be considered as a cellular arsenal enclosing a mixture of pro-apoptotic proteins. In fact, mitochondria represent a control point of apoptosis regulated by Bcl-2 family members at two different levels: through the maintenance of both ATP production linked to mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)⁴⁶ and mitochondrial membrane integrity.⁴⁵ Therefore, if mitochondria are target of the sexual hormones, the protection observed by E2 and T against H₂O₂-induced

apoptosis in C2C12 cells^{13-15,26} could be due to hormonal regulation of the above mentioned mitochondrial events. Accordingly, the data obtained in this work using the C2C12 murine cell line provide evidence that mitochondria play a key role in the antiapoptotic effect, previously observed, of E2 and T in skeletal muscle cells. By means of an established method to evaluate the operational status of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) employing calcein-AM/CoCl₂ loaded cells, it was found that

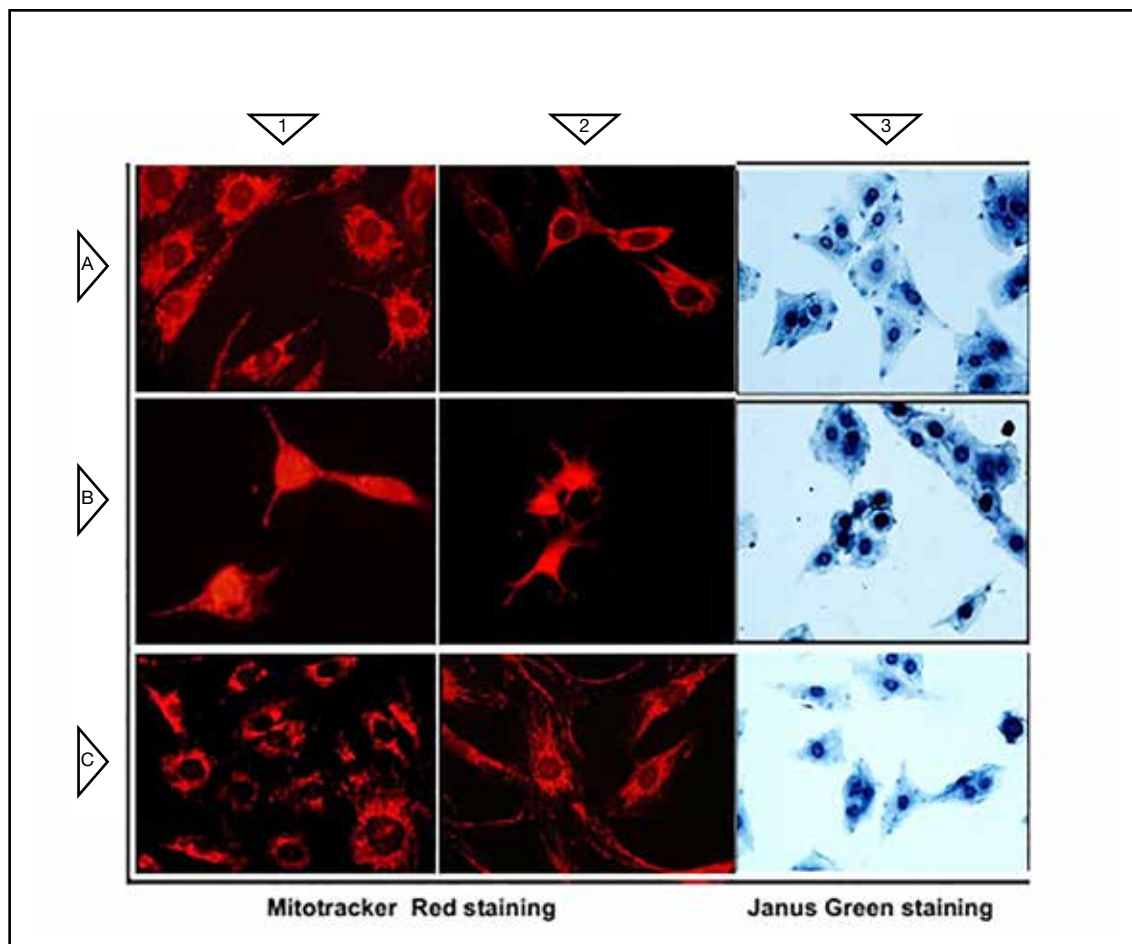


Figure 5. Protective role of 17 β -estradiol and testosterone on mitochondrial morphology in skeletal muscle cells exposed to H₂O₂. First and third columns correspond to C2C12 cells; the second column stands for cells from primary cultures of mouse skeletal muscle. Panel A: 10⁻⁸ M E2 for 1 h; Panel B: 0.5 mM H₂O₂ for 4h; Panel C: 10⁻⁸ M E2 for 1h followed by exposure to 0.5 mM H₂O₂ for 4h. Cells were stained with Janus Green dye (column 3) or Mitotracker dye (columns 1 and 2). Experiments were repeated at least three times with essentially identical results. Magnification: 40X.



H₂O₂ treatment induced its opening. However, pretreatment of the cells with E2 or T abolished this response. Bax is likely to play a role in these effects since in the present work it is shown that H₂O₂ induces its translocation to mitochondria. In mitochondria, Bax can interact with the MPTP components VDAC or ANT.^{21,46} In agreement with this observation, we found that after induction of apoptosis, Bax as well as VDAC levels augment in mitochondria, increasing thereby the probability of interaction between both proteins in C2C12 cells. Hence, Bax may regulate MPTP function via direct molecular interactions with these pore components. Further investigations of protein associations are necessary to evaluate whether these events occur in skeletal muscle cells in response to H₂O₂ treatment and whether the steroids can regulate them. Thus, the effects of E2 on MPTP could be in part due to the hormonal action on Bax, since the hormone inhibits its H₂O₂-induced translocation to mitochondria.

As mentioned before, the mitochondrial inner membrane is impermeable except for a few selected metabolites and ions. However, under stress conditions, the MPTP can open in the inner membrane allowing the free passage of mitochondrial proteins to the cytosol.^{17,18} The induction of apoptosis with hydrogen peroxide in C2C12 cells triggers the loss of mitochondrial components rendering morphological changes of mitochondria. Microscopic analysis with Janus Green and Mitotracker staining revealed a protective effect of the steroids against oxidative stress damage, which included mitochondrial redistribution and pyknosis of the organelle.¹³ Several interpretations can be made of the physiological relevance of these changes in response to H₂O₂ treatment. It is possible that clustering of mitochondria near the nucleus could generate the high energy levels required to maintain the machinery activated by the apoptotic stimulus. Also, displacement of the organelle could facilitate translocation of mitochondrial endonucleases to the nucleus.⁴⁷

Moreover, the mitochondrial modifications such as size reduction could be related to the release of mitochondrial proteins (e.g., AIF, cytochrome c) observed in apoptosis.⁴⁸

In addition to the role of E2 and T on MPTP, in this work, we also demonstrate that E2 as well as T preserve the mitochondrial membrane potential of C2C12 muscle cells from depolarization promoted by H₂O₂. Since an increase of the outer mitochondrial membrane permeability is a crucial event in apoptosis,⁴⁹ these results potentiate the survival role of these sexual hormones acting on mitochondria.

Finally, these studies are relevant to skeletal muscle physiology since C2C12 myoblasts resemble the activated satellite cells that surround mature myofibers. As differentiated adult skeletal muscle fibers have scarce ability to repair and regenerate themselves when a cellular injury occurs, satellite cells have the capacity to proliferate and differentiate, vital properties to repair the injured tissue.⁵⁰ In this context, satellite cells and their response to oxidative stress are important to mature skeletal muscle performance and function. Of significance for our work, enhanced satellite cell apoptosis has been related to compromised recovery potential in skeletal muscle of aged animals.^{51,52} Additional studies will allow deepening the knowledge of the mechanisms by which T and E2 exert the antiapoptotic effect in skeletal muscle cells and its relationship with myopathies associated to hormonal dysregulation.

Acknowledgements

This work was supported by grant PIP 2199 (RB) from the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas of Argentina (CONICET).

Declaration of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

(Recibido: septiembre 2013.

Aceptado: enero 2014)

References

1. Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr* 1997; 127:990-1.
2. Faulkner JA, Larkin LM, Claflin DR, Brooks SV. Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34:1091-6.
3. Meng SJ, Yu LJ. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci* 2010; 11:509-26.
4. Hiona A, Sanz A, Kujoth G, et al. Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice. *PLOS ONE* 2010; 5:e11468.
5. Siu PM, Pistilli EE, Alway SE. Age-dependent increase in oxidative stress in gastrocnemius muscle with unloading. *J Appl Physiol* 2008; 105:1695-705.
6. Sakuma K, Yamaguchi A. Sarcopenia and age-related endocrine function. *Int J Endocrinol* 2012; 2012:127362.
7. Lemoine S, Granier P, Tiffocche C, RannouBekono F, Thieulant ML, Delamarche P. Estrogen receptor alpha mRNA in human skeletal muscles. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35:439-43.
8. Wiik A, Gustafsson T, Esbjörnsson M, et al. Expression of oestrogen receptor α and β is higher in skeletal muscle of highly endurance-trained than of moderately active men. *Acta Physiol Scand* 2005; 184:105-12.
9. Kadi F, Bonnerud P, Eriksson A, Thornell LE. The expression of androgen receptors in human neck and limb muscles: effects of training and self-administration of androgenic-anabolic steroids. *Histochem Cell Biol* 2000; 113:25-9.
10. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000; 1:369-77.
11. Conley KE, Jubrias SA, Esselman PC. Oxidative capacity and ageing in human muscle. *J Physiol* 2000; 526:203-10.
12. Kwong LK, Sohal RS. Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse. *Arch Biochem Biophys* 2000; 373:16-22.
13. Vasconsuelo A, Milanese LM, Boland RL. 17 β -estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Endocrinol* 2008; 196:385-97.
14. Pronsato L, Ronda AC, Milanese L, Vasconsuelo A, Boland R. Protective role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis of skeletal muscle. *Actual Osteol* 2010; 2:45-8.
15. Ronda A, Vasconsuelo A, Boland R. Extracellular-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases are involved in the antiapoptotic action of 17 β -estradiol in skeletal muscle cells. *J Endocrinol* 2010; 2:235-46.
16. Armstrong JS. The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion* 2006; 6: 225-34.
17. Halestrap AP, McStay GP and Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 2002; 84:153-66.
18. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 34:1233-49.
19. Colombini M. Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. *J Membr Biol* 1989; 2:103-11.
20. De Pinto VD, Palmieri F. Transmembrane arrangement of mitochondrial porin or voltage-dependent anion channel (VDAC). *J Bioenerg Biomembr* 1992; 24:21-6.
21. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998; 28:12027-31.
22. Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *P Natl Acad Sci USA* 1998; 95:14681-86.
23. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399:483-7.
24. Shimizu S, Tsujimoto Y. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c re-



- lease, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *P Natl Acad Sci USA* 2000; 97:577-82.
25. Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, et al. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 2000; 19:329-36.
 26. Pronsato L, Boland R, Milanesi L. Testosterone exerts antiapoptotic effects against H₂O₂ in C2C12 skeletal muscle cells through the apoptotic intrinsic pathway. *J. Endocrinol* 2012; 212:371-81.
 27. Lazarow A, Cooperstein SJ. Studies on the enzymatic basis for the Janus Green B staining reaction. *J Histochem Cytochem* 1953; 1:234-41.
 28. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 1981; 9:1227-55.
 29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 7:2248-54.
 30. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
 31. Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer D. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115:2640-47.
 32. Penninger J, Kroemer G. Mitochondria, AIF and caspases-rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol* 2003; 5:97-9.
 33. Reers M, Smiley ST, Mottola-Harshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Method Enzymol* 1995; 260:406-17.
 34. Petronilli V, Costantini P, Scorrano L, Colonna R, Passamonti S, Bernardi P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J Biol Chem* 1994; 269:16638-42.
 35. Snedecor GW, Cochran WG Statistical Methods. Ames, Iowa: The Iowa State University Press 1967.
 36. Le Quoc K, Le Quoc D. Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. *Arch Biochem Biophys* 1988; 265:249-57.
 37. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:619-42.
 38. Zoratti M, Szabò I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1241:139-76.
 39. Zheng YH, Shi Y, Tian CH, et al. Arsenic trioxide (As₂O₃) induces apoptosis through activation of Bax in hematopoietic cells. *Oncogene* 2004; 23:1239-47.
 40. Cesura AM, Pinard E, Schubeneil R, et al. The voltage-dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 2003; 278:49812-8.
 41. Wolter KG, Hsu Y, Smith CL, Mechushtan A, Xi X, Youle RJ. Movement of BAX from cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139:1281-92.
 42. Simpkins JW, Yang SH, Sarkar SN, Pearce V. Estrogen actions on mitochondria—Physiological and pathological implications. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 290:51-9.
 43. Vasconsuelo A, Pronsato L, Ronda AC, Boland R, Milanesi L. Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis. *Steroids* 2011; 12:1223-31.
 44. Leist M, Nicotera P. The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236:1-9.
 45. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6:513-9.
 46. Narita M, Shimizu S, Ito T, et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *PNAS* 1998; 95:14681-6.
 47. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192:571-80.
 48. Granville DJ, Cassidy BA, Ruehlmann DO, et

- al. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and cytochrome c during smooth muscle cell apoptosis. *Am J Pathol* 2001; 159:305-11.
49. Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 2007; 12:815-33.
50. Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K, Nabeshima Y. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J Cell Sci* 1998; 111:769-79.
51. Jejurikar SS, Kuzon M Jr. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis* 2003; 8:573-8.
52. Jejurikar SS, Henkelman EA, Cederna PS, Marcelo CL, Urbanek MG, Kuzon WM Jr Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis. *Exp Gerontol* 2006; 41:828-36.



ACTUALIZACIONES / Reviews

SARCOPENIA: ENFOQUE CLÍNICO

Silvina Mastaglia,^{1*} Carlos Mautalen ²

1. Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Óseas, Instituto de Inmunología, Genética, y Metabolismo (INIGEM), CONICET-UBA, Buenos Aires. 2. Mautalen, Salud e Investigación. Buenos Aires.

Resumen

La sarcopenia, disminución de la masa y rendimiento muscular, es un importante factor de riesgo para la salud en general e, independientemente de la densidad mineral, aumenta el riesgo de sufrir fracturas no vertebrales, especialmente en el hombre.

La masa muscular alcanza su mayor desarrollo alrededor de los 40 años y luego disminuye constantemente. Aun después de los 70 años puede disminuir anualmente alrededor del 1% en el hombre y 0,5% en la mujer.

Desde el punto de vista clínico, la mejor valoración es la medición de la masa muscular apendicular por DXA. El estudio debe incluir prueba de fuerza (apriete del puño), potencia (pararse/sentarse, subir escalones) y rendimiento (velocidad de la marcha) muscular.

La detección/diagnóstico de la sarcopenia debería efectuarse en los sujetos mayores de 65 años e incluso en los menores de esa edad, si sufren caídas frecuentes, fracturas osteoporóticas o falta de fuerza manifiesta.

Las intervenciones destinadas a restaurar o prevenir la pérdida de masa y rendimiento muscular deben incluir ejercicios de resistencia, dieta con contenido proteico de 1,0 a 1,2 g/kg de peso y administración de vitamina D para

mantener niveles de 25OHD mayores de 30 ng/ml. Los agentes terapéuticos en investigación incluyen, entre otros, a los anticuerpos anti-miostatina y los SARM (moduladores selectivos de los andrógenos).

Summary

SARCOPENIA: CLINICAL APPROACH

Sarcopenia, the diminution of muscular mass and performance, is an important risk factor for general health and specifically for bone fractures independently of the bone mineral density.

After reaching a maximal development around 40 years of age, the muscular mass (MM) diminishes constantly, even after 70 years of age at a rate of 1% per year in men and 0.5% per year in women.

From the clinical approach the best measure of MM is accomplished by DXA measuring the appendicular MM. The study of the patient should include physical test to assess strength (hand grip), power (sit/stand test and climb stairs) and muscular performance (walking speed).

Subjects over 65 years of age, or those with frequent fall, osteoporotic fractures or

* Correo electrónico: silvinamastaglia@hotmail.com

manifest diminution of their physical performance could undergo studies for sarcopenia detection.

Medical interventions to restore or prevent MM loss should include resistance exercises, protein content of the diet between 1.0 to 1.2 g/kg and vitamin D administration to keep 25OHD over 30 ng/ml. Intensive research of new agents include, among others, antibodies anti-miostatin and SARM.

Introducción

Rosenberg¹ propuso el nombre de sarcopenia a la progresiva disminución de la masa muscular que acompaña al aumento de la edad. La sarcopenia trae aparejada una disminución de la fuerza y de la función muscular, lo que es un importante factor de riesgo para la salud: disminuye la movilidad, aumenta el riesgo de caídas y por ende causa fracturas óseas, disminuye la capacidad de hacer las labores diarias habituales, conduce a la pérdida de la vida independiente y aumenta el riesgo de muerte.²

La sarcopenia es el resultado de un conjunto de procesos celulares que conducen a una disminución de la cantidad de fibras musculares. Dentro de estos, se señalan principalmente: 1) la pérdida asociada a la edad de la neurona motora, lo que deriva en una denervación de grupos de fibras musculares, 2) cambios hormonales como disminución de las hormonas sexuales y factor de crecimiento insulino-símil (IGF-1), factor anabólico, anticatabólico y antiapoptótico de las fibras musculares esqueléticas, 3) incremento de factores inflamatorios y estrés oxidativo (ROS) que favorecen la mayor degradación de las fibras musculares. Estos, entre otros factores asociados a la edad, conducirán indefectiblemente a la disminución del número de fibras musculares afectando la función y fuerza muscular.

En los últimos tres lustros, un importante caudal de investigaciones ha avanzado en el estudio de la sarcopenia incluyendo los meca-

nismos fisiopatológicos que conducen a la pérdida de la masa muscular,³ un tema imprescindible para llegar a un tratamiento eficaz.

Por el contrario no se ha adelantado con la misma velocidad en la aplicación clínica de las investigaciones efectuadas. Esta revisión se centra principalmente en los conocimientos necesarios para el diagnóstico y eventual tratamiento de los pacientes afectados, con los medios disponibles en la actualidad.

Evolución de la masa muscular con la edad en hombres y mujeres

Varios estudios transversales han mostrado que la masa muscular se mantiene estable entre los 30 y 50 años, iniciando, alrededor de dicha edad, un descenso permanente.

Paralelamente se produce una mayor infiltración del tejido adiposo intramuscular (Figura 1).⁴ La creciente infiltración del tejido muscular con grasa fue comprobada en un estudio longitudinal de cinco años de duración en un grupo de 1678 hombres y mujeres. Mientras que la grasa subcutánea sufrió una leve modificación de acuerdo con la variación del peso corporal, el aumento de la infiltración grasa del músculo se observó en ambos sexos, tanto en los que habían perdido, mantenido o ganado peso, aunque una mayor infiltración grasa del músculo se observó en estos últimos (Figura 2).⁵

La masa muscular apendicular (MMA) alcanza un máximo alrededor de los 40 años y disminuye constantemente a partir ~ de 45 años.⁶

Los estudios transversales pueden cuestionarse por la posible influencia de cambios en la nutrición y la actividad física de las generaciones más jóvenes. Sin embargo, varios estudios longitudinales mostraron una acentuada pérdida anual de la masa muscular en personas de ambos sexos mayores de 70 años. La revisión de tres de esos estudios, mostró pérdidas anuales de MMA entre 0,8 y 1,1% en los hombres y 0,4 y 0,7% en las mujeres (Figura 3).⁷⁻⁹



Valoración de la masa muscular

En los trabajos de investigación iniciales se valoraba la masa muscular por tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética (RM). Estos métodos, si bien son valiosos

para investigación, por la radiación y el costo, limitaban su utilización clínica.

Actualmente se puede valorar la masa muscular por DXA (densitometría por absorción de rayos X) con los equipos avanzados

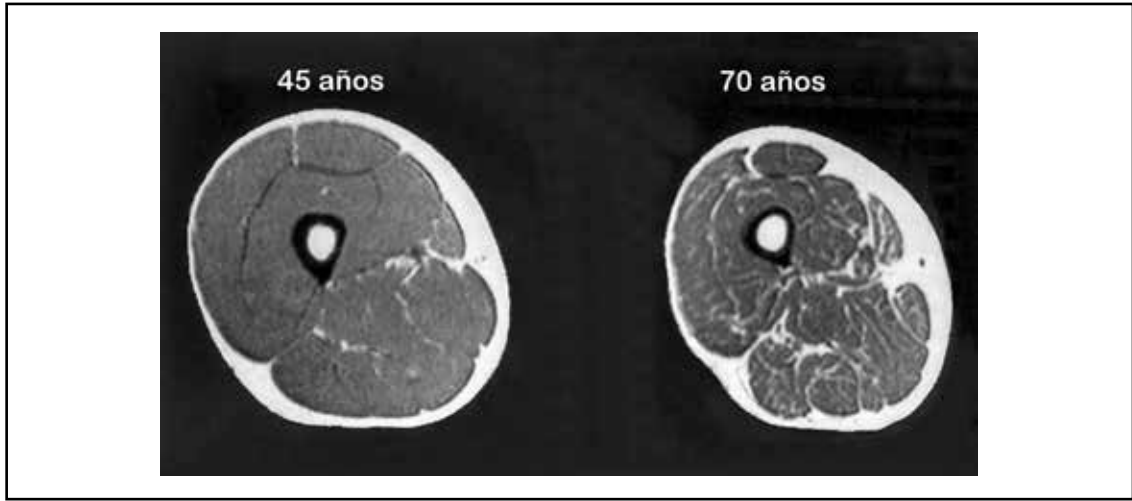


Figura 1. Comparación de la masa muscular de un hombre joven y uno de 70 años. Aumenta la infiltración de grasa y disminuye su volumen (Modificado de Ref. 4).

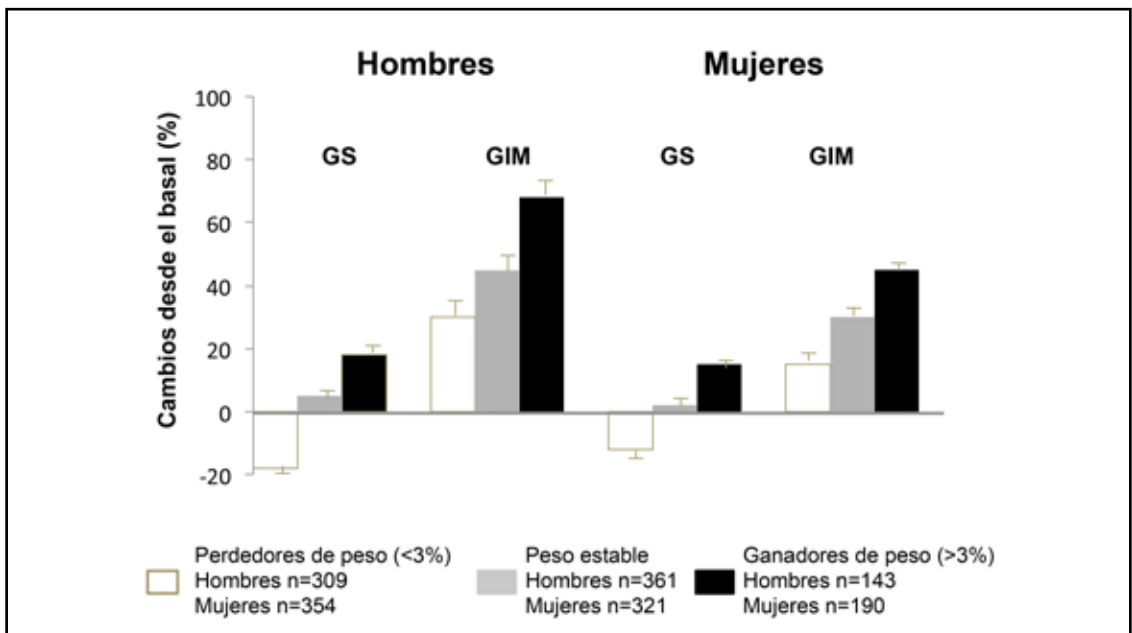


Figura 2. Variación de la grasa subcutánea (GS) y grasa intramuscular (GIM) en un estudio longitudinal de 5 años de duración (Modificado de Ref. 5).

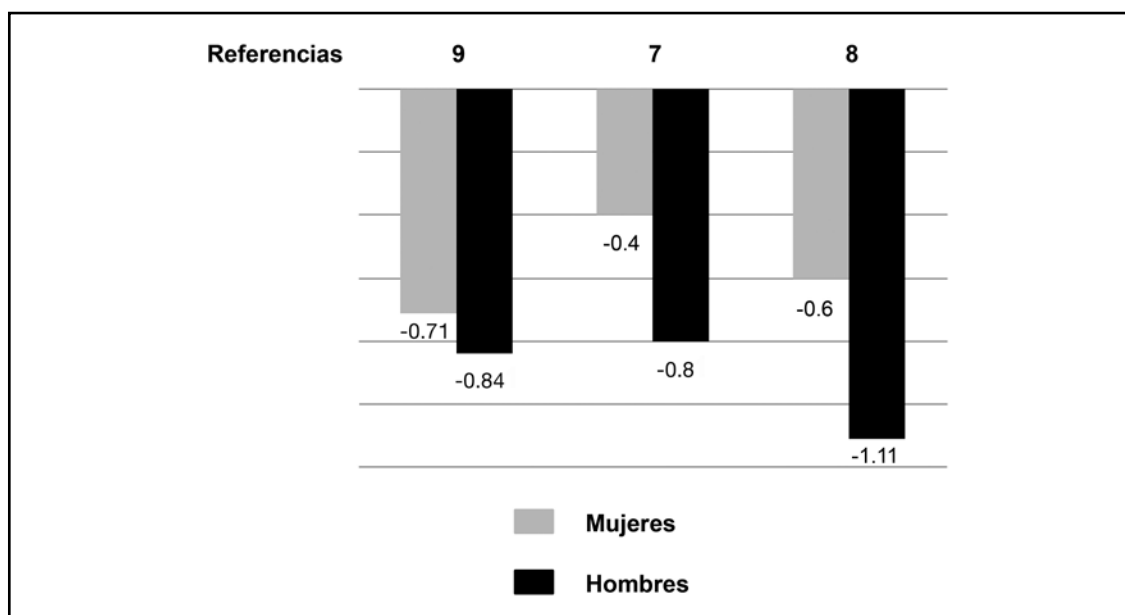


Figura 3. Pérdida anual de masa muscular apendicular (MMA) en tres estudios longitudinales en sujetos mayores de 70 años.

que se utilizan para la evaluación de la masa ósea.

Al efectuar por DXA un rastreo de cuerpo entero se puede valorar la composición corporal: masa ósea, masa grasa y masa magra (músculo, víscera y otros tejidos). Sin embargo, al evaluar los brazos y piernas, la masa magra está integrada principalmente por músculo evitando otras interferencias.

La tabla 1 muestra los valores promedio de la masa muscular apendicular en cuatro estudios realizados en la población blanca joven de Estados Unidos, Australia y Estonia.^{6,11-13}

Los resultados obtenidos originalmente en mujeres por Baumgarten¹⁰ (basado en el estudio Rosetta¹³ [adoptados asimismo en otros estudios^{14,15}]) parecen demasiado elevados a la luz de otros estudios más recientes.^{6,11,12} Los valores son definitivamente más elevados en la población negra de Estados Unidos⁶ y más reducidos en un estudio en la población china de Hong Kong.¹⁶

Desde el punto de vista práctico parece adecuado utilizar los valores recientemente descriptos por Gould y cols.¹¹ con sus respectivos valores de -1 y -2 desvíos estándar (véase apartado Diagnóstico de la sarcopenia).

Evaluación de la fuerza y rendimiento muscular

Es este un capítulo de suma importancia en el diagnóstico clínico de la sarcopenia. La disminución del rendimiento muscular es más rápida que la caída de la fuerza y esta a su vez es más abrupta que la disminución de la masa muscular.

1. Fuerza muscular

La evaluación de la fuerza del puño (*hand grip strength*) es la prueba más común y mejor estandarizada para el uso clínico. Se toman con un dinamómetro (existen varios equipos comerciales), usualmente tres mediciones de fuerza en cada puño y se selecciona el va-



Tabla 1. Valores promedio (\pm 1DS) de la masa muscular apendicular (MMA) en sujetos jóvenes obtenidos en 4 estudios diferentes.

| Autor | País | Ref | Edad | Equipo | Valores kg/talla ² | |
|-----------------|------|-----|---------|---------|-------------------------------|-------------|
| | | | | | Hombres | Mujeres |
| Gallagher et al | E.U | 13 | 18 - 40 | Lunar | 8,6 +/- 1,1 | 7,3 +/- 0,9 |
| Kelly et al | E.U | 6 | 20 - 35 | Hologic | 9,3 +/- 1,3 | 6,9 +/- 1,1 |
| Kull et al | EST | 12 | 25 - 39 | Lunar | 8,8 +/- 1,1 | 6,7 +/- 0,9 |
| Gould et al | AUS | 11 | 20 - 39 | Lunar | 8,8 +/- 0,9 | 6,8 +/- 0,8 |

E.U: Estados Unidos; EST: Estonia; AUS: Australia

lor mayor para el registro. La figura 4 muestra los valores promedio para ambos brazos en hombres y mujeres. La fuerza es considerablemente mayor en el hombre pero asimismo la velocidad de su disminución con la edad es más rápida¹⁷ (Figura 4).

Los valores límite serían 30 kg en el hombre y 20 kg en la mujer. Uno de los inconvenientes de esta prueba es que no se modifica con los tratamientos instituidos para mejorar la sarcopenia.

2. Potencia muscular

a) Levantarse de una silla (*sit-stand*). Esta

prueba es fácilmente aplicable en la clínica y solo se necesita una silla recta sin apoyabrazos y un cronómetro. El paciente debe levantarse de la silla con los brazos cruzados sobre los hombros cinco veces consecutivas. Es muy útil para evaluar la evolución a largo plazo. Los valores de referencia (límite inferior) son los siguientes:¹⁸

Edad 60-69 años: 11,4 segundos
 70-79 años: 12,6 segundos
 80-89 años: 14,8 segundos

A su vez, Strassman y cols.¹⁹ proponen medir el número de movimientos efectuados

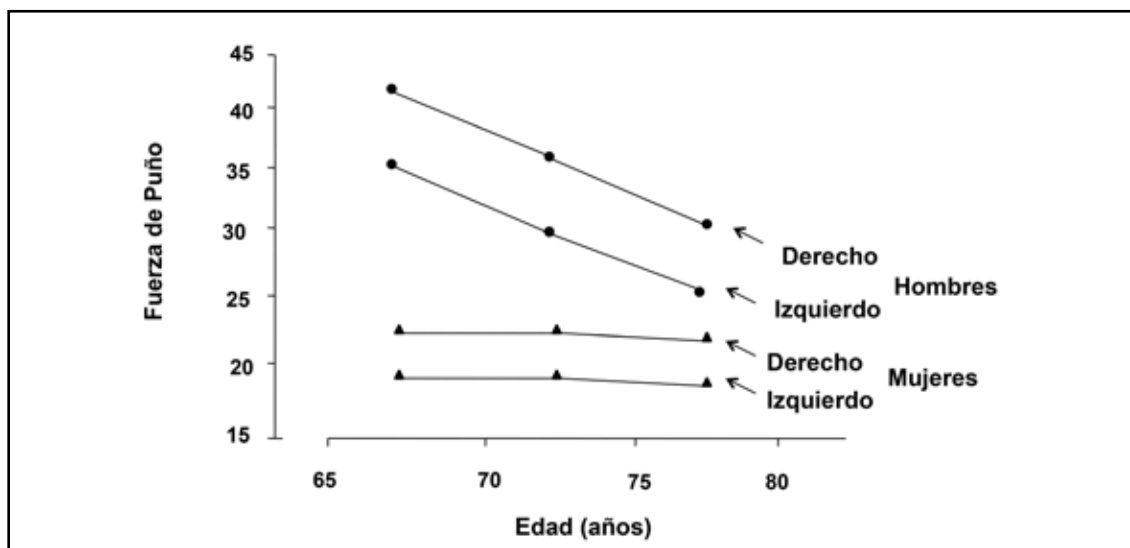


Figura 4. Fuerza del puño (kg) en hombres y mujeres de 60 a 80 años (Modificado de Ref. 19).

en un minuto (una prueba más exigente) y proporciona estos valores promedio:

Edad 20-21 años Hombres: 50, Mujeres 47
75-79 años Hombres: 30, Mujeres 27

b) Subir escalones. Para esta prueba se necesita un tramo de cuatro o cinco escalones que, por razones de seguridad, debe contar con un pasamanos.

Se debe cronometrar el tiempo que le lleva al paciente desde la orden de comenzar hasta llegar con ambos pies al escalón más alto. Es también un estudio útil para evaluar la evolución del paciente.

3. Rendimiento muscular

a) Velocidad de la marcha. La prueba más utilizada es la medición del tiempo empleado para caminar 4 m con marcha habitual. Solo es necesario contar con un espacio despejado de unos 5 m y un cronómetro. Se debe efectuar una prueba de ensayo y tomar el tiempo empleado en la segunda prueba.

Se considera que el resultado es anormal si la velocidad de la marcha es inferior a 0,8 m/s. De hecho, es el valor límite fijado por el Consenso Europeo sobre Sarcopenia para comenzar el estudio del paciente.²⁰

b) Valoración más prolongada de la velocidad de marcha. La prueba más usada consiste en medir los metros de marcha recorridos en 6 minutos. Tiene la ventaja de su mayor precisión por ser más prolongados los tiempos de medición, por valorar no solo la velocidad, sino también la resistencia y por ser un muy buen índice para seguir la evolución del paciente. Se considera que los aumentos mayores de 20 m en la totalidad de los metros recorridos tienen importancia clínica. La dificultad, sobre todo en consultorios y clínicas en grandes ciudades, es contar con un recorrido de 20 a 30 m como mínimo y el tiempo prolongado del estudio.

Sarcopenia y fracturas óseas

La relación positiva entre masa muscular y densitometría ósea (DMO) ha sido descripta con frecuencia. En principio, el factor determinante sería la influencia de la sobrecarga y actividad física sobre el hueso. Sin embargo, Blain y cols.²¹ estudiando 160 hombres saludables entre 20 y 72 años observaron que la MMA era el principal factor asociado a la DMO del cuello femoral ($r = 0,39$; $p < 0,001$) independientemente de la actividad física, estilo de vida, nutrición y factores hormonales. Se especula que el factor común no determinado, posiblemente, sea el genético.

La relación entre sarcopenia y (por lo menos) las fracturas de cadera podría parecer evidente aun sin efectuar estudios sobre el tema. La fractura de cadera es precedida por una caída. En condiciones normales, cualquier factor que desestabiliza la marcha es inmediatamente contrabalanceado por una respuesta correctiva fuerte, rápida y coordinada que restablece el equilibrio. Esta respuesta requiere un sistema neuromuscular adecuado. La sarcopenia disminuye dicha capacidad, aumenta la frecuencia de caídas y por ende las fracturas no vertebrales.

Evaluación de la masa muscular posfractura de cadera

Di Mónaco y cols.²² en un estudio inicial evaluaron por DXA a 313 mujeres, dentro de las primeras tres semanas posfractura de cadera. El 74% de las pacientes tenía osteoporosis y el 58% sarcopenia, de acuerdo con las definiciones habituales para estas patologías.

El mismo grupo publicó más tarde una extensión del estudio inicial, incluyendo también hombres con fractura de cadera. Con la misma metodología anterior, el 64% de las mujeres y el 95% de los hombres posfractura eran sarcopénicos. La mayor prevalencia observada en los hombres fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$).²³

Fiatarone y cols.²⁴ en un estudio prospectivo en Sidney, Australia, observó en un gru-



po de 193 pacientes con fracturas de cadera (edad 81 ± 8 años; mujeres 72%) que el 71% de los pacientes eran sarcopénicos, el 58% desnutridos y el 55% deficientes en vitamina D.

Un año después de una fractura de cadera en un estudio longitudinal de un año de duración se observó que en aquellas pacientes sarcopénicas al inicio, la disminución de la DMO de la cadera contralateral era mayor que en las no sarcopénicas.²⁵

La posibilidad de sufrir una fractura de cadera de acuerdo con los resultados de la prueba de pararse de una silla está descrita en la Figura 5 (estudio prospectivo en hombres).²⁶ Los pacientes fueron divididos en cuartiles (el 1° corresponde al que tiene el mejor rendimiento y el 4°, el peor). Mientras que el riesgo en el 1er cuartil es 1, dicho riesgo aumenta progresivamente hasta ser 3 veces mayor en el cuarto cuartil. En cuanto a los pacientes que tenían imposibilidad física de efectuar la prueba, el riesgo de fractura era: 8,15 veces mayor comparado con el grupo de mejor rendimiento físico.

Evaluación de la masa muscular posfracturas vertebrales

Algunos estudios previos mostraron que la disminución de la densidad muscular del torso (medida por TC) causa dolor e hipercifosis. Anderson y cols.²⁷ observaron que 44 pacientes con fracturas vertebrales vs. 223 controles tenían menor masa muscular (34,3 vs. 39,4 HU; $p < 0,003$) El riesgo relativo de sufrir fracturas vertebrales fue de 2,16 por cada disminución de 1 DS en la densidad muscular del torso. La densidad general de toda la musculatura, fue más sensible para determinar el riesgo, que la de cada músculo por separado.

Recientemente, Iolascon y cols.²⁸ evaluaron en un estudio preliminar la masa muscular apendicular por DXA en mujeres con fracturas vertebrales. Encontraron que el 23% de las pacientes con una fractura y el 44% con dos o más fracturas vertebrales tenían sarcopenia. La prevalencia de sarcopenia aumentaba con la severidad de las fracturas por osteoporosis vertebral.

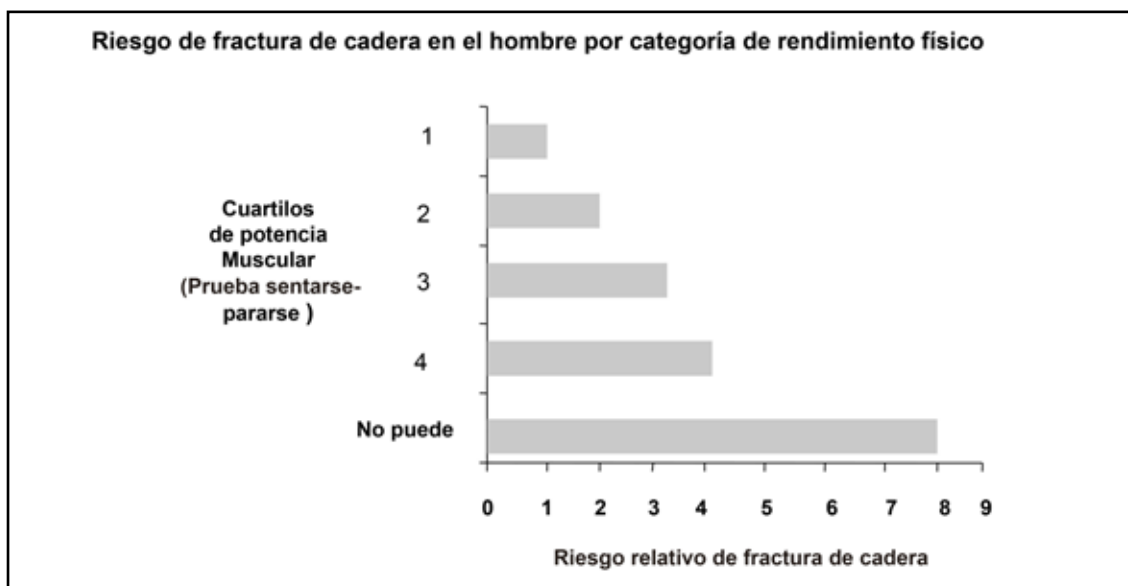


Figura 5. Aumento del riesgo de fractura de cadera en hombres por cuartiles de rendimiento físico (Modificado de Ref. 28).

Estudio prospectivo sobre el riesgo de sufrir fracturas no vertebrales en pacientes con sarcopenia

Este estudio, recientemente comunicado y de singular importancia, siguió durante un período de 8-9 años, a 1204 mujeres y 5279 hombres. Sobre la base de los resultados de densitometría sobre DMO y MMA, pruebas de la fuerza del puño y la velocidad de la marcha, los pacientes fueron clasificados como normales, sarcopénicos, osteopénicos/osteoporóticos y finalmente con ambas patologías.

En los hombres, el riesgo relativo de sufrir una fractura no vertebral fue respectivamente de 1,6, 1,8 y 3,2 para los que sufrían solo sarcopenia, osteopenia/osteoporosis o ambas patologías, lo que demostró que la sarcopenia por sí misma, sin estar necesariamente asociada a la pérdida de masa ósea, era un factor importante para sufrir fracturas óseas no vertebrales. La combinación de ambas patologías duplicó el riesgo.

En las mujeres, los mismos riesgos relativos fueron: 1,6, 3,0 y 3,0. Si bien la importan-

cia de la sarcopenia por sí misma desde el análisis estadístico no tuvo la misma importancia que en el hombre, se pudo observar un aumento del riesgo a 1,6 comparado con 1,0 en los pacientes sin sarcopenia ni osteoporosis (Figura 6).²⁹

Sarcopenia en el obeso

Con la edad, el aumento de la masa grasa y la disminución de la masa muscular son dos procesos presentes en prácticamente la totalidad de la población. El aumento y redistribución de la grasa se pueden dar sin modificación del peso corporal (y del IMC), compensados por la disminución de la masa muscular.

En los estudios originales de Baumgartner³⁰ se observó que alrededor de los 15% de los hombres y mujeres estudiados tenían tanto obesidad como sarcopenia (de acuerdo con los criterios habituales para definir obesidad). En la evaluación transversal, el riesgo relativo de sufrir "discapacidad" era de 2,07 para los sarcopénicos; 2,33 para los obesos y

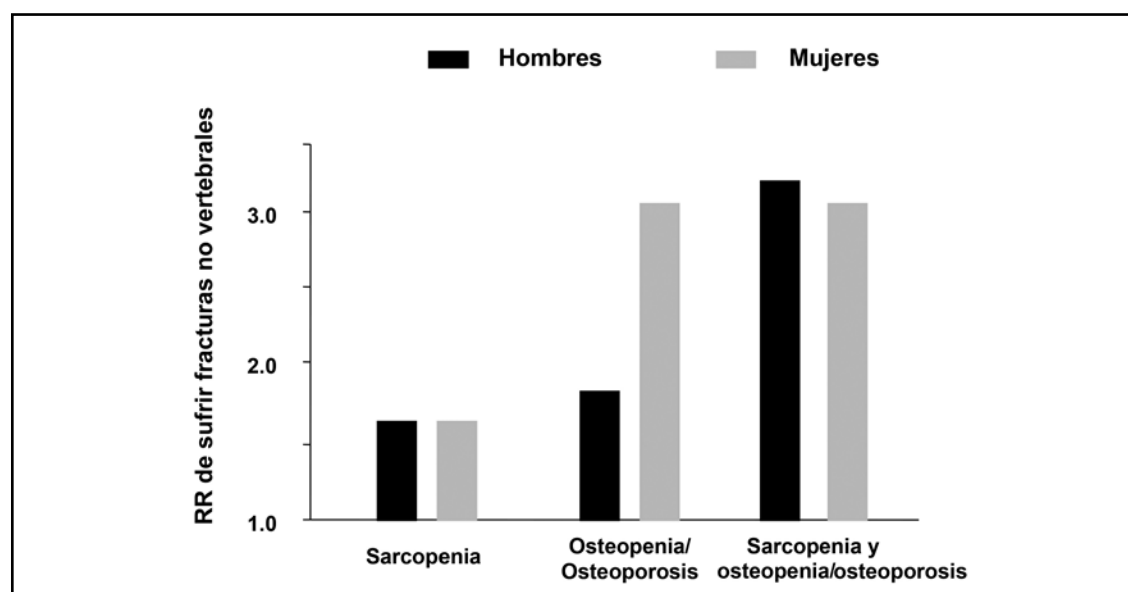


Figura 6. Riesgo relativo de sufrir una fractura no vertebral en un estudio longitudinal de 8-9 años en sujetos que solo tenían sarcopenia o solo osteopenia/osteoporosis o ambas patologías (Modificado de Ref. 31).



4,12 para los que padecían ambas patologías. En un seguimiento longitudinal de 8 años, el mismo grupo observó que los sarcopénicos-obesos al inicio, tenían dos a tres veces mayor probabilidad de desarrollar o agravar su “discapacidad”.³¹

Aceptado el mayor riesgo para la salud, que significa la asociación de obesidad y sarcopenia, nuevos estudios observaron que en el obeso la fuerza y el rendimiento muscular podían ser deficitarios a pesar de que la evaluación de la masa muscular por DXA estaba dentro de los valores normales. Aparentemente, el estímulo de la sobrecarga corporal contribuye a mantener la masa muscular pero no su eficacia.

Newman y cols.³² revisaron la definición de sarcopenia en el obeso, integrando la masa grasa en la fórmula para definir sarcopenia. Observaron que el porcentaje de obesas sarcopénicas aumentaban de 7,1% según el criterio de Baumgartner³⁰ a 21,7% de acuerdo con la nueva definición propuesta. Sorprendentemente, ningún sujeto era clasificado como sarcopénico si su IMC era superior a 30, mientras que el 11,5% de los hombres y el 14,4% de las mujeres, en dicho rango de IMC, eran sarcopénicos cuando la masa grasa entraba en la definición de sarcopenia.

Desde el punto de vista clínico en los sujetos obesos –IMC mayor de 30– la definición de sarcopenia debe basarse en las pruebas de fuerza y rendimiento muscular y en un umbral de masa muscular mayor que el de la población general. Por ejemplo, utilizar un solo DS estándar por debajo del promedio (véase Sarcopenia clínica)

Sarcopenia clínica

Se puede distinguir la sarcopenia primaria, aquella debida al aumento de la edad, de las secundarias. Entre las numerosas causas secundarias se señalan:

- Sedentarismo excesivo
- Enfermedades crónicas cardíacas, pulmonares, renales

- Enfermedades malignas
- Enfermedades gastrointestinales que dificultan la absorción intestinal
- Dieta severamente restringida.

Las sarcopenias secundarias pueden aparecer a cualquier edad. Además pueden sumarse al envejecimiento y acelerar la pérdida de masa muscular debida a la edad.

Detección o diagnóstico de la sarcopenia

No hay un consenso universal sobre este punto. Un esquema interesante es el incluido en el Consenso Europeo.²² Los sujetos mayores de 65 años deben efectuar dos pruebas de suficiencia muscular: velocidad de la marcha y fuerza del puño. Si fallan en cualquiera de ambas, se debe efectuar una medición de la masa muscular (se infiere que es la masa muscular apendicular por DXA). El algoritmo indica que, si la medición de la masa muscular es normal, el sujeto no tiene sarcopenia, a pesar de haber fallado en las pruebas de suficiencia muscular. Esta última conclusión es cuestionable, especialmente en los pacientes obesos.

Se sugiere para la detección/diagnóstico de sarcopenia estudiar a:

- Sujetos mayores de 65 años
- Sujetos de menor edad con las siguientes características:
 - Autodetectada falta de fuerza o rendimiento muscular
 - Caídas frecuentes
 - Fracturas osteoporóticas
 - Deseo de mantener la suficiencia muscular en forma prolongada.

Estudios para efectuar:

- Velocidad de la marcha
- Prueba de pararse-sentarse
- Fuerza del puño
- Masa muscular apendicular por DXA.

Los valores sugeridos para evaluar la MMA son los siguientes:¹¹

| | Promedio | - 1 DS | - 2DS |
|---------|----------|--------|-------|
| Hombres | 8,8 | 7,9 | 6,9 |
| Mujeres | 6,8 | 6,1 | 5,3 |

Finalmente, el médico (que alguna importancia merece para no ser aplastado por los algoritmos) decidirá basándose en la información obtenida si la suficiencia muscular del sujeto es:

- Satisfactoria para la edad
- Sarcopenia subclínica
- Sarcopenia clínica

La periodicidad de los controles posteriores debe tener en cuenta la velocidad de reemplazo de la masa muscular –1 a 2% diaria– y la indicación terapéutica efectuada.

Intervenciones

- Actividad física: los ejercicios de resistencia contrarrestan la pérdida muscular asociada a la edad por incremento del número de las fibras musculares esqueléticas y el área transversal (CSA de su nomenclatura en inglés *cross-sectional areas*).³³ Los ejercicios de resistencia son aquellos que aumen-

tan la frecuencia cardíaca y respiratoria. Las actividades de resistencia moderadas incluyen actividades como nadar, bailar, caminar enérgicamente, andar en bicicleta. Las actividades de resistencia rigurosa incluyen subir escaleras, trotar, remar, nadar varias vueltas continuas en la piscina y andar en bicicleta cuesta arriba.

El desarrollo de una rutina de ejercicios de resistencia realizada en forma gradual produce un incremento del 3-9% en CSA, duplica la fuerza muscular y mejora la *performance* física.³⁶ Otras de las ventajas que se les reconocen a los ejercicios de resistencia son: 1) no requieren ser realizados en forma rutinaria;³⁵ 2) previenen de caídas y pérdida de la movilidad; 3) el tiempo mínimo requerido para su realización con beneficios sobre la salud es 30 minutos dos veces por semana; 4) no requiere un equipamiento sofisticado para su ejecución; 5) son bien tolerados por los adultos mayores aun aquellos que presentan otras condiciones clínicas tales como diabetes, osteoartritis, osteoporosis, enfermedad cardiovascular y depresión.

En la tabla 2 se muestran algunos de los estudios que examinan los efectos de los ejercicios de resistencia sobre diferentes parámetros de los músculos esqueléticos.

Tabla 2. Estudios que evalúan el efecto de la actividad física sobre la pérdida de masa muscular relacionada con la edad.

| Estudio (Ref.) | Género | Edad (años) | Población (n) | Resultados |
|--------------------------------|--------|-------------|---------------|------------|
| Trappe y col. ³⁸ | M | 74±2 | 7 | ↑F, ↑MHC1 |
| Trappe y col. ³⁹ | F | 74±2 | 7 | ↑F |
| Slivka y col. ⁴⁰ | M | 80-86 | 6 | ↑F, ↑CSA |
| Fiatarone y col. ³⁶ | M | 90±3 | 10 | ↑F, ↑CSA |
| Kryger y col. ⁴¹ | M,F | 85-97 | 11 | ↑F, ↑CSA |
| Frontera y col. ³⁵ | F | 68-79 | 14 | ↑F, ↑CSA |

F: fuerza, CSA: cross-sectional areas, MHC1: cadena pesada de miosina tipo 1



- **Dieta:** la ingesta inadecuada de proteínas influye sobre la masa muscular por reducción de la síntesis más que por el incremento de la degradación de las proteínas musculares.⁴⁰ Varios estudios observacionales comunican que los adultos mayores no alcanzan a cubrir las recomendaciones diarias de ingesta de proteínas. Kerstetter y cols. comunicaron que, en una población de adultos mayores de 50 años estadounidenses, el 32-41% de las mujeres y el 22-38% de los hombres muestran un consumo de proteínas inferior al que figura en las Recomendaciones Dietéticas Admitidas (0,8 g/kg de peso corporal).⁴¹

Un estudio epidemiológico prospectivo mostró que la ingesta de proteínas estuvo asociada a la prevención de pérdida de la masa muscular en mujeres y hombres con una edad entre 70-79 años. En este mismo estudio se observó que los individuos que tenían una ingesta mayor de 1,1 g/kg de peso corporal perdieron menos masa magra corporal total y apendicular comparados con aquellos con una ingesta inferior o igual a 0,7 g/kg de peso corporal.⁴² Esto sugeriría que el incremento de la ingesta de proteínas por encima de 0,8 g/kg podría reducir el riesgo de sarcopenia en adultos mayores, proponiéndose un incremento en los requerimientos diarios de 0,8 a 1,0-1,2 g/kg de peso por día de proteínas para alcanzar una adecuada salud musculoesquelética en adultos mayores.⁴³

La ingesta de proteínas con la dieta debe ser dividida en 3 o 4 tomas por día, de acuerdo con las costumbres del paciente. Una sola ingesta proteica importante en el día es mucho menos útil que la misma cantidad dividida en tres tomas. Si es posible, la ingesta debe ser seguida por una actividad física. Se estima que la síntesis de fibras musculares posingesta proteica se prolonga unas 3 horas, intervalo que se extiende a unas cinco horas si es seguida de actividad física.⁴⁴ El incremento de la ingesta de proteínas debería ser realizada con suma precaución en pacientes con una *clearance* de creatinina inferior a 30 ml/min.

- **Vitamina D:** la vitamina D ejerce sus efectos sobre el tejido muscular a través de dos vías, genómica y no genómica. Los efectos genómicos de la vitamina D en músculo comprende la interacción entre 1,25(OH)₂ D₃ y su receptor nuclear que deriva en cambios en ARNm induciendo la síntesis proteica *de novo*, regulando la proliferación celular e induciendo la diferenciación de las fibras musculares.⁴⁵ Los efectos no genómicos de la vitamina D en el tejido muscular incluyen la activación de proteína quinasa C (PKC), que origina un incremento del *pool* de calcio intracelular, lo cual es esencial para la contracción muscular. La activación de PKC, además, promueve la síntesis proteica de las células musculares.^{46,47} Por lo tanto, la vitamina D es un factor requerido para el desarrollo, integridad y función del tejido muscular.

La relación entre el estado de vitamina D y la función muscular fue evaluado en el *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES).⁴⁸ En este estudio se observó que aquellos sujetos con mejores niveles séricos de 25-hidroxivitamina D mostraron mayor capacidad para realizar la prueba de velocidad de marcha y pararse y sentarse. El estudio *Longitudinal Ageing Study Amsterdam* (LASA) evaluó función muscular y vitamina D. En este estudio se observó que aquellos sujetos con niveles de 25(OH)D por encima de 20 ng/ml presentaron mejor rendimiento físico.⁴⁹

Por otro lado, existe evidencia biológica y clínica que avalaría la indicación de suplementar a los adultos mayores con vitamina D con el fin de mejorar la función y fuerza muscular. Basados en estudios que incluyen revisiones sistemáticas del tema, la suplementación con vitamina D sería eficaz para mejorar la fuerza muscular en sujetos con niveles inferiores a 10 ng/ml pero no en aquellos con niveles superiores a estos.⁵⁰ Se requieren futuros estudios para establecer el efecto de la suplementación con vitamina D en aquellos sujetos con niveles de hipovitaminosis D (10-30 ng/ml).

En cambio, los efectos de la vitamina D para la prevención de fracturas y caídas son mejor conocidos.^{51, 52} La reducción en la tasa de caídas y fracturas fue observada después de la suplementación con vitamina D. Se postula que dicho efecto se alcanza porque tanto el tejido muscular como el cerebro expresan el receptor de vitamina D (VDR),⁵³ permitiendo mejorar el balance y en consecuencia reduciendo la tasa de caídas (~13-49%).⁵⁴ Desde el punto de vista práctico, para la salud tanto ósea como muscular, es aconsejable que se administre la dosis necesaria de vitamina D a fin de alcanzar niveles de 25(OH)D entre 30 y 50 ng/ml.

La tabla 3 muestra los resultados de algunos estudios sobre el efecto de la suplementación con vitamina D sobre la función muscular.

- Tratamiento médico de la sarcopenia. Terapia hormonal: existe una relación entre la declinación de los niveles séricos de testosterona asociados a la edad y la pérdida de función y fuerza muscular en los hombres adultos mayores.⁵⁹ En las mujeres, la reducción de los niveles de estrógenos durante la menopausia produce también una disminución de la función y fuerza muscular ya que los estrógenos son convertidos a testosterona, la cual tiene un efecto anabólico sobre la síntesis proteica.⁶⁰ Ambas hormonas sexuales, además, suprimen a las citoquinas

inflamatorias que ejercen un efecto catabólico sobre el músculo. Por todo lo expuesto, la terapia hormonal de reemplazo siempre ha sido considerada como posible tratamiento para la sarcopenia.

Sin embargo, los resultados son controvertidos. En hombres adultos mayores con hipogonadismo, el efecto anabólico de la testosterona es escaso, pues se observan mínimos cambios en la composición corporal, sin incremento en la fuerza muscular. Estos resultados deben ser interpretados en el contexto de que las dosis administradas de testosterona en los hombres adultos mayores son menores que aquellas administradas a hombres jóvenes por el riesgo de cáncer de próstata. En mujeres, la administración de estrógenos y testosterona no mostró un incremento significativo de la fuerza muscular.⁶¹

La hormona de crecimiento (GH) ejerce un efecto anabólico indirecto sobre el músculo a través de la estimulación de la producción de IGF-1. Se ha postulado que GH podría ser eficaz para el tratamiento de sarcopenia en adultos mayores. Sin embargo, la administración de GH en adultos mayores no ha sido exitosa para incrementar la masa y fuerza muscular pero sí la IGF-1/IGFBP-3, como lo demostraron Boonen y cols., quienes observaron un incremento de la fuerza del puño en mujeres añosas con fractura de cadera reciente después de la administración de IGF-1/IGFBP-3.⁶²

Tabla 3. Estudios clínicos sobre los efectos de la suplementación con vitamina D sobre fuerza muscular.

| Estudio (Ref.) | Tratamiento | Dosis | Población(n) | Edad (años) | Duración | Comentario |
|-------------------------------|----------------|---------------|--------------|-------------|----------|------------|
| Glerup y col. ⁵⁷ | Ergocalciferol | 100.000UI/mes | 55 | 32 | 6 meses | Con efecto |
| Bischoff y col. ⁵⁸ | Colecalciferol | 800 UI/día | 122 | 84 | 6 meses | Con efecto |
| Kenny y col. ⁵⁹ | Colecalciferol | 1000UI/día | 65 | 76 | 6 meses | Con efecto |
| Pfeifer y col. ⁶⁰ | Colecalciferol | 800UI/día | 242 | 77 | 12 meses | Con efecto |



• Nuevos agentes terapéuticos: la investigación y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para la prevención y tratamiento de la sarcopenia ha avanzado en los últimos años. El desarrollo de anticuerpos antimiostatina es uno de los tratamientos en investigación más promisorios. La miostatina es un regulador negativo del músculo esquelético; se observan niveles elevados en individuos con sarcopenia.⁶³ La inhibición de miostatina promovería la diferenciación y proliferación de miocitos. Los anticuerpos antimiostatina producirían incremento en la masa y fuerza muscular en modelos animales experimentales.⁶⁴⁻⁶⁶

En 2013, la *Food and Drug Administration* (FDA) aceptó a bimagrumab, un anticuerpo monoclonal antimiostatina, como una terapia de gran avance para el tratamiento de la miopatía esporádica por cuerpos de inclusión (sBMI, de su nomenclatura en inglés: *sporadic inclusión body myositis*). Esta es una rara enfermedad degenerativa muscular del adulto mayor de 65 años caracterizada por una lenta y progresiva atrofia muscular. El bimagrumab ilustra el gran avance alcanzado en los últimos años en la terapéutica de las enfermedades musculares degenerativas atróficas.

Los moduladores selectivos de los receptores de andrógenos (SARM, de su nomenclatura en inglés *Selective Androgen Receptor Modulators*) son agentes no esteroides

con capacidad para unirse a los receptores de andrógenos. Estos últimos se expresan en diversos órganos tales como músculo esquelético, hueso y órganos sexuales pero con escaso efecto sobre próstata, lo que los convierten en importantes candidatos para el tratamiento de la sarcopenia. Los SARM han mostrado mejorar la masa muscular en modelos animales de experimentación.⁶⁷

Conclusión

La evaluación de la masa y el rendimiento musculares adquiere cada vez mayor importancia como factor de riesgo de la salud general; dentro de nuestra especialidad están íntimamente ligados a la prevención de las fracturas y al tratamiento posterior de los pacientes que ya han sufrido una fractura ósea. En última instancia, la mayoría de estos pacientes tiene el “síndrome de dismovilidad” en el que se entrelazan sarcopenia y osteoporosis, como ha sido descrito por Binkley y cols.⁶⁸

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: mayo 2014.

Aceptado: junio 2014)

Referencias

1. Rosenberg I. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr* 1997;127:990S-91S.
2. Lee C, Boyko ES, Nielson CM, et al. Mortality risk in older men associated with changes in weight, lean mass, and fat mass. *J Am Geriatr Soc* 2011; 59:233-40.
3. Rasmussen B, Volpi F. Muscle biology and mTORC1 signaling in aging. In: Cruz Jentoft A, Morley JE (eds.). Sarcopenia. Wiley-Blackwell 2012; p20.
4. Michel JP. Vers une définition consensuelle de la sarcopénie. *La Sarcopénie*. Springer Healthcare 2013; p50.
5. Delmónico MJ, Harris TB, Visser M, et al. Longitudinal study of muscle strength, quality and adipose tissue infiltration. *Am J Clin Nutr* 2009; 90:1579-85.
6. Kelly TL, Wilson KE, Heymsfield SB. Dual Energy x-ray Absorptiometry body composition, Reference values from Nhanes. *PLoSOne* 4: e 7033.

7. Gallagher D, Ruts E, Visser M, et al. Weight stability masks sarcopenia in elderly men and women. *Am J Physiol* 2000; 279: E366-75.
8. Fantin F, Di Francesco V, Fontanan G, et al. Longitudinal body composition changes in old men and women: interrelationships with worsening disability, *J Gerontol Med Sci* 2007; 62A:1375-81.
9. Koster A, Ding J, Stenholm S, et al. Health ABC study. Does the amount of fat mass predict age-related loss of lean mass, muscle strength, muscle quality in older adults? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; 66:888-95.
10. Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, et al. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol* 1998;147: 755-63.
11. Gould H, Brennan SL, Kotowicz MA, et al. Total and appendicular lean mass reference ranges for Australian men and women: the Geelong osteoporosis study. *Calcif Tissue Int* 2014; 94:363-72.
12. Kull M, Kallikorm R, Lember M, et al. The Working Definitions of Sarco-Osteopenia in Estonia. *J Bone Miner Res* 2010; 25:S445.
13. Gallagher D, Visser M, De Meersman RE, et al. Appendicular skeletal muscle mass: effects of age, gender and ethnicity. *J Appl Physiol* 1997; 83: 229-39.
14. Newman AB, Kupelian V, Visser M, et al. Sarcopenia: alternative definitions and associations with lower extremity function. *J Am Geriatr Soc* 2003; 51: 1602-9.
15. Delmónico MJ, Harris TB, Lee JS, et al. Alternative definitions of sarcopenia, lower extremity performance, and functional impairment with aging in older men and women. *J Am Geriatr Soc* 2007; 55:769-74.
16. Lau EM, Lynn HS, Woo JW, et al. Prevalence of and risk factors for sarcopenia in elderly Chinese men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60:213-6.
17. Mathiowetz V, Kashman N, Volland G, et al. Grip and pinch strength: normative data for adults. *Arch Phys Med Rehabil* 1985; 66: 69-74.
18. Bohannon RW. Reference values for the five-repetition sit-to-stand test: a descriptive meta-analysis of data from elders. *Percept Mot Skills* 2006; 103:215-22.
19. Strassmann A, Steurer-Stey C, Lana KD, et al. Population-based reference values for the 1-min sit-to-stand test. *Int J Public Health* 2013; 58:949-53.
20. Alfonso J, Jentoft Cruz A, Baeyens JP, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing* 2010; 39: 412-23.
21. Blain H, Jaussent A, Thomas E, et al. Appendicular skeletal muscle mass is the strongest independent factor associated with femoral neck bone mineral density in adult and older men. *Exp Gerontol* 2010; 45:679-84.
22. Di Monaco M, Vallero F, Di Monaco R, et al. Prevalence of sarcopenia and its association with osteoporosis in 313 older women following a hip fracture. *Arch Gerontol Geriatric* 2011; 52:71-4.
23. Di Monaco M, Castiglioni C, Vallero F, et al. Sarcopenia is more prevalent in men than in women after hip fracture: a cross-sectional study of 591 inpatients. *Arch Gerontol Geriatric* 2012; 55:48-52.
24. Fiatarone Singh MA, Singh NA, Hansen RD, et al. Methodology and baseline characteristics for the Sarcopenia and Hip Fracture study: a 5-year prospective study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009; 64:568-74.
25. Orwig D, Hochberg M, Shledon EG, et al. The relationship between sarcopenia and bone mineral density over the year post hip fracture. *Bone Min Res* 2013; 28 (Suppl 1): S286.
26. Cawthon PM, Fullman R, Marshall L, et al. Physical performance and risk of hip fractures in older men. *J Bone Miner Res* 2008; 23:1037-44.
27. Anderson D, Allaire B, Bruna A, et al. Low trunk muscle density is associated with prevalent vertebral fractures in older adults. *J Bone Min Res* 2013; 28 (Suppl 1):S40.
28. Iolascon G, Giamattei MT, Moretti A, et al. Sarcopenia in women with vertebral fragility fractures. *Aging Clin Exp Res* 2013; Suppl 1:S 129-31.
29. Chalhoub D, Cawthon P, Ensrud K, et al. Risk



- of non-spine fractures among men and women with sarcopenia, low bone mass or both. *Bone Min Res* 2013; 28 (Suppl 1): S1.
30. Baumgartner RN, (2000) Body composition in healthy aging. *Ann N Y Acad Sci* 2000;904: 437-48.
 31. Baumgartner RN, Wayne SJ, Water DL, et al. Sarcopenic obesity predicts instrumental activities of daily living disability in the elderly. *Obes Res* 2004;12:1995-2004.
 32. Newman AB, Lee JS, Visser M, et al. Weight change and the conservation of lean mass in old age: the Health, Aging and Body Composition Study. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 872-8.
 33. Frontera WR, Meredith CN, O'Reilly KP, et al. Strength conditioning in older men: skeletal muscle hypertrophy and improved function. *J Appl Physiol* 1998 ;64:1038-44.
 34. Fiatarone MA, Marks EC, Ryan ND, et al. High-intensity strength training in nonagenarians. Effects on skeletal muscle. *JAMA* 1990; 263:3029-34.
 35. Henwood TR, Taaffe DR Detraining and retraining in older adults following long-term muscle power or muscle strength specific training. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008; 63:751-8.
 36. Trappe S, Williamson D, Godard M, et al. Effect of resistance training on single muscle fiber contractile function in older men. *J Appl Physiol* 2000; 89:143-52.
 37. Trappe S, Godard M, Gallagher P, et al. Resistance training improves single muscle fiber contractile function in older women. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281:C398-406.
 38. Slivka D, Raue U, Hollon C, et al. Single muscle fiber adaptations to resistance training in old (>80 yr) men: evidence for limited skeletal muscle plasticity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295:R273-80.
 39. Kryger AI, Andersen JL. Resistance training in the oldest old: consequences for muscle strength, fiber types, fiber size, and MHC isoforms. *Scand J Med Sci Sports* 2007; 17:422-30.
 40. Boirie Y. Physiopathological mechanism of sarcopenia. *J Nutr Health Aging* 2009; 13: 717-23.
 41. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL. Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in humans. *J Nutr* 2003; 133:855S-861S.
 42. Houston DK, Nicklas BJ, Ding J, et al. Dietary protein intake is associated with lean mass change in older, community-dwelling adults: the Health Aging and Body Composition (Health ABC) Study. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:150-5.
 43. Gaffney-Stomberg E, Insogna KL, Rodríguez NR, et al. Increasing dietary protein requirements in elderly people for optimal muscle and bone health. *J Am Geriatr Soc* 2009; 57:1073-9.
 44. Paddon-Jones D, Van Loon L. Nutritional Approaches to treating Sarcopenia. In: Cruz Jentoff A y J.E.Morley JE (eds). *Sarcopenia*. Wiley Blackwell: 2012; p275.
 45. Freedman LP. Strategies for transcriptional activation by steroid/nuclear receptors. *J Cell Biochem* 1999; Suppl 32-33:103-9.
 46. Boland AR, Boland RL. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 induces arachidonate mobilization in embryonic chick myoblasts. *Biophys Acta* 1993; 1179: 98-104.
 47. Selles J, Boland R. Rapid stimulation of calcium uptake and protein phosphorylation in isolated cardiac muscle by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 77:67-73.
 48. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with better lower-extremity function in both active and inactive persons aged >or =60 y. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:752-8.
 49. Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, et al. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:2058-65.
 50. Stockton KA, Mengersen K, Paratz JD, et al. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 2011; 22:859-71.
 51. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, et al.

- Effects of a short-term vitamin D and calcium supplementation on body sway and secondary hyperparathyroidism in elderly women. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1113-8.
52. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, et al. Vitamin D status, trunk muscle strength, body sway, falls, and fracture among 237 postmenopausal women with osteoporosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:87-92.
 53. Rapuri PB, Gallagher JC. The effects of calcitriol on falls and fractures and physical performance test. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90:503-6.
 54. Bichoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Willett WC, et al. Effect of vitamin D on falls. A meta-analysis. *JAMA* 2004; 291:1999-2006
 55. Glerup H, Mikkelsen K, Poulsen L, et al. Hypovitaminosis D myopathy without biochemical signs of osteomalacic bone involvement. *Calcif Tissue Int* 2000; 66:419-24.
 - 56- Bischoff HA, Stahelin HB, Dick W, et al. Effects of vitamin D and calcium supplementation on falls: a randomized controlled trial. *J Bone Miner Res* 2003;18; 343-51.
 - 57- Kenny AM, Biskup B, Robbins B, et al. Effects of vitamin D supplementation on strength, physical function, and health perception in older, community-dwelling men. *J Am Geriatr Soc* 2003; 51:1762-7.
 58. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, et al. Effects of a long term vitamin D and calcium supplementation on falls and parameters of muscle function in community-dwelling older individuals. *Osteoporos Int* 2009; 20:315-22.
 59. Morley JE, Haren MT, Kin MJ, et al. Testosterone, aging and quality of life. *J Endocrinol Invest* 2005; 28:76-80.
 60. Lang T, Streeper T, Cawthon P, et al. Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention, and assessment. *Osteoporos Int* 2010; 21:543-59.
 61. Borst SE. Interventions for sarcopenia and muscle weakness in older people. *Age Ageing* 2004; 33:548-55.
 62. Boonen S, Rosen C, Bouillon R, et al. Musculoskeletal effects of the recombinant human IGF-1/IGF binding protein-3 complex in osteoporotic patients with proximal femoral fracture: a double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1593-9.
 63. Bradley L, Yaworsky PJ, Walsh FS. Myostatin as a therapeutic target for musculoskeletal disease. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:2119-24.
 64. Siriatt V, Salerno MS, Berry C, et al. Antagonism of myostatin enhances muscle regeneration during sarcopenia. *Mol Ther* 2007; 15:1463-70.
 65. Langley B, Thomas M, Bishop A, et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 49831-40.
 66. Walsh FS, Celeste AJ. Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. *Biochem Soc Trans* 2005; 33:1513-7.
 67. Gao W, Reiser PJ, Coss CC, et al. Selective androgen receptor modulator treatment improves muscle strength and body composition and prevents bone loss in orchidectomized rats. *Endocrinology* 2005;146:4887-97.
 68. Binkley N, Krueger D, Buehning B, et al. What's in a name revisited: should osteoporosis and sarcopenia be considered components of "dysmobility syndrome?" *Osteoporos Int* 2013; 24:2955-9.



ACTUALIZACIONES / Reviews

NIVELES NORMALES DE VITAMINA D PREVIENEN / ATENÚAN EL ENVEJECIMIENTO CARDIOVASCULAR, LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES Y EL CÁNCER: ¿REALIDAD O FICCIÓN?

Adriana S. Dusso*

División de Nefrología Experimental. IRB Lleida. Universidad de Lleida. Lleida. España.

Resumen

En la actualidad, la deficiencia de vitamina D, que alcanza proporciones de epidemia incluso en países muy desarrollados, constituye un reconocido factor de alto riesgo de muerte por todas las causas que podría corregirse a muy bajo costo. Esta revisión presenta los mecanismos fisiopatológicos y moleculares que determinan que, en la población general, la deficiencia de vitamina D y su consecuencia inmediata (defectos en la activación del receptor de vitamina D), contribuyan no solo a alteraciones de la homeostasis fosfocálcica, hiperparatiroidismo y pérdida de masa ósea, sino también a una mayor incidencia y gravedad en patologías asociadas con el envejecimiento acelerado, como la hipertensión, diabetes, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, daño renal, o con alteraciones del sistema inmunitario como infecciones virales y bacterianas, inflamación sistémica, enfermedades autoinmunes y cáncer. Una mejor comprensión de las ventajas y limitaciones de las recomendaciones actuales para la suplementación con colecalciferol, ergocalciferol, o hidroferol es imprescindible para el diseño

de nuevas estrategias para la corrección de la deficiencia de vitamina D, con riesgos mínimos para el paciente, y de máxima eficacia tanto en la prevención de cada una de estas patologías, como en atenuar su avance.

Palabras clave: calcitriol, vitamina D, receptor de vitamina D, calcidiol.

Summary

NORMAL VITAMIN D LEVELS PREVENT/ ATENUATE CARDIOVASCULAR AGING, AUTOIMMUNE DISEASES AND CANCER: FACT OR FICTION?

Vitamin D deficiency, a highly prevalent condition among otherwise healthy individuals even in Western countries, is a well recognized risk factor for higher mortality for all causes, which can be inexpensively corrected. This review presents the current understanding of the pathophysiological and molecular mechanisms responsible for the cause-effect relationship between vitamin D deficiency, defective activation of the vitamin D receptor and a higher prevalence and severity of

* Dirección Postal: División de Nefrología Experimental. IRB Lleida. Universidad de Lleida. Avda. Rovira Roure 80. 25198 Lleida. España. Correo electrónico: adusso@irbllleida.cat

health disorders that compromise survival. Such disorders extend beyond abnormal calcium and phosphate homeostasis and bone loss to include disorders of accelerated aging, responsible for the development of hypertension, diabetes, atherosclerosis, renal and cardiovascular damage, and also abnormalities in immune function that increase the propensity to viral and bacterial infections, systemic inflammation, autoimmune disease and cancer. An analysis of the advantages and limitations of current recommendations for supplementation with cholecalciferol, ergocalciferol or calcidiol should help improve therapeutic strategies to correct vitamin D deficiency and reach circulating levels that safely prevent the onset of these disorders or attenuate their progression.

Key words: calcitrol, vitamin D, vitamin D receptor, calcidiol.

Históricamente, la contribución más reconocida de la vitamina D a la salud de la población ha sido la erradicación del raquitismo en los años 30 del siglo pasado. En la actualidad, la vitamina D ha sido identificada como la molécula responsable de los múltiples mecanismos fisiopatológicos que sustentan la veracidad del dicho popular “donde entra el sol no entra el médico”. De hecho, en la población general, la deficiencia de vitamina D se asocia a un incremento en el riesgo de muerte por todas las causas.^{1,2}

Aunque ninguna correlación constituye una prueba de causalidad, sabemos hoy que los beneficios para la salud del mantenimiento de la integridad del sistema endocrino de la vitamina D resultan, en parte, de una relación causa-efecto entre el déficit de vitamina D y un desarrollo acelerado de patologías del envejecimiento. Estas patologías no se limitan a la osteoporosis o la propensión a fracturas, sino que incluyen también trastornos que cursan con tasas elevadas de morbilidad y mortalidad, como la hipertensión, diabetes, fallo

renal y cardiovascular, mayor susceptibilidad a infecciones respiratorias, enfermedades autoinmunes y cáncer.^{1,2}

Indudablemente, si la deficiencia de vitamina D aumenta el riesgo de morbimortalidad, la corrección de la deficiencia podría proveer una estrategia económica y, “en teoría”, sin riesgos, para prevenir, o al menos para poder reducir, la incidencia de estas patologías responsables de una severa disminución en la calidad de vida en la creciente población añosa del mundo occidental y que, en consecuencia, está drenando recursos de los sistemas sanitarios en todo el mundo. Una alerta importante de posibles riesgos debidos a una suplementación con vitamina D inadecuadamente controlada, provino de un estudio epidemiológico en mujeres normales.³ Este estudio ha demostrado que la progresiva reducción de las tasas de mortalidad, conforme se corrige la deficiencia, es solo la primera fase de una típica curva en U. De hecho, las tasas de mortalidad comienzan a aumentar levemente en lugar de disminuir, para niveles de vitamina D superiores a 60 ng/ml, incluso por debajo del límite superior del rango de normalidad.

Está claro, entonces, que la implementación de ensayos clínicos prospectivos para obtener recomendaciones basadas en la evidencia de estrategias seguras y eficaces de corrección de la deficiencia de vitamina D en la población general requiere una cuidadosa reevaluación de los conocimientos actuales acerca del sistema endocrino de la vitamina D y de su interacción causal con el desarrollo/progresión de cada patología. El objetivo de esta revisión es actualizar los siguientes conocimientos indispensables para optimizar los beneficios de las acciones del sistema endocrino de la vitamina D en la prevención de patologías del envejecimiento:

1. Validez de la evidencia epidemiológica de una asociación inversa entre niveles bajos de vitamina D y mayor riesgo de morbimortalidad.



2. Mecanismos de acción de la vitamina D que maximizan sus acciones biológicas.

3. Patofisiología subyacente en el impacto severo de la deficiencia de vitamina D sobre la morbimortalidad.

4. Consideraciones esenciales para el diseño de estrategias seguras y eficaces para la corrección de la deficiencia de vitamina D.

Validez de la evidencia epidemiológica de una asociación inversa entre riesgos de morbimortalidad y niveles bajos de vitamina D

En la última década, varios metanálisis de estudios retrospectivos de alta potencia han demostrado que la deficiencia de vitamina D se asocia a un aumento marcado del riesgo de mortalidad por todas las causas.^{1,2} Recientemente, sin embargo, la validez de estas asociaciones ha sido severamente cuestionada por Autier y col.,⁴ basándose en los resultados de un metanálisis que sugiere que los procesos inflamatorios subyacentes en el desarrollo de patologías del envejecimiento son la causa, y no la consecuencia, de la deficiencia de vitamina D. Es importante enfatizar que, en franca oposición a estas afirmaciones, existen hoy evidencias experimentales y clínicas crecientes de la eficacia de la vitamina D en atenuar la severidad de la inflamación y sus efectos adversos. Más importante aún, un riguroso metanálisis posterior al trabajo de Autier, en más de 900.000 participantes de 26 naciones, ha corroborado no solo una asociación inversa entre niveles bajos de vitamina D y aumentos en el riesgo de mortalidad, sino también la eficacia de la administración de colecalciferol en disminuir las tasas de mortalidad.²

La alta rigurosidad de este reciente metanálisis radica, fundamentalmente, en los criterios de inclusión de los estudios retrospectivos. Solo fueron analizados aquellos estudios que examinaron la asociación entre niveles de 25-hidroxivitamina D circulantes con causas específicas de muerte, o con muerte

por todas las causas, solo en adultos de la población general que no presentaban ninguna patología. Los resultados más relevantes de este metanálisis han sido: a) la demostración de una prevalencia de insuficiencia de vitamina D, definida como niveles séricos de 25-hidroxivitamina D inferiores a 30 ng/ml, del 69,5% en los Estados Unidos y del 86,4% en Europa, y con una prevalencia de deficiencia severa (<10 ng/ml) de un 15% y un 4%, respectivamente; b) la confirmación de una moderada pero significativa asociación inversa entre los niveles circulantes de vitamina D y las tasas de mortalidad por todas las causas, y que asignan a la deficiencia de vitamina D la responsabilidad del 9,4% de muerte por todas las causas en Europa y de 12,8% en los Estados Unidos. El mayor riesgo de muerte se asoció a enfermedad coronaria, linfoma, cáncer del tracto digestivo y trastornos respiratorios. Si se tiene en cuenta que en los Estados Unidos el riesgo de muerte en fumadores es del 20%, del 11% en individuos sin actividad física alguna y del 9% en alcohólicos, el hallazgo de una tasa de mortalidad del 13% atribuible exclusivamente a la deficiencia de vitamina D enfatiza la necesidad de implementar estrategias públicas de corrección de la deficiencia de vitamina D dirigidas a reducir las altas tasas de muertes prematuras que, obviamente, podrían evitarse.

Un aporte adicional muy valioso de este metanálisis se obtuvo de los estudios aleatorizados de suplementación con ergocalciferol o colecalciferol, exclusivamente. Al estratificar por el tipo de vitamina D utilizado, se demostró un descenso de la mortalidad de un 11% solo en individuos suplementados con colecalciferol, pero no en los tratados con ergocalciferol. Estos resultados podrían explicar, en parte, las discrepancias vigentes en cuanto a la eficacia de la corrección de la deficiencia de vitamina D en disminuir mortalidad, que han surgido de la comparación de metanálisis en los que no se discriminó por el tipo de vitamina D utilizada en la suplementa-

ción. Indudablemente, se necesitan estudios prospectivos aleatorizados de alta potencia para establecer la dosis óptima, la frecuencia de administración y la duración de la suplementación, así como también para verificar las posibles desventajas del uso de la vitamina D₂ en disminuir eficazmente el riesgo de mortalidad. Para el diseño de estos estudios es imprescindible conocer en profundidad los mecanismos de acción de la vitamina D que aumentan la supervivencia.

Mecanismos de acción de la vitamina D que maximizan sus acciones biológicas

La mal llamada vitamina D es en realidad una prohormona, la precursora de la potente hormona esteroidea 1,25-dihidroxitamina D o calcitriol. No es una vitamina ya que, como se indica en la Figura 1, el organismo puede generarla simplemente por la acción de la luz

ultravioleta del sol sobre su precursor en la piel, el 7-dehidrocolesterol. Es una prohormona porque cualquiera de sus dos formas, el ergocalciferol (o vitamina D₂ presente en los vegetales) o el colecalciferol (o vitamina D₃ presente en los animales) son inactivas en el momento de su síntesis y deben ser convertidas por el organismo a la forma hormonal para ejercer sus importantes funciones biológicas como la de aumentar la supervivencia. Este proceso de activación requiere dos hidroxilaciones sucesivas, ambas esenciales para maximizar los beneficios en la salud del sistema endocrino de la vitamina D.⁵

La primera hidroxilación ocurre mayoritariamente pero no exclusivamente en el hígado, donde la vitamina D se convierte en 25-hidroxitamina D (también llamada calcidiol), el metabolito que circula en mayor concentración (de 30 a 100 ng/ml). Dos 25-hidroxisas, los citocromos P450 CYP27A1 y principalmente el CYP2R1 en seres humanos, son los res-

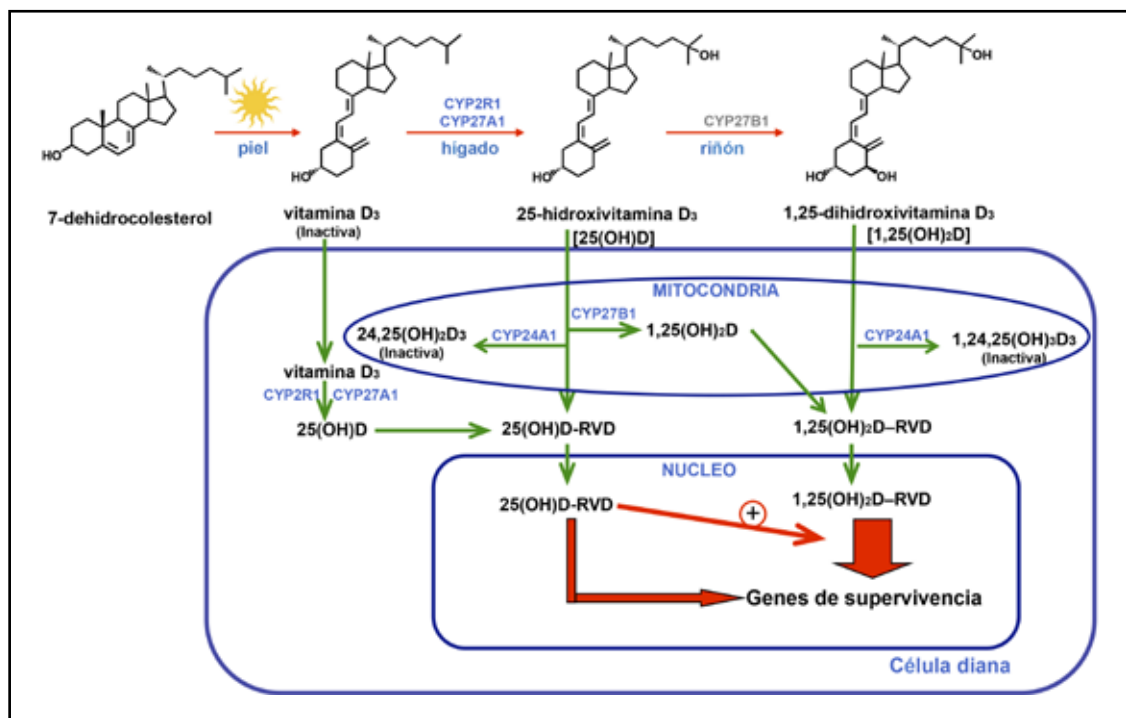


Figura 1. Síntesis de vitamina D, bioactivación y catabolismo sistémico y celular. Eficacia relativa del complejo ligando/receptor en promover supervivencia (véanse detalles en el texto).



ponsables del mantenimiento de niveles circulantes adecuados de 25-hidroxivitamina D.⁵ De hecho, mutaciones en la CYP2R1 y no en la CYP27A1 derivan en deficiencia severa de vitamina D.⁶ Debido a las dificultades metodológicas para las mediciones de los niveles de vitamina D y, también a que no existen mecanismos de regulación estrictos de la expresión o de la actividad de las 25-hidroxilasas,⁵ toda la vitamina D disponible en el organismo se convierte en 25-hidroxivitamina D, de modo que la medición de los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D se utiliza para estimar el estado de vitamina D del individuo.

La segunda hidroxilación, que convierte a la 25-hidroxivitamina D en la 1,25-dihidroxivitamina D (también llamada calcitriol), la vitamina D hormona y, por tanto, el metabolito natural más activo del sistema endocrino de la vitamina D, tiene lugar predominante pero no exclusivamente en el riñón, y también en numerosas células no renales.⁵ A diferencia de la falta de control descrito para las 25-hidroxilasas, y debido a las potentes acciones del calcitriol en la movilización de calcio y fósforo, la actividad de la 1-hidroxilasa renal está rigurosamente controlada. Esta enzima es también un citocromo P450, el CYP27B1, que se induce en respuesta al bajo calcio y bajo fósforo o a aumentos en la parathormona (PTH) y es fuertemente inhibida por la poderosa hormona fosfatúrica, la FGF23, el gen de la longevidad: el *klotho*, y el propio calcitriol.⁷ El calcitriol también controla estrictamente sus propios niveles en la circulación induciendo la expresión de la enzima CYP24A1, responsable del catabolismo tanto de la 25-hidroxivitamina D como del calcitriol.^{5,7}

De modo que el riñón es esencial para las acciones biológicas de la vitamina D que aumentan la supervivencia, por ser el sitio principal de producción del calcitriol circulante.⁵ De hecho, en individuos normales, las hidroxilasas no renales contribuyen muy poco al calcitriol sérico, pero son sumamente importantes para proveer localmente el calcitriol

necesario para las acciones autocrinas y/o paracrinas en la misma célula productora de calcitriol o en células de su entorno, con un impacto mínimo en la homeostasis mineral y en la remodelación ósea. De hecho, a diferencia de la 1-hidroxilasa renal, la regulación de la actividad de las hidroxilasas extrarrenales se ajusta a la función local de la activación de la vitamina D. Por ejemplo, en monocitos-macrófagos, la producción de calcitriol, que aumenta eficazmente la capacidad antibacteriana o antiviral, está altamente estimulada por citoquinas.¹ Es importante destacar también que un mismo modulador puede controlar la actividad de la 1-hidroxilasa de manera diferente según el tipo celular. De hecho, la FGF23, que suprime la 1-hidroxilasa renal y la de monocitos-macrófagos, estimula en cambio la 1-hidroxilasa de la glándula paratiroidea, en la que la FGF23 suprime la síntesis y secreción de PTH.⁸

Tal como ocurre con otras hormonas esteroideas, la unión del calcitriol al receptor de vitamina D (VDR) es el paso inicial necesario para activar la maquinaria genética de las células diana para inducir o reprimir genes involucrados en las múltiples acciones biológicas de la vitamina D. Se trata de una unión calcitriol/VDR de alta afinidad y especificidad, y que origina un cambio en la estructura tridimensional del VDR que es esencial para favorecer la formación de heterodímeros con el receptor del ácido retinoide, RXR. Esta es la primera de una serie de interacciones del VDR tanto con elementos de respuesta a la vitamina D en el ADN de los genes diana, así como también con un gran número de correuladores nucleares que aumentan marcadamente la inducción o la represión de genes por el complejo calcitriol/VDR.⁵ Un hallazgo reciente de gran importancia para aumentar la eficacia del sistema endocrino de la vitamina D en promover supervivencia, y que se resume en la Figura 1, se obtuvo de estudios en ratones que carecen de CYP27B1 y que por lo tanto no pueden convertir la 25-hidroxivi-

tamina D en calcitriol. Se demostró de manera concluyente no solo que la 25-hidroxivitamina D es capaz de activar al VDR directamente para regular la maquinaria genética de la célula, sino también que aumenta marcadamente la eficacia del complejo calcitriol/VDR para inducir una respuesta biológica.^{9,10}

Indudablemente, la magnitud de una respuesta biológica a la vitamina D dependerá no solo de los niveles circulantes de calcitriol, o del contenido intracelular de calcitriol y de VDR, sino también de los niveles circulantes e intracelulares de 25-hidroxivitamina D tanto para estimular la conversión local a calcitriol para acciones intracrinas, autocrinas/paracrinas con poco impacto en la homeostasis fosfocálcica sistémica, como para inducir la sinergia de la 25-hidroxivitamina D con las acciones biológicas del complejo calcitriol/VDR.^{9,10}

Es importante destacar que en células que expresan tanto la 1-hidroxilasa como la 25-hidroxilasa, la suplementación con vitamina D podría ser suficiente para promover una acción sinérgica entre la 25-hidroxivitamina D y el calcitriol producidos localmente para aumentar la supervivencia sin modificar en absoluto la homeostasis fosfocálcica sistémica. De hecho, se han observado recientemente elevaciones significativas en los niveles de CYP27A1 y de CYP2R1 en el cáncer de endometrio humano,¹¹ que se asocian con menor proliferación celular a pesar de las disminuciones en el contenido de VDR, muy común en carcinomas de cualquier tipo celular. Más aún, algunos estudios en líneas celulares de cáncer de endometrio demostraron que la producción local de 25-hidroxivitamina D contribuye, al menos en parte, a la disminución de las tasas de proliferación en respuesta al tratamiento con colecalciferol.¹¹ Esos estudios sugieren una contribución de la producción local de 25-hidroxivitamina D en el menor riesgo de cáncer en individuos con niveles normales de vitamina D.

La alta incidencia de deficiencia/insufi-

ciencia de vitamina D en el curso de la enfermedad renal crónica (ERC)¹² ha sido una alerta reciente sobre el papel crítico del riñón en el mantenimiento no solo de los niveles séricos de calcitriol sino también de 25-hidroxivitamina D. De hecho, la Figura 2 muestra que la 25-hidroxivitamina D unida a su transportador en el plasma, la proteína transportadora de vitamina D (DBP), ingresa en las células del túbulo proximal para producir calcitriol no desde la circulación sino desde el filtrado glomerular a través de un proceso activo de endocitosis mediado por la megalina.¹³ El reciclado de la 25-hidroxivitamina D intracelular desde el túbulo proximal a la circulación es crítico para mantener niveles séricos normales de 25-hidroxivitamina D. De hecho, el ratón *knock out* para la megalina desarrolla una deficiencia severa de vitamina D aun con función renal normal.¹³ De modo que el riñón es también esencial para mantener los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D necesarios para la producción local de calcitriol en numerosos tejidos diana, para promover acciones intracrinas, autocrinas o paracrinas que aumentan la supervivencia sin cambios detectables en la homeostasis mineral que pudiesen comprometer la integridad del esqueleto o incrementar la deposición ectópica de calcio. De hecho, todas las patologías asociadas con el envejecimiento acelerado en la población general están exacerbadas en la ERC, en la cual la prevalencia y la severidad de la deficiencia de vitamina D y de calcitriol progresan en paralelo a la pérdida de función renal.¹⁴

Es importante destacar también que la deficiencia de vitamina D, y no la de calcitriol, es un factor de riesgo de progresión de daño renal¹⁵ y de mortalidad cardiovascular¹⁶ en el enfermo renal, y, además, que las asociaciones entre el déficit de vitamina D y las altas tasas de mortalidad en la población general ocurren con niveles normales de calcitriol.^{1,17}

De modo que para maximizar una respuesta biológica a la vitamina D minimizando riesgos para el individuo, deben tenerse en



cuenta también: a) las probables anomalías en la capacidad de una célula diana de internalizar 25-hidroxivitamina D tanto para la síntesis local de calcitriol como para potenciar la eficacia del calcitriol/VDR; b) la actividad de las 25-hidroxilasas para activar localmente la vitamina D a 25-hidroxivitamina D y, finalmente, c) la expresión y/o actividad de la enzima CYP24A1, responsable del catabolismo tanto de la 25-hidroxivitamina D como del calcitriol.

Las alteraciones en cada uno de estos mecanismos demostradas en la ERC,¹⁴ enfatizan la necesidad de considerar que anomalías similares en individuos deficientes en vitamina D pero con función renal normal podrían reducir la eficacia para mejorar la supervivencia de estrategias vigentes para la corrección de la deficiencia. En la ERC, además de la disminución progresiva de la filtración glomerular que causa una reducción paralela en la dis-

ponibilidad de 25-hidroxivitamina D en el filtrado glomerular para sintetizar calcitriol y/o para su reciclado a la circulación, el contenido renal de megalina está también reducido.¹⁸

La megalina también desempeña un papel crítico en la reabsorción tubular de albúmina y otras proteínas de bajo peso molecular del filtrado glomerular. Como el complejo calcitriol/VDR induce la expresión de la megalina renal,¹⁹ la deficiencia de vitamina D, aun en individuos con función renal normal, podría limitar la producción de calcitriol en el túbulo proximal para mantener los niveles renales de megalina. Esto generaría un círculo vicioso con deterioros progresivos tanto en la producción renal de calcitriol como en la proteinuria y en el mantenimiento de niveles normales de 25-hidroxivitamina D para funciones autocrinas/paracrinas dentro y fuera del riñón. De hecho, en la población general,

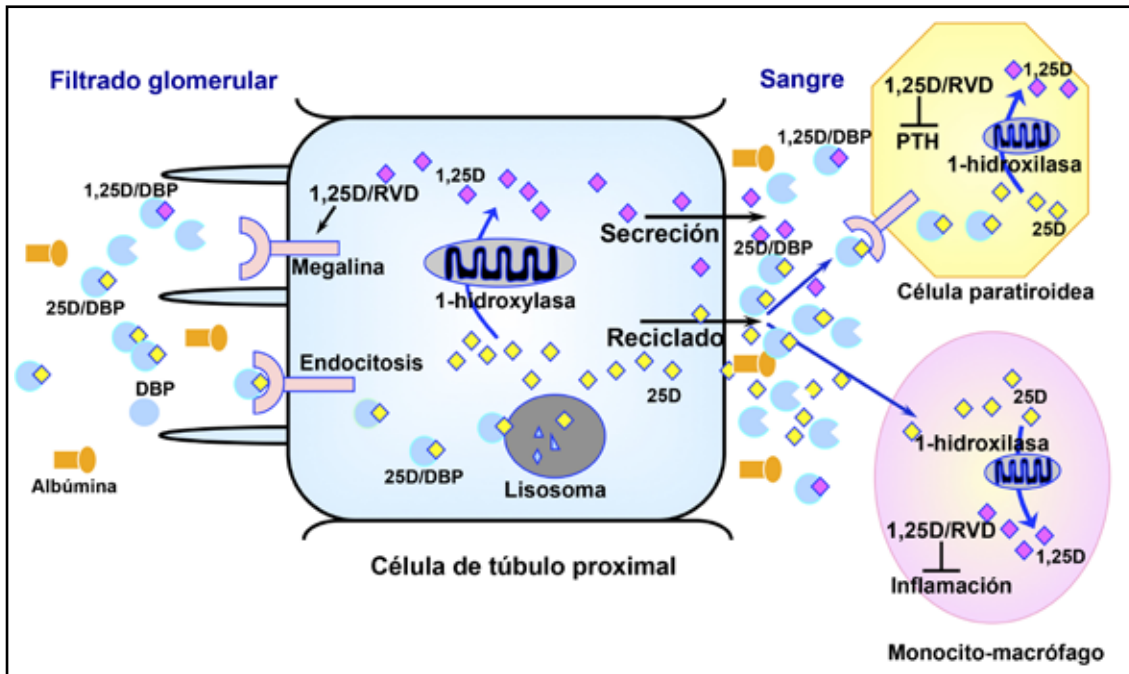


Figura 2. Papel esencial del riñón en el mantenimiento de niveles normales de 25-hidroxivitamina D y calcitriol (véanse detalles en el texto. 25D=25-hidroxivitamina D, 1,25D=calcitriol; DBP=Vitamin D Binding Protein).

si bien los niveles séricos de calcitriol descienden solo cuando los niveles de 25-hidroxivitamina D son inferiores a 4 ng/ml,¹ se ha demostrado que la proteinuria se agrava en proporción directa con la disminución de los niveles de vitamina D de insuficiencia (<30 ng/ml) a deficiencia (<16 ng/ml) de vitamina D.²⁰ Esto sugiere que niveles de 25-hidroxivitamina D en el límite inferior de lo normal son insuficientes para mantener funciones autocrinas/paracrinas en el riñón, tales como la inducción de megalina para prevenir proteinuria.

Reducciones similares de megalina en otros tipos celulares con capacidad de sintetizar calcitriol, como las células paratiroideas o de la glándula mamaria, limitarían acciones autocrinas/paracrinas clave como la supresión de PTH o el control de la proliferación celular. De hecho, en pacientes renales trasplantados, la supresión de PTH requiere la administración de 100.000 UI de vitamina D₂ cada 14 días.²¹ Más aún, en estadios 3 y 4, solo el 50% de los pacientes que reciben 50.000 UI de vitamina D₂ logran aumentar los niveles de la 25-hidroxivitamina D por encima de 35 ng/ml, el valor que se requiere para conseguir suprimir PTH.²² Por otra parte, otro estudio en ERC estadios 3 y 4 con administración diaria de vitamina D₃ en dosis de 4.000 UI durante un mes, y de 2.000 UI por dos meses adicionales, con las que se consigue aumentar los niveles de 25-hidroxivitamina D de 14 ng/ml a 37 ng/ml en todos los pacientes, aunque la disminución de PTH, albuminuria o de la presión diastólica no alcanza a ser significativa.²³ Es decir que ni la corrección del calcitriol sérico ni alcanzar niveles de 25-hidroxivitamina D superiores a 35 ng/ml, ambos eficaces en suprimir PTH, son indicadores certeros de la eficacia de la suplementación en las acciones específicas de los numerosos tipos celulares que contribuyen a aumentar la supervivencia.

También los monocitos periféricos de enfermos en hemodiálisis internalizan *ex vivo* un 50% menos de la 25-hidroxivitami-

na D disponible comparados con monocitos provenientes de individuos normales,²⁴ y aunque esos efectos no pueden atribuirse a defectos en los niveles de megalina, los defectos de internalización se corrigen cuando se suplementa al paciente con calcitriol para normalizar los niveles circulantes.

En resumen, mientras que el déficit de 25-hidroxivitamina D sistémico contribuye a disminuir la producción renal y extrarrenal de calcitriol, disminución que se traduce en defectos en las acciones autocrinas y endocrinas, el déficit de calcitriol en individuos vitamina D deficientes podría causar defectos en la internalización de 25-hidroxivitamina D, con la consiguiente disminución de la producción extrarrenal de calcitriol para mantener las funciones autocrinas/paracrinas. Sin embargo, así como niveles de 25-hidroxivitamina D superiores a 50 ng/ml podrían causar eventos adversos fatales, con dosis no hipercalcemiantes de calcitriol, como se ha reportado en mujeres normales, la corrección de calcitriol a niveles normales³ es suficiente para suprimir la expresión de la 1-hidroxilasa en monocitos periféricos,²⁴ y podría también inhibir las 25-hidroxilasas para la activación local de la vitamina D a 25-hidroxivitamina D.²⁵

Es de prever entonces que las altas dosis de calcitriol y sus análogos que se han utilizado para compensar el bajo contenido tisular de VDR en la ERC y en el cáncer, podrían agravar no solo la deficiencia de vitamina D por inducir su degradación por la CYP24A1, como se mencionó con anterioridad, sino también las funciones autocrinas debido a un efecto inhibitorio en la expresión tanto de las 1-hidroxilasas extrarrenales y, por ende, en la síntesis local de calcitriol, como de las 25-hidroxilasas responsables de la sinergia 25-hidroxivitamina D/calcitriol para controlar los 200 genes involucrados en el control del ciclo celular modulados por la vitamina D. Este último efecto podría explicar en parte la reciente demostración de que la vitamina D es más eficaz que el calcitriol en el control del cáncer en modelos experimentales.²⁶



Indudablemente, el diseño de estudios prospectivos para obtener recomendaciones basadas en la evidencia de estrategias de suplementación con vitamina D eficaces para mejorar la supervivencia requiere identificar los mejores biomarcadores de la relación causal entre la deficiencia/insuficiencia de vitamina D y el desarrollo y la progresión de la patología diana.

Patofisiología subyacente en el impacto severo de la deficiencia de vitamina D sobre la morbimortalidad

Este apartado actualiza los principales mecanismos fisiopatológicos involucrados en la asociación entre la deficiencia de vitamina D y el desarrollo de patologías del envejecimiento, como la pérdida de masa ósea, la calcificación vascular, la hipertensión, la inflamación sistémica, la obesidad, la aterosclerosis, las infecciones respiratorias, las enfermedades autoinmunes, y el cáncer.

Inducción de klotho y FGF23

Durante los últimos 30 años, la producción renal de calcitriol ha sido considerada el eje central en un sistema endocrino altamente integrado, compuesto por el riñón, las glándulas paratiroides, el intestino y el hueso, para el mantenimiento de la homeostasis fosfocálcica. En este sistema multiorgánico, la glándula paratiroidea actúa como el sensor de calcio para regular adecuadamente la secreción de PTH, la que a su vez induce la producción renal de calcitriol, para estimular la absorción intestinal de calcio, normalizar la calcemia y prevenir pérdidas de masa ósea.⁵ En la enfermedad renal, la pérdida de la capacidad del riñón de producir calcitriol para estimular la absorción de calcio e inhibir la hipersecreción de PTH es un factor determinante de la intensa resorción ósea, con las consiguientes elevaciones de calcio y fósforo circulantes que predisponen a calcificación vascular.^{14,27}

El descubrimiento reciente de que la vitamina D induce no solo la síntesis de la fosfatona FGF23 por el hueso, sino también la de la proteína de la longevidad, klotho,⁷ en el riñón, ha revelado un importante y complejo sistema endocrino, donde el hueso actúa como sensor de fósforo secretando la potente hormona fosfática FGF23. Las elevaciones de FGF23 no solo impiden aumentos de fósforo que promuevan hiperparatiroidismo y calcificación vascular, sino también inhiben la síntesis renal de calcitriol por la CYP27B1 e inducen su degradación por la CYP24A1 para controlar estrictamente los niveles de calcitriol circulantes.²⁸

Los potentes mecanismos recíprocos de regulación tanto de la PTH como de la FGF23 por el calcitriol, sumados a la inducción por el calcitriol de la expresión de klotho, un coreceptor para las acciones de la fosfatona FGF23, no solo mantienen la integridad del hueso y de la homeostasis mineral sino que, al prevenir los aumentos de fósforo estimulando fosfatúria, contribuyen a proteger de hiperparatiroidismo secundario y daño renal²⁷ y de calcificación vascular²⁹ y a promover un envejecimiento saludable.^{7,28} De hecho, el complejo FGF23/klotho protege del hiperparatiroidismo secundario inhibiendo la secreción de PTH y la proliferación de las células principales, induce la excreción tubular de fosfato por el riñón a través de la inducción del cotransportador NaPi2a y protege de ese modo a las células de músculo liso vascular de la adquisición de un fenotipo osteoblástico inducido por el alto nivel de fósforo y que predispone a la calcificación. La pérdida de klotho en la glándula paratiroidea, el riñón y las arterias en curso de la enfermedad renal genera una resistencia a las acciones fosfáticas del FGF23 ocasionando el envejecimiento acelerado de la enfermedad renal.^{27,29} La inducción del klotho renal en respuesta a una adecuada suplementación con vitamina D en el enfermo renal no en diálisis, podría explicar la asociación entre niveles de 25-hidroxivitamina D inferiores a 23 ng/ml y un aumento en el riesgo de desarrollo acelerado

de enfermedad renal terminal.¹⁵ De hecho en modelos animales de ERC, las terapias génicas dirigidas a sobreexpresar *klotho* atenúan marcadamente el desarrollo de daño renal.³⁰ Dos factores que disminuyen marcadamente los niveles renales de *klotho*, además del envejecimiento, obviamente una variable no modificable, son los aumentos de angiotensina y la inflamación sistémica, ambos también controlables por niveles adecuados de vitamina D.³⁰

El otro rasgo clave de los procesos de envejecimiento inducidos por la falta o la hipofunción de *klotho* es la acumulación de ADN dañado,³⁰ otro proceso que, como se describirá a continuación, es susceptible de regulación por adecuados niveles de vitamina D. Es decir que el envejecimiento acelerado de la enfermedad renal, podría atribuirse a los defectos en el mantenimiento del *klotho* renal debidos a la severa deficiencia de vitamina D y de calcitriol. También podría inferirse que defectos en el mantenimiento adecuado de los niveles renales de *klotho* por el sistema endocrino de la vitamina D en individuos deficientes, podría contribuir al desarrollo de las patologías del envejecimiento que disminuyen la supervivencia.

Control de la inflamación sistémica

Una de las funciones más importantes de la vitamina D en la prevención de patologías del envejecimiento es el mantenimiento de la integridad del sistema inmunitario para prevenir el daño multiorgánico causado por la inflamación excesiva. Tanto el calcitriol circulante como el producido localmente atenúan la severidad de la inflamación por múltiples mecanismos que incluyen: a) reducción de la antigenicidad en las células presentadoras de antígenos; b) reducción de la síntesis de citoquinas profibróticas y proinflamatorias del tipo Th1 e inducción de la producción de citoquinas antiinflamatorias del tipo Th2 que inclinan la diferenciación de los linfocitos T a un fenotipo regula-

torio Th2; c) inducción del número circulante de linfocitos T regulatorios responsables de atenuar las lesiones vasculares que aceleran los procesos de rigidez arterial, aterosclerosis y calcificación vascular; d) inhibición de la diferenciación de plasmocitos, de la producción de IgG e IgM y la generación de linfocitos B.^{1,31} De modo que, al favorecer el mantenimiento de un fenotipo protector en lugar de inflamatorio en los procesos de infiltración linfocitaria, se protege a los órganos diana de los efectos adversos de la producción excesiva de citoquinas inflamatorias y radicales libres que acompaña a la inflamación excesiva.

De hecho, en la enfermedad renal experimental inducida por una obstrucción ureteral unilateral, o por la administración de adriamicina, la administración de calcitriol o sus análogos es suficiente para atenuar la infiltración inflamatoria al parénquima renal^{32,33} y de reducir la expresión de citoquinas inflamatorias como RANTES, TNF- α y MCP1.³³ Estos hallazgos en la enfermedad renal experimental sugieren que la deficiencia de vitamina D, o la de vitamina D y calcitriol en el caso de individuos con función renal normal pero con deficiencia severa de vitamina D, podrían facilitar la invasión de monocitos no protectores al parénquima renal y los vasos. Es posible entonces que la medición de cambios en la proporción de monocitos tolerogénicos/inmunogénicos en la circulación en respuesta a la suplementación con vitamina D pueda utilizarse para estimar de modo personalizado la eficacia de la suplementación en atenuar el daño renal y vascular.

Inducción de tolerancia

La eficacia de la vitamina D en mantener un estado tolerogénico en las células presentadoras de antígeno, reducir la inflamación e inducir la generación de linfocitos T regulatorios explican en parte la asociación entre deficiencia de vitamina D y patologías autoinmunes,^{1,31} y también la eficacia de la adminis-



tración de análogos del calcitriol en el tratamiento de la psoriasis. De hecho, la inducción de tolerancia exponiendo a monocitos periféricos a la acción de activadores selectivos del VDR se está utilizando en este momento en un estudio europeo multicéntrico para reducir la autodestrucción de los islotes β pancreáticos en diabéticos de tipo 1.

Reducción de la propensión a la ateromatosis

Los defectos en el control de la inflamación se traducen también en excesos de TNF- α soluble en la circulación, una potente citoquina inflamatoria responsable de la autoagresión vascular, al iniciar no solo el proceso ateromatoso sino también la calcificación vascular a través de la inducción de la infiltración de macrófagos activados a la pared vascular, su transformación en células espumosas y la progresiva transformación de las lesiones vasculares subclínicas en placas de ateroma.³⁴

El control del sistema inmunitario por el calcitriol o sus análogos disminuye los niveles de TNF- α en la circulación y por tanto la propensión a la aterosclerosis. La medición de aumentos en TNF- α circulante podría proveer un marcador más temprano que las elevaciones de proteína C reactiva en la severidad del proceso inflamatorio en los tejidos diana y también de la eficacia de la terapia de suplementación con vitamina D para controlar la inflamación y el daño vascular.

Asimismo la producción local adecuada de calcitriol controla en parte el desarrollo de ateromatosis por una inhibición directa de la adquisición de un fenotipo aterogénico en los monocitos-macrófagos circulantes.³⁵ Sabemos que los macrófagos cargados de lípidos producen especies reactivas de oxígeno y factores procoagulantes que amplifican la inflamación e inducen complicaciones trombóticas. Estudios *ex vivo* utilizando monocitos circulantes de individuos hipertensos, vitamina D deficientes y con diabetes tipo II, han demostrado que la exposición a calcitriol

atenúa significativamente la acumulación de lípidos estimulada por la LDL-oxidada o acetilada.³⁵ Estas acciones anti-arterogénicas del calcitriol requieren un VDR funcional, ya que el silenciado del VDR resulta en una marcada acumulación lipídica aún en presencia de calcitriol.

La importancia de niveles normales de vitamina D y de las acciones autocrinas/paracrinas en la prevención de la adquisición del fenotipo aterogénico se demostró de modo concluyente en estudios en el ratón *knock out* para el receptor de LDL, que reproduce la enfermedad ateromatosa humana cuando se lo expone a una dieta alta en grasas.³⁵ El marcado fenotipo aterogénico presente en ratones transgénicos deficientes en vitamina D desaparece en los ratones de idéntico genotipo con niveles normales de vitamina D.

Sabemos también que la neovascularización de la placa de ateroma agrava la ateromatosis debido a que la mayor vulnerabilidad de la placa a posibles rupturas acelera el desarrollo de enfermedad vascular sintomática. La eficacia del calcitriol de inhibir la neovascularización en la retina³⁶ sugiere que el mantenimiento de la integridad del sistema endocrino de la vitamina D podría atenuar los trastornos cardiovasculares adversos que resultan de una placa inestable. Indudablemente, las medidas del grosor íntima-media utilizando la ecografía carotídea, o una evaluación del grado de neovascularización de la adventicia (densidad de *vasa vasorum*) utilizando la ecografía con contraste³⁷ podrían constituir marcadores precoces de la eficacia de la suplementación con vitamina D para atenuar el desarrollo de lesiones aterotrombóticas subclínicas y para prevenir la desestabilización de la placa.

Disminución de la incidencia y/o severidad de patologías respiratorias

El control del sistema inmunitario a través de la producción local del calcitriol por el macrófago activado, que se traduce en un

aumento de las propiedades antibacterianas y antivirales en monocitos-macrófagos circulantes, constituye un mecanismo importante de prevención de patologías respiratorias tan severas como la propia tuberculosis.^{1,31} Sabemos hoy que la mayor incidencia de tuberculosis en la población afronorteamericana en los Estados Unidos, o en los inmigrantes de la India en el Reino Unido, se asocia al grado de deficiencia de vitamina D que limita la inducción de la síntesis de catelicidina, un potente antibiótico, por el calcitriol generado localmente en el macrófago activado por el *Mycobacterium tuberculosis*.³⁸ La simple corrección de la deficiencia de vitamina D es suficiente para revertir los defectos en los monocitos circulantes para ejercer una efectiva actividad antituberculosa, ratificando la importancia de los mecanismos autocrinos/paracrinos de acción de la vitamina D.

Disminución del daño renal y cardiovascular inducido por la proteinuria

La disminución de proteinuria por el calcitriol y sus análogos,^{20,33,39,40} también contribuye a disminuir la inflamación sistémica a través de la reducción de la formación de péptidos antigénicos que derivan de la albúmina urinaria. En nefropatías no inflamatorias, la albuminuria causa un aumento en los fragmentos antigénicos de la albúmina procesada en las células del túbulo proximal que activan a las dendritas asociadas a las células tubulares a montar una respuesta inflamatoria.⁴¹ Debido a que tanto las células del túbulo proximal como las dendritas son capaces de producir calcitriol, la simple corrección de la deficiencia de vitamina D podría disminuir simultáneamente la albuminuria y la antigenicidad de las células dendríticas evitando el desarrollo de una reacción inflamatoria, reconocida causa de daño cardiovascular. De hecho, en pacientes con ERC estadio 4 que recibían dosis estables de inhibidores de ECA y ARA, la reducción de la proteinuria por el paricalcitol, un análogo del calcitriol, se aso-

ció a reducciones paralelas en la inflamación sistémica medida por niveles séricos de proteína C reactiva.³⁹

Además del efecto antiproteinúrico del calcitriol a nivel del túbulo proximal atribuible al mantenimiento de niveles adecuados de megalina,¹⁹ la reducción de la proteinuria por el calcitriol o sus análogos también involucra acciones directas en el mantenimiento de la integridad de la funcionalidad de los podocitos. El mantenimiento de los niveles de podocina y nefrina, dos proteínas importantes para mantener la barrera de filtración glomerular, por el calcitriol o sus análogos no solo evita el desarrollo de lesiones sino también puede revertir la proteinuria ya establecida, como se demostrará en modelos de ERC en ratón.

La inhibición de la proteasa cathepsina L (CTSL)⁴² es un nuevo mecanismo que media una parte de las acciones antiproteinúricas de la vitamina D, ya que la CTSL degrada la GTPasa dinamina y la molécula sinaptopodina causando un desarreglo marcado del esqueleto de actina que afecta la integridad de las barreras de filtración del podocito causando proteinuria.⁴³

Los resultados del estudio VITAL confirman el efecto de dosis de 2 µg de paricalcitol en disminuir la proteinuria en enfermos renales con niveles de 25-hidroxivitamina D inferiores a 16 ng/ml.⁴⁰

La contribución de la producción local de calcitriol para disminuir proteinuria²⁰ y riesgo de enfermedad cardiovascular¹⁶ en individuos normales sugiere que la simple corrección de la deficiencia de vitamina D en los pacientes del estudio VITAL podría haber mejorado los observados efectos antiproteinúricos del paricalcitol.

Inhibición del sistema renina angiotensina

La activación del sistema RAS es un contribuyente esencial al daño renal, la rigidez vascular y también a la inflamación que inicia el proceso aterotrombótico. La vitamina D inhibe directamente la expresión del gen de la



renina.⁴⁴ De hecho, en la ERC, los aumentos en los niveles de renina en suero se asocian directamente con la disminución del calcitriol. Esta inhibición directa del gen de la renina por la vitamina D le confiere a la suplementación con vitamina D una ventaja de protección cardiovascular adicional a individuos hipertensos que reciben tratamiento con inhibidores del receptor de angiotensina, los llamados ARA II, porque bloquearía el conocido efecto compensatorio de elevaciones en la renina inducido por los ARA II. De hecho, en un modelo experimental de diabetes inducida por estreptozotocina en el ratón, la administración de paricalcitol no solo disminuye marcadamente los niveles de renina, sino también atenúa los aumentos en renina inducidos por el losartán, un ARA II, causando una mayor reducción de los niveles de angiotensina.⁴⁵

El paricalcitol también potencia el efecto antiinflamatorio de la inhibición del sistema renina-angiotensina con enalapril, un inhibidor de la ECA (enzima convertidora de angiotensina),⁴⁶ en un modelo de enfermedad renal en la rata, y las acciones anti-TACE (*tumor necrosis alpha converting enzyme*) de la vitamina D podrían explicar en parte esta sinergia. Los estudios pioneros de Lautre et al.⁴⁷ demostraron que la angiotensina II causa daño renal e inflamación sistémica después de haber activado a su receptor AT1 por mecanismos no relacionados con la hipertensión sino, precisamente con aumentos en la actividad de TACE. Esta enzima es la responsable de liberar a la circulación la forma madura del factor transformador de crecimiento TGF- α , a partir de su precursor en la membrana de la célula renal. La activación por el TGF- α de su receptor, el EGFR, es la causa del desarrollo de proteinuria, glomeruloesclerosis, hiperplasia tubular, infiltración de células mononucleares y fibrosis.⁴⁷ Estos aumentos de TACE y TGF- α en respuesta a la exposición prolongada a angiotensina, inicialmente descritos por Lautre et al. en la enfermedad renal en el ratón,⁴⁷ han sido confirmados recientemente en la en-

fermedad renal humana.⁴⁸ De modo que, una vez iniciados los aumentos renales de TACE y de TGF- α , el daño inflamatorio se hace sistémico, ya que la activación de la TACE renal también libera a la circulación moléculas tales como TNF- α , ICAM-1 y el VCAM, todas potentes citoquinas proinflamatorias y profibróticas. De hecho, mientras que el ICAM y VCAM nos proveen mejores marcadores que la proteinuria para evaluar el avance de lesiones renales en pacientes transplantados,⁴⁹ los aumentos de VCAM también marcan de modo muy temprano la disfunción endotelial,⁵⁰ ya que preceden tanto a la infiltración de macrófagos en la pared vascular como a la formación de células espumosas.

Como se explicó previamente, la liberación de TNF- α , es suficiente *per se* para causar daño vascular. Un agravante es que también induce la expresión de la TACE, generando un círculo vicioso que aumenta la propensión a lesiones cardiovasculares.⁵¹ De hecho, individuos normales con un polimorfismo en el gen de TACE que deriva en la liberación de cantidades ligeramente mayores de TNF- α , tienen un mayor riesgo de muerte por enfermedad vascular.⁵² Diversos estudios acerca de la enfermedad renal en la rata demostraron que la corrección simultánea de la deficiencia de vitamina D nutricional y activa deriva en una eficaz supresión de la expresión de TACE en el riñón y en los monocitos-macrófagos circulantes, disminución que se asocia a prevención en la progresión de la proteinuria y de calcificación aórtica, para dosis que son insuficientes si se administran como terapia exclusiva.⁵³ Más importante aún, intervenciones con paricalcitol en enfermos en hemodiálisis que reciben terapia anti-RAS y suplementación con vitamina D muestran que la vitamina D hormona, el paricalcitol, puede reducir los niveles de TACE en monocitos y también los niveles circulantes de TNF- α , VCAM e ICAM.

Es de enfatizar que solo estudios prospectivos pueden evaluar la certeza de mediciones en suero de los niveles de estas mo-

léculas proinflamatorias liberadas por TACE como marcadores de la eficacia de la terapia en reducir la actividad de TACE tanto en monocitos periféricos como en los tipos celulares involucrados en el avance del daño renal y cardiovascular en el enfermo renal. La eficacia de la vitamina D para inhibir la actividad de TACE y la de estimular la generación de linfocitos T regulatorios podría potenciar el efecto protector a nivel renal y vascular. De hecho, la simple inyección en el peritoneo de linfocitos T en ratones sometidos a una exposición prolongada a angiotensina II es suficiente para prevenir las lesiones graves en la integridad estructural y funcional de la aorta abdominal.⁵⁴

Control de la obesidad

Las acciones antiobesidad de la vitamina D incluyen la inhibición de la adipogénesis a través del control de la proliferación de precursores de adipocitos, y también por inducción de la apoptosis de los adipocitos.⁵⁵ Ambos efectos ocasionan una disminución de la masa grasa visceral y de la masa grasa global con la suplementación con vitamina D.⁵⁶

Los niveles normales de vitamina D también se asocian a la corrección de los niveles de adiponectina, una hormona producida por el adipocito y cuya síntesis está disminuida en el obeso, que controla no solo la sensibilidad a la insulina sino también la producción de citoquinas y adipoquinas inflamatorias como el TNF- α y el MCP1.⁵⁷ De hecho, los aumentos de los niveles de vitamina D se asocian con dosis menores de insulina requeridas para el control metabólico en niños con diabetes de tipo 1⁵⁸ y en una disminución de la glucemia en ayunas y de la hemoglobina glicosilada en la diabetes mellitus de tipo 2.⁵⁹ Es importante destacar que estos efectos de la suplementación con vitamina D podrían ser secundarios a la inhibición de PTH, ya que los aumentos de PTH se asocian a inhibición de la síntesis de insulina y de su secreción, como así también de disminuir los niveles de adiponectina.⁶⁰

Inhibición de la acumulación de ADN dañado

La acumulación de ADN dañado es un determinante mayoritario del proceso de envejecimiento celular en general y vascular en particular, que acelera el desarrollo de cáncer y los procesos de calcificación en las células de músculo liso vascular,⁶¹ respectivamente.

La inhibición de CTSL desempeña un papel clave en los efectos vasculoprotectores de la vitamina D.⁴² Específicamente, sabemos hoy que la acumulación de prelamina A se ha identificado como un determinante de aumentos en el daño de ADN y de defectos en los mecanismos de reparación de ADN que agravan los mecanismos de calcificación vascular.

En progerias y en laminopatías, la pérdida de lamina A se asocia a elevaciones marcadas en CTSL que degradan la proteína 53BP1, responsable de reparar el ADN dañado por un proceso de recombinación no homóloga. Varios estudios en fibroblastos desprovistos de lamina A han demostrado que el tratamiento con calcitriol es suficiente para impedir la degradación de 53BP1 y mantener la capacidad de reparar ADN dañado. De modo que parte de la protección vascular de niveles normales de vitamina D podría atribuirse a su capacidad de atenuar la acumulación de ADN dañado a través del mantenimiento de los niveles de 53BP1 por inhibición de la actividad de CTSL.⁴²

En el cáncer de mama triple negativo, el tipo celular de peor pronóstico que se presenta en mujeres jóvenes, la inhibición de la actividad aumentada de CTSL nuclear en estos tumores por parte de la vitamina D previene la degradación de 53BP1, que es una proteína esencial para evitar tanto la progresión acelerada del crecimiento en tumores BRCA1 positivos, como la resistencia al tratamiento.⁶² Como la prevalencia de deficiencia severa de vitamina D es superior al 90% en pacientes con cáncer de mama triple negativo, la simple corrección de la deficiencia de vitamina D desde el momento del diagnóstico podría modificar la biología tumoral para aumentar la capacidad de respuesta al tratamiento.



Inhibición de la progresión tumoral

La sólida evidencia epidemiológica de una asociación directa entre el grado de deficiencia de vitamina D, no solo con una mayor propensión al cáncer de todo tipo sino también a un peor pronóstico, se puede explicar en parte por la activación endocrina, autocrina o paracrina del VDR para ejercer alguna de sus numerosas funciones antitumorales entre ellas: a) acciones antiproliferativas (regulación de más de 200 genes que controlan el ciclo celular); b) proapoptóticas; c) antiangiogénicas; d) inducción de la diferenciación de precursores mieloides inmaduros a células circulantes con función leucocitaria normal, e) disminución del componente inflamatorio y aumento del potencial antitumoral de las células inmunes; f) reducción de las tasas de invasión y metástasis, e) reparación de ADN dañado; f) control de la expresión de micro-RNA involucrados en la regulación de RNA mensajeros para oncogenes y supresores tumorales, o micro-RNA que modulan la replicación de células madre cancerosas (véase el excelente resumen de Feldman).²⁶

Todas estas posibles acciones antitumorales de la suplementación con vitamina D están marcadamente disminuidas debido a severas reducciones en VDR, CYP27B1 y a aumentos en CYP24A1 con la progresión del tumor.

La estimulación aún mayor de la CYP24A1 ocurriría tras la administración de altas dosis de vitamina D hormona en el intento de compensar por la disminución del VDR. La reciente demostración en cáncer de endometrio¹¹ de aumentos marcados en las enzimas CYP27A1 y CYP2R1 sugiere que la conversión local de vitamina D a 25-hidroxivitamina D y su posterior sinergia con el complejo VDR-calcitriol impedirían la progresión tumoral con riesgos mínimos en cambios en la homeostasis cálcica sistémica. Indudablemente, ciertos tumores hacen factible un seguimiento histológico que permitiría evaluar la magnitud de la respuesta local a la estrategia de suple-

mentación con vitamina D, específicamente, mediciones concretas de los cambios en la expresión de genes diana antitumorales críticos, y también los cambios en las principales proteínas del metabolismo intratumoral de la vitamina D y su receptor. Estas mediciones constituirían una valiosa herramienta para delinear la patofisiología causal de la asociación entre deficiencia de vitamina D y crecimiento tumoral.

En síntesis, aunque indiscutiblemente resulta imposible proveer una única recomendación de corrección de la deficiencia de vitamina D que impida eficazmente la progresión de todas las alteraciones funcionales desencadenadas y en todos los tipos celulares adecuados, la utilización de los marcadores más sensibles para cada patología permitirían evaluar de modo personalizado la eficacia de la estrategia de suplementación adoptada. En el caso de individuos sanos existen las siguientes consideraciones para tener en cuenta a fin de optimizar las estrategias de suplementación:

Consideraciones esenciales para el diseño de estrategias seguras y eficaces para la corrección de la deficiencia de vitamina D

La principal fuente de vitamina D es la exposición a la luz solar, ya que el contenido de vitamina D en la mayor parte de los alimentos es muy pobre, excepto en aquellos expresamente enriquecidos. En la actualidad, el tiempo de exposición a la luz solar se ha reducido marcadamente por los cambios en los hábitos laborales en la población adulta y en los de recreación, tanto en adultos como en niños, así como también por el uso de protectores solares, que impiden la acción de la luz ultravioleta del sol para convertir al precursor de la piel en vitamina D₃.¹⁷

Las necesidades de una suplementación adecuada para compensar las menores tasas naturales de conversión del precursor de la piel en vitamina D por acción de la luz

solar aumentan también por razones: a) geográficas, como la inclinación particular de la radiación ultravioleta en países alejados del Ecuador o durante el invierno, independientemente de la localización geográfica; b) culturales, como el uso de vestimenta que cubre totalmente la piel; c) raciales, como la inhibición de la síntesis de vitamina D causada por la hiperpigmentación de los melanocitos en individuos de raza negra, o d) nutricionales, como la creciente prevalencia de obesidad en la población mundial que causa una disminución de los niveles de vitamina D circulantes debido a que el 80% de la vitamina D sintetizada en la piel o ingerida en la dieta se diluye en la mayor masa grasa del obeso.

Es importante señalar que el Instituto de Medicina⁶³ y la Sociedad Americana de Endocrinología⁶⁴ discrepan aún, y con argumentos válidos de ambas partes, con respecto al valor de 25-hidroxivitamina D que define “deficiencia” en la población general en 20 o 30 ng/ml, respectivamente, y por lo tanto estas instituciones disienten también en sus recomendaciones para la suplementación diaria con vitamina D.

Más importante aún: para lograr niveles circulantes superiores a 20 o a 30 ng/ml se debe elegir una frecuencia de suplementación con colecalciferol o ergocalciferol que tenga en cuenta las diferencias significativas en la vida media biológica de estos metabolitos. De hecho, en individuos normales, la eficacia de una dosis bolo de 100.000 UI de ergocalciferol para mantener un aumento sostenido en los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D es menor que la del colecalciferol, aun cuando los niveles séricos de ergocalciferol y colecalciferol fluctúan en paralelo durante los tres días posteriores a la administración.⁶⁵ Específicamente, mientras que los aumentos séricos de la 25-hidroxivitamina D₃ se mantienen por 1 mes, los niveles séricos de la 25-hidroxivitamina D₂ retornan a los valores basales en menos de 14 días.⁶⁵

La menor vida media biológica de la vita-

mina D₂ podría explicar, en parte, los resultados del metanálisis en el que solo la suplementación con D₃, pero no con D₂, redujo la mortalidad en un 11%.² Sería importante examinar si una estrategia de suplementación con D₂ que contemple una frecuencia semanal que consiga mantener niveles séricos normales de 25-hidroxivitamina D₂ deriva también en una reducción significativa de la mortalidad. De hecho, no se requiere más que un simple cambio a dosis diarias para eliminar toda diferencia entre la vitamina D₂ y D₃ para una corrección sostenida del nivel sérico de 25-hidroxivitamina D_{2/3}.⁶⁶ En el caso de individuos obesos, la suplementación tanto con D₂ como con D₃ debe adecuarse también al peso corporal. La recomendación actual es de 70-80 UI/kg de peso/día para alcanzar niveles de 30-40 ng/ml.

La ventaja adicional del uso de dosis diarias de vitamina D₂ o D₃ inferiores a 4.000 UI es una mayor eficacia de conversión a 25-hidroxivitamina D_{2/3} que la que se obtiene tras la administración de dosis bolos semanales o mensuales.⁶⁷

Las dificultades señaladas en la enfermedad renal crónica para conseguir que la suplementación con vitamina D sea suficiente para suprimir eficazmente la síntesis de PTH o la proteinuria sugieren que, en la población general, deberían examinarse de manera más personalizada y también de modo patología-dependiente tanto la eficacia de conversión de vitamina D en 25-hidroxivitamina D, como la vida media de la 25-hidroxivitamina D circulante.

Como se enfatizara en la introducción, una consideración importante es el cuidado en las dosis, la frecuencia y la vía de administración de suplementos de vitamina D para evitar excesos que podrían empeorar en lugar de disminuir el riesgo de muerte, ya que en mujeres normales suplementadas con vitamina D, la disminución progresiva en las tasas de mortalidad con los aumentos de los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D hasta valores de 30-40 ng/ml, comienza a revertirse



para niveles de 25-hidroxivitamina D superiores a los 50 ng/ml.³

La otra consideración de importancia en las estrategias de suplementación poblacionales es la de estimar anticipadamente los casos muy excepcionales, pero posibles, de hipersensibilidad a la vitamina D debidos a mutaciones o polimorfismos en la CYP24A1 que impiden el freno de una respuesta exagerada al complejo calcitriol VDR debido a la incapacidad de degradar tanto la 25-hidroxivitamina D como el calcitriol.

En España, se cuenta con la 25-hidroxivitamina D₃, o calcidiol, para su administración oral bajo el nombre de hidroferol. Este compuesto, que permite una corrección inmediata de la deficiencia de vitamina D, podría ser muy útil también para compensar los defectos en la hidroxilación hepática de la vitamina D en el carbono 25, en individuos que reciben tratamientos antiepilépticos.^{68,69}

Un cuidado importante para evitar efectos tóxicos con el uso del calcidiol es tener en cuenta, al decidir la frecuencia de administración y la dosis, que este metabolito de la vitamina D tiene una vida media de unos 15-18 días, muy superior a la de la vitamina D, y también que puede activar directamente al VDR, mientras que la vitamina D, *per se*, es inactiva. Es decir que tanto la dosis como la frecuencia de administración oral del hidroferol deben ser rigurosamente controladas para evitar una activación excesiva del VDR intestinal para absorber calcio y fósforo, con los conocidos efectos adversos de elevaciones transitorias de la calcemia o la fosfatemia.

En cuanto a la validez de los métodos de medida del estado de vitamina D del indivi-

duo, es importante puntualizar también que es necesario asegurarse de que los radioinmunoensayos y los Elisas utilizados sean capaces de reconocer tanto a la 25-hidroxivitamina D₂ como a la D₃. Una limitación importante, aun en aquellos ensayos capaces de medir D₂ y D₃, es una reactividad cruzada del 100% con la 24,25-dihidroxivitamina D, un producto de la degradación de la 25-hidroxivitamina D₃ cuya síntesis se estimula en la ERC y también en carcinomas, en los que es frecuente la sobreexpresión de la CYP24A1 asociada con los peores pronósticos.^{70,71} Estos aumentos patológicos de los niveles de 24,25-dihidroxivitamina D sobreestimarían la eficacia de la suplementación dando lugar a una inadecuada corrección de la deficiencia de vitamina D.

La solución a las dificultades para alcanzar un balance entre minimizar los efectos adversos y potenciar los beneficios de supervivencia con la suplementación con vitamina D es el diseño y la ejecución de estudios clínicos prospectivos utilizando los marcadores no invasivos más certeros de la severidad de la patología en estudio y de su respuesta a la estrategia de suplementación. Indudablemente, la implementación de estrategias de corrección de la deficiencia en individuos normales constituiría un vital primer paso en la prevención de patologías del envejecimiento.

Conflicto de intereses

La autora declara no tener conflictos de intereses.

(Recibido: marzo 2014.
Aceptado: abril 2014)

Referencias

1. Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:471-8.
2. Chowdhury R, Kunutsor S, Vitezova A, et al. Vitamin D and risk of cause specific death: systematic review and meta-analysis of observational cohort and randomised intervention studies. *BMJ* 2014; 348:g1903.
3. Melamed ML, Michos ED, Post W, et al. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med* 2008; 168:1629-37.
4. Autier P, Boniol M, Pizot C, et al. Vitamin D status and ill health: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2:76-89.
5. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289:F8-28.
6. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, et al. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:7711-5.
7. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, et al. The role of vitamin D in the FGF23, klotho, and phosphate bone-kidney endocrine axis. *Rev Endocr Metab Disord* 2012; 13:57-69.
8. Krajisnik T, Bjorklund P, Marsell R, et al. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 2007; 195:125-31.
9. Lou YR, Molnar F, Perakyla M, et al. 25-Hydroxyvitamin D(3) is an agonistic vitamin D receptor ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 118:162-70.
10. Hoenderop JG, van der Kemp AW, Urban CM, et al. Effects of vitamin D compounds on renal and intestinal Ca²⁺ transport proteins in 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase knockout mice. *Kidney Int* 2004; 66:1082-9.
11. Bergadà L, Pallares J, Arcidiacono MV, et al. Role of local bioactivation of vitamin D by CYP27A1 and CYP2R1 in the control of cell growth in normal endometrium and endometrial carcinoma. *Lab Invest* 2014; 94:608:22.
12. LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, et al. Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States. *Am J Kidney Dis* 2005; 45:1026-33.
13. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. *Cell* 1999; 96:507-15.
14. Dusso AS, Tokumoto M. Defective renal maintenance of the vitamin D endocrine system impairs vitamin D renoprotection: a downward spiral in kidney disease. *Kidney Int* 2011; 79:715-29.
15. Nakano C, Hamano T, Fujii N, et al. Combined use of vitamin D status and FGF23 for risk stratification of renal outcome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7:810-9.
16. Pilz S, Tomaschitz A, Friedl C, et al. Vitamin D status and mortality in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26:3603-9.
17. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-81.
18. Takemoto F, Shinki T, Yokoyama K, et al. Gene expression of vitamin D hydroxylase and megalin in the remnant kidney of nephrectomized rats. *Kidney Int* 2003; 64:414-20.
19. Liu W, Yu WR, Carling T, et al. Regulation of gp330/megalyn expression by vitamins A and D. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:100-7.
20. de Boer IH, Ioannou GN, Kestenbaum B, et al. 25-Hydroxyvitamin D levels and albuminuria in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Am J Kidney Dis* 2007; 50:69-77.
21. Courbebaisse M, Thervet E, Souberbielle JC, et al. Effects of vitamin D supplementation on the calcium-phosphate balance in renal transplant patients. *Kidney Int* 2009; 75:646-51.
22. Al-Aly Z, Qazi RA, Gonzalez EA, et al. Changes in serum 25-hydroxyvitamin D and plasma intact PTH levels following treatment with ergocalciferol in patients with CKD. *Am J Kidney Dis* 2007; 50:59-68.
23. Moe SM, Saifullah A, LaClair RE, et al. A randomized trial of cholecalciferol versus



- doxercalciferol for lowering parathyroid hormone in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5:299-306.
24. Gallieni M, Kamimura S, Ahmed A, et al. Kinetics of monocyte 1 alpha-hydroxylase in renal failure. *Am J Physiol* 1995; 268 (4 Pt 2):F746-53.
25. Ellfolk M, Norlin M, Gyllensten K, et al. Regulation of human vitamin D(3) 25-hydroxylases in dermal fibroblasts and prostate cancer LNCaP cells. *Mol Pharmacol* 2009; 75:1392-9.
26. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* 2014; 14:342-57.
27. Silver J, Rodriguez M, Slatopolsky E. FGF23 and PTH--double agents at the heart of CKD. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27:1715-20.
28. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int* 2013; 92:77-98.
29. Lim K, Lu TS, Molostvov G, et al. Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation* 2012; 125:2243-55.
30. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. The emerging role of Klotho in clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27:2650-7.
31. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008; 29:726-76.
32. Tan X, Wen X, Liu Y. Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D receptor-mediated sequestration of NF-kappaB signaling. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19:1741-52.
33. He W, Kang YS, Dai C, et al. Blockade of Wnt/beta-catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22:90-103.
34. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473:317-25.
35. Oh J, Weng S, Felton SK, et al. 1,25(OH)₂ vitamin D inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2009; 120:687-98.
36. Albert DM, Scheef EA, Wang S, et al. Calcitriol is a potent inhibitor of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:2327-34.
37. Arcidiacono MV, Traveset A, Rubinat E, et al. Microangiopathy of large artery wall: a neglected complication of diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2013; 228:142-7.
38. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006; 311:1770-3.
39. Alborzi P, Patel NA, Peterson C, et al. Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease: a randomized double-blind pilot trial. *Hypertension* 2008; 52:249-55.
40. de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, et al. Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376:1543-51.
41. Macconi D, Chiabrando C, Schiarea S, et al. Proteasomal processing of albumin by renal dendritic cells generates antigenic peptides. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:123-30.
42. Gonzalez-Suarez I, Redwood AB, Grotsky DA, et al. A new pathway that regulates 53BP1 stability implicates cathepsin L and vitamin D in DNA repair. *Embo J* 2011; 30:3383-96.
43. Yaddanapudi S, Altintas MM, Kistler AD, et al. CD2AP in mouse and human podocytes controls a proteolytic program that regulates cytoskeletal structure and cellular survival. *J Clin Invest* 2011; 121:3965-80.
44. Li YC. Renoprotective effects of vitamin D analogs. *Kidney Int* 2010; 78:134-9.
45. Zhang Z, Zhang Y, Ning G, et al. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:15896-901.
46. Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, et al. Combination therapy with an angiotensin-

- converting enzyme inhibitor and a vitamin D analog suppresses the progression of renal insufficiency in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1796-806.
47. Lautrette A, Li S, Alili R, et al. Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nat Med* 2005; 11:867-74.
48. Melenhorst WB, Visser L, Timmer A, et al. ADAM17 upregulation in human renal disease: a role in modulating TGF- α availability? *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297:F781-90.
49. van Ree RM, Oterdoom LH, de Vries AP, et al. Circulating markers of endothelial dysfunction interact with proteinuria in predicting mortality in renal transplant recipients. *Transplantation* 2008; 86:1713-9.
50. Sanz J, Fayad ZA. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* 2008; 451:953-7.
51. Gooz M. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010; 45:146-69.
52. Morange PE, Tregouet DA, Godefroy T, et al. Polymorphisms of the tumor necrosis factor- α (TNF) and the TNF- α converting enzyme (TACE/ADAM17) genes in relation to cardiovascular mortality: the AtheroGene study. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86:1153-61.
53. Dusso A, Arcidiacono MV, Yang J, et al. Vitamin D inhibition of TACE and prevention of renal osteodystrophy and cardiovascular mortality. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121:193-8.
54. Barhoumi T, Kasal DA, Li MW, et al. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension* 2011; 57:469-76.
55. Sergeev IN. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces Ca²⁺-mediated apoptosis in adipocytes via activation of calpain and caspase-12. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 384:18-21.
56. Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, et al. Vitamin D deficiency: a new risk factor for type 2 diabetes? *Ann Nutr Metab* 2012; 61:337-48.
57. Bae YJ, Kim SH, Chung JH, et al. Evaluation of adiposity-related biomarkers as metabolic syndrome indicators. *Clin Nutr Res* 2013; 2:91-9.
58. Gikas A, Sotiropoulos A, Pastromas V, et al. Seasonal variation in fasting glucose and HbA1c in patients with type 2 diabetes. *Prim Care Diabetes* 2009; 3:111-4.
59. Karvonen M, Jantti V, Muntoni S, et al. Comparison of the seasonal pattern in the clinical onset of IDDM in Finland and Sardinia. *Diabetes Care* 1998; 21:1101-9.
60. Ulutas O, Taskapan H, Taskapan MC, et al. Vitamin D deficiency, insulin resistance, serum adipokine, and leptin levels in peritoneal dialysis patients. *Int Urol Nephrol* 2013; 45:879-84.
61. Warren DT, Shanahan CM. Defective DNA-damage repair induced by nuclear lamina dysfunction is a key mediator of smooth muscle cell aging. *Biochem Soc Trans* 2011; 39:1780-5.
62. Grotzky DA, Gonzalez-Suarez I, Novell A, et al. BRCA1 loss activates cathepsin L-mediated degradation of 53BP1 in breast cancer cells. *J Cell Biol* 2013; 200:187-202.
63. 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.
64. 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.
65. Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D₂ is much less effective than vitamin D₃ in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:5387-91.
66. Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, et al. Vitamin D₂ is as effective as vitamin D₃ in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:677-81.
67. Heaney RP, Armas LA, Shary JR, et al. 25-Hydroxylation of vitamin D₃: relation to circulating vitamin D₃ under various input conditions. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:1738-42.
68. Ashworth B, Horn DB. Evidence of osteomalacia in an outpatient group of adult epileptics. *Epilepsia* 1977; 18:37-43.



69. Hahn TJ, Halstead LR. Anticonvulsant drug-induced osteomalacia: alterations in mineral metabolism and response to vitamin D3 administration. *Calcif Tissue Int* 1979; 27:13-8.
70. Cross HS, Bises G, Lechner D, et al. The Vitamin D endocrine system of the gut: a possible role in colorectal cancer prevention. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97:121-8.
71. Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, et al. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* 2000; 25:144-6.

IMÁGENES EN OSTEOLOGÍA / *Imaging in Osteology*

RESORCIÓN ÓSEA EN UN MODELO EXPERIMENTAL PARA EVALUACIÓN DE CEMENTOS ENDODÓNTICOS EN LA ZONA DE LA FURCA DE MOLARES DE RATA

Rubén A. Domínguez Pérez*¹, Manuel López Rodríguez², Graciela Letechipia Vallejo¹

1. Laboratorio de Neurociencias, División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez". 2. Laboratorio de Histopatología de la Unidad de Servicios Auxiliares para el Diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.

A continuación se muestran cuatro micrografías de cortes histológicos longitudinales de molares de rata en la zona de la furca teñidos por técnica histoquímica TRAP (fosfatasa ácida tartrato-resistente) y contrastados con hematoxilina.

Las imágenes fueron tomadas con un sistema conformado por un microscopio óptico compuesto marca Leica modelo DM100, cámara para microscopía DFC 295 y software de análisis de imagen Leica Application Suite versión 3.6.0.

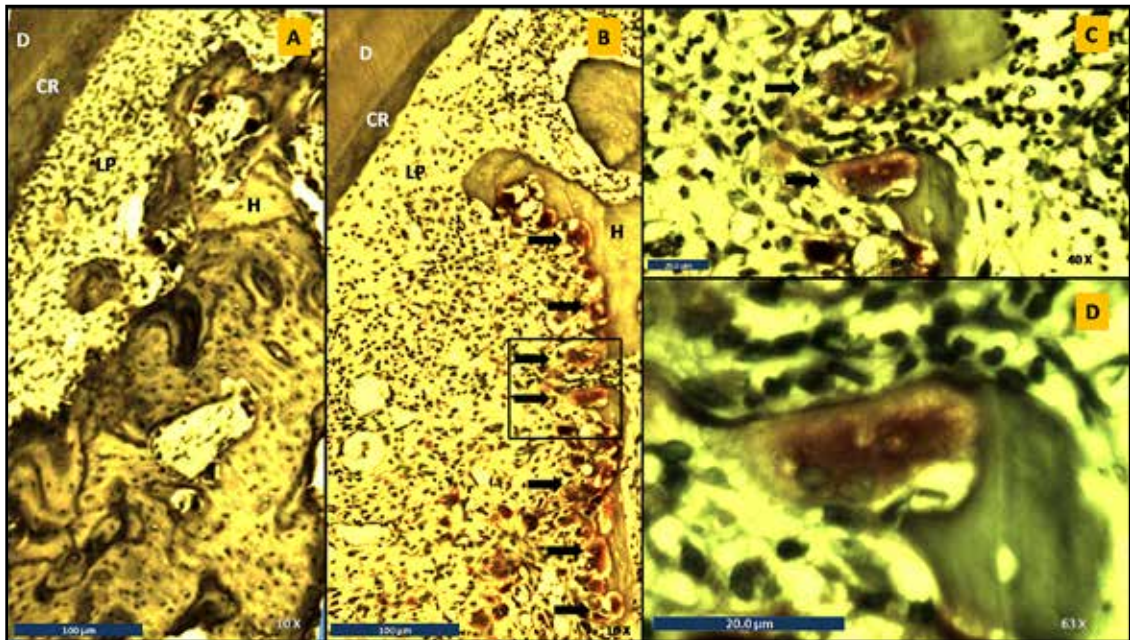
En la imagen A (10x) se observa la morfología normal de un tejido periodontal intacto y la ausencia total de osteoclastos teñidos. En la

imagen B (10x) se observa la morfología alterada por pérdida ósea, además de osteoclastos adyacentes a la línea de resorción, esto estimulado por una perforación intencional en furca realizada para simular un proceso patológico en estos tejidos antes de la implantación de cementos endodónticos.

Esto es parte de un modelo experimental para evaluación de biocompatibilidad de materiales de reparación endodóntica en tejidos periodontales previamente afectados.

Las imágenes C y D son acercamientos en 40x y 63x, respectivamente, de la zona marcada con el recuadro en la imagen B.

* Dirección Postal: Laboratorio de Neurociencias de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez". Calle: Dr. Rafael Carrillo esquina Dr. Salvador González Herrejón; Colonia Centro, C.P. 58000, Morelia, Michoacán. México.
Correo electrónico: rpdominguez1984@hotmail.com



Las flechas indican la presencia de osteoclastos. D: dentina, CR: cemento radicular, LP: ligamento periodontal, H: hueso.

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

(Recibido: marzo 2014.
Aceptado: abril 2014)

IMÁGENES EN OSTEOLÓGÍA / *Imaging in Osteology*

ENFERMEDAD DE PAGET MONOSTÓTICA

María Lorena Brance*

Centro de Reumatología. Rosario.

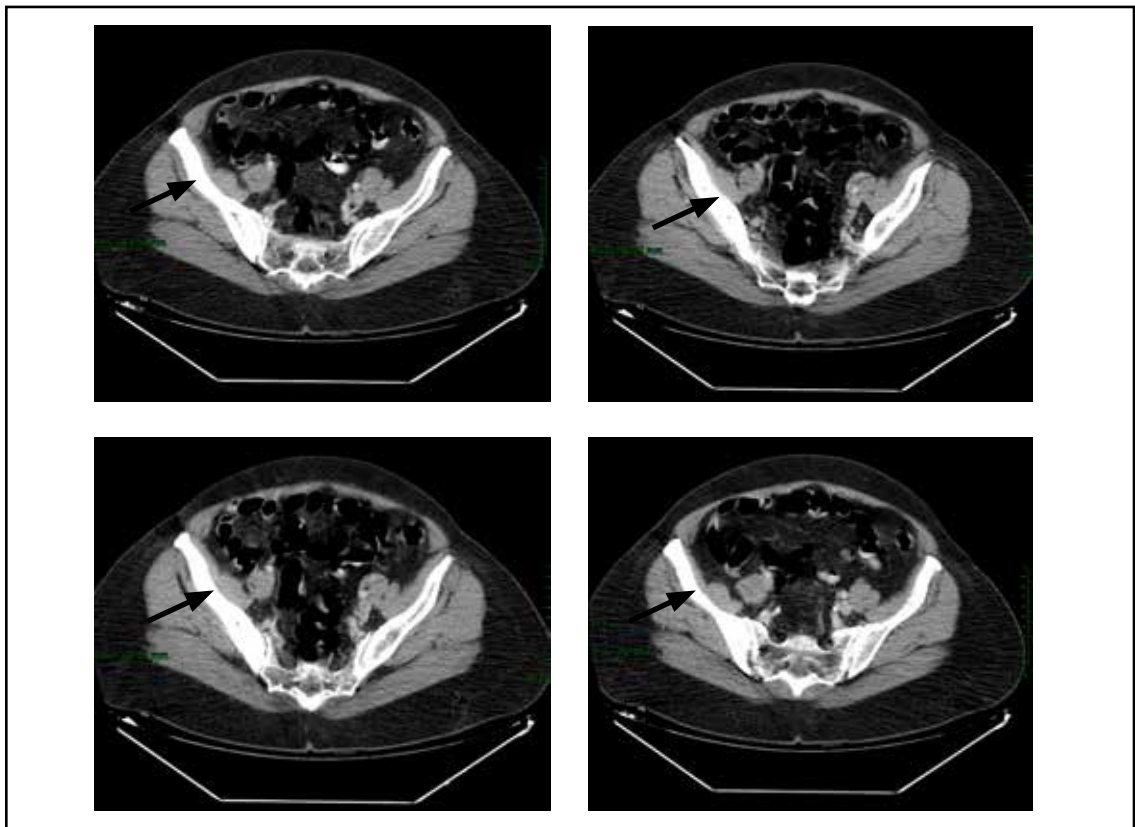


Figura 1. Esclerosis de hueso ilíaco derecho visualizado por tomografía computarizada. Hallazgo incidental

* Correo electrónico: lorenabrance@gmail.com



Figura 2. Radiografía de pelvis: hueso ilíaco derecho con radiopacidad difusa.

Enfermedad de Paget monostótica con afectación de hueso ilíaco derecho descubierta incidentalmente en una mujer de 67 años que realizó tomografía computarizada de abdomen y pelvis. Se observa importante esclerosis de hueso iliaco derecho, con marcada asimetría respecto del lado izquierdo. En la radiografía solicitada posteriormente se observa radiopacidad difusa en el hueso ilíaco característico de osteitis de Paget. Los valores de fosfatasa alcalina fueron elevados: 290U/L (rango normal: 200 U/L). En algunos casos con compromiso de la articulación sacroilíaca

podría evolucionar a fusión de la articulación sacroilíaca debiendo realizar el diagnóstico diferencial con otras entidades como la espondilitis anquilosante o la anquilosis vertebral hiperostótica.

Conflicto de intereses

La autora declara no tener conflictos de intereses.

(Recibido: mayo 2014.
Aceptado: junio 2014)

CONTROVERSIAS / *Controversies*

USO DE MARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

María Josefina Pozzo*

Servicio de Endocrinología. Hospital Alemán, Buenos Aires.

Resumen

Los marcadores bioquímicos del recambio óseo son determinaciones analíticas que miden enzimas sintetizadas por los osteoblastos u osteoclastos o los productos generados durante la degradación o la formación ósea y que se liberan a la circulación, proporcionando un estimado de la remodelación ósea.

Han demostrado su utilidad en diversas enfermedades metabólicas óseas pero persisten controversias en relación con su utilidad en el manejo de la osteoporosis en la práctica clínica. A pesar de que mucho se ha avanzado en el desarrollo de los ensayos, persiste la variabilidad (analítica y preanalítica) y falta de estándares de referencia que han limitado su recomendación.

Un mejor reconocimiento de los factores preanalíticos ha permitido minimizar la variabilidad biológica.

La densitometría mineral ósea (DMO), a pesar de ser un método imperfecto e impreciso, se ha erigido como procedimiento de elección para el diagnóstico de osteoporosis y la estimación del riesgo de fracturas. Los marcadores óseos, con sus ventajas y limitaciones, no pretenden hacer diagnóstico

de osteoporosis y tampoco sustituyen a las pruebas de medición de masa ósea. Pero, como pruebas complementarias, contribuyen a identificar causas secundarias, a predecir tempranamente la respuesta terapéutica a un fármaco antirresortivo y probablemente a identificar a la población con mayor riesgo de fractura. Además son útiles para controlar la adherencia y decidir cuándo reiniciar el tratamiento después de un período de descanso de bisfosfonatos.

Summary

BONE TURNOVER MARKERS IN CLINICAL SETTING

A variety of biochemical assays that reflects the activity of osteoblasts (the bone-forming cells) and osteoclasts (the bone-resorbing cells) called bone turnover markers (BTM), have been developed for clinical use. Such tests do not establish the diagnosis of a disease, but rather they reflect the activity of the skeleton. BTM are non-invasive, comparatively inexpensive and, when applied and interpreted correctly,

* Correo electrónico: mjpozzo@fibertel.com.ar



helpful tools in the diagnostic and therapeutic assessment of metabolic bone disease. With regard to osteoporosis, the usefulness of BTM remains controversial. Technological developments have greatly enhanced assay performance producing reliable and rapid assays with improved sensitivity and specificity. Problems in the measurement and interpretation of bone marker values continue to hamper the optimal utility of this clinical tool. Most of these difficulties originate from problems related to the handling and control of analytical and biological variability of bone marker measurements. These sources of variability can be substantial and need to be controlled.

Bone mineral density, in spite of its imperfections and inaccuracy, has been chosen as the goal standard for the diagnosis of osteoporosis and prediction of fractures. BTM do not intend to diagnose osteoporosis or replace bone mass measurements. But, as complementary tools, they help in the management of osteoporosis in some circumstances: prediction of bone loss and fracture risk in untreated patients, identification of secondary causes of osteoporosis, monitoring response to treatment and documentation of adherence. BTMs may also be useful to decide when therapy should be recommenced after treatment holiday.

Los marcadores bioquímicos del recambio óseo (MRO) son determinaciones analíticas que miden enzimas sintetizadas por los osteoblastos u osteoclastos o los productos generados durante la degradación o la formación ósea y que se liberan a la circulación.

El hueso es un tejido metabólicamente activo que está sometido a una continua remodelación por dos procesos contrapuestos: formación y resorción. Estos procesos dependen de la actividad de osteoclastos (resorción), osteoblastos (formación) y osteocitos (mantenimiento). En condiciones normales,

en el esqueleto joven, los procesos de formación y resorción están altamente acoplados uno con el otro, de manera que la cantidad de hueso resorbido es similar a la de hueso formado. Este balance se alcanza y regula a través de factores mecánicos, de la acción de hormonas sistémicas (PTH, vitamina D y esteroides) y mediadores locales (citoquinas, factores de crecimiento). Por el contrario, el crecimiento somático, el envejecimiento, las enfermedades metabólicas óseas, los estados de aumento o disminución de movilidad y las intervenciones terapéuticas, entre otras, se caracterizan por desequilibrios más o menos marcados en el recambio óseo. Los resultados de ese desacople se traducen en cambios en estructura, fuerza y masa ósea. Los dos primeros son difíciles de evaluar clínicamente, mientras que la masa se mide por la densitometría ósea (DMO). En contraste con esa medida estática, los MRO son herramientas útiles para detectar la dinámica del desequilibrio en sí.¹

A nivel microscópico, el remodelado óseo se produce en pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular, llamadas unidades básicas multicelulares o BMU (*basic multicellular units*). El proceso de resorción siempre precede al de formación y es más rápido que él, por lo tanto todo aumento en el ciclo de remodelación lleva a una pérdida de masa ósea.

Dependiendo de su participación en el proceso de remodelación óseo, los marcadores se categorizan en dos grupos (Tabla 1):

- Marcadores de formación.

Son productos derivados de osteoblastos activos y que se expresan en diferentes estadios de la diferenciación. Todos se miden en suero o plasma.

- Marcadores de resorción.

La mayoría de los marcadores de resorción son producto de la degradación del colágeno. Pueden medirse en sangre o en orina. El resto expresa actividad de enzimas osteoclasticas.

Los MRO han demostrado su utilidad en la evaluación y el manejo de diversas enfermedades metabólicas óseas como enfermedad de Paget, raquitismo, osteomalacia, metástasis óseas osteoblásticas y osteodistrofia renal, entre otras. No diagnostican una enfermedad específica. Reflejan aumento de la actividad ósea y potencial pérdida ósea. Sus niveles elevados indican necesidad de profundizar la evaluación.

En relación con la osteoporosis, los MRO han sido muy importantes en el desarrollo y en la determinación de las dosis de los fármacos para tratar la osteoporosis. Sin embargo, su utilidad en el paciente individual ha sido muy controvertida.

El grupo de trabajo de la *International Osteoporosis Foundation* (IOF) y la *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) realizó una revisión sistemática que incluyó en el análisis 22 estudios de cohorte prospectivos relacionados con la predicción de riesgo de fractura y 5 estudios

relacionados con la monitorización de la terapia.²

Concluye que, a pesar de observarse resultados promisorios, se hace difícil establecer conclusiones claras que permitan recomendarlos en la práctica clínica por los siguientes motivos:

- Variedad de marcadores usados que dificultan la comparación entre estudios.
- Diferentes tipos de fractura como “outcome”.
- Manejo estadístico incorrecto.
- Inadecuada apreciación de las causas de variabilidad.

Otra revisión que incluyó 43 artículos tuvo como objetivo evaluar los MRO como predictores de pérdida ósea y riesgo de fractura a nivel individual.³

Si bien reconocen la relación entre MRO (especialmente resorción), pérdida de masa ósea y riesgo de fractura, no recomiendan su uso fuera de la investigación clínica. Se enu-

Tabla 1. Marcadores bioquímicos de recambio óseo.

Marcadores de formación ósea

- Osteocalcina (OC)
- Fosfatasa alcalina ósea (FAO)
- N – propéptido del procolágeno tipo 1 (PINP)
- C – propéptido del procolágeno tipo 1 (PICP)

Marcadores de resorción ósea

- Productos de la degradación del colágeno*
 - Derivado del colágeno tipo 1 carboxiterminal CTX o *crosslaps* (s y u)
 - Derivado del colágeno tipo 1 aminoterminal NTX (s y u)
 - Enlaces (crosslinks)*
 - Deoxipiridinolina Dpyr (u)
 - Piridinolina urinaria Pyr(u)
 - Hidroxiprolina
 - Enzimas osteoclásticas*
 - Fosfatasa ácida tartrato resistente sérica (TRACP)
 - Catepsina K
-

S: sérico; u: urinarios.



meran las principales limitaciones metodológicas para la interpretación de los resultados:

- Horario de toma de las muestras.
- Fracturas recientes: son un distractor muy importante.
- Falta de especificación en los estudios acerca de la inclusión de tratamientos que pueden afectar el metabolismo del calcio (por ejemplo, niveles de vitamina D)
- Necesidad de establecer intervalos de referencia y valores de corte.

Varios países y/o regiones han expresado su opinión a través de guías de práctica clínica teniendo en cuenta fortalezas y debilidades de los MRO. Un resumen de estos fue incluido en la revisión del grupo de trabajo previamente citada.² Se observa que las recomendaciones de distintas sociedades difieren en relación con su uso en la práctica diaria. Algunos sugieren su uso de rutina, otros aceptan su uso con limitaciones y algunos directamente no los recomiendan.^{2,4} Por los motivos previamente enumerados, tampoco han sido incluidos en los algoritmos/calculadores de riesgo de fractura.

La variabilidad es la debilidad más importante de la que adolecen los marcadores:

- Variabilidad preanalítica (biológica). Tiene un fuerte efecto sobre los MRO y puede llegar hasta 20-30%. Incluye un número importante de factores que pueden coexistir en una misma persona.
 - Factores controlables (Tabla 2)
 - Factores no controlables (Tablas 3 y 4)
- Variabilidad analítica: intraensayo e interensayo. Persiste a pesar de haber disminuido sensiblemente con los métodos automatizados.
- Falta de estándares de referencia.

En general, los marcadores de formación son menos variables que los de resorción. Los urinarios muestran mayor variabilidad que los séricos. La determinación de los derivados del colágeno tipo 1 carboxiterminal (CTX) en

sangre se desarrolló con el fin de eliminar las limitaciones inherentes a los ensayos en orina, la dificultad para la recolección de orina de 24 horas y la necesidad de corregir por la excreción de creatinina.

Existe actualmente un mejor reconocimiento de la necesidad de controlar los factores preanalíticos, a los fines de minimizar la variabilidad biológica.

El grupo de trabajo IOF-IFCC propuso péptido del procolágeno tipo 1 (PINP) y CTX séricos como marcadores de referencia de formación y resorción ósea, respectivamente.⁶ Estos marcadores fueron seleccionados porque son los que mejor cumplen con las condiciones que debe reunir un marcador bioquímico: respuesta al tratamiento, baja variabilidad intraindividual, clara caracterización bioquímica y accesibilidad para laboratorios en la práctica asistencial. En nuestro medio, el PINP no ha sido implementado probablemente por el costo.

A pesar de lo expuesto anteriormente y teniendo siempre en cuenta los factores preanalíticos y analíticos en la interpretación de los resultados, abono la posición de quienes consideran que los MRO son herramientas muy útiles en el manejo de la osteoporosis en la práctica diaria, especialmente en las situaciones que se desarrollan a continuación.

- Identificación de riesgo de fractura.

Se ha observado que el alto recambio óseo se asocia con un mayor riesgo de fractura vertebral y periférica en mujeres posmenopáusicas y de fracturas de fémur en mujeres ancianas, y que esta asociación es independiente del riesgo analizado por la medición de la densidad mineral ósea.^{7,8} Los niveles elevados de recambio óseo indican un riesgo de fractura similar al de tener un *T-score* < -2,5, con *odds ratio* entre 2,4 y 2,8. Si el individuo tiene bajo *T-score* y niveles elevados de marcadores, el riesgo es mayor, con *odds ratio* de 4,1.⁹ Por ello, se ha sugerido que la combinación de

Tabla 2. Marcadores óseos: factores controlables de variabilidad preanalítica ^{2,5}

| Origen | Importancia | Efecto |
|------------------|---|---|
| Ritmo circadiano | Muy importante | Más significativo para marcadores de resorción |
| Ayuno | Importante para algunos casos específicos | CTX séricos disminuyen 20% posdesayuno |
| Ejercicio | Importante | Cambios dependen del ejercicio y la edad |
| Ciclo menstrual | No importante | Pequeños cambios en fase luteal |
| Estacional | No importante en casos individuales | Leve disminución en invierno |
| Dieta | No importante | Pequeña disminución postsuplementación con calcio |

Tabla 3. Marcadores óseos: factores no controlables de variabilidad preanalítica ^(2,5)

| Origen | Importancia | Efecto |
|-----------------------------------|-----------------|--|
| Edad | Muy importante | Aumentan con edad |
| Estado menopáusico | Muy importante | Aumento rápido después de la última menstruación |
| Sexo | Importante | Más alto en mujeres que hombres |
| Fracturas | Importante | Aumento posfracturas |
| Embarazo y lactancia | Importante | Aumento máximo en 3 ^{er} trimestre |
| Fármacos | Importante | Aumentan o bajan según fármacos |
| Enfermedades | Importante | Depende de la enfermedad |
| Reposo/inmovilización | Importante | Disminuyen los de formación Aumentan los de resorción |
| Déficit vitamina D/HPT secundario | Importante | Aumentan |
| Zonas geográficas | Poco importante | Pequeñas diferencias |
| Etnias | No importante | Pequeñas diferencias |



Tabla 4. Enfermedades que modifican la remodelación ósea⁴

Caracterizadas por remodelación acelerada

Hiperparatiroidismo primario
Hipertiroidismo
Acromegalia
Enfermedad de Paget
Metástasis óseas

Caracterizadas por baja remodelación

Hipotiroidismo
Hipoparatiroidismo
Hipopituitarismo
Déficit de hormona de crecimiento

Caracterizadas por disociación en la remodelación

Enfermedad de Cushing
Mieloma múltiple

la medición de la densidad mineral ósea y de marcadores sensibles del recambio permite identificar a las pacientes con alto riesgo de fractura con mayor precisión que con cada una de las de estas pruebas en forma aislada.

- Monitorización de la terapia.

Los MRO han demostrado su utilidad en el manejo de los pacientes en la práctica clínica.¹⁰

La principal y más aceptada utilidad de los marcadores ha sido la monitorización del tratamiento antirresortivo.

Los MRO se mueven en consonancia con la medicación utilizada: su actividad disminuye con el tratamiento antirresortivo y aumenta con el anabólico. Esto ha sido demostrado ampliamente en los estudios controlados y aleatorizados de los diferentes fármacos utilizados para el tratamiento de la osteoporosis que incluyeron un gran número de pacientes.

La disminución de los marcadores de resorción con la terapia antirresortiva expresa inhibición de la actividad osteoclástica. La rapidez y la magnitud de los cambios dependen de la potencia y de la vía de administración

del antirresortivo usado (mayor y más rápida para denosumab y zoledronato).

El cambio de los marcadores es mucho más rápido y mayor que el cambio en la densitometría ósea. Algunos marcadores (CTX) disminuyen entre 50 y 70% en pocas semanas o meses, mientras que para observarse un cambio significativo en DMO pueden necesitarse 1-2 años. La reducción precoz de los marcadores puede predecir mayor ganancia ósea a largo plazo.

Con el tratamiento anabólico (PTH) existe un aumento temprano de los marcadores de formación, seguido de aumento posterior de marcadores de resorción.

La meta de todo tratamiento de osteoporosis es la disminución del riesgo de fracturas. Esto puede lograrse en muchos casos antes de que se logre un cambio significativo en la medición de la densidad mineral. Tampoco existe una relación lineal entre aumento el DMO y reducción de fracturas. Los cambios en la DMO explican solo una pequeña proporción de la reducción de fracturas.

Existen datos que sugieren que la reducción temprana de los marcadores con tratamiento antirresortivo, se asocia a un menor

riesgo de fractura vertebral a largo plazo.^{11,12}

Se ha sugerido que debería considerarse buena respuesta al tratamiento si los marcadores alcanzan los valores medios de la población sana premenopáusicas.

Por otra parte, no todo paciente con osteoporosis tiene MRO elevados. En ese caso es de utilidad considerar como significativos los valores que excedan el cambio significativo mínimo. Los cambios que superan el cambio significativo mínimo (2,8 xCV interensayo del marcador) en general exceden la variabilidad al azar del marcador y representan un real cambio biológico.

La no observancia del cambio esperado debe alertar al médico a averiguar el motivo: que existan otras patologías no diagnosticadas, que el paciente esté tomando la medicación en forma inapropiada, o directamente que no la esté tomando. En el caso de los bisfosfonatos, la falta de disminución de los marcadores de resorción (si se constata la correcta toma de la medicación) puede indicar necesidad de cambiar la vía de administración (de oral a intravenosa).

- Documentar adherencia al tratamiento.

Es otra de las razones importantes para considerar el uso de marcadores (medir entre 3-6 meses de tratamiento), ya que la falta de adherencia es un problema mayor en el seguimiento de una enfermedad asintomática.

Algunos datos sugieren que los pacientes que reciben información positiva sobre la reducción de los marcadores tienen mayor adherencia al tratamiento.^{13,14}

- Decidir cuándo reiniciar terapia con bisfosfonatos.

Después de un tratamiento prolongado con bisfosfonatos, el fármaco es retenido en el esqueleto por muchos años. Esto es particularmente cierto con alendronato y zoledronato, que tienen la mayor afinidad por el

hueso.^{15,16} Los marcadores de resorción pueden mantenerse suprimidos por varios años después de la suspensión. El aumento de los marcadores a niveles pretratamiento puede indicar necesidad de reiniciar el tratamiento.

- Elección de tratamiento

En teoría parecería lógico usar antirresorptivos en pacientes con osteoporosis y recambio acelerado y anabólicos en aquellos con recambio bajo. Este concepto por el momento no ha sido validado.

Los médicos que usan los MRO deben estar familiarizados con los factores que tienen influencia en los resultados de los ensayos, para evitar incorrectas interpretaciones.

Para ello son de ayuda algunas recomendaciones:

1. Recolectar y conservar las muestras en forma correcta. La incorrecta recolección puede afectar de manera importante la precisión del ensayo. Debido a la variación diurna y a la disminución de algunos marcadores posingesta, las muestras deben tomarse de la siguiente manera:

- a. Marcadores séricos: en ayunas por la mañana

- b. Marcadores urinarios: segunda muestra de la mañana en ayunas.

2. Usar el mismo laboratorio para las mediciones seriadas, ya que los resultados pueden variar considerablemente entre laboratorios, aun usando los mismos métodos.

3. Tener en cuenta los factores preanalíticos no modificables para la interpretación de los resultados.

4. Solicitar un marcador de formación y otro de resorción.

En editoriales y revisiones, diferentes expertos han dado su opinión sobre la utilidad de los marcadores en la práctica clínica. La monitorización de la terapia es la utilidad universalmente reconocida.¹⁷⁻²¹



Consideración final: la densitometría mineral ósea, a pesar de ser un método imperfecto e impreciso se ha erigido como procedimiento de elección para el diagnóstico de osteoporosis y la estimación del riesgo de fracturas. Los marcadores óseos, con sus ventajas y limitaciones, no pretenden hacer diagnóstico de osteoporosis y tampoco sustituyen a las pruebas de medición de masa ósea. Pero, como pruebas complementarias, contribuyen a identificar causas secundarias, a predecir tempranamente la respuesta terapéutica a un fármaco antirresortivo y pro-

bablemente a identificar a la población con mayor riesgo de fractura. Además son útiles para controlar la adherencia y decidir cuándo reiniciar el tratamiento después de un período de descanso de bisfosfonatos.

Conflicto de intereses

La autora declara no tener conflictos de intereses.

(Recibido: mayo de 2014.

Aceptado: junio de 2014)

Referencias

1. Siebel MJ. Biochemical Markers of Bone Turnover. Part I: Biochemistry and Variability. *Clin Biochem Rev* 2005; 26:97-122.
2. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int* 2011; 22:391-420.
3. Chopin F, Biver E, Funck-Brentano T, et al. Prognostic interest of bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Joint Bone Spine* 2012; 79:26-31.
4. Schurman L, Bagur A, Claus-Hermberg H y cols. Guías 2012 para el diagnóstico, prevención y tratamiento de la osteoporosis. *Medicina (B Aires)* 2013; 73:55-74.
5. Szulc P, Bauer DC, Eastell R. Biochemical Markers of Bone Turnover. In: *Osteoporosis Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 8th ed. 2013. Chap 35, pp. 297-306.
6. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, et al. International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Position on bone marker standards in osteoporosis. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49:1271-4.
7. Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1526-36.
8. Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, et al. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS prospective study. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1531-8.
9. Johnell O, Odén A, De Laet C, Garnero P, Delmas PD, Kanis JA. Biochemical indices of bone turnover and the assessment of fracture probability. *Osteoporos Int* 2002; 13:523-6.
10. Singer FR, Eyre DR. Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Cleve Clin J Med* 2008; 75:739-50.
11. Bjarnason NH, Sarkar S, Duong T, Mitlak B, Delmas PD, Christiansen C. Six and twelve month changes in bone turnover

- are related to reduction in vertebral fracture risk during 3 years of raloxifene treatment in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2001; 12:922-30.
12. Eastell R, Barton I, Hannon RA, Chines A, Garnero P, Delmas PD. Relationship of early changes in bone resorption to the reduction in fracture risk with risedronate. *J Bone Miner Res* 2003; 18:1051-6.
 13. Clowes JA, Peel N, Eastell R. The impact of monitoring on adherence and persistence with antiresorptive treatment for postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1117-23.
 14. Delmas PD, Vrijens B, Eastell R, et al. Effect of monitoring bone turnover markers on persistence with risedronate treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1296-1304.
 15. Black DM, Schwartz AV, Ensrud KE, et al. Effects of continuing or stopping alendronate after 5 years of treatment: the Fracture Intervention Trial Long-term Extension (FLEX): a randomized trial. *JAMA* 2006; 296:2927-38.
 16. Black DM, Reid IR, Boonen S, et al. The Effect of 3 Versus 6 Years of Zoledronic Acid Treatment of Osteoporosis: A Randomized Extension to the HORIZON-Pivotal Fracture Trial (PFT) *J Bone Miner Res* 2012; 27:243-54.
 17. Licata AA. Biochemical markers of bone turnover: useful but underused. *Cleve Clin J Med* 2008; 75:751-2.
 18. Vasikaran SD, Cooper C, Kanis JA. Recommendations for bone marker standards in osteoporosis: what, why and where to now? *Ann Clin Biochem* 2011; 48:91-2.
 19. Hlaing T, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover – uses and limitations. *Ann Clin Biochem* 2014; 51:189-202.
 20. Szulc P. The role of bone turnover markers in monitoring treatment in postmenopausal osteoporosis. *Clin Biochem* 2012; 45:907-19.
 21. Lee J, Vasikaran S. Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. *Ann Lab Med* 2012; 32:105-12.



CASUÍSTICAS / Case Reports

FRACTURA VERTEBRAL DORSAL SECUNDARIA A ENFERMEDAD DE PAGET

Luis Agustín Ramírez Stieben,* Pablo Caballini, Alexis Ostinelli, Cristian Díaz, Pablo Toni, Mariana Negri, Domingo Cera

Servicio de Clínica Médica, Hospital de Emergencias Dr. Clemente Álvarez. Rosario.

Resumen

La enfermedad de Paget es una enfermedad ósea caracterizada por la alteración de la remodelación ósea que predispone a fracturas. Aunque el compromiso vertebral es frecuente, no lo es su localización en la columna dorsal. Presentamos un paciente varón de 57 años que sufrió una fractura de octava vértebra dorsal con compromiso medular segmentario; tras estudios por imágenes y anatomopatológicos se arribó al diagnóstico de enfermedad de Paget.

Palabras clave: enfermedad de Paget, fractura vertebral, compresión de médula espinal.

Summary

SPINAL DORSAL FRACTURE SECONDARY A PAGET DISEASE

The Paget disease (PD) is a bone disorder characterized by abnormal bone remodeling predisposing fractures. Although vertebral affection is common, dorsal localization is not. We present a 57 years old male patient,

who suffered an eighth dorsal spinal fracture with segmental spinal involvement, and after imaging and anatomic-pathologic studies was diagnosed with Paget disease.

Key words: Paget disease, spinal fracture, spinal cord compression.

Introducción

La enfermedad de Paget (EP) u *osteítis deformante* es una enfermedad ósea descrita en el año 1876 por Sir James Paget. Se caracteriza por una remodelación ósea excesiva y anormal que predispone a lesiones líticas y deformaciones óseas. La etiopatogenia no es clara. Aunque puede presentarse de forma monostótica, generalmente, es poliostótica.^{1,2} En orden de frecuencia, los huesos más afectados son pelvis, fémur, cráneo, tibia, columna vertebral, clavícula, húmero y costillas.³ La EP con compromiso de columna torácica es relativamente infrecuente.^{4,5} Presentamos el caso clínico de un varón de 57 años de edad con una fractura vertebral torácica secundaria a EP.

* Correo electrónico: ramirez.stieben@gmail.com

Caso clínico

Un varón de 57 años, extabaquista (20 paquetes/año), ingresó a nuestro hospital por un cuadro clínico de 18 meses de evolución caracterizado por parestesias en miembros inferiores, dificultad en la marcha y en la micción. Negaba pérdida de peso u otros síntomas constitucionales.

Al examen físico se comprobó: buen estado general. Índice de masa corporal 28 kg/m². Normotenso. Afebril. Exámenes cardiológico y respiratorio normales. Abdomen sin visceromegalias; paraparesia +4/5, paraparestesia e hiperreflexia osteotendinosa en miembros inferiores, respuesta plantar indiferente y esfínter anal tónico.

Los análisis bioquímicos mostraron: hematocrito 48,6% (42-52%), hemoglobina 15,4 g/dl (14-18), leucocitos 6600 cél./ μ l (5000-10.000), plaquetas 284.000/ μ l (150.000-400.000), glucemia 88 mg/dl (70-110), creatinemia 0,9 mg/dl (0,5-1,1), natremia 134 mM (135-145), potasemia 3,8 mN (3,5-5,0), calcemia 9,3 mg/dl (9-10,5), fosfatemia 4 mg/dl (3,0-4,5), magnesemia 1,7 mg/dl (1,3-2,1), proteínas 6,7 mg/dl (6,4-8,3), albuminemia 4,5 g/dl (3,5-5,0), TGO 23 UI/l (5-40), TGP 18 UI/l (7-56), fosfatasa alcalina 4029 UI/l (30-120), γ -GT 29 UI/l (0-30), bilirrubinemia 1,1 mg/dl (0,3 1,2). Eritrosedimentación 6 mm/h (5-20). Proteinograma por electroforesis: α 1-globulinas 0,12 g/dl (0,1-0,3), α 2-globulinas 0,94 g/dl (0,6-1,0), β -globulinas 0,89 g/dl (0,6-1,3 g/dl), γ -globulinas 0,78 g/dl (0,7-1,5 g/dl). Paratohormona (PTH): 18,70 pg/ml (VN: 14-72 pg/ml). Dosaje de 25-hidroxicolecalciferol 25 ng/ml (*insuficiencia*: 10-30 ng/ml). Tirotrófina 1,25 μ UI/ml (0,4 a 4,0 mIU/l). Antígeno prostático específico (PSA) 0,42 ng/ml (0-4 ng/ml). Orina de 24 horas: diuresis 1400 ml, proteinuria 0,14 g, calciuria 346 mg, fosfatúria 82 mg, creatinuria 1,62 g, reabsorción tubular de fosfato (RTP) 98% (mayor 85%).

Se solicitó una tomografía computarizada de tórax, abdomen y pelvis (Figura 1). En este estudio se constataron múltiples imágenes lí-

ticas y blásticas que afectaban cuerpos vertebrales dorsales, lumbares, sacro y ambas crestas ilíacas. No se evidenciaron lesiones ocupantes de espacio en tórax, abdomen y pelvis. Se solicitó una ecografía prostática que informó glándula con parénquima heterogéneo y escasas calcificaciones en su interior.

Para la evaluación del compromiso neurológico se solicitó una resonancia magnética de la columna dorsal (Figura 2), en la cual se evidenció aplastamiento en "forma de pez" de la octava vértebra dorsal con protrusión del muro anterior y posterior. Toda la estructura ósea del cuerpo vertebral se encontraba comprometida al igual que el arco neural. Además se evidenció la acentuación del brillo de la cuerda medular en dicho sector.

Se solicitó biopsia bajo guía tomográfica de la octava vértebra dorsal donde se constató signos de remodelación ósea, neoformación trabecular irregular con actividad osteoblástica y osteoclástica, fibroangiogénesis de los espacios medulares, sin evidencias de infiltrado inflamatorio ni presencia de células atípicas.

Se solicitó centellografía ósea corporal total (Tc⁹⁹-MDP) y se constató intensa hipercaptación en octava vértebra dorsal y extremo posterior del octavo arco costal derecho. Otras áreas hipercaptantes fueron las últimas vértebras lumbares, el sacro con las articulaciones sacroilíacas y el hueso ilíaco izquierdo. Debido a que estas lesiones, aunque inespecíficas, iban acompañadas con elevación de la fosfatasa alcalina y biopsia ósea que no demostró células neoplásicas, se interpretó el cuadro clínico como EP con compromiso vertebral. Tras evaluación por el Servicio de Neurocirugía se decidió fijación vertebral dorsal por vía anterolateral. Se indicó tratamiento con ácido zoledrónico (infusión intravenosa única de 5 mg), calcitriol (50 μ g/día) y carbonato de calcio (1000 mg/día de calcio elemental). Por evolución clínica favorable se decidió alta hospitalaria.



Figura 1. Tomografía computarizada de tórax, abdomen y pelvis. Se observan imágenes líticas y blásticas en cuerpos vertebrales y huesos ilíacos. Aplastamiento de octava vértebra dorsal.

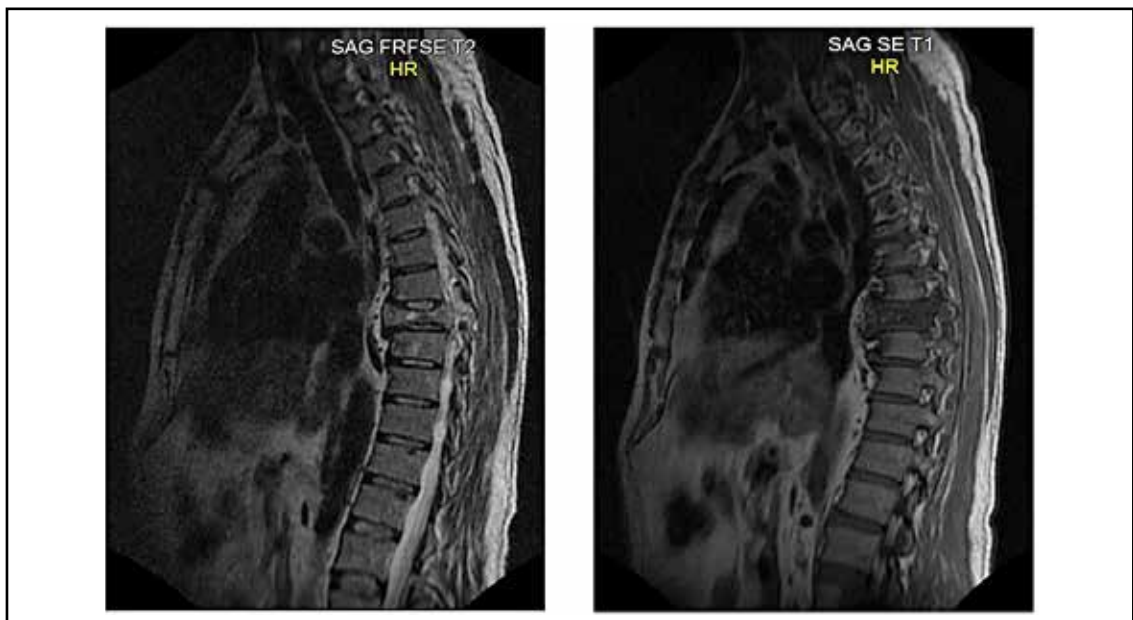


Figura 2. Resonancia magnética de columna dorsal. Aplastamiento en forma de pez de la octava vértebra dorsal con compromiso medular segmentario.

Discusión

La EP es una de las enfermedades óseas metabólicas más comunes, segunda en frecuencia luego de la osteoporosis. Se caracteriza por una alteración en la remodelación ósea debido a un incremento tanto de la actividad osteoclástica como osteoblástica, que da como resultado la formación de un hueso de una calidad inferior a la de un hueso normal, lo que predispone a fracturas y deformidades esqueléticas en estadios avanzados.¹⁻³

La etiología no se conoce con exactitud. Sin embargo, se postula la existencia de una predisposición genética e, incluso, la participación de agentes virales, como el virus sincitial respiratorio y el paramixovirus. Presenta una relación 3:2 entre hombres y mujeres y el inicio promedio de la enfermedad se encuentra entre los 45 y 55 años. La enfermedad presenta un curso prolongado y las anomalías esqueléticas frecuentemente son asintomáticas; muchas veces se llega al diagnóstico de manera incidental. Los síntomas suelen estar relacionados con complicaciones de la enfermedad y consisten en deformidad y dolor óseo, fracturas, artrosis secundaria, compresión nerviosa o transformación sarcomatosa. Aunque la EP puede ser monostótica, comúnmente es polioestótica.¹⁻³

La columna vertebral es el segundo sitio en frecuencia más afectado (aproximadamente, un 53%). La columna lumbar y, especialmente, la cuarta y quinta vértebras lumbares son los sitios más afectados. El compromiso exclusivo de la columna torácica es extremadamente raro. Los cuerpos vertebrales están casi siempre implicados junto a una porción variable del arco neural. La apariencia radiológica se caracteriza por expansión del soma con aumentos de las dimensiones vertebrales anteroposteriores y transversales.^{4,5} Las radiografías en proyecciones laterales y las reconstrucciones sagitales en tomografía computarizada demuestran con mayor sensibilidad la mayor densidad en la periferia vertebral y un centro relativamente más radiolúcido

en el cuerpo. Durante la fase esclerótica de la enfermedad, la progresión de esta conduce a una "vértebra de marfil", debido al aumento de la densidad del cuerpo vertebral. En estos casos, en el diagnóstico diferencial deben considerarse a las metástasis, el osteosarcoma o procesos linfoproliferativos.

El compromiso vertebral por la EP puede dar lugar a varias complicaciones, entre ellas la estenosis espinal, la disfunción neural o fracturas por compresión del cuerpo vertebral. Esta última es la más frecuente y suele presentarse con un inicio súbito de dorsalgia y, en casos graves, compresión medular, principalmente, en columna lumbar y más raramente en sacro, cóccix, odontoides o columna torácica. La fractura se puede observar en la fase lítica, viéndose en las radiografías signos de osteopenia. Sin embargo, es raro constatar la fase lítica en la columna vertebral.⁴ La resonancia magnética puede contribuir al diagnóstico incluso ante hallazgos inespecíficos. Cuando la fractura no es reciente, la intensidad de señal en T1 y T2 será baja por la esclerosis del hueso. La EP de la columna vertebral que conduce a mielopatía es más a menudo secundaria a compromiso torácico que cervical. Una variedad de mecanismos están involucrados, entre ellos la extensión extradural del hueso, la distorsión del canal espinal por fracturas por compresión, hematomas epidurales espinales, degeneración sarcomatosa o robo vascular por hipermetabolismo del cuerpo vertebral.⁵⁻⁷

Entre los exámenes complementarios, la gammagrafía ósea con Tc^{99m}-MDP es útil para examinar los diferentes sitios comprometidos, para estimar la actividad de la enfermedad debido a su sensibilidad para detectar la actividad osteoblástica e, incluso, para evaluar la respuesta al tratamiento. Se observa un aumento en la captación del radiofármaco en los huesos implicados. Varios patrones de absorción se describen en la EP. Sin embargo, debe remarcar que no es un estudio con alta especificidad, por lo que se requiere implemen-



tar estudios radiológicos. La resonancia magnética se utiliza para excluir afectación de tejidos blandos o para evaluar complicaciones, como la invaginación basilar, la compresión medular o la transformación sarcomatosa. La biopsia puede ser de utilidad en aquellos casos en los que el diagnóstico no es claro o no existe expansión del cuerpo vertebral. Aunque la mayoría de los pacientes con EP presentan elevación de la fosfatasa alcalina ósea y de los marcadores de resorción ósea, en la variante monostótica con complicación neurológica los valores séricos pueden encontrarse dentro del rango de la normalidad. Los valores de fosfatasa alcalina elevados no solo son útiles para apoyar el diagnóstico sino también para evaluar el seguimiento y la respuesta terapéutica.^{5,6}

Con respecto a la terapéutica, los bifosfonatos son fármacos potentes y de elección para el tratamiento de la EP. La resorción ósea disminuye en el transcurso de unos días y el dolor óseo suele mejorar durante las primeras dos semanas de tratamiento.⁸ La disminución de la formación ósea osteoblástica y la caída de los niveles séricos de fosfatasa alcalina se observa luego de uno o dos meses. La mejoría neurológica suele retrasarse hasta uno a tres meses. Algunos estudios han demostrado al-

tas tasas de remisión con ácido zoledrónico en dosis única. En casos de compresión medular severa estaría indicada la neurocirugía, que mejora significativamente la sintomatología; la sintomatología; debe acompañarse del tratamiento con bifosfonatos para controlar la enfermedad de base.⁹⁻¹⁰

Comentarios finales

El compromiso vertebral torácico causado por la EP es una complicación relativamente infrecuente. En el caso reportado, se procedió a la realización de biopsia estereotáxica que permitió descartar la presencia de células atípicas o inflamatorias. Junto a elevados niveles séricos de fosfatasa alcalina, niveles normales de parathormona (junto a una RTP del 98%), imágenes de osteólisis y de formación ósea en los estudios radiológicos, más hallazgos compatibles aunque inespecíficos en la gammagrafía ósea, se arribó al diagnóstico de EP.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: mayo 2014.

Aceptado: junio 2014)

Referencias

1. Adami S, Bartolozzi P, Brandi ML, et al. Italian guidelines for the diagnosis and treatment of Paget's disease of bone. *Reumatismo* 2007; 59:153-68.
2. Novo Veleiro I, Perianes Díaz MA, Alvela Suárez ML, et al. Dolor en la región isquiopubiana en un paciente con enfermedad de Paget. *Reumatol Clin* 2011; 7:419-20.
3. Cheong HW, Peh WC, Guglielmi G. Imaging of diseases of the axial and peripheral skeleton. *Radiol Clin N Am* 2008; 46:703-33.
4. Dell'Atti C, Cassar-Pullicino VN, Lalam RK, Tins BJ, Tyrrell PN. The spine in Paget's disease. *Skeletal Radiol* 2007; 36:609-26.
5. Guglielmi G, Muscarella S, Leone A, Peh WC. Imaging of metabolic bone diseases. *Radiol Clin N Am* 2008; 46:735-54.
6. Slavković SM, Vukasinović Z, Slavković NS,

- Apostolović MD. Diagnosis and treatment of Paget disease of the spinal vertebrae. *Acta Chir Jugosl* 2010; 57:49-55.
7. Vukasinović Z, Slavković N, Spasovski D, Slavković S. Spinal localization of Paget disease-case report. *Srp Arh Celok Lek* 2008; 136:419-22.
 8. Lojo Olivera L, Torrijos Eslava A. Tratamiento de la enfermedad ósea de Paget. *Reumatol Clin* 2012; 8:220-4.
 9. Reid IR, Lyles K, Su G, et al. A single infusion of zoledronic acid produces sustained remissions in Paget disease: data to 6.5 years. *J Bone Miner Res* 2011; 26:2261-70.
 10. Drake MT, Clarke BI, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2008; 83:1032-45.

FE DE ERRATAS Actualizaciones en Osteología, VOL. 10 - Nº 1 - 2014

- En la página 19 en lugar de *Cien años de Soledad (1967)*. Gabriel García Márquez (1927-2014) debió decir:

Libro: Doce cuentos peregrinos. Cuento: Maria dos Prazeres. Gabriel García Márquez (1927-2014)

- En el artículo "*Diagnóstico de las calcificaciones vasculares por métodos radiológicos semicuantitativos*", página 83, figura izquierda, debió decir:

Figura 1. Rx de frente de pelvis. Se observan las líneas que delimitan los cuatro cuadrantes (ver texto).



ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

RAQUITISMO HIPOFOSFATÉMICO FAMILIAR Y ESPORÁDICO: CLÍNICA Y HALLAZGOS MOLECULARES

Guillermo Alonso,¹ Luisa Plantalech,² Rodolfo Guelman,² Sergio Gonzalez,³ Hamilton Cassinelli,⁴ María Redal,³ Titania Pasqualini^{1*}

1. Departamento de Pediatría, Sección Endocrinología, 2. Servicio de Medicina Nuclear y Endocrinología; 3. Unidad de Medicina Molecular y Genética (ICBME), Hospital Italiano de Buenos Aires. 4 División Endocrinología, Hospital de Niños R Gutiérrez, CABA.

Resumen

Las alteraciones de los genes PHEX y FGF23 son las causas más estudiadas de raquitismos hipofosfatémicos (RH). Ambas se heredan en forma ligada al X (RHLX) y autosómica (RHAD) respectivamente. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de variaciones moleculares de estos genes en pacientes y familiares con RH y establecer relaciones entre las manifestaciones somáticas y el tipo de alteración molecular. Se evaluaron fenotipo y genotipo en 29 casos con manifestación somática: 13 casos propósitos (5 esporádicos), 16 familiares con clínica de RH y 12 familiares asintomáticos mediante el análisis de los genes PHEX y FGF23. Se analizaron las mutaciones del gen PHEX mediante SSCP/HD y secuenciación directa de las regiones con patrón de bandas alterado y del FGF23 por secuenciación directa para detectar mutación R176Q (c.527 G>A), R179Q(c.535 G>A) y R179W (c.535 C>T). El RH fue de predominio familiar (8/13) y se diagnosticó en la infancia y niñez, excepto en 7 casos (2 con alteraciones

clínicas y 5 sujetos con bioquímica de hipofosfatemia descubiertos en la evaluación familiar). El 75% de los casos con RH familiares y el 44% de los esporádicos, presentaba alteraciones del gen PHEX. En una familia con RHAD se detectaron mutaciones del gen FGF23. Los pacientes con alteraciones del PHEX presentaban fenotipo somático más grave. Se halló la mutación del gen FGF23 en el exón 3: sustitución (CGC a CAG): c.535 G>A, R179Q. Se observaron 4 nuevas mutaciones del gen PHEX en 3 familias y un caso esporádico. A: c.552 Inserción G+1 del intron 3-4 en sitio splicing dador. B: Mutación silenciosa c.401 C>A en posición 11 exón 3. C: Mutación, codón stop, c.1241 C>G en posición 105 del exón 9. D: Mutación silenciosa c.2260 T>G en posición 93, exón 20 en una niña (esporádico). Conclusiones: se detectaron mutaciones del PHEX en la mayoría de los casos especialmente en los familiares. Describimos 4 nuevas mutaciones del gen PHEX. Si bien se observaron diferentes tipos de mutaciones, el fenotipo fue similar en las distintas familias. El

* Dirección electrónica: titania.pasqualini@hospitalitaliano.org.ar

RHAD presentó una forma menos grave y de presentación en distintos periodos de la vida.

Palabras clave: Raquitismo hipofosfatémico, raquitismo hipofosfatémico ligado al X, raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante, gen PHEX, gen FGF 23.

Summary

FAMILIAL AND SPORADIC HYPOPHOSPHATEMIC RICKETS: CLINICAL AND MOLECULAR FINDINGS.

Human disorders of phosphate handling and skeletal mineralization can result from inactivating mutations in PHEX, an X linked dominant disorder (XLH). Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) is a rare disorder caused by mutation in the FGF23 gene, which, in contrast to XLH, displays incomplete penetrance and variable age of onset. We studied genomic DNA of 13 Argentinean families in order to characterize these genes. We studied 29 patients and their relatives (n=12) with hypophosphatemic rickets and osteomalacia, belonging to 13 families. FGF23 was analyzed by bidirectional complete sequencing of the exons 3. For the evaluation of the PHEX gene all 22 exons and introns/exons boundaries were analyzed by SSCP/HD and bidirectional complete sequencing of regions with abnormal migration patterns was performed. We found five sporadic cases. Six patients had been diagnosed in early childhood. FGF23 missense mutation was identified in 4 affected members of a family (G>A, R179Q, in exon 3). Four novel PHEX gene mutations were detected. Family III: two patients, presented c.552 ins G+1 of intron 3-4 in splice donor. Family IV: three members, had a silence mutation c.401 C>A pos 11 exon 3. Family VII: two patients had a codon stop mutation, c.1241 C>G pos 105 exon 9. A single girl with healthy parents showed silence mutation c.2260 T>G in pos 93 exon 20. Patients with XLRH have more severe skeletal disease. We describe 4 novel mutations in the PHEX gene.

In contrast, we detected only one family with ADHR where we could observe different clinical manifestations. PHEX mutations were detected also in sporadic cases.

Key words: hypophosphatemic rickets, X linked hypophosphatemic rickets, autosomal-dominant hypophosphatemic rickets, PHEX gene, FGF23 gene.

Introducción

El raquitismo hipofosfatémico (RH) es la causa más frecuente de estas enfermedades transmitidas por herencia. Han sido descritos cuatro tipos de RH por alteraciones genéticas: RH ligado al X (RHLX) se hereda en forma dominante, es resultado de alteraciones del gen PHEX;¹⁻⁸ el RH autosómico dominante (RHAD) es inducido por mutaciones del gen FGF23 en el exón 3; el RH autosómico recesivo se debe a mutaciones del gen DMP1 o del gen que codifica a la proteína ectonucleótido pirofosfatasa/diesterasa (ENPP1) y el RH asociado a hiper calciuria se presenta por compromiso del gen SLC3A3.⁷⁻¹³ Otras formas poco comunes de RH se adscriben al exceso de FGF23 en la displasia fibrosa (Mc Cunnery-Albright), al síndrome nevo epidérmico, al RH asociado a hiperparatiroidismo inducido por exceso de klotho.^{7,8,14}

La forma más frecuente es el RHLX con una incidencia de 1/20 000 recién nacidos. El RHAD presenta fenotipo similar al RHLX cuando se presenta en la infancia y variable de menor gravedad en la expresión fenotípica más tardía. Tanto el gen PHEX como el gen FGF 23 son los más estudiados y tiene importancia en el diagnóstico clínico.^{6-8,14}

La expresión clásica de la enfermedad es el retardo de crecimiento y la presencia de *genu varum* o *genu valgo* en los niños al inicio de la deambulación. Sin embargo esta sintomatología puede ser muy variable y en algunos casos el diagnóstico es muy tardío. En la investigación familiar se han hallado portadores sanos de la enfermedad. El tratamiento sustitutivo con sales de fósforo mejora el fenotipo, evitando las deformaciones esqueléticas y el retardo de creci-



miento que aparecen en los casos de expresión clínica más severa. Por ello, la detección precoz es muy importante. Se ha observado que el RH ligado al X presenta el fenotipo más grave. En los adultos la enfermedad se manifiesta con dolores óseos, fracturas en los sitios de carga y/o mialgias constituyendo un cuadro de osteomalacia por pérdida de fosfatos (OMH).^{6-8,14}

Nuestro objetivo fue evaluar y relacionar el genotipo y el fenotipo de una población de pacientes que consultó por raquitismo u osteomalacia asociado a hipofosfatemia e hiperfosfaturia.

Población y métodos

Se evaluaron 13 pacientes propósitos (1 adulto) que concurrieron a la consulta. En todos se constató manifestaciones somáticas compatibles con raquitismo y en el caso de la mujer adulta, osteomalacia (Tabla 1A).

Mediante el interrogatorio y examen se detectaron 16 familiares con historia y fenotipo compatible con RH u OMH (1 abuela con fracturas e hipofosfatemia de diagnóstico en edad adulta). En 5/13 de los propósitos no se constataron familiares afectados (examen físico y laboratorio normales) por ello, se consideraron casos esporádicos.^{15,16} Se observaron familias con varios individuos afectados [2 Flias: 4 casos, 4 Flias: 3 casos, 2 Flias: 2 casos].

Los individuos sintomáticos incluían niños y adultos que presentaban hipofosfatemia e hiperfosfaturia asociado o no a las siguientes características somáticas:

En los niños: *genu varum* o *valgo*, ensanchamiento de muñecas y distal de huesos largos, rosario raquíptico, talla baja o cualquier otra manifestación esquelética de raquitismo.

En los adultos: talla baja, mialgias, dolores óseos, fracturas.

Todos los propósitos presentaban: hipofosfatemia, hiperfosfaturia, reabsorción tubular de fosfatos disminuida, calcemia y calciuria normales, elevación de la fosfatasa alcalina (Tabla 1B).

Criterios de exclusión: se excluyeron pacientes con raquitismo carencial, aquellos tra-

tados con terapia anticonvulsivante, síndromes de mala absorción intestinal como celiaquía o cirugías gástricas e intestinales, enfermedades renales tubulares (síndrome de Fanconi hereditario o adquirido), enfermedad hepática, alcoholismo, deficiencias nutricionales, consumo crónico de antiácidos.

Una vez obtenido el diagnóstico de raquitismo u osteomalacia perdedora de fosfatos en el propósito, o bioquímica característica sin manifestación somática, se procedió a estudiar a sus familiares de primer grado, con la finalidad de detectar si el RH o OMH era de origen familiar.

El fenotipo fue clasificado siguiendo las consideraciones de Holm I y col.¹⁵ y Morey y col.¹⁷ como:

- *Leve:* bioquímica y escasa manifestación somática.
- *Moderado:* talla normal o baja, *genu varum* sin cirugía correctora, abscesos dentarios, osteomalacia en la adultez.
- *Grave:* talla muy baja, *genu varum*, osteotomía correctora.

Estudio de las alteraciones génicas

Se estudiaron los genes FGF23 y PHEX de 41 personas : propósitos (n=13) y familiares con fenotipo (n=16) y sin manifestaciones (n=12) de RH y OMH, para determinar la etiología molecular de los raquitismos y osteomalacias. Se analizaron los genes PHEX y FGF23 en padres, hermanos o hijos.

Se realizó la extracción de ADN, a partir de 3 ml de sangre periférica, mediante un kit comercial (QIAmp DNA kit, QIAGEN).

Se estudió el gen del raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (RHAD) para detectar las tres mutaciones hasta ahora halladas que causan el fenotipo de RHAD por un mecanismo de ganancia de función. Se amplificó el exón 3 con *primers* de secuencia específica, posteriormente se realizó secuenciación automática bidireccional, en búsqueda de las mutaciones R176Q (c.527 G>A), R179Q (c.536 G>A) y 179W (c.535 C>T) o mutaciones nuevas aun no descriptas.^{10,11,18,19}

Tabla 1 A. Sexo, edad en el momento del diagnóstico clínico y del estudio genético, y características somáticas en el momento del diagnóstico. Cirugías correctoras de *genu varum* o fractura de cadera de los propósitos (casos clínicos iniciales).

| Familia | Sexo | Edad (diagnóstico años) | Edad (estudio genético años) | Talla (cm) | Z-score | Genu varum | Cirugías correctoras | Otros |
|---------|------|-------------------------|------------------------------|------------|---------|------------|----------------------|--|
| I | F | 1,7 | 8,9 | 77,5 | -1,51 | Si | | Leve ensanchamiento metafisario |
| II | M | 2 | 19,6 | 77,3 | -2,65 | Si | | Talla baja |
| III | M | 2,0 | 11,6 | 108,9 | -3,99 | Si | | Macrocefalia Miembros cortos Problemas dentales |
| IV | M | 0,8 | 6,4 | 67,8 | -1,48 | - | | Leve ensanchamiento metafisario. Fontanela amplia Macrocefalia |
| V | F | 3,3 | 7,8 | 95,8 | 0 | Si | | |
| VI | F | 2,1 | 20 | 139 * | -4,07 | Si | Si | |
| VII | F | 1,4 | 22 | 149* | -2,07 | Si | Si | Osteoartritis de rodillas |
| VIII | F | 5,0 | 43 | 146* | -2,53 | Si | Si | |
| IX | F | 1,5 | 23 | 146* | -2,30 | Si | | Talla baja Craneostenosis En la infancia |
| X | F | 1 | 7,5 | 113,2* | -1,89 | Si | | Ensanchamiento epifisario |
| XI | F | 2,1 | 3,6 | 85,4 | -0,49 | Si | | Ensanchamiento metafisario |
| XII | F | 1,7 | 8,5 | 77,5 | -1,51 | Si | | Ensanchamiento metafisario |
| XIII | F | 28 | 33 | 160 | 0 | No | Si | Fx de ambas caderas Fx ambas ramas ileopubianas |

* Talla y Z score evaluados en el momento del estudio genético.

Se procedió a estudiar el gen PHEX vinculado con el RHLX. Para la búsqueda inicial de variantes, se desarrolló la técnica de polimorfismo conformacional de hebra simple y de heteroduplex (SSCP-HD); posteriormente se realizó la secuenciación directa de las regiones con patrón de bandas alterado²⁰⁻²² mediante PCRs con

primers de secuencia específica para los exones e intrones adyacentes del gen PHEX.

Este análisis detecta más de 3/4 de las mutaciones en los pacientes con XLH familiares y 1/3 en los casos con mutaciones esporádicas.^{15,23,24}

Todas las secuencias fueron analizadas mediante el programa Sequencher 5.0 y se clasi-



Tabla 1 B. Estudios complementarios de los propósitos: bioquímica del metabolismo fosfocálcico y radiología, estudios iniciales luego de la primera consulta.

| Familia | Calcemia (mg%) | Fosfatemia (mg%) | Rtp % | FAL ui/ml (VN superior) | Ca/cru | PTH pg/ml | 25OHD ng/ml | 1,25(OH) ₂ D ₃ pg/ml | Radiología |
|---------|----------------|------------------|-------|-------------------------|--------|-----------|-------------|--|--|
| I | 9,9 | 3,0 | 82% | 1750 | 0,24 | 45 | 16 | 32 | GV+ EM |
| II | 10 | 2,7 | 76% | 784 (420) | 0,21 | - | - | - | GV + EE |
| III | 9,0 | 3,1 | 90% | 640 (382) | 0,05 | - | 40 | - | GV y Cráneo |
| IV | 10,4 | 2,7 | 78% | 1876 | 0,08 | - | - | - | EM y Cráneo |
| V | 9,3 | 2,6 | 76% | 1085 | 0,08 | 38.8 | 21,9 | - | GV |
| VI | 8,7 | 2,0 | 60% | 211 (190) | 0,16 | - | - | - | GV +EM |
| VII | 9,4 | 2,4 | 82% | 110 (240) | 0,09 | 28 | 28 | - | GV + EE |
| VIII | 8,7 | 2,1 | 78% | 107 (240) | 0,18 | 45 | 28 | - | GV |
| IX | 10 | 1,2 | 59% | 604 | 0,13 | 55 | 34 | - | Cráneo |
| X | 10,5 | 2,9 | 76% | 1623 | 0,04 | 33,6 | 35,9 | - | EE |
| XI | 10 | 2,7 | 77% | 1720 | 0,05 | 20 | 42 | - | EM |
| XII | 9,7 | 2,1 | 63% | 511 (382) | 0,1 | - | - | - | EM |
| XIII | 8,2 | 2,0 | 64% | 542 (380) | 0,03 | 298 (100) | 26 | <4 | Fx de ambas caderas y ramas ileopubianas |

GV: genu varum; EM: ensanchamiento metafisario; EE: ensanchamiento epifisario; Cráneo: macrocefalia o craneoestenosis; RTP: reabsorción tubular de fosfatos; FAL : Fosfatasa alcalina.

ficaron las variantes detectadas según la información disponible en las bases de datos del gen PHEX (www.PHEXdb.mcgill.ca).²⁵

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de protocolos de Investigación del Departamento de Docencia e Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Los pacientes adultos y los padres de los niños firmaron el consentimiento informado y aceptaron la presentación de los resultados del

estudio genético con fines académicos manteniendo oculta la identidad. Este protocolo siguió los lineamientos de la Declaración de Helsinki.

Resultados

Se estudiaron 29 pacientes con manifestaciones fenotípicas, 24 pertenecientes a 8 familias (Tablas 2); 5 casos se consideraron esporádicos (Tabla 3). Por lo tanto la manifestación de RH fue de predominio familiar.

El diagnóstico se realizó en la infancia y niñez en el 75,9% de los casos y siete pacientes en la adultez (2 con manifestaciones clínicas y 5 con bioquímica alterada), de los cuales 1 es un caso esporádico. La relación mujer/varón fue 3,4:1.

Familiares:

El 75% de los RH familiares presentaban alteraciones del gen PHEX (6 de 8 familias). (Tabla 4).

Se detectó en una familia RHAD (niña, madre, abuela, tío) (Familia I de Tabla 1) con mutaciones del gen FGF23. El propósito fue una niña que consultó al 1 año y 8 meses por presentar talla en percentilo 3 (longitud corporal 77,5 cm), *genu varum* (Figura 1) y leve ensanchamiento de muñecas. Entre los antecedentes familiares la abuela materna presentaba talla de 1,56 m, fracturas múltiples, hipofosfatemia en tratamiento con sales de fósforo. El tío materno había presentado raquitismo tratado en la infancia

con talla adulta normal de 1,67m y bioquímica normal en el momento de esta investigación. A posteriori en la madre se detectó hipofosfatemia asintomática.

En una familia (II), constituida por madre y dos hijos varones con fenotipo de RH no se encontró ninguna mutación en los dos genes estudiados (Tabla 2).

Esporádicos:

Los familiares relacionados fueron evaluados en todos los casos según posibilidades, se consideraron esporádicos por ausencia de fenotipos (hipofosfatemia, alteraciones somáticas) y genotipos en familiares vinculados al propósito.

Se observaron mutaciones del gen PHEX en 2/5 casos esporádicos (44%) uno de los cuales se presentó en forma tardía (28 años): se trataba de una mujer que había manifestado su enfermedad luego del segundo embarazo. Los es-



Figura 1. A. Caso índice: una niña con raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante vinculado a alteración del gen FGF23. Obsérvese el *genu varum*. **B.** Radiografía de la paciente, nótese el ensanchamiento de las metafisis e incurvación de fémures y tibias.



tudios bioquímicos mostraron hipofosfatemia, calcemia normal baja, niveles plasmáticos no detectados de calcitriol e hiperparatiroidismo (Tabla 1 A-B).

Fenotipo

Los pacientes con alteraciones del PHEX presentaban fenotipo somático más grave (talla baja, *genu varum*), sin embargo se observó expresiones variadas en algunos familiares (Hipofosfatemia sin alteraciones esqueléticas). Las manifestaciones leves se diagnosticaron en forma más tardía o como parte de la investigación familiar (Tabla 2; Tabla 3).

Se consideró que el 68,4 % (13 de 19) de los RHLX eran graves, 10,5% (2 de 19) moderados y 21% (4 de 19) leves (Tabla 1 y 2). Las manifestaciones somáticas del RHAD se presentaron en forma incompleta, con fenotipo menos grave y a variable edad de comienzo (Tabla 2). No se observaron diferencias de sexo en relación a la gravedad del fenotipo.

Genotipo

Se halló una mutación sin sentido del FGF23 en 4 miembros afectados de la Familia I: c.536 G>A, R179Q, en el exón 3 (Figura 2).

Se detectaron 8 mutaciones del gen PHEX, 6 de origen familiar y 2 casos esporádicos. Algunas de estas variaciones estaban previamente descritas en la literatura (Tabla 3).

Se observaron 4 nuevas mutaciones del gen PHEX: Familia III: (madre e hijo) c. 552 inserción G+1 del intrón 3-4 en sitio *splicing* dador. Familia IV: (hijo, madre y tía) presentaron una mutación silenciosa c.401 C>A en posición 11 exón 3. Familia VII: (hija y madre) mutación con efecto codón stop, c.1241 C>G en posición 105 del exón 9. Una niña (Familia XI) mostró una mutación silenciosa c.2260 T>G en posición 93, exón 20 (esporádico) (Tabla 4).

Discusión

En los últimos años se han realizado grandes avances en el entendimiento de las bases moleculares y bioquímicas de los desórdenes hipo-

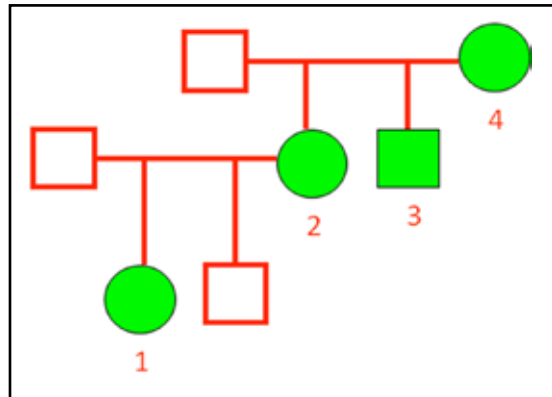


Figura 2. Árbol genealógico de una familia con raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante. Alteración del gen FGF23: sin sentido en 4 miembros. Exon 3: c.536 G>A, R179Q. Cuadrados: varones, círculos: mujeres. Figuras rellenas: casos afectados.

fosfatémicos heredados y adquiridos. La identificación de trastornos genéticos en los raquitismos hipofosfatémicos hereditarios como RHLX, el RHAD y el RH autosómico recesivo (RHAR) han permitido un mejor entendimiento de los factores causales de pérdida de fosfatos.^{6,7,8,26,27}

El RHLX es la forma más común de los raquitismos hereditarios. Se produce por mutaciones que inactivan el gen PHEX que codifica una proteína de 749 aminoácidos, miembro de la familia M13 de las metaloproteasa de membrana, localizado en el cromosoma Xp22. Se describieron hasta la fecha 329 mutaciones.²⁵ El gen PHEX regula de manera aún poco conocida la síntesis y/o actividad del FGF23.^{3,6,7}

El RHAD es una forma rara de presentación. Esta forma de RH está vinculada con mutaciones del gen FGF23, localizado en el cromosoma 12 (12p13.3). Su proteína FGF23 se segmenta entre Arg(179) y Ser(180), y este proceso elimina su actividad biológica. La mutación más frecuente, es una mutación *missense* en el sitio de clivaje del FGF23 que envuelve a los aminoácidos 176 y 179 (RXXR motif) dando lugar a una mutación activante de función del FGF23 al codificar una proteína resistente a la fragmentación.^{10,13,28-30}

Tabla 2. Fenotipo y tipo de herencia de 13 familias portadoras de casos de raquitismo hipofosfatémico.

| Familia | Paciente | Sexo | Edad diag | Herencia | Fenotipo |
|---------|----------|------|------------|----------|----------|
| I | 1 | F | 1.7 años * | AD | M |
| I | 2 | F | Adulto | AD | L |
| I | 3 | M | Niñez | AD | L |
| I | 4 | F | Adulto | AD | M |
| II | 1 | M | 2.0 años * | LX o AD? | G |
| II | 2 | M | 1.1 años | LX o AD? | G |
| II | 3 | F | Niñez | LX o AD? | G |
| III | 1 | M | 2.0 años* | LX | G |
| III | 2 | F | Niñez | LX | G |
| IV | 1 | M | 0.8 años* | LX | G |
| IV | 2 | F | Niñez | LX | G |
| IV | 3 | F | Niñez | LX | G |
| V | 1 | F | 3.3 años* | LX | M |
| V | 2 | F | 48 años | LX | L |
| V | 3 | F | 19 años | LX | L |
| V | 4 | M | 22 años | LX | L |
| VI | 1 | F | 2 años* | LX | G |
| VI | 2 | F | 1 año* | LX | G |
| VI | 3 | F | Niñez | LX | G |
| VII | 1 | F | 1,4 años* | LX | G |
| VII | 2 | F | 50 años | LX | L |
| VIII | 1 | F | 5 años* | LX | G |
| VIII | 2 | F | 1 año | LX | G |
| VIII | 3 | F | Niñez | LX | G |

El asterisco señala el propósito. F: femenino, M: masculino, AD: autosómico dominante; LX: ligado al cromosoma X; L: leve; M: moderado; G: grave.



En nuestra observación hemos comprobado una alta frecuencia de RH familiar cuya base molecular se adscribe a mutaciones del gen PHEX, que también fue hallada en 2 de 5 casos esporádicos. Se ha detectado una mutación activante del gen FGF23 en una familia que presentaba RH con herencia autosómica dominante. No se hallaron mutaciones de los genes PHEX o FGF23 en 1 familia y 3 casos esporádicos.

Este estudio coincide con otras series más

extensas^{16,17,31-33} en las cuales se han evaluado casos familiares y esporádicos siendo la alteración del gen PHEX el genotipo más frecuente.

El raquitismo autosómico dominante y el recesivo son raras formas de presentación.^{16,32,34} Gaucher y col.,¹⁶ Ruppe y col.,³² Kinoshita y col.³⁴ detectaron en sus estudios, 1 familia con RH autosómico dominante por alteración del gen FGF23 en 118 *pedigrees*, 27 familias y 27 pacientes respectivamente. Estos estudios de-

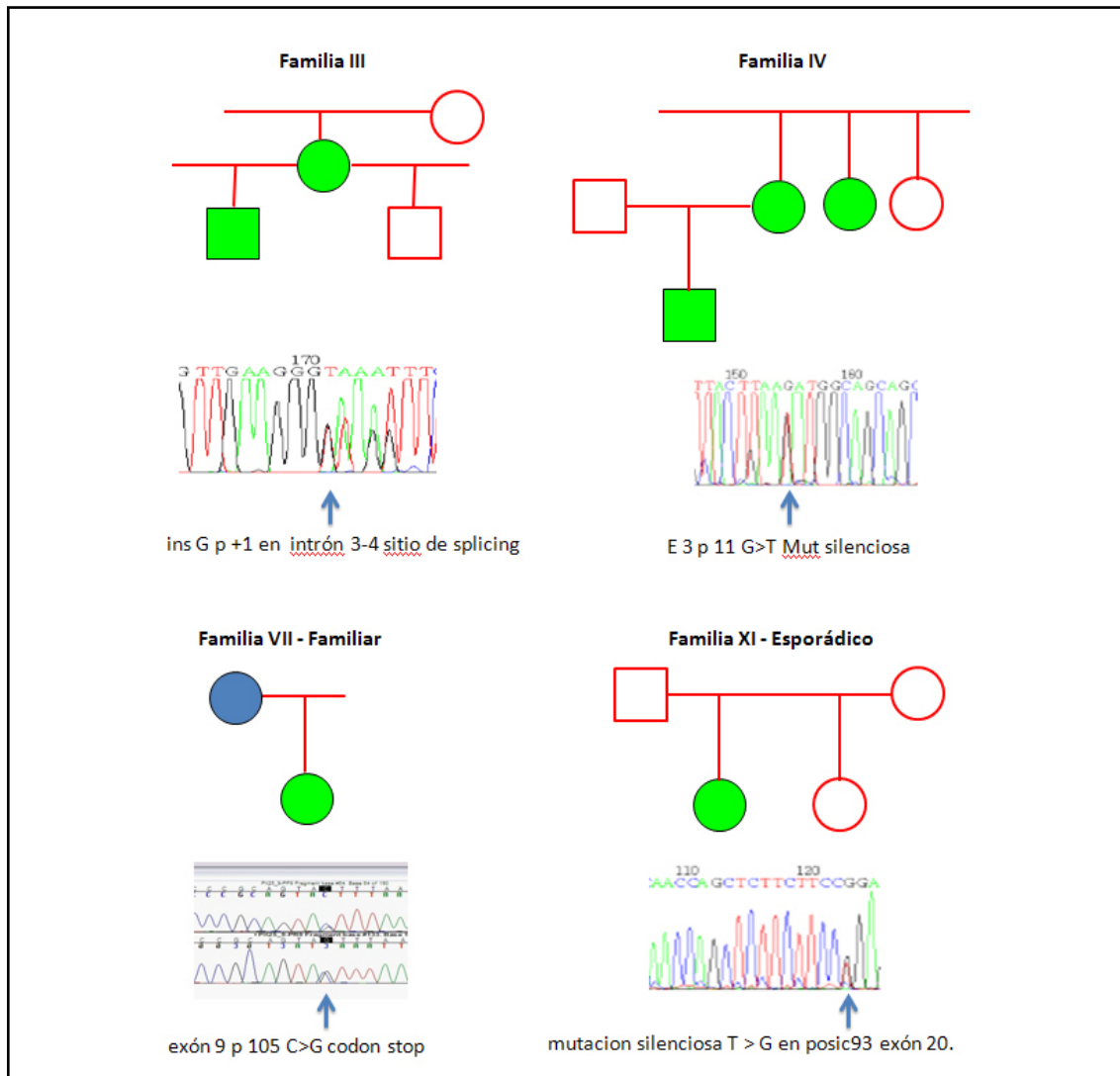


Figura 3. Alteraciones del gen PHEX no reportadas en la literatura. Se describen en 4 tipos de alteraciones, 3 en casos familiares y uno correspondiente a un caso esporádico.

Tabla 3. Fenotipo y genotipo hallado en 5 familias evaluadas por caso índice. Se asume como casos esporádicos.

| Familia | Paciente | Sexo | Edad diagnóstico | Herencia | Fenotipo | Genotipo |
|---------|----------|------|----------------------|----------|----------|----------|
| IX | 1 | F | 1,5 años | ? | G | - |
| X | 1 | M | 1.0 años | ? | G | - |
| XI | 1 | F | 2.0 años | ? | M | PHEX |
| XII | 1 | F | 1,7 años | ? | M | - |
| XIII | 1 | F | 28 años [#] | ? | G | PHEX |

[#] Caso de presentación post parto, presentaba manifestaciones somáticas de osteomalacia y bioquímica caracterizada por hipofosfatemia, hiperfosfaturia, calcemia normal baja, hiperparatiroidismo, calcitriol no detectable, fosfatasa alcalina elevada.

muestran que la causa más frecuente de RH es secundaria a mutaciones del gen PHEX tanto en formas familiares como esporádicas.

El predominio de sexo femenino es característico de nuestra serie y también se comprueba en otros estudios.^{15,17,24,33,35}

En nuestro trabajo comprobamos alteraciones del gen PHEX en el 75% de los casos familiares (6 de 8 familias) y en el 44% de los casos esporádicos (2 de 5 casos). Esta prevalencia coincide con estudios previos³⁶⁻³⁸ en los cuales se utilizó un método similar de estudio molecular que el utilizado en nuestra investigación: SSCP/HD y secuenciación directa de las regiones con patrón de bandas alterado. En estos trabajos se detectaron variaciones del gen PHEX en el 55%,³⁶ 74%,³⁷ 45,5%,³⁸ respectivamente de todos los casos (familiares y esporádicos). Las mutaciones halladas se localizaron en exones frecuentes descritos en el consorcio PHEX y la literatura.^{16,25,36,38}

En estudios recientes se han detectado alteraciones genéticas del gen PHEX en el 100% de casos esporádicos,¹⁷ 100% de familiares y esporádicos³⁴ 91% de casos familiares y 73% (esporádicos)¹⁶ utilizando nuevas técnicas como MLPA: *multiple ligation probe amplification* (en inglés) que detecta con alta sensibilidad deleciones e inserciones genómicas, PCR en tiem-

po real [*High resolution melting curve technique* (HRM)] y estudio del ARNm.^{17,16,33,34}

Los pacientes con RHLX presentaron un fenotipo grave en su mayoría, sin embargo se observaron casos leves en familiares asintomáticos (madre, tía y primos) evaluados para establecer el genotipo familiar (familias V y VII).

Como describen otros estudios,^{16,24} no se relacionaron fenotipos según alteraciones del genotipo. Muchos autores sostienen que las formas con importantes deleciones generan proteínas truncadas asociándose a fenotipos más graves. Holm y col.²⁴ no verificó diferencias significativas en aquellos genotipos que codifican proteínas truncadas versus los otros. Por el contrario Morey y col.¹⁷ verificaron un fenotipo más grave en aquellos genotipos que codificaban proteínas truncadas; la diferencia se adscribe a que detectaron un mayor número de mutaciones en esta serie por el uso técnicas más complejas.

La familia V de nuestra casuística, presenta una mutación en el exón 2 cercano al extremo 5'UTR, fue la única que expresó en sus miembros un fenotipo moderado a leve. La mutación *missense*, no determina cambios estructurales graves en la proteína y además se especula que el sitio alterado codifica zonas no tan importantes como las descritas a partir del exón 13 hasta el extremo 3'UTR que



Tabla 4. Alteraciones moleculares del gen PHEX halladas en formas familiares y esporádicas de presentación.

| Familia | Exón | ADNc | Efecto de la Mutación | Herencia |
|---------|-------------------|---|---|----------|
| III | I 3-4 | c. 552 +1insG* | Splicing alterado | F |
| IV | E 3 | c. 401 C >A* | Mutación silenciosa | F |
| V | E 2 | c.378 T>C | Mutación missense (p.Cis60Arg) | F |
| VI | E 21 | c. 2341delC | Frame shift | F |
| VII | E 9 | c.1241 C>G* | Codon stop | F |
| VIII | E 8 E 8 + E 13 | c.1053 - 1G>A c.1136 +41 A>G c.1482+22del T | Splicing alterado Splicing alterado? | F |
| XI | E 20 | c.2260 T>G* | Mutación silenciosa | E |
| XIII | E 8 | c. 1136 +41A>G | Splicing alterado? | E |

F: familiar, E: esporádico * *mutación no descrita previamente*

codifican residuos cistina y el sitio de unión del zinc de la proteína.^{16,17,24,36}

La paciente de la familia XIII expresó su enfermedad en forma tardía, en situaciones de alto requerimiento de fósforo luego del embarazo. Este caso esporádico presentó además hiperparatiroidismo secundario previo al tratamiento. Los casos de aparición de la enfermedad en periodos tardíos de la vida han sido descriptos en el consorcio PHEX db.mcgill.ca y en diferentes series.^{16,17,34,35,39} La presencia de hiperparatiroidismo es un tema de controversia, sin embargo en la serie de Morey y col.¹⁷ algunos pacientes presentaron hiperparatiroidismo antes del inicio del tratamiento con sales de fósforo y también se describe esta posibilidad en otra revisión.⁷

No se observaron alteraciones del gen PHEX ni FGF23 en una familia con herencia dominante y en tres casos esporádicos. La madre y los dos

hijos varones afectados presentaban un fenotipo grave (familia II). La falta de detección puede adscribirse al método de estudio del gen ya comentado arriba. Por otra parte se ha descrito indemnidad de ADN en pacientes con fenotipo característico de RHLX y detección de variaciones estructurales en el ARNm que codifica la metaloproteasa (*splicing alterado*).^{17,34} Esta familia tiene un tipo de herencia autosómica dominante o ligada al X y es poco probable que se trate de alteraciones de genes vinculados a los RHAR.^{7,8}

En relación a los 3 casos esporádicos en los que no se hallaron mutaciones, se especula que otros genes no evaluados podrían ser causales del RH como DMP1 o ENPP1, previamente descrito en los casos de RHAR.^{7,8}

Cuatro mutaciones nuevas se hallaron en el gen PHEX en esta serie: tres en familias, y un

caso, considerado esporádico. Una de ellas fue una mutación intrónica atribuida al nucleótido más cercano al exón contiguo que determinó un *splicing* alterado. La mutación observada en el exón 9 determina un codón stop. Las restantes fueron mutaciones silentes no descritas en la literatura. Existen dudas sobre la relación entre el reemplazo de un único nucleótido y la ocurrencia de enfermedad, especialmente en la familia XI donde un solo miembro está afectado. Las nuevas mutaciones halladas se localizan en la zona del intrón 1-3 y exones 3, 9 y 20, sitios del ADN que codifican los residuos de cistina de alta presencia en diferentes especies de mamíferos.^{16,24,38}

Es de interés destacar que en las últimas publicaciones se registran nuevas mutaciones del gen^{16,17,32,34,35,40-42} y el notable incremento del registro de nuevas mutaciones en el consorcio PHEX db.mcgill.ca, desde el inicio de este estudio, 2008. La base de datos fue consultada en distintos momentos de este trabajo, constándose un incremento cercano a 100 nuevas mutaciones.

En una misma familia (VIII), hemos hallado varias mutaciones en el exón 8 (dos tipos de mutaciones) y en el exón 13 en diferentes individuos, configurando un fenotipo grave en todos los miembros estudiados. Esta observación de diferentes mutaciones en distintos exones de miembros de una misma familia fue descrita también en otras series investigadas; algunas de ellas corresponden a polimorfismos.¹⁶

Se ha descubierto en esta serie de RH, una familia con mutaciones del gen FGF23; sus miembros presentaron una expresión fenotípica moderada o leve y distintos momentos de aparición de la enfermedad. El fenotipo fue en el caso índice moderado, madre leve, abuela moderada y de aparición tardía, tío de manifestación en la niñez y mejoría clínico-bioquímico en la adultez. Nuestra familia coincide con las descripciones clásicas de RHAD los cuales se agrupan en dos

formas clínicas: un grupo que presenta pérdida renal aislada de fósforo, dolor óseo, debilidad muscular y a veces fracturas pero sin deformidades de las extremidades inferiores especialmente observada en adolescentes y adultos. El otro grupo se presenta en la primera infancia con pérdida de fósforo, raquitismo, trastorno del crecimiento y deformidades de las piernas. Mientras que en la mayor parte de los pacientes la hipofosfatemia persiste en la edad adulta, algunos pierden el trastorno de reabsorción de fosfato luego de la pubertad, como parece haber ocurrido en el tío del caso índice de la familia (datos no mostrados).^{7,8}

Conclusiones

Se detectaron mutaciones del PHEX en la mayoría de los casos especialmente en los familiares. Describimos 4 nuevas mutaciones del gen PHEX no consignadas (PHEX db.mcgill.ca). Si bien se observaron diferentes tipos de mutaciones, el fenotipo fue similar en las distintas familias. El RHAD presentó un fenotipo menos grave y de variable manifestación entre los miembros de la familia.

Se aconseja la evaluación genética en las manifestaciones clínicas esporádicas y tardías; son frecuentes las mutaciones del PHEX y su detección descarta otras enfermedades como tumores inductores de osteomalacia que son de lenta expresión clínica.

El estudio molecular de los genes PHEX y FGF23 es una herramienta útil para establecer diagnóstico, tratamiento temprano, pronóstico y consejo genético para los pacientes y su descendencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: junio 2014.
Aceptado: julio 2014)



Referencias

1. Winters RW, Graham JB, Williams TF, et al. A genetic study of familial hypophosphatemia and vitamin D-resistant rickets with review of the literature. *Medicine* 1958; 37:97-142.
2. Bianchine JW, Stambler AA, Harrison HE. Familial hypophosphatemic rickets showing autosomal dominant inheritance. *Birth Defects Or Artic Ser* 1971; 7:287-94.
3. HYP Consortium: A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat Genet* 1995; 11:130-6.
4. Holm IA, Nelson AE, Robinsin BG, et al. Mutational analysis and genotype-phenotype correlation of the PHEX gene in X-linked hypophosphatemic rickets. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3889-99.
5. Christie PT, Harding B, Nesbit MA, Whyte MP, Thakker RV. X-linked hypophosphatemia attributable to pseudoexons of the PHEX gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3840-4.
6. Carpenter TO, Imel EA, Holm IA, Jan de Beur SM, Insogna KL. A clinician's guide to X-linked hypophosphatemia. *J Bone Miner Res* 2011; 26:1381-8.
7. Carpenter TO. The expanding family of hypophosphatemic syndromes. *J Bone Miner Metab* 2012; 30:1-9.
8. Ruppe M, Jan de Beur, S Disorders of Phosphate Homeostasis Chap 74. In *The Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 8th Edition, 2013. Editor Rosen CJ.
9. Scriver CR, MacDonald W, Reade T, Glorieux FH, Nogrady B. Hypophosphatemic nonrachitic bone disease: An entity distinct from X-linked hypophosphatemia in the renal defect, bone involvement, and inheritance. *Am J Med Genet* 1977; 1:101-17.
10. ADHR Consortium: Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet* 2000; 26:345-8.
11. White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, Benetpages A, Strom TM, Econs MJ. Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF 23. *Kidney Int* 2001; 60:2079-86.
12. Bai XY, Miao D, Goltzman D, Karaplis AC. The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances biological potency. *J Biol Chem* 2003; 278:9843-9.
13. Shimada T, Muto T, Urakawa I, et al. Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology* 2002; 143:3179-82.
14. Bastene M, Jüppner H. Inherited hypophosphatemic disorders in children and the evolving mechanisms of phosphate regulation. *Rev Endocr Metab Disord* 2008; 9:171-180
15. Holm IA, Huang X, Kunkel LM. Mutational analysis of the PEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Am J Hum Genet* 1997; 60:790-7.
16. Gaucher C, Walrant-Debray O, Nguyen TM, Esterle L, Garabédian M, Jehan F. PHEX analysis in 118 pedigrees reveals new genetic clues in hypophosphatemic rickets. *Hum Genet* 2009; 125:401-11.
17. Morey M, Castro-Feijóo L, Barreiro J, et al. Genetic diagnosis of X-linked dominant Hypophosphatemic Rickets in a cohort study: tubular reabsorption of phosphate and 1,25(OH)₂D serum levels are associated with PHEX mutation type. *BMC Med Genet* 2011; 12:116.
18. Gribaa M, Younes M, Bouyacoub Y, et al. An autosomal dominant hypophosphatemic rickets phenotype in a Tunisian family caused by a new FGF23 missense mutation. *J Bone Miner Metab* 2010; 28:111-5.
19. Econs MJ, McEnery PT. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: clinical characterization of a novel renal phosphate-wasting disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:674-81.
20. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis

- for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16:325-32.
21. Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech App* 1992; 9:73-9.
22. Kozłowski P, Krzyżosiak WJ. Economical protocol for combined single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis on a standard capillary electrophoresis apparatus. *Methods Mol Biol* 2010; 653:181-92.
23. Dixon PH, Christie PT, Wooding C, et al. Mutational analysis of PHEX gene in X-linked hypophosphatemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3615-23.
24. Holm IA, Nelson AE, Robinson BG, et al. Mutational analysis and genotype-phenotype correlation of the PHEX gene in X-linked hypophosphatemic rickets. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3889-99.
25. Consorcio PHEX db.mc gill.ca [ingreso 6 de julio 2014]
26. Pettifor JM, Thandrayen K. Hypophosphatemic rickets: unraveling the role of FGF23. *Calcif Tissue Int* 2012; 91:297-306.
27. Prié D, Friedlander G. Genetic disorders of renal phosphate transport. *N Engl J Med* 2010; 362:2399-409
28. Econs MJ, McEnery PT, Lennon F, Speer MC. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is linked to chromosome 12p13. *J Clin Invest* 1997; 100:2653-7.
29. Econs MJ, McEnery PT. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: clinical characterization of a novel renal phosphate-wasting disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:674-81.
30. Imel EA, Hui SL, Econs MJ. FGF23 concentrations vary with disease status in autosomal dominant hypophosphatemic rickets. *J Bone Miner Res* 2007; 22:520-6.
31. Dixon PH, Christie PT, Wooding C, et al. Mutational analysis of PHEX gene in X-linked hypophosphatemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3615-23.
32. Ruppe MD, Brosnan PG, Au KS, Tran PX, Dominguez BW, Northrup H. Mutational analysis of PHEX, FGF23 and DMP1 in a cohort of patients with hypophosphatemic rickets. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; 74:312-8.
33. Beck-Nielsen SS, Brixen K, Gram J, Brusgaard K. Mutational analysis of PHEX, FGF23, DMP1, SLC34A3 and CLCN5 in patients with hypophosphatemic rickets. *J Hum Genet* 2012; 57:453-8.
34. Kinoshita Y, Saito T, Shimizu Y, et al. Mutational analysis of patients with FGF23-related hypophosphatemic rickets. *Eur J Endocrinol* 2012; 167:165-72.
35. Durmaz E, Zou M, Al-Rijjal RA, et al. Novel and de novo PHEX mutations in patients with hypophosphatemic rickets. *Bone* 2013; 52:286-91.
36. Rowe PS, Oudet CL, Francis F, et al. Distribution of mutations in the PEX gene in families with X-linked hypophosphatemic rickets (HYP). *Hum Mol Genet* 1997; 6:539-49.
37. Francis F, Strom TM, Hennig S, et al. Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked dominant hypophosphatemic rickets. *Genome Res* 1997; 7:573-85.
38. Dixon PH, Christie PT, Wooding C, et al. Mutational analysis of PHEX gene in X-linked hypophosphatemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3615-23.
39. Igaki JM, Yamada M, Yamazaki Y, et al. High iFGF23 level despite hypophosphatemia is one of the clinical indicators to make diagnosis of XLH. *Endocr J* 2011; 58:647-55.
40. Jap TS, Chiu CY, Niu DM, Levine MA. Three novel mutations in the PHEX gene in Chinese subjects with hypophosphatemic rickets extends genotypic variability. *Calcif Tissue Int* 2011; 88:370-7.
41. Cheon CK, Lee HS, Kim SY, Kwak MJ, Kim GH, Yoo HW. A novel de novo mutation within PHEX gene in a young girl with hypophosphatemic rickets and review of literature. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2014; 19:36-41.
42. Yue H, Yu JB, He JW, et al. Identification of two novel mutations in the PHEX gene in Chinese patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *PLoS One* 2014; 9:e97830.



COMENTARIOS BIBLIOGRÁFICOS / *Bibliographical Comments*

Romozzumab in postmenopausal women with low bone mineral density

Mc Clung M, Grauer A, Steven Boonen MD, et al.

N Engl J Med 2014; 370:412-20

León Schurman*

LIOMM (Laboratorio de Investigación en Osteología y Metabolismo Mineral), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

La posibilidad de introducir nuevos esquemas terapéuticos para la osteoporosis donde se hace hincapié en la utilización de fármacos con efectos anabólicos se refleja en este trabajo recientemente publicado en el *New England Journal of Medicine* que utiliza el anticuerpo antisclerostina como variante terapéutica.

El sistema WNT- β catenina es un controlador maestro de la formación ósea. Está implicado en la formación ósea ya durante el crecimiento embrionario, se activa al unirse a los correceptores LRP 5-6 (*low density lipoprotein receptors related proteins 5-6*) y al receptor *frizzled* (rizado). Regula positivamente la producción de osteoprotegerina y en forma negativa la de RANK L.^{1,2}

La esclerostina es una glicoproteína segregada por los osteocitos y codificada por el gen SOST. Actúa como un inhibidor clave para mantener la formación ósea en límites

normales y evitar un efecto deletéreo de un crecimiento no controlado. Cuando falta el gen SOST se produce un proceso denominado esclerostosis.^{3,4} La esclerostina realiza la sintonía fina en la regulación del remodelado óseo (formación). Es producida, luego de la mineralización primaria, por los osteocitos en los osteones recién formados para restringir la formación ósea por parte de los osteoblastos. Actúa como un modulador local de la función de los osteoblastos maduros y regula en forma negativa la maduración de los preosteoblastos. En pacientes con FX de cadera se han encontrado mayores niveles circulantes de esclerostina, lo que explicaría el mayor recambio óseo y la hipomineralización.^{5,6}

La esclerostina es inhibida por la PTH y esto explica en parte la acción anabólica de la PTH. Es la primera sustancia osteoactiva generada en los osteocitos y no dependiente directamente del sistema osteoblasto-osteocito.

* Correo electrónico: aschurman@intramed.net

clasto. Identificada como blanco terapéutico de anticuerpos monoclonales humanizados, antiesclerostina ha demostrado utilidad en el tratamiento de la osteoporosis en los modelos animales observando un aumento de la densidad mineral ósea (DMO) del área cortical y del volumen óseo.⁷

Este trabajo es un estudio multicéntrico fase 2, aleatorizado, controlado con placebo, donde en 8 grupos se evaluó la eficacia y seguridad del anticuerpo antiesclerostina romosozumab en 419 mujeres posmenopáusicas de 55 a 85 años que tenían baja densidad mineral ósea (*T-score* de $-2,0$ o menos en columna lumbar, fémur total o cuello femoral). Los pacientes fueron aleatorizados y asignados a recibir romosozumab mensualmente por vía subcutánea en dosis de 70,140 o 210 mg, o cada 3 meses en dosis de 140 o 210 mg, placebo por vía subcutánea, o alendronato 70 mg semanales por vía oral, o teriparatida 20 μ g diarios por vía subcutánea. El objetivo principal fue evaluar el porcentaje de cambio de la DMO en columna lumbar a los 12 meses. Como objetivo secundario se propusieron evaluar el porcentaje de cambio de la DMO en otros sitios esqueléticos (fémur total y cuello femoral a los 6 y 12 meses y del tercio distal del radio a los 12 meses) y del propéptido del colágeno tipo 1 (PINP) como marcador de formación ósea y el telopéptido C terminal del colágeno 1 (β -CTX) como marcador de reabsorción ósea en los meses 1, 6, 9 y 12.

De los 419 pacientes enrolados en el estudio, 383 lo completaron. La edad media de los participantes fue de 67 años; el 86% de ellos eran blancos y la media de los *T-scores* en columna lumbar, fémur total y cuello femoral fue de $-2,29$, $-1,53$ y $-1,93$, respectivamente.

En el mes 12, agrupados todos los pacientes que recibieron romosozumab y comparados con los que recibieron placebo, presentaron un incremento significativo de la DMO en columna lumbar ($p < 0,001$) independientemente de la frecuencia de la dosis (mensual o cada 3 meses) y de la dosis administrada

(140 mg o 210 mg). Ese mismo resultado se observó en cada uno de los 5 grupos tratados con romosozumab comparado con el del grupo de placebo en la medición de la DMO en columna lumbar, fémur total y cuello femoral ($p < 0,001$).

La ganancia más importante fue observada con la dosis de 210 mg mensual con un incremento a los 12 meses del 11,3% en columna lumbar, 4,1% en fémur total y del 3,7% en cuello femoral. Ese incremento fue significativamente mayor que el observado en los grupos que recibieron alendronato y teriparatida ($p < 0,001$). No se observaron diferencias significativas entre todos los grupos a nivel del tercio distal del radio. A los 6 meses hubo diferencia significativas entre todos los grupos que recibieron romosozumab comparados con placebo en columna lumbar y fémur total ($p < 0,006$), mientras que en cuello femoral a los 6 meses el incremento de la DMO fue mayor con las dosis de 140 y 210 mg mensuales y la de 210 mg cada 3 meses comparadas con placebo ($p < 0,02$). En el mes 6, el incremento de la DMO en las 3 zonas estudiadas fue mayor con las dosis de 140 y 210 mg mensuales que la observada en los grupos que recibieron alendronato o teriparatida.

En el grupo que recibió romosozumab, el incremento del PINP fue transitorio: los mayores niveles se obtuvieron en el primer mes y retornaron a los niveles basales o levemente debajo de ellos entre los meses 2 y 9. Con respecto al β -CTX disminuye, más intensamente en la primera semana. Los grupos que recibían la dosis en forma mensual permanecían por debajo de los niveles basales en el mes 12. Con respecto a los niveles de calcio, descendieron durante el primer mes pero retornaron luego a los niveles basales. Hubo un incremento compensatorio en los niveles de PTH que fue dosis-dependiente de los distintos grupos que recibían romosozumab.

Con respecto a los efectos adversos, los eventos fueron similares en los grupos que recibían romosozumab y el grupo placebo. La



reacción local en el sitio de la inyección fue más frecuente con romosozumab que con placebo, pero no hubo relación dosis-respuesta. La incidencia de efectos adversos serios fue en el grupo placebo del 14% (7 sobre 50 participantes), 8% en el grupo alendronato (14 de 51), 9% en el grupo teriparatida (5 de 54), 10% en el grupo que recibía 210 mg mensuales de romosozumab (5 de 51) y 7% entre todos los grupos que recibían romosozumab (17 de 255). No se observaron cambios importantes en los signos vitales, valores de laboratorio y ECG.

En síntesis, romosozumab administrado por vía subcutánea mensualmente o con intervalos de 3 meses por un período de 12 meses fue acompañado por un rápido y transito-

rio aumento del marcador de formación ósea, una disminución sostenida en el marcador de la resorción ósea y un incremento importante de la DMO mayor que el observado con placebo, alendronato o teriparatida. La aplicación de un novedoso esquema que utiliza una droga que modifica mecanismos fisiológicos para lograr un efecto anabólico potente abre una ventana terapéutica importante para el tratamiento de la osteoporosis.

Conflicto de intereses.

El autor no presenta conflicto de intereses.

(Recibido: mayo 2014.

Aceptado: junio 2014)

Referencias

1. Bhanot P, Brink M, Samos Ch, et al. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as Wingless receptor. *Nature* 1996; 382:225-31.
2. Mao J, Wang J, Liu B, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical WNT signaling pathway. *Mol Cell* 2001; 7:801-9.
3. Loots GG, Kneissel M, Keller H, et al. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in van Buchem disease. *Genome Res* 2005; 15:928-35.
4. van Lierop AH, Hamdy NA, Hamersma H, et al. Patients with sclerosteosis and disease carriers: human models of the effect of sclerostin on bone turnover. *J Bone Miner Res* 2011; 26:2804-11.
5. Arasu A, Cawton P, Lui L, et al. Serum sclerostin and risk of hip fracture in older caucasian women. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:2027-32.
6. Ardawi MS, Rouzi AA, Al-Sibiani SA, et al. High serum sclerostin predicts the occurrence of osteoporotic fracture in postmenopausal women: the CEOR study. *J Bone Miner Res* 2012; 26:2592-2602.
7. Ominsky MS, Vlasseros F, Jollette J, et al. Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. *J Bone Miner Res* 2010; 25:248-59.

SECCIÓN CULTURAL / Cultural Section

Scrimshaw

Ariel Sánchez*

Centro de Endocrinología, Rosario.

Scrimshaw es una palabra que proviene del inglés, de etimología dudosa, que significa el arte de la escultura y la pintura sobre marfil o la grabación en los dientes y huesos de la mandíbula de los cachalotes.

Las piezas son variadas, utilitarias y decorativas, tales como cuadros, dedales, lapiceras, etcétera.

Esta forma de arte tradicional está vinculada a la actividad de la caza de ballenas, particularmente la realizada por marineros estadounidenses y portugueses. El *scrimshaw* permitía una ocupación placentera en las horas de ocio a bordo. La caza de ballenas era muy peligrosa y no podía desarrollarse por la noche. Esto les daba a los balleneros más tiempo libre que a otros marineros.

Las técnicas más utilizadas son la incisión o la grabación, y las muescas están pigmentadas.

Una gran parte de las piezas son anónimas. El *scrimshaw* primitivo se realizaba con agujas bastas de coser velas, y el movimiento de la nave, así como la mayor o menor habilidad del artista, produjo dibujos de diferentes niveles de detalle y belleza. Originalmente, el hollín y el jugo de tabaco se utilizaban para visualizar mejor el grabado. Luego se usó tinta que los marineros llevaban al barco antes de iniciar la travesía. Los artistas de hoy usan herramientas más finas en varios tamaños, en su mayoría tomadas de la industria dental. Algunos realizan su trabajo con más de un color. En ciertas regiones (por ejemplo, Nueva Inglaterra) las muestras policromas de este arte son muy populares. Véanse las Figuras 1 y 2.

Fuente: Wikipedia



Figura 1. Hueso grabado con la efígie de un mariner.



Figura 2. Imagen de un velero grabada en un colmillo.

* Correo electrónico: asanchez@circulomedicorosario.org



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

¿EL MECANOSTATO, UN SISTEMA AUTOREGULADO?

Además de haber disfrutado de la lectura del reciente artículo de revisión de Ferretti JL y col. (*Actual Osteol* 2014; 10(1):43-80),¹ la misma me ha generado una serie de reflexiones que quisiera compartir con los autores y lectores de la revista. Las didácticas explicaciones de la teoría del mecanostato con epicentro en el osteocito, elevado a paradigma como corolario de las disquisiciones epistemológicas de la introducción, no sería por si solo suficiente de acuerdo a opiniones actuales, para explicar el desarrollo de los huesos y el mantenimiento de su eficiencia mecánica. Desde un punto de vista teórico se cuestiona que pueda considerarse un verdadero sistema retroalimentado pues no se conoce una regulación de naturaleza biomecánica del hueso dirigida al músculo, generador de las fuerzas, cargas, que los deforman.² Desde ese punto de vista faltaría en la Figura 2 una flecha desde el rectángulo “rigidez ósea” dirigido hacia el ícono del músculo. No habría una verdadera interacción sino que la acción sería unidireccional. Estas observaciones teóricas, han encontrado últimamente su respaldo en investigaciones que evidencian interacciones bioquímicas entre el hueso y el músculo que no son sistémicas sino por “vecindad”, mediado por diversos mediadores bioquímicos.² Esto abre el horizonte de las relaciones musculoesqueléticas también en el plano biomecánico, sin menoscabar la validez del mecanostato como mecanismo autorregulado a nivel estrictamente óseo y podría explicar, por ejemplo, la

hipotrofia muscular observable en la osteogénesis imperfecta.^{3,4}

Otro aspecto que como clínico amerita un comentario, es que la aplicación de técnicas de imágenes que permiten la medición de varias de las características estructurales de los huesos mencionadas en la actualización han resultado muy útiles para la investigación clínica, pero solo mejoraron discretamente la insuficiente capacidad predictiva del riesgo de fracturas osteoporóticas aportada por la densitometría ósea areal por DXA,⁵ la condición fragilizante ósea mas frecuente, tanto en estudios de caso-control como prospectivos. Esta comprobación probablemente no debería sorprender dado que aun un hipotético “estucturómetro ideal”, un subrogado perfecto (un equivalente), de las propiedades biomecánicas de determinadas subregiones anatómicas de los huesos, solo evalúa uno de los determinantes físicos del evento clínico fractura, ignorando la complejidad (configuración de fuerza, energía o potencia) de la carga que genéricamente se denomina “traumatismo mínimo” o caída de propia altura.

Dr. Haraldo Claus-Hermberg
Servicio de Endocrinología y Metabolismo
Hospital Alemán
hclaus@fibertel.com.ar

(Recibido: julio 2014.

Aceptado: julio 2014)

Referencias

1. Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF. Osteocitos mirando hacia arriba (o "La estructura ósea vista desde abajo"). *Actual Osteol* 2014; 10:43-80.
2. Brotto M. ASBMR webinar Mar 5, 2014, Muscle and bone interactions. www.asbmr.org
3. Caudill A, Flanagan A, Hassani S, et al. Ankle strength and functional limitations in children and adolescents with type I osteogenesis imperfecta. *Pediatr Phys Ther* 2010; 22:288-95.
4. Boot AM, de Coe RF, Pals G, de Muinck Keiser-Schrama SM. Muscle weakness as presenting symptom of osteogenesis imperfecta. *Eur J Pediatr* 2006; 165:392-4.
5. Black DM, Bouxsein ML, Marshall LM et al. Proximal femoral structure and the prediction of hip fracture in men: a large prospective study using QCT. *J Bone Miner Res* 2008; 23:1325-33.



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

RESPUESTA A LA CARTA “¿EL MECANOSTATO, UN SISTEMA AUTOREGULADO?”

Agradecemos los comentarios y observaciones efectuados por el Dr. Haraldo Claus-Hermberg que nos incitan a explicar un poco más profundamente los siguientes puntos de nuestro artículo.

A. Hay paradigmas y paradigmas. La etimología de “paradigma” sugiere un “ejemplo supremo”, elevado a la categoría divina por Platón. Su sentido epistemológico, más mundano, lo considera un “conjunto de ideas que definen una disciplina científica durante un período específico” - es decir, un concepto valioso por su grosor, pero inestable.¹ Nuestro artículo no “eleva” al concepto del mecanostato centrado en los osteocitos al rango de “paradigma-ejemplo”; lo que hace es adscribirlo (“rebajarlo”) al “paradigma-propuesta” de Utah (control de la rigidez ósea en función del uso, lejos del límite de fractura), que hace cuatro décadas sustituyó a su similar derivado de la Ley de Wolff (simple adecuación de la “robustez” de los huesos a las “funciones” que desempeñarían),² y que no tardará en ser substituido por otro mejor.

B. El mecanostato no es el “factótum” del hueso. Los huesos responden al Paradigma de Utah debido **1.** a la rigidez y la tenacidad de su material mineralizado, y **2.** a su distribución en el espacio en relación con las cargas que soportan (en realidad, todas las cosas de la vida funcionan como interacciones entre “calidades” y “distribuciones”). Esta condición reconoce sólo 3 determinantes: **a.** La morfogénesis (tibia difiere de fémur), **b.** el entorno mecánico (direccionalidad de cargas determina direccionalidad de estructura), y **c.**

el entorno metabólico (orientado a controlar otras variables biológicas más vitales). La Figura 9 del artículo muestra que el mecanostato, limitado por “a”, sólo puede dar cuenta de la direccionalidad de “b”, perturbado, o raramente coadyuvado, por “c”. El mecanostato sólo controla la rigidez estructural de los huesos (no su resistencia, porque ésta depende también de su tenacidad); y no en todos ellos. El probable “control” colateral de la resistencia ósea (Figura 3-b), es sólo una propuesta técnica sin soporte evidencial; y la alusión final a un “segundo mecanostato”, que controlaría independientemente la tenacidad, no pasa de una moción de anhelo.³

C. El mecanostato no es un sistema “autoregulado” (que se regula solo), sino un sistema “regulador” (que regula a otros). El mecanostato óseo es un sistema regulatorio retroalimentado completo y cerrado en sí mismo, y contenido totalmente en los huesos. Su *receptor* (siempre molecular) y su *modulador* (determinante macromolecular u organelar de la naturaleza y la direccionalidad de la respuesta) están contenidos en los osteocitos. Su *amplificador* es el sistema canalicular que los conecta con las *lining cells*, y sus *efectores* son los blastos y clastos. Su *input* es la deformación tisular provocada por las cargas, sus *setpoints* son los valores de deformación sensada, por encima o por debajo de los cuales se dispa-

ran la modelación formadora y la remodelación perdedora de hueso en forma orientada (que otros sistemas o factores pueden desplazar, de modo que el sistema jamás podría considerarse autorregulado) su *output* es la modulación direccional de la arquitectura ósea visible (cuya deformación es originalmente sensada por el sistema – asa cerrada), y la *variable regulada* es la rigidez estructural del hueso.

D. Distinción entre mecanostato e interacciones músculo-hueso. Las interacciones músculo-hueso reconocen factores estáticos y dinámicos (morfogenéticos, alométricos, mecánicos, metabólicos, etc.), no obligadamente vinculados con asas regulatorias.⁴⁻⁶ Para explicar el mecanostato (óseo) centrado en los osteocitos (objeto del artículo), sólo interesa el vector músculo-hueso que vehiculiza la fuerza contráctil hacia la estructura, *sin formar parte de ella*. Este vector está perfectamente ubicado en las Figuras 2 y 9, a las que no les sobra ni les falta ningún elemento descriptivo. Incorporar la musculatura a la estructura regulatoria del mecanostato óseo equivaldría a reconocer al sol o a las lámparas dentro de la estructura del mecanostato que optimiza la claridad de la visión adaptando la apertura de la pupila a la luminosidad ambiente.

E. La “absorciometría biomecánica”. La resistencia ósea es una propiedad física, determinada en forma excluyente por otras dos “condiciones físicas”: la calidad (rigidez, tenacidad) y la distribución (geometría de tramas y cortezas) del tejido duro disponible. La DXA (considerada por Parfitt como basada en “*misleading and often frankly erroneous terminology and units that have encouraged physicians to make diagnostic and therapeutic decisions on the basis of an abstract set of numbers that are completely divorced from the underlying structural reality which the numbers purport to represent*”)⁷ mide la masa de tejido disponible, pero *no mide* ninguna de esas dos propiedades; por tanto, *no puede* estimar re-

sistencia, pese a las numerosas correlaciones (espúreas) que parecen demostrarlo. La QCT, *aparte* de medir indicadores de masa asimilables a los de la DXA (CMO, vDMO) discriminados por tejido, *también puede* estimar indicadores de la calidad mecánica (vDMO cortical, proporcional a la rigidez intrínseca) y de la distribución espacial del tejido duro (momentos de inercia en secciones de huesos tubulares), con *alto correlato biomecánico*.^{8,9} Ergo, si se desea comparar el poder discriminante de ambas tecnologías entre casos fracturados y no fracturados, los datos de DXA no deben cotejarse *únicamente* contra los de los indicadores tomográficos de masa, que son análogos a los que ella determina; sino justamente con los indicadores de calidad y de distribución, que son los candidatos a superar esa performance. Un ejemplo de este tipo de omisión es el trabajo del Black et al referido en el comentario recibido,¹⁰ que está bien planificado, ejecutado y analizado; pero cuya conclusión (“*Overall hip fracture prediction was not improved relative to aBMD, by adding QCT parameters*”) excede los límites del modelo estudiado, porque sólo se miden en él indicadores tomográficos de masa. Inexplicablemente, ese trabajo desecha la aptitud tomográfica para determinar la distribución del tejido duro (momentos de inercia seccionales) y la geometría (relación diámetros/longitud) del cuello, que son *determinantes genuinos* de su fragilidad. Por eso, su conclusión puede inducir infundadamente al lector a pensar que la tomografía es irrelevante para mejorar el diagnóstico densitométrico de fragilidad. La conclusión correcta debería haber especificado: “... *by adding the selected QCT parameters*”. ¡Lo que realmente habría sorprendido sería que ese estudio *hubiera* detectado diferencias entre los métodos, ensayados y comparados de esa forma! Incidentalmente, el trabajo cita un *paper* publicado en la misma revista (Ref 40), del cual uno de nosotros (JLF) fue coautor,¹¹ apoyando el valor de los indicadores tomográficos del *tamaño* óseo para



evaluar resistencia, pero *volviendo a ignorar* que nuestro trabajo se basó en indicadores de *distribución* (momentos de inercia del radio distal), antes que de tamaño.

F. El “estructurómetro ideal”. Un indicador perfecto de la resistencia de un hueso, específico de sitio y de tipo de fractura, debería contemplar. **a.** la cantidad de tejido óseo presente en el sitio (metabólicamente modulada), **b.** la calidad mecánica (rigidez, tenacidad) del tejido mineralizado y de su distribución espacial *respecto del uso habitual del hueso en ese sitio* (que controla el mecanostato), y **c.** esas mismas propiedades, calculadas *en relación con la dirección y la intensidad del trauma que provocaría la fractura estudiada* (que no están controladas). La DXA sólo puede medir “a”, sin correlato biomecánico (como en el trabajo de Black et al). La QCT (pQCT) puede medir “b”, en forma estándar, en algunos huesos en particular y en la musculatura que los afecta,^{5,8,9,12,13} y “c”, en forma orientada al caso, aun no intentada en estudios serios.¹³ Si debiéramos elegir entre “lo que hay”, preferiríamos **1.** a la DXA, sólo para controlar variaciones de “a”, sin correlato biomecánico, y **2.** a la QCT (pQCT), para medir “b”, y para intentar medir direccionalmente “c”. Un ejemplo cabal de la aptitud y de la limitación de la pQCT para medir “b” fue el desarrollo original de nuestro “BSI”,^{14,15} que predijo mucho mejor que la DXA del mismo sitio la carga real de fractura de fémures de rata *en condiciones estrictamente controladas dentro del modelo*

de estudio. Un ejemplo de la incapacidad de la misma pQCT para medir “c” en cualquier instancia fue nuestro propio reporte de un *poder discriminante similar* para indicadores tomográficos de masa (que la DXA hubiera podido proveer) y de distribución (momentos de inercia, BSI’s) en el radio distal de mujeres post-MP con o sin fracturas de Colles cuyos mecanismos de producción *no fueron* registrados.¹⁶ Un fundamento para la aplicación futura de estos conceptos en modelos dinámicos direccionales (que podrían permitir calcular “c”), es el cálculo del “factor de seguridad” esquelético orientado a sitio y a modo de carga (Figura 4d del trabajo de osteocitos).

Los autores apoyamos la formulación de este tipo de comentarios referidos a nuestro trabajo por los lectores, toda vez que los aco-se una duda generada por nuestra referencia particular al tema. La discusión enriquecería a ambas partes, y contribuiría mucho a actualizar conceptos osteológicos indebidamente postergados en nuestro medio.

**José L Ferretti,
Gustavo Roberto Cointry,
Ricardo Francisco Capozza**
*Centro de Estudios de Metabolismo
Fosfocálcico (CEMFOC), Universidad
Nacional de Rosario/CONICET.*

(Recibido: julio 2014.
Aceptado: julio 2014)

Referencias

1. Kuhn TS (ed). The Structure of Scientific Revolutions, 2nd Ed., Univ Chicago Press, Chicago & Londres, 1970.
2. Frost HM. From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its critical applications. *Anat Rec* 2001; 262:398-419.
3. Frost HM. Does bone strength design intend to minimize fatigue failures? A case for the affirmative. *J Bone Miner Metab* 2000; 28:278-82.
4. Ferretti JL, Frost HM. Osteopenias and osteoporosis. Muscle-bone interactions, safety factors, and fracture risk. An overview. En: An YH (ed). Orthopaedic Issues in Osteoporosis. Boca Raton (FL): CRC Press, 2002, p. 203-17.
5. Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF, Frost HM. Bone mass, bone strength, muscle-bone interactions, osteopenias and osteoporosis. *Mech Ageing Devel* 2003; 124:269-79.
6. Frost HM, Ferretti JL, Jee WSS. Some roles of mechanical usage, muscle strength, and the mechanostat in skeletal physiology, disease, and research (Editorial). *Calcif Tissue Int* 1998; 62:1-7.
7. Parfitt AM. A structural approach to renal bone disease (Editorial). *J Bone Miner Res* 1998; 13:1213-20.
8. Cointry GR, Capozza RF, Negri AL, Roldán EJA, Ferretti JL. Biomechanical background for a noninvasive assessment of bone strength and muscle-bone interactions. *J Musculoskel Neuron Interact* 2004; 4:1-11.
9. Capozza RF, Rittweger J, Reina PS, et al. pQCT-assessed relationships between diaphyseal design and cortical bone mass and density in the tibiae of healthy sedentary and trained men and women. *J Musculoskel Neuron Interact* 2013; 13:195-205.
10. Black AM, Bouxsein ML, Marshall LM, et al. Proximal femoral structure and the prediction of hip fracture in men: a large prospective study using QCT. *J Bone Miner Res* 2008; 23:1325-33.
11. Zanchetta JR, Bogado CE, Ferretti JL, et al. Effects of teriparatide [recombinant hPTH(1-34)] on cortical bone in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2003; 18:539-43.
12. Rittweger J, Ferretti JL. Imaging muscle-bone relationships. How to see the invisible. *Clin Rev Bone Miner Metab*, en prensa, 2014.
13. Ireland A, Rittweger J, Ferretti JL. Imaging the muscle-bone relationships. *Curr Osteopor Rep*, en prensa, 2014.
14. Ferretti JL, Capozza RF, Zanchetta JR. Mechanical validation of a tomographic (pQCT) index for the noninvasive assessment of rat femur bending strength. *Bone* 1996; 18:97-102.
15. Cointry GR, Ferretti JL, Reina PS, Nocciolino LM, Rittweger J, Capozza RF. The pQCT "Bone Strength Indices". Relative mechanical impact and diagnostic value of the indicators of bone tissue design employed in their calculation in healthy men and pre- and post-menopausal women. *J Musculoskel Neuron Interact* 2014; 14:29-40.
16. Schneider P, Reiners C, Cointry GR, Capozza RF, Ferretti JL. Bone quality parameters of the distal radius as assessed by pQCT in normal and fractured women. *Osteoporos Int* 2001; 12:639-46.



INSTRUCCIONES PARA AUTORES

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

El artículo podrá ser redactado en **castellano** o en **inglés** y deberán ser enviados a actualizaciones@osteologia.org.ar.

Los trabajos enviados deben estar incluidos en alguna de las secciones de la revista: **Actualizaciones, Artículos Originales, Comunicaciones Breves, Casuísticas, Imágenes en Osteología, Editoriales, Cartas al Editor, Comentarios Bibliográficos, Consensos y Educación en Osteología, Controversias, Sección Cultural.**

GUÍA DE PRESENTACIÓN DE MANUSCRITOS

Los trabajos se prepararán en un procesador de textos (preferiblemente en una versión reciente de Microsoft Word), en hoja A4, con márgenes de al menos 25 mm, a doble espacio, en letra de tipo *Arial* 10. Las páginas deben numerarse en forma consecutiva.

Abreviaturas, siglas y símbolos: sólo se utilizarán abreviaturas estandarizadas. Se evitará su uso en el título y en el resumen. La primera vez que se use una abreviatura o sigla irá precedida del término completo, salvo que se trate de una unidad de medida estándar.

Unidades de medida: se emplearán unidades del Sistema Internacional de Unidades (SI), empleando comas para los decimales. http://www.bipm.org/en/si/base_units/

La **primer página** deberá contener la siguiente información: (a) el título del trabajo en castellano e inglés; (b) un título abreviado para cabeza de página; (c) nombre y apellido de los autores; éste último debe estar subrayado; (d) nombre de las instituciones en que se desempeñan; (e) dirección postal y correo electrónico del autor con quien se deba mantener correspondencia; (f) sección de la revista a la cual corresponde el trabajo; (g) Conflicto de intereses.

Los **Artículos Originales** estarán divididos en *Introducción, Materiales y métodos, Resultados y Discusión*, sin incluir numeración de los mismos. Los títulos se escribirán en negrita. La extensión máxima recomendada del texto es de 5.000 palabras y se admitirán hasta 6 figuras y 6 tablas. Se sugiere no incluir más de 45 referencias bibliográficas. Se presentará también un **Resumen** en castellano y otro en inglés (**Summary**), precedido por el correspondiente título. Cada resumen no deberá exceder las 250 palabras, sin incluir tablas o figuras.

Las **Actualizaciones y Consensos y Educación en Osteología** tendrán una extensión máxima recomendada del texto de 6.000 palabras y se admitirán hasta 6 figuras y 6 tablas. Se sugiere no incluir más de 60 referencias bibliográficas. Se presentará también un Resumen en castellano y otro en inglés (**Summary**), precedido por el correspondiente título. Cada resumen no deberá exceder las 250 palabras

Las **Comunicaciones Breves, Controversias** y las **Casuísticas** tendrán una extensión máxima recomendada del texto de 3.000 palabras y se admitirán hasta 4 figuras y 4 tablas. Se sugiere no incluir más de 30 referencias bibliográficas.

En todos los casos previamente descriptos deberá presentarse un **Resumen** en castellano y otro en inglés (**Summary**), precedido por el correspondiente título. Cada resumen no deberá exceder las 250 palabras, sin incluir tablas o figuras. Se requieren de 3 a 6 **palabras clave** en inglés y en castellano; se sugiere incluir términos incluidos en la lista del Index Medicus (*Medical Subject Headings, MeSH*). Para comprobarlo ingrese a la dirección siguiente y compruebe si las palabras keywords existen: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/>

Las **Cartas al editor y Comentarios bibliográficos** tendrán una extensión máxima recomendada de 1000 palabras y se admitirán hasta 2 figuras o tablas. Se sugiere no incluir más de 10 referencias bibliográficas.

Las **Imágenes en Osteología** se enviarán en formato de imagen (.jpg o .tif) con una resolución no menor de 300 dpi. No se aceptarán imágenes en archivos de Word. Se deberán acompañar de un texto con una extensión máxima recomendada de 500 palabras. Se sugiere no incluir más de 5 referencias bibliográficas.

Agradecimiento. Cuando se considere necesario se citará a las personas, centros o entidades que hayan colaborado o financiado la realización del trabajo.

Conflicto de intereses. Los autores deberán indicar cualquier relación financiera que pudiera dar lugar a un conflicto de intereses en relación con el artículo publicado.

Las **Referencias bibliográficas.** Se limitarán a aquellos artículos directamente relacionados con el trabajo mismo, evitándose las revisiones bibliográficas extensas.

En el texto se numerarán consecutivamente mediante el formato "superíndice". Al final del manuscrito se colocarán en el orden en que se las menciona en el texto. Se incluirán todos los autores cuando sean seis o menos; si fueran más, el tercero será seguido de la expresión et al. (et alia: y otros). Los títulos de las revistas serán abreviados según el estilo empleado en el *Index Medicus como NLM Title Abbreviation* (la lista puede obtenerse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>). Los nombres de las revistas deben ir en *bastardilla*.

En la lista de referencias, las revistas, los libros y los capítulos de libros, actas de reuniones científicas *deben presentarse* de acuerdo con los siguientes ejemplos:

Revistas

Schroeder JS, Hunt SA. Chest pain in heart transplanted recipients. *N Engl J Med* 1991; 324:1805-7.

Libros

Phillips DJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM (eds). Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press, 1995, p. 465-78.

Congresos

DuPont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R (eds). *Proceedings of the third annual meeting*



of the International Society for Experimental Hematology. Houston: International Society for Experimental Hematology; 1974: 44-6.

Sitios de internet

World Health Organization (WHO). The Stop TB Web Alert. (2000 December 6- 12, week 48) <http://www.stoptb.org/updates/index.html>

Las **Tablas** se presentarán en hojas individuales al final del texto y numeradas con números arábigos; éstas deben ser indispensables y comprensibles por sí mismas y poseer un título claramente explicativo de su contenido. No se emplearán líneas verticales de separación entre columnas ni líneas horizontales, salvo, en general, tres: las que separan el título de la Tabla, los encabezamientos del resto, y la que indica la terminación de la Tabla.

En el texto se indicará el lugar aproximado de ubicación con la leyenda "Inserte Tabla número xxx en este sitio".

Las **Figuras** deben enviarse en forma separada del parte del texto. Sólo se incluirá en el manuscrito una leyenda explicativa. El formato de imágenes requerido es ".jpg o .tif" con una resolución no menor de 300 dpi. No se aceptarán imágenes en archivos de Word. En las microfotografías se indicará la escala o el aumento utilizado. *Considerar que, si bien en la versión on line la imagen se muestra en color, en la versión impresa se presentará en escala de grises.* En el texto se indicará el lugar aproximado de ubicación con la leyenda "Inserte Figura número xxx en este sitio".

Todos los artículos que publica **Actualizaciones en Osteología** son enviados a **revisión por pares (peer-review)**. La revisión está a cargo del Editor y por lo menos dos revisores con amplia experiencia en el tema. La identidad de los autores y de los revisores se mantiene en forma 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 y orientación de **Actualizaciones en Osteología**.

El tiempo de evaluación durará entre 30 y 60 días. Se notificará por correo electrónico al autor responsable sobre la aceptación (con correcciones o sin ellas) o el rechazo del manuscrito. La decisión de este será inapelable. El Comité de Redacción se reserva el derecho de introducir, con conocimiento de los autores, todos los cambios editoriales exigidos por las normas gramaticales y las necesidades de compaginación. Los trabajos aceptados con modificaciones serán devueltos a sus autores para eventuales correcciones y se les otorgará para la devolución un plazo no mayor de 30 días. Luego de su aceptación y diagramación se otorgará a los autores 72 horas para revisar la prueba de galera.

Acordamos con los lineamientos expuestos por el *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE, [http:// www.icmje.org](http://www.icmje.org)) éstos guiarán las resoluciones del Comité Editorial en lo referente a **Conflicto de intereses** de revisores, autores y editores, relaciones con la industria, apoyo financiero, confidencialidad de los manuscritos, relaciones entre revistas médicas, los medios populares de difusión y otros aspectos no mencionados en estas instrucciones.

POLÍTICA EDITORIAL

Transferencia de Derechos de Autor

Una vez aceptado el manuscrito y antes de su publicación, se debe enviar al editor una carta de concesión de los derechos de autor y consentimiento de publicación, firmada por los autores la cual puede obtenerse del sitio web www.osteologia.org.ar. En el caso de que los autores certifiquen que el artículo arriba mencionado es trabajo original y no ha sido previamente publicado excepto en forma de resumen, y sea aceptado para publicación en **Actualizaciones en Osteología**, los derechos de autor serán transferidos a la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

Actualizaciones en Osteología es una publicación de Acceso Abierto, sin embargo los derechos de propiedad intelectual deberán ser reconocidos. La transcripción por cualquier medio de los contenidos de la revista será **debidamente referenciado**, indicando la autoría y la fuente bibliográfica. Asimismo, para la reproducción escrita del material de la revista se solicitará la autorización pertinente.

Autoría: La lista de autores debe estar conformada únicamente por aquellas personas que hayan participado en la concepción y realización del trabajo, participado en la redacción del texto y que hayan aprobado la versión del texto que será publicada.

Responsabilidades éticas. Cuando se describen experimentos realizado en **seres humanos** se debe indicar si los procedimientos realizados siguieron las normas éticas del comité de experimentación humana (institucional o regional), y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki. Asimismo se debe enviar el modelo de consentimiento informado utilizado para la realización del estudio. Cuando se describen experimentos en **animales** se debe indicar si se han seguido las pautas de una institución o consejo de investigación sobre cuidado y la utilización de animales de laboratorio.

La revista **Actualizaciones en Osteología** apoya las políticas para registro de ensayos clínicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE), reconociendo la importancia de esas iniciativas para el registro y divulgación internacional de información sobre estudios clínicos, en acceso abierto. En consecuencia, solamente se aceptarán para publicación, a partir de 2007, los artículos de investigaciones clínicas que hayan recibido un número de identificación en uno de los Registros de Ensayos Clínicos validados por los criterios establecidos por la OMS y el ICMJE, cuyas direcciones están disponibles en el sitio del ICMJE (www.icmje.org). El número de identificación se deberá registrar al final del resumen.



INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Manuscripts may be written in Spanish or in English and should be sent to actualizaciones@osteologia.org.ar.

“Actualizaciones en Osteología” contributions for publication in the following categories: **Original Articles, Reviews, Brief Communications, Case Reports, Images in Osteology, Editorials, Letters to the Editor, Bibliographic Comments, Consensus and Education in Osteology, Controversies, Cultural Section.**

MANUSCRIPT SUBMISSION GUIDELINES

Manuscripts should be prepared in a word processor (preferably a recent version of Microsoft Word), on A4 paper size, with margins of at least 25 mm, double-spaced, in an Arial 10 font. Pages should be numbered consecutively.

Abbreviations, acronyms and symbols. Only standard abbreviations, acronyms and symbols must be used. Their use in the title and abstract should be avoided. The first time an abbreviation or acronym is used it will be preceded by the full name, except when it is a standard unit of measurement.

Measuring units: Units of the International System of Units (SI) http://www.bipm.org/en/si/base_units/ must be used; for decimals, use commas in Spanish, and periods in English.

The **first page** should contain the following information: (a) title of the work in Spanish and English, (b) abbreviated title for running head, (c) author/s' first and last name/s, 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.

Original Articles will be divided into *Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion*, without numbering them. Titles must be written in bold type. The recommended maximum text length is 5,000 words and up to 6 figures and 6 tables will be accepted. It is suggested not to include more than 45 references. A 250-word **Abstract** in Spanish and in English, not including tables or figures, preceded by an appropriate heading, must also be included.

Reviews and Consensus and Education in Osteology have a recommended maximum text length of 6,000 words and up to 6 figures and 6 tables will be accepted. It is suggested not to include more than 60 references. A 250-word Abstract in Spanish and in English, preceded by an appropriate heading, must also be included.

Brief Communications, Controversies and **Case Reports** will 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.

In all these cases, an **Abstract** must also be submitted in Spanish and in English, preceded by an appropriate heading. Each abstract should not exceed 250 words, not including tables or figures. Also, 3 to 6 key words in English and Spanish are required as listed in *Medical Subject Headings, MeSH*. To check them go to the following link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/>.

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

Images in Osteology must be submitted in image format (.jpg or .tif) with no less than 300 dpi resolution. Images in Word files will not be accepted. They must be accompanied by a text with a recommended maximum of 500 words length. It is suggested not to include more than 5 references.

Acknowledgments. When necessary, people, institutions or organizations that have collaborated or financed the work will be acknowledged.

Conflict of interest statement. Authors must disclose any financial relationship that could lead to a conflict of interest in relation to the published article.

References. These will be limited to items directly related to the work itself, avoiding extensive literature reviews. They will be consecutively numbered in the text using the “superscript” format. They will be placed at the end of the manuscript in the order they are mentioned in the text. All authors may be included when they are six or less; if there are more, the third name will be followed by *et al.* (et alia: and others). Titles of journals must be abbreviated according to the style used in *Index Medicus* as *NLM Title Abbreviation* (the list may be obtained at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>). The names of journals should be in italics.

In the list of references, journals, books and book chapters, and proceedings of scientific meetings should be submitted according to the following examples.

Journals

Schroeder JS, Hunt SA. Chest pain in heart transplanted recipients. *N Engl J Med* 1991; 324:1805-7.

Books

Philips DJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM (eds). Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press, 1995, p. 465-78.

Congresses

DuPont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R (eds). *Proceedings of the third annual meeting*



of the *International Society for Experimental Hematology*. Houston: International Society for Experimental Hematology; 1974: 44-6.

Websites

World Health Organization (WHO). The Stop TB Web Alert. (2000 December 6- 12, week 48) <http://www.stoptb.org/updates/index.html>

Tables will be presented on separate pages at the end of the text and numbered in Arabic numerals; they must be essential and understandable by themselves and have a clear explanatory title of their content. 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 number xxx 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 number xxx here."

All articles published in "**Actualizaciones en Osteología**" are subject to peer review. The review is made by the Editor and at least two reviewers with extensive experience in the 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 given a period of 72 hours to review the galley proof.

We agree with the guidelines set out by the *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE, <http://www.icmje.org>) to guide the resolutions of the Editorial Committee regarding **Conflict of interest** of reviewers, authors and publishers, relations with the industry, financial support, confidentiality of manuscripts, relationships between medical journals, popular media and other aspects not mentioned in these instructions.

PUBLISHING POLICY

Transfer of Copyright

Upon acceptance of the manuscript and prior to publication, a letter to the editor must be sent to grant copyright and publication consent, signed by the authors, which can be obtained from the **www.osteologia.org.ar** website. In case the authors certify that the above mentioned article is original work, it has not been previously published except in abstract form, and is accepted for publication in “**Actualizaciones en Osteología**”, copyright will be transferred to the Argentine Association of Osteology and Mineral Metabolism.

Actualizaciones en Osteología is an Open Access publication, however, intellectual property rights must be acknowledged. Transcription by any means of the contents of the journal will be **properly referenced**, indicating the author and the source. Also, for the written reproduction of material from the journal proper authorization will be requested.

Authorship: The list of authors should be made up only by those who have participated in the conception and realization of the work, been involved in drafting the text and have approved the text version to be published.

Ethical responsibilities. When experiments performed in humans are described, 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. You must also send the informed consent model used for the study. When animal experiments are described, indicate whether you followed the guidelines of an institution or research council on care and use of laboratory animals.

Actualizaciones en Osteología journal supports policies for registry of clinical trials of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), recognizing the importance of such initiatives for the registration and international dissemination of information on clinical studies in open access. Therefore, since 2007, it only accepts for publication clinical research articles that have received an identification number in one of the Clinical Trials Registry validated by the criteria established by WHO and ICMJE, whose addresses are available at the ICMJE site (www.icmje.org). The identification number must be recorded at the end of the abstract.