

ARTÍCULOS ORIGINALES / *Originals*

MÉTODO MININVASIVO DE MEDICIÓN DE LA REMODELACIÓN ÓSEA EN RATAS. VALIDACIÓN EN DISTINTOS MODELOS BIOLÓGICOS.*

Maela Lupo, Alfredo Rigalli.**

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

Resumen

La remodelación ósea puede medirse con marcadores bioquímicos óseos, isótopos radioactivos e histomorfometría. En este trabajo se propone un método basado en la farmacocinética del fluoruro. El método consiste en la medición de la fluoremia y la excreción urinaria de fluoruro antes y después de una dosis endovenosa de fluoruro. Con los datos obtenidos se aplica un modelo matemático y se calcula la resorción (Ro) y formación ósea (Fo), medidos en $\mu\text{mol/l.min}$. El método fue validado en ratas Sprague-Dawley con osteoporosis inducida por ovariectomía (OVX), con tratamiento con zoledronato (OVX+Z), con insuficiencia renal por nefrectomía parcial (NFX) y con hipoparatiroidismo por paratiroidectomía (PX). En todos los casos se utilizó un grupo control (C) y cada grupo experimental contuvo 5 ratas; se utilizaron los test de Kruskal Wallis y Mann Whitney, considerando diferencias significativas si $p < 0,05$. Fo y Ro fueron mayores en OVX (Fo=1,36 \pm 0,56 [X \pm EE]; Ro=1,84 \pm 0,47) con respecto a C (Fo=0,50 \pm 0,07; Ro=0,56 \pm 0,38) y a OVX+Z (Fo=0,34 \pm 0,17; Ro=0,45 \pm 0,18). Fo y Ro fueron mayores en ratas NFX (Fo=5,00 \pm 0,40; Ro=5,08 \pm 0,45) con respecto a C (Fo=0,55 \pm 0,14; Ro=0,56 \pm 0,14). Fo y Ro fueron menores en PX (Fo=0,75 \pm 0,08; Ro=0,96 \pm 0,06) respecto de C (Fo=1,20 \pm 0,32; Ro=1,44 \pm 0,27). Conclusiones: el método es de bajo costo, mini-invasivo, requiere reducido volumen de sangre, permite el seguimiento de tratamientos con otras drogas y el mismo marcador es utilizado para medir ambos procesos. Los valores de resorción y formación ósea obtenidos coinci-

dieron con los valores que se esperaban en los modelos biológicos estudiados.

Palabras clave: remodelación ósea, hipoparatiroidismo, insuficiencia renal, osteoporosis postmenopáusicas, ratas, fluoruro.

Summary

NON-INVASIVE TECHNIQUE FOR THE MEASUREMENT OF BONE REMODELING IN RATS. VALIDATION IN DIFFERENT BIOLOGICAL MODELS

Bone remodeling can be measured through bone markers and histomorphometry. This work developed a technique to measure bone resorption (Br) and formation (Bf) in rats, using a mathematical model, fluoremia and renal excretion of fluoride, before and after an intravenous injection of fluoride, in rats. The aim of this work was to validate the method in biological models with modified bone remodeling. Mann Whitney or Kruskal Wallis tests were used to compare two or more groups, respectively. Results are expressed as mean \pm SEM and differences were considered significant if $p < 0.05$. Each experimental group is composed of 5 rats. The following models in Sprague-Dawley rats were used: 1) Post menopausal osteoporosis induced by ovariectomy without treatment (OVX) and with anti-resorptive treatment with zoledronate (OVX+Z) in 100-day-old rats. Bf and Br were higher in OVX (Bf=1.36 \pm 0.56, Br=1.84 \pm 0.47) than C (Bf=0.50 \pm 0.07, Br=0.56 \pm 0.38) and OVX+Z (Bf=0.34 \pm 0.17, Br=0.45 \pm 0.18). 2) Chronic renal failure in

* Este trabajo obtuvo el 1º premio a la Investigación Básica "AAOMM" en la XXV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Buenos Aires, Noviembre de 2008.

** Dirección postal: Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNR. Santa Fe 3100, (2000) Rosario, SF. Correo electrónico: arigalli@fmedic.unr.edu.ar



5/6 nephrectomized-100-day-old-male rats (NX). Bf and Br were higher in NX ($Bf=5.00\pm 0.40$, $Br=5.08\pm 0.45$) than in C ($Bf=0.55\pm 0.14$, $Br=0.56\pm 0.14$). 3) Hypoparathyroidism in parathyroidectomized-140-day-old-male rats (PX). Bf and Br were lower in PX ($Bf=0.75\pm 0.08$, $Br=0.96\pm 0.06$) than in C ($Bf=1.20\pm 0.32$, $Br=1.44\pm 0.27$). Conclusions: The values of bone resorption and formation are consistent with the expected values for the biological models. The technique is of low cost, mini-invasive and allows the evaluation of different treatments.

Key words: bone remodeling, menopausal osteoporosis, hypoparathyroidism, renal failure, rats, fluoride.

INTRODUCCIÓN

El tejido óseo se origina por dos mecanismos: osificación intramembranosa y osificación endocondral. Ambos procesos conducen a la formación de un mismo tipo de hueso, que luego se mantiene por el proceso de remodelación ósea que consta de dos procesos básicos: la resorción y la formación ósea. Los osteoclastos son las principales células encargadas de la resorción. Entre la fase de resorción y la de formación, se da un proceso conocido como fase de reversión, en el cual las células mononucleares, como macrófagos, forman una capa de cemento que une el hueso neoformado con el tejido óseo existente. Luego de la formación de matriz, ésta se calcifica y la velocidad del proceso depende de la presencia de pirofosfato, proteínas no colágenas acídicas de la matriz ósea y de la expresión de fosfatasa alcalina en la membrana del osteoblasto. Normalmente los procesos de resorción y formación ósea están acoplados, es decir la resorción y formación ocurren en igual magnitud. Estos procesos mantienen la estructura del hueso, removiendo hueso antiguo, con defectos o con microfracturas y rellenando con tejido óseo nuevo.¹

En algunas patologías, la remodelación ósea puede estar aumentada o disminuida respecto del valor normal, no siendo ninguna de

las dos situaciones deseables.

La medición de la remodelación ósea es un proceso que ha sido encarado de maneras diferentes, dependiendo si se trata de necesidades clínicas o de investigación básica. Una técnica utilizada para la determinación de la remodelación ósea es la histomorfometría ósea.² Requiere la toma de biopsias óseas y el procesamiento histológico del material. Mientras que la histomorfometría estática se puede realizar con técnicas histológicas convencionales, la histomorfometría dinámica se realiza sobre cortes histológicos de hueso sin desmineralizar, y tratamiento previo con tetraciclinas, siendo aplicable a trabajo con animales. El análisis de los resultados puede dar una medida del estado del proceso de remodelación ósea. La desventaja y ventaja de este método es que informará respecto de la zona donde se obtuvo la biopsia y requiere un personal muy especializado. Los parámetros que se pueden medir son numerosos y la aparición de *software* de análisis de imágenes ha contribuido a hacer estas mediciones de manera cuantitativa.

Otra técnica de medida de la remodelación ósea es por medio de la utilización de marcadores bioquímicos óseos. Estas son moléculas cuya concentración se puede medir en plasma y orina, e indican el estado metabólico del tejido óseo.³⁻⁵ Sus concentraciones se detectan habitualmente por ELISA, IRMA o RIA. Existen diversas marcas comerciales y tipos de ensayos para cada uno. Los valores de referencia dependen de las marcas comerciales y la metodología utilizada. Los marcadores bioquímicos óseos son de amplia aplicación en la clínica, dan una medida global del esqueleto, y no requieren personal altamente capacitado. Como desventajas se pueden mencionar que los valores hallados no siempre se correlacionan con la clínica o la realidad dentro del tejido óseo y el elevado costo de los equipos de determinación. Existen marcadores de resorción y formación ósea. Los marcadores de formación más utilizados son: fosfatasa alcalina total, fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina (BGP). Entre los marcadores de

resorción en la actualidad se dispone de hidroxiprolina, piridinolina (Pyr), desoxipiridinolina (D-Pyr), telopéptidos: NTX y CTX, catepsina K, sRANKL, péptido helicoidal del colágeno.

Por último, se puede tener en cuenta que el calcio y el fosfato son dos iones utilizados en la formación del cristal de hidroxiapatita, responsable de la calcificación del hueso. Existen iones que tienen afinidad específica por el tejido óseo y pueden ser utilizados como trazadores de dicho tejido. La captación de calcio radiactivo por el hueso⁶ como la de algunos bifosfonatos con trazadores radiactivos que reemplazan al fosfato en el cristal han sido utilizados como medida de la remodelación ósea.^{7, 8}

Existen otros iones que pueden ser intercambiados por otras partes del cristal, tal es el caso del estroncio y del fluoruro.

La medición de la remodelación ósea y los resultados obtenidos sigue siendo un problema en la clínica y en la investigación básica especialmente con animales, donde los marcadores bioquímicos óseos no están tan desarrollados

La retención corporal de fluoruro ha sido utilizada como trazador del tejido óseo. Este método se ha validado contra la captación de metil-bifosfonato marcado con ^{99m}Tc. Se halló que en pacientes en los cuales el proceso de remodelación ósea estaba aumentado, la retención corporal de fluoruro se hallaba aumentada y esto, correlaciona adecuadamente con otros parámetros de la remodelación ósea como son la excreción urinaria de hidroxiprolina y de la fosfatasa alcalina ósea.⁹ Sin embargo, la técnica carece de adecuada sensibilidad para detectar pequeños cambios.

La medición de la remodelación ósea en animales de experimentación es necesaria para evaluar el progreso del tratamiento con drogas que tienen efecto sobre el tejido óseo, cuando estas sustancias se encuentran en fase de desarrollo.

La farmacocinética del fluoruro de sodio y el monofluorofosfato de sodio han sido extensamente estudiadas,¹⁰⁻¹² obteniéndose modelos matemáticos precisos para la

obtención de los parámetros en la rata. Este trabajo muestra el desarrollo de un modelo matemático, la metodología y los cálculos necesarios para medir simultáneamente la remodelación y formación ósea en esta especie. En este trabajo se muestra la validación del método en modelos experimentales quirúrgicos con remodelación ósea modificada y valores predictivos del proceso como son la ovariectomía, el tratamiento con drogas antirresortivas, la nefrectomía y la paratiroidectomía.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó con ratas Sprague-Dawley provenientes del Bioterio central de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. El número de animales así como sexo y edad se especifican en cada uno de los modelos. El proyecto de investigación fue aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario. El manejo de los animales se realizó acorde con las reglas internacionales.^{13,14} Antes de cada cirugía los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (6 mg/100 g peso corporal) y xilazina (0,6 mg/100 g peso corporal), por vía intramuscular. La zona de incisión se desinfectó con iodopovidona y cuando se detectó falta de analgesia suficiente como para comenzar la cirugía se realizó la inyección de 10 µl de clorhidrato de lidocaína en 4-5 puntos adyacentes a la zona de incisión. Se suturaron los planos musculares con lino 90 y el cuero con nailon 50. Se desinfectó la herida con clorhexidina e inmediatamente después de la cirugía los animales recibieron una dosis intramuscular de ceftriaxona 3 mg/100 g peso corporal en 0,1 ml de solución fisiológica estéril en el muslo derecho y 0,05 ml/100 g peso corporal de diclofenac de 25 mg/ml por vía intramuscular, en el muslo izquierdo. La dosis de diclofenac se repitió cada ocho horas durante el primer día del período post-operatorio. Se colocó un collar isabelino que se retiró pasadas



48 horas de la cirugía, con el objetivo de evitar la autoinjuria del animal. Los animales fueron mantenidos en un bioterio con ciclo luz-oscuridad (12 h-12 h), temperatura 23-27°C, en jaulas metabólicas individuales, con probetas para la provisión de agua y recolección de orina, ambas con apreciación $\pm 0,5$ ml. Salvo el día previo a las cirugías en que las ratas se ayunan por 24 h y el día posterior que se les proveen 10 g de alimento; los animales fueron alimentados con dieta para roedores (Gepsa, Argentina) *ad libitum*. Las muestras de sangre se obtuvieron de la punta de la cola en capilares heparinizados.

Medición de la remodelación ósea

El estudio consta de tres etapas que se realizan en tres días consecutivos.

Día 1: Mediciones basales: Se realizó una inyección intravenosa en la vena de la cola, de 67 $\mu\text{l}/100$ g de peso corporal de solución fisiológica, bajo anestesia inhalatoria con éter sulfúrico. El objetivo de esta inyección fue reproducir la intervención que se realizará en el segundo día. De esta manera el animal está sometido en el día de mediciones basales a los efectos de la inyección y la anestesia, situaciones que actúan como factores importantes de generación de estrés. Luego de la inyección se obtuvo una muestra de sangre. Se recolectó orina durante 24 h.

Día 2: Mediciones post-minidosis de NaF: Luego de la recolección de orina de 24 hs se le realizó una inyección endovenosa de 1 μmol F/100 g de peso corporal (67 $\mu\text{l}/100$ g de peso corporal de una solución 15 mmol/l de NaF, Sigma Co., St Louis, MO, USA). Para esto se llevaron a cabo los mismos pasos descriptos para la inyección de solución fisiológica del día 1. Luego de la inyección de NaF se obtuvieron tres muestras de sangre a los 3, 18 y 33 minutos de la inyección endovenosa. La primer muestra se extrajo a los 3 minutos de la inyección de manera que el fluoruro se distribuya uniformemente en el compartimiento sanguíneo. Se recolectó orina otras 24h.

Día 3: Se recolectó orina de las 24 h post dosis de NaF.

Se determinó la concentración de fluoruro en muestras de plasma y orina como se describe más adelante. En el tercer día se terminó el estudio, retornando la rata a la condición previa al estudio.

Cálculo de remodelación, formación y resorción ósea

Para estos cálculos se utilizó un modelo matemático desarrollado a partir de la farmacocinética del fluoruro en la rata (ver Anexo).

Con los valores de fluoremia basal y la concentración de fluoruro de la orina obtenido el día 2 se calculó la remodelación ósea (resorción ósea + formación ósea), que simbolizaremos en adelante con V_o . Posteriormente, con las fluoremias medidas en las muestras obtenidas el día 2 (3, 18 y 33 minutos luego de la dosis de NaF) y la concentración de fluoruro en orina obtenida el día 3 se calculó el valor de resorción ósea (R_o). Con los valores obtenidos de V_o y R_o se obtiene el valor de formación ósea (F_o). F_o y R_o se miden en $\mu\text{mol}/\text{l}\cdot\text{min}$

MODELOS BIOLÓGICOS CON REMODELACIÓN ÓSEA MODIFICADA

Insuficiencia renal (modelo de alta remodelación ósea)

La insuficiencia renal se indujo por nefrectomía de 5/6 (NFX)¹⁵ en 5 ratas macho de 7 semanas. Un grupo de 5 ratas se utilizó como grupo control con cirugía simulada (*sham* NFX). El modelo quirúrgico implica la realización de dos cirugías separadas por 1 semana: Primer cirugía: luego de la anestesia se le realizó la ablación del riñón derecho previa incisión lumbar paramedial derecha y ligado del pedículo renal. Segunda cirugía: se realizó una incisión sub-frénica izquierda, y luego de la identificación del riñón izquierdo se retiró el tejido conectivo próximo al pedículo renal dejando a la vista la arteria renal y sus ramas. Se llevó a cabo una microligadura quirúrgica, por medio de lupa estereoscópica de dos de tres ramas extrarrenales de la arteria renal izquierda, provocando una necrosis isqué-

mica de aproximadamente dos tercios (2/3) del parénquima. Se comprobó la isquemia por cambios en la coloración del tejido, que cambia de color rojo oscuro a negro. A los animales del grupo control (*sham* NFX) se los expuso a una cirugía simulada, que consistió en los mismos pasos pero sin la extirpación del riñón derecho y la ligadura de las mencionadas ramas arteriales del riñón izquierdo.

Sesenta días después de la segunda cirugía los animales NFX y los *sham* NFX fueron sometidos a medición de la remodelación, formación y resorción ósea como se detalló anteriormente. El mismo día se determinó el *clearance* de creatinina para evaluar la función renal, a través de valores de creatinina plasmática, urinaria y el volumen minuto urinario.

Ovariectomía (modelo de alta remodelación ósea) y tratamiento con bifosfonatos (droga antiresortiva)

Se realizó ovariectomía bilateral (OVX) en un grupo de 10 ratas hembras de 9 semanas. Cinco ratas ovariectomizadas recibieron inyección subcutánea semanal de ácido zoledrónico (0,15 µg/100 g de peso corporal). Las otras 5 ratas OVX actuaron como modelo de osteoporosis postmenopáusicas. El grupo control estuvo formado por 5 ratas que fueron sometidas a cirugía simulada (*sham* OVX). La ovariectomía se realizó a través de dos incisiones ventrales paramediales y dos ligaduras, una a la altura de la arteria ovárica y otra en el extremo distal del útero. Se realizó luego la excisión del ovario. Sesenta días después de la ovariectomía y el tratamiento con ácido zoledrónico se midió la remodelación ósea. El éxito de la ovariectomía fue verificado al finalizar el experimento por la disminución del peso del útero respecto de los animales *sham* OVX.

Paratiroidectomía (Modelo de baja remodelación ósea)

Se realizó paratiroidectomía en 5 ratas macho de 18 semanas (PX) y 5 ratas fueron

sometidas a una cirugía simulada (*sham* PX). Se realizó una incisión mediana en el cuello a la altura del músculo esternohioideo, exponiendo la glándula tiroidea. Con la ayuda de microfórceps, bisturí y una lupa estereoscópica se realizó la ablación de ambas glándulas paratiroideas. Treinta días después de la paratiroidectomía se realizó la medida de la remodelación ósea. El éxito de la cirugía fue verificado por medio de la medición de calcemia 48-72 horas luego de la operación. Los niveles de calcio en plasma menores de 7,5 mg/dl indican el éxito de la cirugía.

Determinaciones

Calcemia: por espectrofotometría con un *kit* comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

Creatinina urinaria y plasmática: por espectrofotometría con *kit* comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

Fluoruria: por potenciometría directa con electrodo de ion específico Orion 94-04, Orion Research Inc., Cambridge MA, USA.¹⁵

Fuoremia: se realizó por potenciometría directa post destilación isotérmica del flúor de las muestras de plasma.¹⁶

Análisis estadísticos

Cuando se compararon más de una muestra se utilizó el test de Kruskal Wallis y para la comparación de dos muestras el test de Mann Whitney. Se consideraron diferencias significativas si $p < 0,05$. Por claridad los resultados se presentaron como $\text{media} \pm \text{error estándar}$, aunque los tests utilizados fueron no paramétricos.

RESULTADOS

Insuficiencia renal crónica inducida por nefrectomía de 5/6 en ratas macho de 120 días (NFX).

Fo y Ro fueron mayores en ratas NFX con respecto a *sham* NFX (Fig 1). El *clearance* de creatinina de los animales NFX ($1,23 \pm 0,3$ ml/min) fue significativamente menor que en el grupo *sham* NFX ($2,5 \pm 0,8$ ml/min).

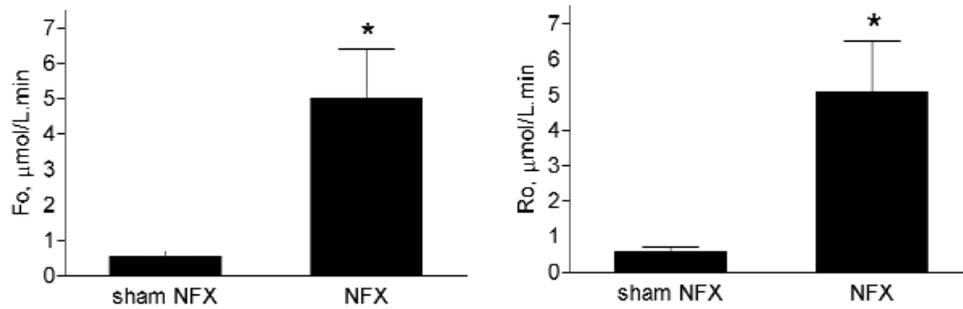


Figura 1. medidas de formación ósea (Fo, izquierda) y resorción ósea (Ro, derecha) en ratas controles (*sham* NFX) y con insuficiencia renal (NFX). Los resultados se expresan como media \pm EE por razones de simplicidad, aunque el análisis estadístico fue el test de Mann Whitney. * indica diferencias significativas respecto de *sham* NFX $p < 0,05$.

Osteoporosis postmenopáusica inducida por ovariectomía sin tratamiento (OVX) y con tratamiento antirresortivo con ácido zoledrónico (OVX+Z) en ratas de 130 días. Fo y Ro fueron mayores en OVX con respec-

to a *sham* OVX y a OVX+Z (Fig. 2). El peso del útero (mg/100 g peso corporal) de los animales OVX ($32,3\pm 1,1$) fue significativamente menor que en los animales *sham* OVX ($140,0\pm 20,0$).

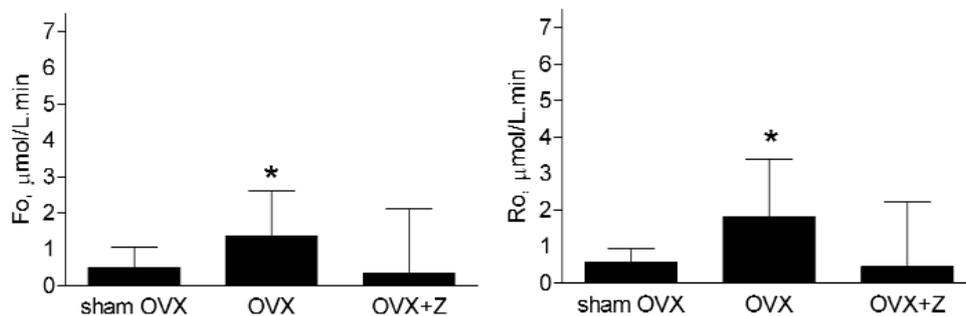


Figura 2. Medidas de formación ósea (Fo, izquierda) y resorción ósea (Ro, derecha) en ratas controles (*sham* OVX), en ratas ovariectomizadas (OVX) y en ovariectomizadas con tratamiento antirresortivo (OVX+Z). Los resultados se expresan como media \pm EE por razones de simplicidad, aunque el análisis estadístico fue el de Kruskal Wallis. * indica diferencias significativas respecto de los otros grupos $p < 0,05$.

Hipoparatiroidismo por paratiroidectomía (PX) en ratas macho de 150 días Fo y Ro fueron significativamente menores en PX respecto de Sham PX (Fig. 3). La cal-

cemia (mg/dl) de los animales paratiroidectomizados ($3,8\pm 1,9$) fue significativamente menor que en los *sham* PX ($9,7\pm 0,9$).

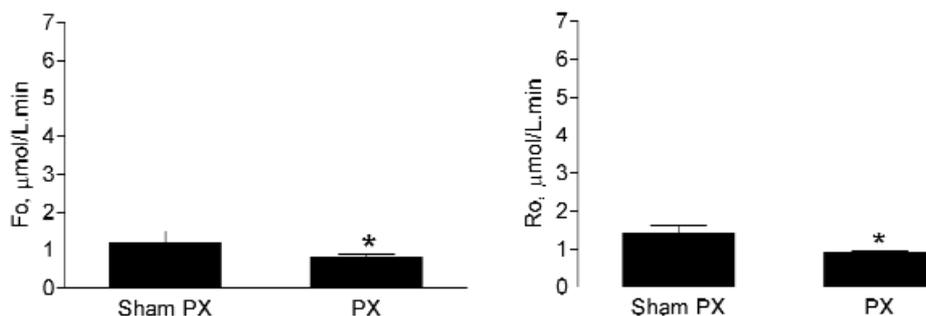


Figura 3. Medidas de formación ósea (Fo, izquierda) y resorción ósea (Ro, derecha) en ratas controles (*sham* PX) y con paratiroidectomía (PX). Los resultados se expresan como media \pm EE por razones de simplicidad, aunque el análisis estadístico fue el test de Mann Whitney. * indica diferencias significativas respecto de *sham* PX $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Los valores de resorción ósea (Ro) y formación ósea (Fo) obtenidos coincidieron con los valores esperados de dichas variables en los modelos biológicos estudiados. El método propuesto es de baja complejidad aunque presenta algunas limitantes y desventajas: 1. La aplicación del método en ratas en tratamiento con compuestos que contienen flúor requiere correcciones adicionales (no presentadas en este trabajo). 2. Fo y Ro dependen de la precisión en la medición de la concentración de flúor. 3. La inyección endovenosa, aunque es una técnica de baja complejidad, requiere adiestramiento especial y es dificultosa en animales de bajo peso corporal. Por otro lado se pueden enumerar sus ventajas respecto de otros métodos de medición de la remodelación ósea: 1. Bajo costo. 2. Mini-invasividad. 3. Reducido volumen de sangre. 4. Permite el seguimiento de tratamientos con otras drogas. 5. El mismo marcador es utilizado para medir ambos procesos. 6. Da una medida de resorción y formación ósea que hace referencia a todo el esqueleto. Se están realizando mediciones histomorfométricas estáticas de los huesos de los animales que participaron en el estudio, así como determinaciones bioquímicas de marcadores óseos (desoxipiridinolina urinaria y fosfatasa alcalina ósea). La correlación entre los valores de estos métodos aceptados para la medición de la remodelación y los valores obtenidos con este método aportarán mayor validez a la metodología planteada.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Agustín Ramírez y Valeria Dalmau por la colaboración en la realización del modelo de insuficiencia renal, a Jéssica Nipoti, Diego Holotte, María J. Pretini y Verónica Di Loreto por la colaboración en el modelo de ovariectomía. A laboratorios Wiener Lab por la donación de los reactivos utilizados en la determinación de creatinina y calcio. Los trabajos fueron

financiados con subsidios de CONICET (PIP 5018) y fundación Alberto J. Roemmers.

(Recibido: febrero de 2009. Aceptado: marzo de 2009)

ANEXO: Modelo matemático para la determinación de la remodelación ósea.

Modelo en ausencia de una dosis externa de fluoruro:

La distribución del fluoruro en diferentes compartimientos biológicos se puede representar a través del esquema de la figura 4

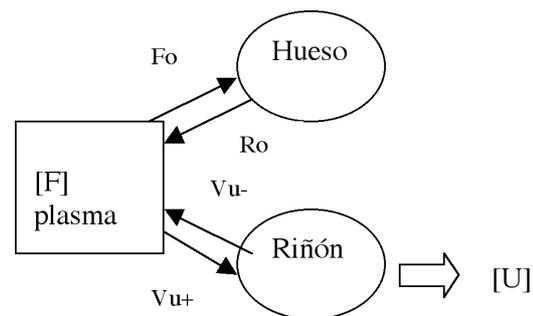


Figura 4.

Donde Fo: velocidad de ingreso de fluoruro al tejido óseo que será considerado una estimación del proceso de formación ósea. Ro: velocidad de salida de fluoruro del tejido óseo, que será utilizado como estimación de la resorción ósea. Vu+: velocidad de filtración renal de fluoruro, Vu-: velocidad de reabsorción renal de fluoruro. [U]: concentración urinaria de fluoruro. [F]: concentración plasmática de fluoruro.

La concentración de fluoruro en plasma ([F]) depende de los procesos mencionados: Fo, Ro, Vu+ y Vu-.

La variación de [F] puede representarse por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d[F]}{dt} = V_o - V_u$$

donde

$$V_o = R_o - F_o$$

$$V_u = V_{u+} - V_{u-}$$



V_o : remodelación ósea y V_u : manejo renal de fluoruro.

En ausencia de dosis de fluoruro, la concentración de fluoruro en plasma tiene un valor constante, hallándose esta variable en estado estacionario. Por lo tanto

$$\frac{d[F]}{dt} = V_o - V_u = 0 \quad (1)$$

por otra parte, la excreción renal de fluoruro (V_u) que depende de la concentración plasmática del mismo, se puede representar por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d[U]}{dt} = k_u \cdot [F] = V_u \quad (2)$$

De (1) se deduce que

$$V_o = V_u$$

por lo tanto la variación de la concentración de fluoruro en orina se puede expresar por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d[U]}{dt} = V_o$$

Resolviendo la ecuación diferencial:

$$\int_{[U_0]}^{[U]} d[U] = V_o \cdot \int_0^t dt$$

Como $[U_0] = 0$, resulta

$$[U] = V_o \cdot t$$

por lo tanto la remodelación ósea (V_o) se calcula por

$$V_o = \frac{[U]}{t} \quad (3)$$

donde $[U]$ es la concentración de fluoruro urinaria acumulada durante 24 h y t es el tiempo durante el cual se recolectó la orina.

Luego de una dosis externa de flúor

Luego de una dosis intravenosa de NaF, la distribución del anión se puede representar esquemáticamente como se muestra en figura 5.

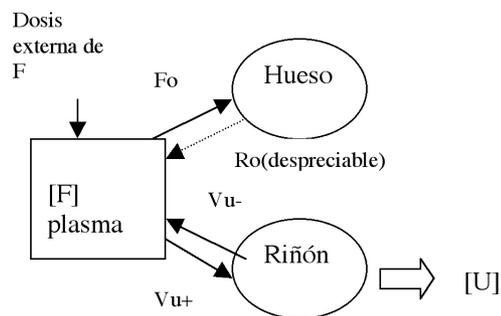


Figura 5.

Donde las variables son las mismas que las descritas para el modelo en ausencia de una dosis externa (figura 4).

En estas condiciones la concentración de fluoruro en plasma puede ser representada por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d[F]}{dt} = V_o - V_u$$

donde

$$V_o = R_o - F_o$$

Reescribiendo la ecuación

$$\frac{d[F]}{dt} = R_o - F_o - V_u$$

Luego de una dosis externa de flúor, se supone que el proceso de salida de fluoruro del hueso (R_o) es despreciable con respecto al ingreso de fluoruro al hueso (F_o) y a la depuración urinaria de fluoruro (V_u). Por lo tanto:

$$\frac{d[F]}{dt} = -F_o - V_u \quad (4)$$

Al resolver esta ecuación se tiene en cuenta que la salida de fluoruro del esqueleto depende de la cantidad de fluoruro en el hueso, mientras que el ingreso de fluoruro al tejido óseo depende de la concentración del anión en el líquido extracelular. Ambas consideraciones quedan representadas en las siguientes ecuaciones:

$$R_o = k_r \cdot [F_{oseo}] \quad (5)$$

Donde kro es la constante de velocidad del proceso de salida de fluoruro del hueso y [Foseo] la concentración de fluoruro óseo.

$$F_o = kfo.[F] \quad (6)$$

Donde kfo es la constante de velocidad de entrada de fluoruro al hueso

En base a estas dos ecuaciones se puede fundamentar la suposición realizada respecto de Ro. Luego de una dosis de NaF la [F] es elevada, mientras que en ese mismo intervalo de tiempo la [Foseo] se mantiene constante y será baja si el animal no ha sido expuesto durante largos períodos de tiempo a tratamiento con compuestos con flúor.

Dado que los procesos estudiados son de orden 1, las constantes se pueden operar algebraicamente.

Reemplazando en la ecuación (4) las ecuaciones (6) y (2), resulta

$$\frac{d[F]}{dt} = -kfo.[F] - ku.[F] = -(kfo + ku)[F] = -ke.[F]$$

$$ke = kfo + ku \quad (7)$$

Eliminando términos de la igualdad:

$$\frac{d[F]}{dt} = -ke.[F] \quad (8)$$

Integrando ambos miembros de la ecuación diferencial (8)

$$\int_{[F_0]}^{[F]} \frac{d[F]}{[F]} = -ke \int_0^t dt$$

Resolviendo:

$$\ln \frac{[F]}{[F_0]} = -ke.t \quad (9)$$

Donde [F] y [F₀] son las concentraciones plasmáticas de fluoruro a un dado tiempo y al tiempo inicial luego de la inyección endo-

venosa de NaF, respectivamente.

Reordenando la ecuación (9):

$$[F] = [F_0].e^{-ke.t} \quad (10)$$

Reemplazando la concentración inicial ([F₀]) por el cociente entre la dosis intravenosa (D₀) y el volumen de distribución (V_d), obtenemos

$$[F] = \frac{D_0}{V_d} e^{-ke.t} \quad (11)$$

Rectificando la ecuación (11)

$$\ln[F] = \ln \frac{D_0}{V_d} - ke.t \quad (12)$$

Con los datos de las concentraciones de fluoruro en plasma luego de la minidosis de NaF se obtienen los parámetros de la ecuación (12): su pendiente (ke) y su ordenada al

origen ($\ln \frac{D_0}{V_d}$). Dado que D₀ es conocido se

puede obtener el valor de V_d, por medio del valor de la ordenada al origen.

La variación de la concentración de fluoruro en orina: [U], luego de la dosis intravenosa de NaF está dada a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{d[U]}{dt} = ku.[F] \quad (13)$$

Reemplazando la ecuación (10) en (13) se obtiene

$$\frac{d[U]}{dt} = ku.[F_0].e^{-ke.t}$$

Resolviendo la ecuación anterior

$$\int_{[U_0]}^{[U]} d[U] = ku.[F_0] \int_0^t e^{-ke.t} .dt$$



Cuya solución es:

$$[U] - [U_0] = \frac{ku[F_0]}{ke} (1 - e^{-ke.t})$$

Como $[U_0]=0$

$$[U] = \frac{ku.D_0}{Vd.ke} (1 - e^{-ke.t}) \quad (14)$$

Luego de 24 hs de la mini dosis de NaF se puede considerar que el fluoruro no retenido en el hueso se ha excretado completamente por orina. Este tiempo es suficientemente largo como para considerarse a la excreción urinaria es a tiempo infinito ($[U]_\infty$). Por lo tanto la ecuación (14) resulta:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} [U] = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{ku.D_0}{Vd.ke} (1 - e^{-ke.t}) = [U]_\infty$$

Por lo tanto:

$$[U]_\infty = \frac{ku.D_0}{Vd.ke} \quad (15)$$

Reemplazando en la ecuación anterior los valores obtenidos de $[U]_\infty$ (a partir de la fluoruria luego de 24 post inyección), Vd (obtenido por medio de la ordenada al origen de la recta correspondiente a la ecuación 12), D_0 (mini dosis inyectada) y ke (pendiente de la recta de la ecuación 12) se obtiene ku. Con los valores obtenidos de ke y ku, y la ecuación (7) se obtiene kfo. Por medio de la ecuación (6) y la concentración de fluoruro basal se obtiene Fo. Finalmente, con el valor de la remodelación ósea (V_0) obtenido en la ecuación (3) y el valor de la formación ósea (F_0) se obtiene la medida de resorción ósea (R_0) por la ecuación.

$$V_0 = R_0 - F_0.$$

Referencias

1. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:191-220.
2. Parfitt AM. Bone histomorphometry: proposed system for standardization of nomenclature, symbols, and units. *Calcif Tissue Int* 1988; 42:284-6.
3. Delmas PD, Wahner HW, Mann KG, Riggs BL. Assessment of bone turnover in postmenopausal osteoporosis by measurement of serum bone Gla-protein. *J Lab Clin Med* 1983; 102:470-5.
4. Nobbs BT, Walker AW, Davies TJ. A simplified method for the estimation of urinary total hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 1975; 64:219-25.
5. Puche RC, Caferra DA, Rosillo I. Bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase measured with wheat germ agglutinin. *Clin Chem* 1988; 34:219-25.
6. Reeve J. Radiotracer methods for studying bone formation and its disorders. En: Osteoporosis (Christiansen C *et al.*, eds). Copenhagen; Dept of Clinical Chemistry, Glostrup Hospital, 1984; pp133-8.
7. Hyldstrup L, Mogesen N, Jensen GF, Transbolt I. Urinary ^{99m}Tc diphosphonate excretion as a simple method to quantify bone metabolism. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44:105-9.
8. Thomsen K, Rodbro P, Christiansen C. Bone turnover determined by urinary excretion of ^{99m}Tc diphosphonate in the prediction of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1987; 2:125-32.
9. Puche RC, Rigalli A, Trumper L, et al. Estimation of bone turnover in climacteric women by the whole body retention of fluoride. *Maturitas* 1991; 14:57-64.

10. Rigalli A, Ballina JC, Beinlich A, Alloatti R, Puche RC. Pharmacokinetic differences between sodium fluoride and sodium monofluorophosphate and comparative bone mass increasing activity of both compounds, in the rat. *Arzneimittelforschung* 1994; 44:762-6.
11. Rigalli A, Cabrerizo M, Beinlich A, Puche RC. Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. *Arzneimittelforschung* 1994; 44:651-5.
12. Rigalli A, Morosano M, Puche RC. Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or sodium monofluorophosphate to human volunteers. *Arzneimittelforschung* 1996; 46:531-3.
13. US Department of Health and Human Services. NIH Publication N° 86-23, revised 1985, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.
14. Canadian Council on animal care Guidelines. Guide to the care and use of experimental animal. Guide Vol. 1, 2nd Edition, 1993.
15. Gretz N, Strauch M. The remnant kidney model. En: Experimental and genetic rat models of chronic renal failure (Gretz N, Strauch M, eds.). Karger; Basel, 1993; pp 1-28.
16. Rigalli A, Pera LI, Di Loreto V, Brun LR. Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. Rosario; Editorial de la Universidad Nacional de Rosario, 2007; pp 65-9.

LA MUERTE DE LOS OSTEOCITOS: UNA SEÑAL PARA LA REMODELACIÓN DIRIGIDA

Teresita Bellido, Ph.D.

Professor of Anatomy and Cell Biology; Adjunct Professor of Medicine
Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA

Resumen

Desde hace largo tiempo se piensa que la red de osteocitos compara continuamente las deformaciones mecánicas actuales con los niveles usuales de las mismas, y dispara señales a osteoclastos y osteoblastos que resultan en ganancia o pérdida ósea, según se necesite. Mientras que los niveles fisiológicos de estimulación mecánica mantienen la masa ósea, niveles demasiado bajos o demasiado altos de deformación inducen resorción ósea. Un mecanismo por el cual los osteocitos pueden gatillar la resorción ósea es entrando en apoptosis. Niveles altos o bajos de carga mecánica llevan a una mayor prevalencia de apoptosis osteocitaria, que temporalmente precede y está espacialmente asociada con el reclutamiento de osteoclastos y subsiguiente aumento de la resorción ósea. Además, recientemente se ha demostrado una relación causa-efecto entre muerte de los osteocitos y resorción ósea. Usando un modelo de ablación osteocítica inducible en ratón transgénico, Tatsumi y col. demuestran que la apoptosis de osteocitos es suficiente para gatillar reclutamiento de osteoclastos y resorción ósea. Más aún, la respuesta osteoclastogénica a la falta de carga está ausente en los huesos de ratones depletados de osteocitos, confirmando que estas células son indispensables para la adaptación esquelética a la ingravidez. Debido a que la apoptosis de los osteocitos es inhibida no sólo por la estimulación mecánica sino también por los estrógenos y los bifosfonatos, estos hallazgos plantean la posibilidad de que la preservación de osteocitos viables contribuya a las propiedades anti-resortivas de dichos agentes.

Palabras clave: osteocitos - apoptosis - remodelación

Summary

OSTEOCYTE DEATH: A BEACON FOR TARGETED REMODELING

It has been long proposed that the osteocyte network continually compares present mechanical strains to usual levels of strain, and triggers signals to osteoclasts or osteoblasts resulting in bone loss or gain, as needed. Whereas physiological levels of mechanical stimulation maintain bone mass, too low or too high levels of strain induce bone resorption. One mechanism by which osteocytes may trigger bone resorption is by undergoing apoptosis. Either low or high levels of mechanical loading lead to increased prevalence of osteocyte apoptosis, which temporally precedes and is spatially associated with osteoclast recruitment and the subsequent increase in bone resorption.^{1,2} Moreover, a cause and effect relationship between osteocyte death and bone resorption has been recently demonstrated. Using a transgenic mouse model of inducible osteocyte ablation, Tatsumi *et al.*³ show that osteocyte apoptosis is sufficient to trigger osteoclast recruitment and bone resorption. Moreover, the normal osteoclastogenic response to unloading is missing in bones from osteocyte-depleted mice, confirming that osteocytes are indispensable for the skeletal adaptation to weightlessness. Because osteocyte apoptosis is inhibited not only by mechanical stimulation but also by estrogens and bisphosphonates, these

* Dirección postal: Division of Endocrinology, Dept. of Internal Medicine Indiana University School of Medicine. Indianapolis, USA. Correo electrónico: tbellido@iupui.edu



findings raise the intriguing possibility that preservation of osteocyte viability contributes to the anti-remodeling properties of these agents.

Key words: osteocytes - apoptosis - remodeling

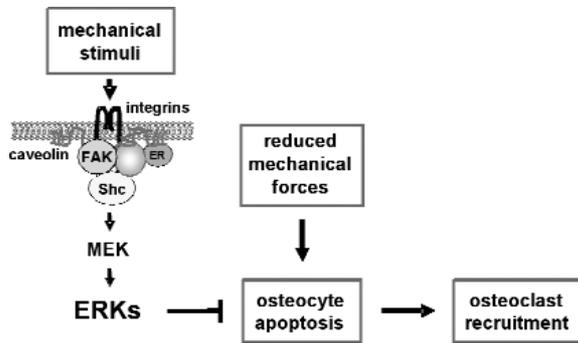
Regulation of the executive cells of bone remodeling by osteocytes – the sclerostin paradigm

Osteocytes are ideally positioned to be the means by which bone adapts in response to mechanical stimuli. Osteoblasts and osteoclasts that are present on bone only transiently, in low number, and in variable locations. Osteocytes, on the other hand, constitute more than 90 percent of cells in bone and are strategically distributed throughout the entire bone volume. In addition, osteocytes form a syncytium among themselves and with cells on the bone surface via cytoplasmic processes that radiate from their bodies and travel along canaliculi excavated in the mineralized matrix. This network is perfectly suited to sense and respond to both mechanical and systemic stimuli by generating signals that affect osteoblasts, osteoclasts, and their progenitors in the bone marrow. In spite of significant progress in our knowledge about osteocytes in recent years, the mechanisms by which these cells control the function of osteoblasts and osteoclasts are just starting to emerge. Sclerostin is the first, undisputable mediator of the communication between osteocytes and the executive cells of bone remodeling. Osteocytes but not other cells in bone express sclerostin – the product of the *Sost* gene that antagonizes the action of Wnts and BMPs.^{4,5} Evidence from human diseases and experimental animals indicates that sclerostin acts in a paracrine fashion to inhibit bone formation.^{4,6,7} Recently, it was shown that sclerostin expression is potently inhibited by two recognized stimuli that increase osteoblast number: parathyroid hormone and mechanical loading,⁸⁻¹⁰ thereby representing a novel mechanism of regulation of bone formation mediated by osteocytes.

Osteocyte apoptosis: regulation and consequences

That osteocytes perceive changes in the level of both physical stimuli as well as circulating factors is evidenced by studies on the regulation of their life span. Osteocytes are long-lived cells. However, like osteoblasts and osteoclasts, they die by apoptosis; and decreased osteocyte viability accompanies the bone fragility syndrome that characterizes glucocorticoid excess and estrogen withdrawal.¹¹⁻¹³ Conversely, preservation of osteocyte viability might explain at least part of the anti-fracture effects of bisphosphonates, which cannot be completely accounted for by changes in bone mineral density.¹⁴

Osteocyte apoptosis is also regulated by mechanical forces. Thus, mechanical stimulation of osteocytes protects them from the pro-apoptotic action of glucocorticoids, etoposide and other death inducers.^{15,16} Mechanistic studies indicate that the transduction of mechanical forces into intracellular signals is accomplished by molecular complexes assembled at caveolin-rich domains of the plasma membrane and composed of integrins, cytoskeletal proteins and kinases including the focal adhesion kinase FAK and Src, resulting in activation of the ERK pathway and osteocyte survival.¹⁵ *In vivo* mechanical stimulation also regulates osteocyte life span. Thus, increased prevalence of apoptotic osteocytes is found in unloaded bones¹ or in bones exposed to high levels of mechanical strain.² In both cases, increased apoptosis of osteocytes was observed before any evidence of increased osteoclast resorption. Moreover, apoptotic osteocytes in unloaded bones accumulated in areas that were subsequently removed by osteoclasts.¹ Taken together with the *in vitro* evidence, these findings had suggested that diminished mechanical forces eliminate signals that maintain viability, thereby leading to osteocyte apoptosis; and that dying osteocytes in turn become the beacons for osteoclast recruitment to the vicinity and the resulting increase in bone resorption (**Figure**).



A signalsome comprising integrins, cytoskeletal proteins and kinases, including the focal adhesion kinase FAK and Src, transduces physiological levels of mechanical stimulation into activation of the ERK pathway leading to osteocyte survival.¹⁵ Reduced mechanical stimulation eliminates kinase-mediated survival signaling, thereby leading to osteocyte apoptosis.¹ Apoptotic osteocytes, in turn, become the beacons for osteoclast recruitment and the resulting increase in bone resorption and bone loss.³

Recent work provides direct evidence that death of osteocytes is sufficient to recruit osteoclasts and to increase resorption. Tatsumi et al. generated transgenic (TG) mice expressing the diphtheria toxin receptor (DTR) under the control of the dentin matrix protein 1 (DMP1) promoter that is only active in osteocytes. DTR is normally not expressed in murine cells; therefore, osteocytes are the only cells sensitive to the toxin in these TG animals. A single injection of DT resulted in rapid induction of apoptosis of 70-80% of osteocytes; and this was followed by increased osteoclasts and loss of bone. These findings demonstrate that osteocyte apoptosis is sufficient to trigger osteoclast recruitment and bone resorption. Taken together with the evidence that osteocyte apoptosis is inhibited by estrogens and bisphosphonates,^{12,14} these findings also raise the intriguing possibility that preservation of osteocyte viability contributes to the anti-remodeling properties of these agents. Future research is required to directly test this stimulating hypothesis.

Osteocytes: primary culprits for the bone loss induced by physical inactivity

Mechanical loading is critical for the maintenance of bone mass; and skeletal unloading

as with reduced physical activity with old age, immobilization of bed rest, and total or partial motor paralyses, cause bone loss leading to disuse osteoporosis.¹⁷ Furthermore, the bone loss that ensues under microgravity conditions represents the most significant hindrance for long-term space flying.¹⁸ The rapid decrease in osteocyte viability with unloading had suggested that osteocytes are the first responders to the change in mechanical forces.¹ The results of Tatsumi *et al.*¹⁹ demonstrate that mice depleted from osteocytes are protected from the bone loss induced by tail suspension indicating that in the absence of osteocytes bones are unable to elicit the normal osteoclastogenic response. These findings confirm that osteocytes are the primary culprit of the negative bone balance that ensues with weightlessness.

In conclusion, the osteocyte ablation model revealed that osteocyte apoptosis is sufficient to initiate an osteoclastogenic response and that osteocytes are required for the skeletal adaptation to reduced mechanical forces. Whether living osteocytes continually produce molecules that restrain osteoclast recruitment or whether in the process of undergoing apoptosis osteocytes produce pro-osteoclastogenic signals remains to be determined. It is expected that intense investigations will take place in the near future attempting to identify the molecular mediators involved in the communication between osteocytes and osteoclasts.

(Recibido: enero de 2009.
Aceptado: febrero de 2009)

References

1. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Min Res* 2006; 21:605-15.
2. Verborgt O, Gibson G, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after



- fatigue in vivo. *J Bone Miner Res* 2000; 15:60-7.
3. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* 2007; 5:464-75.
 4. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 2003; 22:6267-76.
 5. Van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, et al. Sclerostin as an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 2004; 199:805-14.
 6. Balemans W, Van Hul W. Human genetics of SOST. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6:355-6.
 7. Ke HZ, Ominsky M, Li X, Simonet S, Lacey DL, Paszty C. Bone anabolism achieved by reducing sclerostin bioavailability with an anti-sclerostin antibody. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6:359-60.
 8. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 2008; 283:5866-75.
 9. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, et al. Chronic elevation of PTH in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* 2005; 146:4577-83.
 10. O'Brien CA, Plotkin LI, Galli C, et al. Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PLoS ONE* 2008; 3:32942.
 11. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids: potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 1998; 102:274-82.
 12. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001; 104:719-30.
 13. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3128-35.
 14. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999; 104:1363-74.
 15. Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289:C633-43.
 16. Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E. Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320:1163-8.
 17. Marcus R. Mechanisms of exercise effects on bone. In *Principles of Bone Biology* (JP Bilezikian, LG Raisz, GA Rodan, editors). Academic Press; San Diego, 2002. Pp 1477-88.
 18. Bikle DD, Halloran BP, Morey-Holton E. Spaceflight and the skeleton: lessons for the earthbound. *Gravit Space Biol Bull* 1997; 10:119-35.
 19. Kalajzic I, Braut A, Guo D, Jiang, et al. Dentin matrix protein 1 expression during osteoblastic differentiation, generation of an osteocyte GFP-transgene. *Bone* 2004; 35:74-82.

EL HUESO EN EL SÍNDROME DE TURNER

María Elena Peralta López,⁽¹⁾ Mirta Miras,⁽²⁾ Adriana Pérez,⁽¹⁾ Nori Tolosa de Talamoni⁽¹⁾

1) Laboratorio de Vitamina D y Metabolismo Fosfocálcico "Dr. Fernando Cañas",

Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

2) Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina.

Resumen

Las pacientes con síndrome de Turner presentan retardo en el crecimiento óseo, que determina una talla final muy inferior a la normal. Muestran anomalías óseas tales como metacarpianos cortos, *cubitus valgus*, *genu valgum*, deformidad de Madelung, micrognatia y paladar ojival, cuya etiología se atribuye a la delección heterocigota del gen *SHOX* debido a la ausencia total o parcial del cromosoma X. Esta haploinsuficiencia de *SHOX* podría también contribuir, junto con otros genes, a la hipomineralización ósea predominantemente cortical que presentan estas niñas, la cual se agudiza en la adolescencia y en la vida adulta, etapa en la que se añade hipomineralización del hueso trabecular, producto de la deficiencia estrogénica crónica. Estas alteraciones conducen a un incremento en el riesgo de fracturas. La administración de hormona de crecimiento mejora sustancialmente la talla final, mientras que la terapia de reemplazo hormonal es fundamental para la adquisición y el mantenimiento de la densidad mineral ósea.

Palabras clave: síndrome de Turner, gen *SHOX*, densidad mineral ósea, riesgo de fracturas, hormona de crecimiento, estrógeno

Summary

THE BONE IN TURNER SYNDROME

Turner syndrome patients show growth retardation which leads to a final height considerably lower than the average. Short metacarpals, cubitus valgus, genu valgum, Madelung's deformity, micrognatia and high arched palate are the result of the heterozy-

gous deletion of the SHOX gene due to the partial or total absence of one X chromosome. This haploinsufficiency of SHOX could also determine, together with other genes, the selective cortical bone deficiency of these girls, which is intensified during adolescence and adulthood because of the addition of trabecular hypomineralization as a consequence of estrogen deprivation. This defective mineralization leads to an increase in fracture risk. Growth hormone therapy improves final height whereas hormone replacement therapy is crucial for the acquisition and maintenance of bone mineral density.

Key words: Turner syndrome, *SHOX* gene, bone mineral density, fracture risk, growth hormone, estrogen

Introducción

El síndrome de Turner (ST) es uno de los trastornos cromosómicos más frecuentes en el ser humano: afecta a 1 de cada 2.500-3.000 recién nacidas vivas y se caracteriza por la ausencia total o parcial de un cromosoma X. Cerca del 50% de las pacientes presentan cariotipo 45,XO y el resto poseen cariotipo 45,XO/46,XX u otros mosaicos o una variedad de cromosoma X estructuralmente defectuosa. Esto determina la disgenesia ovárica, amenorrea primaria y, en consecuencia, el infantilismo generalizado característico en estas pacientes.¹ Es frecuente la presencia de anomalías congénitas en distintos órganos y sistemas, siendo las cardiovasculares las más serias. El sis-

* Dirección postal: Cosquín 1673, Barrio Jardín, (5014) Córdoba. Argentina.



tema músculo esquelético también se halla afectado. Estas pacientes presentan trastornos del crecimiento, que comienzan a manifestarse levemente en la vida intrauterina y que se agudizan notablemente en la infancia y en la etapa prepuberal.² Estas alteraciones llevan progresivamente a una de las

manifestaciones más frecuentes del ST que es la talla baja, presente en el 100% de las pacientes, y que suele acompañarse de malformaciones óseas características, así como también de trastornos de la mineralización ósea cuya etiología aún no ha sido completamente dilucidada (Tabla 1).

Tabla 1. Manifestaciones esqueléticas del Síndrome de Turner

ALTERACIONES ÓSEAS		FRECUENCIA (%)
Defectos en la mineralización ósea	Osteopenia/osteoporosis	50-80
	Riesgo de fracturas incrementado	—
Trastornos del crecimiento esquelético	Talla baja	100
	Edad ósea retardada	85
	Cuello corto	40
	Cúbito valgo	50
	Metacarpianos cortos	35
	Escoliosis	10
	Cifosis	10
	<i>Genu valgum</i>	35
	Micrognatia y paladar ojival	38
	Deformidad de Madelung	5
Luxación congénita de cadera	20	

Defectos en el crecimiento y desarrollo óseo

El retardo en el crecimiento esquelético y la talla baja presentes en las pacientes con ST suelen estar acompañados de otras anomalías óseas como metacarpianos cortos, *cubitus valgus*, *genu valgum*, deformidad de Madelung, micrognatia y paladar ojival, las cuales también se hallan presentes, con mayor o menor frecuencia, en otras patologías como el síndrome de Léri-Weill y la displasia mesomélica de Langer. Se ha detectado que estas últimas patologías son productos de diferentes deleciones del gen *SHOX*³ ubicado en la región pseudoautosómica PAR 1 cercana al telómero de los cromosomas sexuales. Dado que todas las pacientes con ST presentan deleción heterocigota de dicho gen por la ausencia total o parcial del cromosoma X, se sostiene que las anomalías

esqueléticas en el ST también son consecuencia de la haploinsuficiencia del gen *SHOX*.⁴

El gen *SHOX* codifica para un factor de transcripción SHOX que estaría involucrado, entre otras funciones, en el crecimiento y desarrollo óseo. Estudios de inmunohistoquímica mostraron su expresión en los condrocitos hipertróficos del cartílago de crecimiento humano fetal y puberal, lo que sugiere que podría regular la diferenciación de los condrocitos a este nivel. La insuficiencia de SHOX podría promover la proliferación atípica y la diferenciación defectuosa de los condrocitos, siendo de esta manera responsable del retardo de crecimiento y, por ende, de la baja talla, así como también de las anomalías esqueléticas del ST y demás patologías que muestran deleciones de *SHOX*.⁵

Defectos en la mineralización ósea

Osteopenia y osteoporosis secundaria

Ya en las primeras descripciones del ST se advertía, con llamativa frecuencia, la presencia de osteopenia radiográfica.⁶ Estudios más recientes evidencian una disminución significativa en la densidad mineral ósea (DMO) detectada por DXA en niñas, jóvenes y mujeres adultas con ST;^{7,8} sin embargo, esta metodología, por su naturaleza bidimensional, es notablemente influenciada por la talla baja, lo que podría conducir a una subestimación de la DMO en estas pacientes.⁹ Por esto se aconseja la valoración de la DMO por métodos independientes de la talla como el QCT (*Quantitative Computed Tomography*) o la DMO volumétrica (conversión de la densidad areal detectada por DXA), especialmente en pacientes con estatura inferior a 1,50 m.¹⁰

No obstante, aun después de realizar las correcciones correspondientes a la talla, se detectó en reiterados estudios –tanto por DXA como por QCT– osteopenia y osteoporosis en sitios con claro predominio de hueso cortical como el cuello de fémur y el tercio proximal del radio, lo que sugiere un déficit real y selectivo del hueso cortical en estas pacientes.¹¹⁻¹³ Este déficit cortical es evidente en las niñas, pero es más notorio en las pacientes adultas, lo que sugiere que podría estar relacionado con una deficiencia estrogénica o andrógena en el momento clave de adquisición de la masa ósea.¹³ En niñas sanas, los niveles de estrógenos experimentan una elevación característica antes y durante la pubertad, que favorece tanto la tasa de aposición ósea en endostio como la formación ósea periostica, lo que se traduce en un aumento del grosor de la cortical.¹⁴ La ausencia de pubertad espontánea y el inicio tardío de la terapia hormonal de reemplazo (THR) en las pacientes con ST impediría una formación normal del hueso cortical, el cual no mejora con la THR posterior.¹⁰ No se descarta que este déficit cortical pudiera producirse, al menos en parte, por la haploinsuficiencia de algún gen del cromosoma X como el gen *SHOX*, clave en el desarrollo y creci-

miento óseo¹⁵ o por algún defecto propio del tejido conectivo que podría justificar también la elevada mortalidad por disección aórtica en estas pacientes.¹⁶ Defectos en el metabolismo de la vitamina D podrían también participar en la patogénesis de la osteopenia en el ST. Gravholt et al.¹² reportaron la existencia de niveles normales o bajos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, disminución de 25OHD_3 e incremento de PTH, lo que sugiere una adecuada conversión de 25OHD_3 en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, pero quizás disminución en la captación del 25OHD_3 o menor ingesta de vitamina D. Además, las pacientes con ST presentan disminución de DMO trabecular, producto de la deprivación crónica y sostenida de estrógenos, que es más acuciante en pacientes que discontinúan la THR.¹⁷

Incremento en el riesgo de fracturas

Las pacientes con ST poseen un leve incremento en el riesgo de fracturas causadas por trauma de impacto alto a medio, que sería cercano al 25%, de acuerdo con un estudio llevado a cabo en Dinamarca.¹⁸ Este incremento del riesgo de fracturas muestra dos picos etarios bien destacados, el primero en la infancia, período en el que predominan ampliamente las fracturas del antebrazo, y el segundo, después de los 45 años.¹⁰ La existencia de estos dos picos etarios es reflejo de la complejidad etiológica del trastorno de la mineralización ósea que presentan estas pacientes, la cual obedece a un conjunto de factores que interactúan entre sí. La osteopenia/osteoporosis secundaria, anteriormente mencionada, podría llevar al aumento en el riesgo de fracturas después de los 45 años. La fragilidad ósea independiente de la DMO sería también otro factor de riesgo importante.^{9,19}

El pico de incremento en el riesgo de fracturas presente en la infancia podría estar determinado, al menos en parte, por un defecto primario de la formación ósea. La haploinsuficiencia de genes situados en el cromosoma X podría ser responsable de una alteración mecánica en el sistema esquelético de las pacientes con ST. Uno de los genes candidatos, como se mencionó



antes, es *SHOX*. Todos las pacientes con ST presentan haploinsuficiencia para esta región,²⁰ lo que explicaría la falta de correlación entre cariotipo y riesgo de fracturas.

Las pacientes con síndrome de Turner poseen reducción en el tamaño de huesos tales como los del antebrazo (-53%), las vértebras lumbares (-18%) y los de la cadera (2%),^{9,12} siendo un factor de riesgo de fracturas. La alteración de la geometría ósea también constituye otro factor de riesgo importante en el ST. Un estudio realizado por Nissen y col.²¹ detectó en fémur que el diámetro del cuello era mayor y el de la cabeza menor que en el grupo de controles sanas. Se desconoce si estos cambios podrían contribuir al incremento en el riesgo de fractura y, si fuera así, tampoco se conocen los mecanismos desencadenantes.

Por último, cabe destacar la mayor propensión de las pacientes con ST a las caídas, debido a cierto deterioro en la audición y el equilibrio,²² así como en la visión²³ y en la función cognitiva visuoespacial y en la motricidad.²⁴

Tratamiento hormonal: efectos sobre el hueso en ST

Hormona de crecimiento (GH)

La talla baja es el hallazgo más frecuente y uno de los problemas más preocupantes para las pacientes con ST.²⁵ Aquéllas que no reciben tratamiento alcanzan estaturas de alrededor de 20 cm por debajo de la media de las mujeres normales de su respectiva población.²⁶ A pesar de tener niveles séricos normales de GH, estas pacientes se benefician con la administración farmacológica de la hormona. Como lo demostró un estudio llevado a cabo en Canadá, el tratamiento con dosis moderadas de GH permite mejorar la talla final en aproximadamente unos 7 cm, aunque sin llegar a la estatura normal.²⁷ La respuesta individual a la GH está determinada por numerosos factores, entre los que se destacan la altura individual y la edad al inicio de la terapia, la altura de los padres, la duración y la dosis empleada.² Hamelin y col.²⁸ obtuvieron resultados que

sugieren que la impronta ligada al cromosoma X también podría jugar un rol de importancia en la respuesta al tratamiento, ya que observaron que la retención del cromosoma X materno se asocia a una mejor respuesta al tratamiento con GH, si se la compara con la de aquellas niñas que presentan intacto el cromosoma paterno. Esto podría estar determinado por polimorfismos en genes relacionados con el mecanismo de acción de la hormona, como el gen del receptor de GH entre otros.

La edad óptima para el inicio del tratamiento con GH no se ha establecido, y debe ser considerado tan pronto como el fallo de crecimiento se haga evidente. Se recomienda comenzar con una dosis de 0,375 mg/kg·sem, que será más efectiva si se aplica diariamente por la noche. Esta dosis puede adaptarse de acuerdo con la respuesta individual del paciente y sus niveles de IGF-I.²

El efecto de hormona de crecimiento sobre la DMO es menos claro y existen evidencias contradictorias al respecto. Algunos estudios encontraron efecto positivo de la GH sobre la DMO;²⁹ sin embargo, investigaciones más recientes no detectaron ningún efecto sobre la DMO cortical ni la trabecular.^{30,31}

Tratamiento de reemplazo hormonal

Si bien más del 20% de las pacientes con ST desarrollan pubertad espontáneamente,² la gran mayoría no lo hace, y es en este grupo en el que la inducción de la pubertad por medio del TRH es de gran importancia, ya que promueve el desarrollo oportuno de los caracteres sexuales secundarios, mejor funcionamiento psicosocial y adecuada adquisición del pico de masa ósea en las adolescentes.² El inicio, la dosis y la forma de dicha inducción puberal debe asemejarse lo más posible al proceso fisiológico. La administración oral de estrógenos es muy utilizada, sin embargo las vías transdérmica e inyectable parecieran ser alternativas más fisiológicas.² Bondy et al.² aconsejan el inicio temprano a la edad de 12 años con dosis bajas de estradiol (la décima parte de

la dosis de reemplazo en el adulto) y un aumento gradual en un período de 2 a 4 años, hasta alcanzar la dosis que garantiza niveles adecuados de estradiol en la mujer adulta (estradiol oral 2 mg/d; estradiol transdérmico 0,1 mg/d; cipionato de estradiol inyectable 2,5 mg/mes). Recomiendan postergar la combinación con progestágenos hasta la aparición del primer sangrado o 2 años posterior al inicio del tratamiento con estrógenos.

Conclusiones

Las pacientes con síndrome de Turner presentan retardo en el crecimiento óseo, y talla final muy inferior a la normal, que puede ser sustancialmente mejorada gracias al diagnóstico oportuno y al tratamiento adecuado con hormona de crecimiento. Las anomalías óseas tales como metacarpianos cortos, *cubitus valgus*, *genu valgum*, deformidad de Madelung, micrognatia y paladar ojival, se atribuyen a la delección heterocigota del gen *SHOX* causada por la ausencia total o parcial del cromosoma X. Esta haploinsuficiencia de *SHOX* podría contribuir, junto con otros genes, a la hipomineralización ósea, la cual se manifiesta en la infancia y se agudiza en la adolescencia y en la adultez, a consecuencia de la deficiencia estrogénica. La terapia de reemplazo hormonal es de gran importancia, tanto para la inducción puberal como para el mantenimiento de niveles estrogénicos adecuados y, contribuye a la adquisición y al mantenimiento de la densidad mineral ósea. El estudio de genes relacionados con el hueso, tanto en el cromosoma X como en otros cromosomas, sería importante a los fines de dilucidar la etiología de la reducción de la DMO en estas pacientes y posiblemente orientar la prevención y el tratamiento en este sentido.

Agradecimientos: El presente trabajo se financió con fondos de FONCYT (PICT2005-32464), CONICET (PIP 2005/6) y SECYT (UNC). La Dra. Nori Tolosa de Talamoni es Investigadora de Carrera del Consejo Nacional de Investigación Científica (CONICET-

Argentina). La Méd. María Elena Peralta López es Becaria Doctoral de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba. (SECYT-UNC)

(Recibido: octubre de 2008. Aceptado: noviembre de 2008)

Referencias

1. Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. *N Engl J Med* 2004; 351:1227-38.
2. Bondy CA; Turner Syndrome Study Group. Care of girls and women with Turner syndrome: A guideline of the Turner Syndrome Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:10-25.
3. Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, et al. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of *SHOX* haploinsufficiency. *J Med Genet* 2007; 44:306-13
4. Leka SK, Kitsiou-Tzeli S, Kalpini-Mavrou A, Kanavakis E. Short stature and dysmorphism associated with defects in the *SHOX* gene. *Hormones* 2006; 5: 107-18.
5. Marchini A, Marttila T, Winter A et al. The short stature homeodomain protein *SHOX* induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 103-14.
6. Turner HH. A syndrome of infantilism, congenital webbed-neck and cubitus valgus. *Endocrinology* 1938; 23: 566-74.
7. Shore RM, Chesney RW, Mazess RB, Rose PG, Bargman GJ. Skeletal demineralization in Turner's Syndrome. *Calcif Tissue Int* 1982; 34:519-22.
8. Landin-Wilhelmsen K, Bryman I, Windh M, Wilhelmsen L. Osteoporosis and fractures in Turner Syndrome-importance of growth pro-



- moting and oestrogen therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; 51: 497-502.
9. Bakalov VK, Chen ML, Baron J, *et al.* Bone mineral density and fractures in Turner Syndrome. *Am J Med* 2003; 115: 259-64.
10. Bakalov VK, Bondy CA. Fracture risk and bone mineral density in Turner syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 2008; 9:145-51.
11. Bechtold S, Rauch F, Noelle V, *et al.* Musculoskeletal analyses of the forearm in young women with Turner syndrome: a study using peripheral quantitative computed tomography. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5819-23.
12. Gravholt CH, Lauridsen AL, Brixen K, Mosekilde L, Heickendorff L, Christiansen JS. Marked disproportionality in bone size and mineral, and distinct abnormalities in bone markers and calcitropic hormones in adult turner syndrome: a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2798-808.
13. Bakalov VK, Axelrod L, Baron J *et al.* Selective reduction in cortical bone mineral density in turner syndrome independent of ovarian hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5717-22.
14. Sumnik Z, Land C, Coburger S, *et al.* The muscle-bone unit in adulthood: influence of sex, height, age and gynecological history on the bone mineral content and muscle cross-sectional area. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6: 195-200.
15. Gravholt CH. Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005; 49: 145-56.
16. Rubin K. Turner Syndrome and Osteoporosis: Mechanisms and prognosis. *Paediatrics* 1998; 102: 481-5.
17. Hanton L, Axelrod L, Bakalov V, Bondy CA. The importance of estrogen replacement in young women with Turner syndrome. *J Womens Health (Larchmt)* 2003; 12: 971-7.
18. Gravholt CH, Vestergaard P, Hermann AP, Mosekilde L, Brixen K, Christiansen JS. Increased fracture rates in Turner's syndrome: a nationwide questionnaire survey. *Clin Endocrinol* 2003; 59: 89-96.
19. Zuckerman-Levin N, Yaniv I, Schwartz T, Guttman H, Hochberg Z. Normal DXA bone mineral density but frail cortical bone in Turner's syndrome. *Clin Endocrinol* 2007; 67: 60-4.
20. Marchini A, Rappold G, Schneider KU. SHOX at a glance: from gene to protein. *Arch Physiol Biochem* 2007; 113: 116-23.
21. Nissen N, Gravholt CH, Abrahamsen B, *et al.* Disproportional geometry of the proximal femur in patients with Turner syndrome: a cross-sectional study. *Clin Endocrinol* 2007; 67: 987-03.
22. Han TS, Cadge B, Conway GS. Hearing impairment and low bone mineral density increase the risk of bone fractures in women with Turner's syndrome. *Clin Endocrinol* 2006; 65: 643-7.
23. Brunnerová R, Lebl J, Krásný J, Průhová S. Ocular manifestations in Turner's syndrome. *Cesk Slov Oftalmol* 2007; 63: 76-84.
24. Holzapfel M, Barnea-Goraly N, Eckert MA, Kesler SR, Reiss AL. Selective alterations of white matter associated with visuospatial and sensorimotor dysfunction in turner syndrome. *J Neurosci* 2006; 26: 7007-13.
25. Sutton EJ, McInerney-Leo A, Bondy CA, Gollust SE, King D, Biesecker B. Turner syndrome: four challenges across the lifespan. *Am J Med Genet A* 2005; 139: 57-66.
26. Baxter L, Bryant J, Cave CB, Milne R. Recombinant growth hormone for children

- and adolescents with Turner syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (1): CD003887.
27. Stephure DK; Canadian Growth Hormone Advisory Committee. Impact of growth hormone supplementation on adult height in turner syndrome: results of the Canadian randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3360-6.
28. Hamelin CE, Anglin G, Quigley CA, Deal CL. Genomic imprinting in Turner syndrome: effects on response to growth hormone and on risk of sensorineural hearing loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3002-10.
29. Sas TC, de Muinck Keizer-Schrama SM, Stijnen T, *et al*; Dutch Advisory Group on Growth Hormone. Bone mineral density assessed by phalangeal radiographic absorptiometry before and during long-term growth hormone treatment in girls with Turner's syndrome participating in a randomized dose-response study. *Pediatr Res* 2001; 50: 417-22.
30. Ari M, Bakalov VK, Hill S, Bondy CA. The effects of growth hormone treatment on bone mineral density and body composition in girls with turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:4302-5.
31. Aycan Z, Cetinkaya E, Darendeliler F, *et al*. The effect of growth hormone treatment on bone mineral density in prepubertal girls with Turner syndrome: a multicentre prospective clinical trial. *Clin Endocrinol* 2008; 68: 769-72.
32. Pasquino AM, Passeri F, Pucarelli I, Segni M, Municchi G. Spontaneous pubertal development in Turner's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1810-3.

Avances en Terapéutica: Informe sobre la 30ª Reunión Anual de la American Society for Bone and Mineral Research *

12-16 de septiembre de 2008; Montreal (Quebec), Canadá.

Ego Seeman

Austin Health, University of Melbourne; Melbourne, Australia

Este informe resume los avances terapéuticos presentados en la última reunión anual de la ASBMR. Hubo mucha información, que no ha sido aún revisada por pares, de modo que las inferencias son tentativas.

Denosumab

Los resultados de un estudio fase 3, al azar, doble-ciego, revelaron una reducción en el riesgo de fracturas vertebrales, de cadera y no vertebrales.¹ 7.808 mujeres con osteoporosis fueron aleatorizadas a placebo o tratamiento con denosumab (DMAb) por 3 años. El riesgo de fractura se redujo en la columna vertebral (70%), en sitios no vertebrales (20%) y en la cadera (41%). El diseño y la ejecución del estudio fueron excelentes; 83% de los participantes completaron el estudio y el análisis de intención-de-tratar. No se presentaron eventos adversos serios. Tenemos un nuevo tratamiento para la osteoporosis.

Otro estudio informó que el DMAb y el alendronato (ALN) redujeron los índices de remodelación en monos, y que la transición de ALN a DMAb redujo todavía más la remodelación.² La porosidad cortical (costillas, diáfisis tibial) se redujo con DMAb y con ALN-DMAb, pero no con ALN solo. La carga pico soportada por fragmentos trabeculares de L5-6 fue mayor en los grupos DMAb y ALN-DMAb que en los controles, pero no con ALN continuo. La porosidad cortical es una causa importante de fragilidad ósea, y hasta el momento ninguna droga había demostrado reducirla. El DMAb es un poderoso supresor de la remodelación, pero sus efectos son rápidamente reversibles, lo que significa que la adherencia al tratamiento resultará crítica.

SERMS y Fracturas No Vertebrales

Después de un buen tiempo, la cuestión de si un SERM puede reducir las fracturas no vertebrales está resuelta: sí puede. Los

efectos del lasofoxifeno (LASO) fueron investigados en 8.556 mujeres que participaron en el estudio PEARL (*Postmenopausal Evaluation And Risk-reduction with LASO*). Comparado con placebo, LASO a 0,25 y 0,5 mg/d redujo las fracturas vertebrales en 31% y 42%, respectivamente ($P < 0,002$).³ La dosis de 0,5 mg disminuyó el riesgo de fractura no vertebral en 22% ($P = 0,02$); la disminución fue 14% con 0,25 mg/d ($P = \leq n.s.$). LASO a 0,25 mg/d y 0,5 mg/d redujo el riesgo de cáncer de mama ER+ en 84% y 67%, respectivamente, y también el riesgo de ACV (-36%), pero aumentó el riesgo de eventos tromboembólicos venosos. Ocurrieron dos casos de cáncer endometrial en el grupo placebo, dos en el grupo LASO-0,25 mg, y uno en el grupo LASO-0,5 mg. Sofocos, calambres musculares, flujo vaginal, candidiasis, pólipos uterinos y prolapso ocurrieron con mayor frecuencia con LASO, mientras que lumbalgia, insomnio, hiperlipemia, hipertensión y gastritis fueron menos frecuentes que con placebo.

Bazedoxifeno redujo el riesgo de fracturas vertebrales en un reciente ensayo fase 3. Se realizó un análisis *post hoc* de la incidencia de fracturas no vertebrales en mujeres con mayor riesgo de fractura en ese estudio (*T-score* en cuello femoral $\leq -3,0$ y/o ≥ 1 fracturas vertebrales moderadas o ≥ 2 fracturas vertebrales leves; $n = 1.772$).⁴ Los resultados mostraron tasas de fracturas no vertebrales de 4.9%, 6.5%, 8.4%, y 9.1% con bazedoxifeno 20 mg y 40 mg, raloxifeno 60 mg, y placebo, respectivamente. Bazedoxifeno a 20 mg/d redujo la incidencia de fracturas no vertebrales en comparación con placebo y con raloxifeno a 60 mg/d. Estos resultados son interesantes, pero los análisis

Artículo original publicado en *IBMS BoneKEy*. 2009; 6(1):36-43. Reproducido con permiso del Editor.



sis *post hoc* sirven para generar hipótesis, no para probarlas.

Anticuerpo Antiesclerostina

La esclerostina, un producto del gene *SOST* en osteocitos, inhibe la formación ósea. La sobrecarga disminuye la expresión de esclerostina, facilitando así la formación de hueso, mientras que el desuso hace lo opuesto. Un estudio informó que el anticuerpo antiesclerostina aumentó la formación ósea y disminuyó la resorción en hueso trabecular de metafisis tibial de ratas castradas.⁵ El anticuerpo aumentó el cociente BV/TV a todas las dosis (2.5, 5, 10, y 25 mg/kg). Los aumentos ocurrieron en la superficie de mineralización, la tasa de aposición y la tasa de formación ósea. El cociente superficie erosionada/superficie ósea total disminuyó a todas las dosis.

Otro estudio informó que los anticuerpos antiesclerostina, administrados a ratas macho cuyo tren posterior estaba inmovilizado, previnieron tanto el aumento de la resorción ósea como la disminución en la tasa de aposición mineral y en la formación ósea inducidas por la inmovilización.⁶ No sólo se revirtieron los efectos de la misma, sino que el tratamiento aumentó BV/TV, Tb.Th, superficie de mineralización, MAR y BFR/BS con respecto a los controles. Sólo el tiempo y las experiencias en seres humanos dirán si se ha hecho realidad el sueño de “disminución de la resorción – aumento de la formación ósea”.

La interrupción del tratamiento con anticuerpo antiesclerostina en ratas llevó a revertir los beneficios derivados del mismo.⁷ Esto es interesante por la misma razón que el cese del tratamiento con PTH lleva a la pérdida de los efectos anabólicos a menos que se administre un agente antirresortivo. No sabemos por qué ocurre esto, ya que los autores no informaron sobre los marcadores del recambio óseo en las ratas tratadas, o sobre la histomorfometría en ratas post-esclerostina.

El anticuerpo antiesclerostina se comparó con ALN para determinar si se amortiguaba el efecto anabólico, como se ve cuando se administra PTH a pacientes tratados con ALN, pero esto no se comprobó.⁸ En ratas castradas tratadas por 3,5 meses, el ALN

dado por 6 semanas previno la pérdida ósea. El anticuerpo antiesclerostina evitó la pérdida de hueso trabecular y restauró el volumen óseo trabecular, la arquitectura y el área cortical de las vértebras a los niveles testigo. Los resultados obtenidos con ALN y con anticuerpo no difirieron, de modo que no se dio una amortiguación del efecto beneficioso del anticuerpo antiesclerostina en ratas castradas. Se informó aumento de la superficie de mineralización y de las tasas de aposición mineral y de formación ósea, tanto en la superficie perióstica como en la endocortical de la diáfisis tibial.

Hormona Paratiroidea

Las respuestas de la DMO y los marcadores del recambio óseo se amortiguan cuando se administra PTH a individuos tratados con ALN. La PTH(1-34) aumentó de modo similar los índices histomorfométricos del remodelado en 38 mujeres que cesaron ALN y en 28 mujeres que nunca lo habían recibido.⁹ Las biopsias basales mostraron remodelado inhibido, pero el aumento porcentual post-PTH fue mayor, excepto por las superficies de mineralización, que permanecieron por debajo de los niveles vistos en mujeres no tratadas. Los autores infieren que la respuesta celular a la PTH ocurre, pero que la tasa de aparición de nuevas unidades de remodelación está disminuida.

Se examinó el mecanismo celular responsable de la amortiguación del efecto anabólico de la PTH en sujetos pretratados con bifosfonatos.¹⁰ En mujeres tratadas con ALN, la tasa de aposición mineral aumentó casi al doble que en mujeres no tratadas, pero la tasa basal de aposición era menor en las primeras. El perímetro mineralizado aumentó en ambos grupos, pero menos en el grupo ALN, en el que también se observó una disminución basal de este parámetro. La PTH(1-34) estimula la formación de nuevo hueso, pero la limitación de la superficie activa de remodelación amortigua su efecto.

Se informó que la calcitonina atenúa el efecto anabólico de la PTH *in vivo* e hiperregula la expresión de esclerostina.¹¹ Ratas de 3 semanas de edad fueron tratadas con hPTH(1-34) [30 µg/kg] y 0,5 µg/kg de calcitonina de salmón (sCT) para inhibir la activa-

ción de osteoclastos sin un efecto prolongado sobre la resorción. El efecto anabólico de la PTH resultó frenado, con una reducción de la supresión del mRNA de esclerostina inducido por PTH, y necesaria para el efecto anabólico de ésta. La sCT redujo el mRNA de otros productos génicos de los osteocitos, incluyendo MEPE y DMP-1. La calcitonina puede promover la producción de esclerostina, amortiguando el efecto anabólico de PTH.

Se mostró la eficacia antifractura de la PTH(1-34) *versus* ALN en terapia corticosteroidea durante 3 años.¹² Menor número de pacientes tratados con PTH(1-34) tuvieron nuevas fracturas vertebrales radiográficas (3/173; 1,7%) comparados con los que recibieron ALN (13/169; 7,7%) [p=0,007]. La incidencia de fracturas no vertebrales no resultó diferente [PTH(1-34) 16/214 (7,5%), ALN 15/214 (7,0%)]. Se presentaron resultados de la aplicación transdérmica (TD) de hPTH(1-34) en 48 mujeres postmenopáusicas sanas con 65 años de edad promedio, aleatorizadas para recibir 50, 70, ó 90 µg TD, o una dosis diaria SC de 20 µg.¹³ La hPTH (1-34) era medible en suero durante 1,5-3,5 horas más luego de la dosificación TD que luego de la inyección SC de 20 µg. La biodisponibilidad de la hPTH(1-34) TD fue ~40% comparada con la inyección SC. Después de 6 días de tratamiento con hPTH(1-34), el PINP sérico aumentó en ambos grupos.

Ácido Zoledrónico

El ácido zoledrónico (ZOL) dado a pacientes que han sufrido recientemente una fractura de cadera se ha asociado con una mortalidad 28% más baja. La reducción absoluta es mayor en varones que en mujeres (6,4% vs. 2,8%) y se han reportado menos muertes cardíacas (2,9% vs. 7,7%).¹⁴ Las fracturas subsiguientes aumentaron el riesgo de muerte en 72%, pero sólo 2% más de la asociación general entre tratamiento y mortalidad pudo explicarse por fracturas ulteriores, de modo que las causas de la reducción en la mortalidad quedan sin aclararse.

Un estudio reportó que el ZOL reduce la intensidad del remodelado, y que la disminución de los marcadores de la remodelación ósea –pero no los aumentos en la DMO–

predicen la reducción del riesgo de fractura.¹⁵ Una disminución del P1NP de 1 desvío estándar a 12 meses se asoció con una reducción del riesgo de fractura de 34% (cualquier fractura clínica), 27% (fracturas no vertebrales), 64% (fracturas de cadera) y 40% (fracturas morfométricas). ¿Qué combinación de indicadores sustitutos de la resistencia ósea puede dar cuenta del restante ~50-60% en la reducción del riesgo?

Bifosfonatos y Propiedades Tisulares

Se informó que 32 pacientes que tomaban ALN y 13 que tomaban risedronato (RIS) desde hacía 3-12 años (media 6,5) tenían mayor densidad mineral tisular que testigos (ALN 1,13 ± 0,07; RIS 1,10 ± 0,07; controles 1,09 ± 0,08; placebo 1,07 ± 0,06) pero menor densidad mineral tisular que pacientes tomando ALN por 3 años (1,19 ± 0,06).¹⁶ No había diferencias por tratamiento. Los autores infieren que la mineralización tisular aumenta durante los primeros 3 años de terapia y declina luego a pesar de la persistencia de la baja tasa de remodelación. Los datos son difíciles de interpretar por el escaso tamaño de los grupos.

En comparación con controles, el hueso trabecular de pacientes tratados con ALN por dos años tenía doble acumulación de pentosidina.¹⁷ No se observaron cambios en el hueso cortical. La acumulación era mayor con mayor supresión del remodelado (reflejada por la frecuencia de activación, la tasa de formación ósea, y las superficies de mineralización). La contribución de estos cambios a la resistencia ósea general y sus efectos sobre los cambios estructurales y cambios en el mineral tisular todavía queda por determinarse.

En biopsias óseas de 8 mujeres con bajo recambio tratadas con ALN por más de 5 años y de 8 testigos se halló una asociación entre la supresión del remodelado y la viabilidad de los osteocitos.¹⁸ Los pacientes tratados tenían más lagunas vacías y una reducida densidad de osteocitos, y más heterogeneidad en la distribución de estas células, debido a mayor número de trabéculas sin osteocitos. La reducción de osteocitos puede reducir la detección de daños y la remoción del tejido defectuoso, y puede ser en sí una forma de daño, ya que aumentaría



la dureza del tejido que rodea a las lagunas vacías, formando una región propensa a microfracturas, debido a que no puede absorber energía.

Bifosfonatos y Rapidez de Comienzo de Acción

Se examinaron conejas de 4 meses tratadas con vehículo (VEH), RIS a dosis baja o alta (1,2 ó 2,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$), o ALN (2,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por vía SC 3 veces por semana durante 5 semanas.¹⁹ Con relación a la cantidad de superficie marcada en la 1ª semana, hubo menor porcentaje de superficie marcada a la 2ª y 3ª semanas en los grupos RIS 1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (-8%) y RIS 2,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (-11%) comparados tanto con VEH como con ALN; no hubo diferencias entre VEH y ALN. A las 4 semanas, sólo el grupo RIS 1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ resultó diferente de VEH y ALN. RIS tiene un comienzo de acción más rápido -en cuanto a inhibir el remodelado en hueso trabecular vertebral- que ALN.

Se estudiaron perras *beagle* intactas de 1 año de edad tratadas por 3 meses con VEH, ALN 0,2 mg/kg.día o ZOL 0,06 mg/kg.mes.²⁰ El remodelado óseo intracortical se redujo con ZOL en el hueso alveolar de la mandíbula (-92%), el hueso no alveolar mandibular (-83%) y en las costillas (-85%), en comparación con VEH. Estas reducciones de la remodelación en animales tratados con ZOL también eran más profundas que con ALN en los tres sitios estudiados (-56%, -55%, and -57%, respectivamente). Los niveles de remodelado intracortical no eran diferentes entre ALN y VEH en ninguno de los sitios, y no hubo diferencia en el número de osteones tibiales marcados en ninguno de los grupos tratados.

Vitamin D: Meta-Análisis

Cuando los estudios no están bien diseñados como para producir respuestas, recurrimos a un meta-análisis; éste es el caso de los estudios sobre vitamina D, calcio, o ambos. Un meta-análisis de la eficacia de la vitamina D en la prevención de fracturas no vertebrales y de cadera en individuos mayores de 65 años incluyó 12 ensayos aleatorizados controlados (EACs) para fracturas no

vertebrales (n = 42.279) y 8 EACs para fracturas de cadera (n = 40.886);²¹ dio un riesgo relativo (RR) de 0,86 (IC 95%: 0,77-0,96) para las primeras, y de 0,91 (IC 95%: 0,78-1,05) para las segundas. Con mayores dosis, el RR conjunto para cualquier fractura no vertebral en 9 estudios fue de 0,80 (IC 95%: 0,72-0,89; n = 33.265), y el RR conjunto para fractura de cadera en 5 estudios fue 0,82 (IC 95%: 0,69-0,97; n = 31.872). Para las dosis mayores, la reducción en fracturas no vertebrales fue significativo tanto en sujetos viviendo en la comunidad (-29%) como en los institucionalizados (-15%), independientemente de la suplementación cálcica.

Ranelato de estroncio

El ranelato de estroncio (RE) reduce el riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales, pero el mecanismo responsable de este efecto no se comprende completamente. Se ha informado previamente que el RE induce replicación y diferenciación, y además mayor supervivencia, de osteoblastos humanos primarios (HOBs). Después del tratamiento durante 24 horas, el RE 2 mM aumentó la expresión del mRNA de OPG en forma dosis-dependiente, hasta 1,9 veces.²² La secreción de OPG fue hiperregulada, mientras que la expresión del mRNA de RANKL disminuyó 75% después del tratamiento con RE, y la expresión de RANKL en la superficie de los HOBs también fue hiporregulada. Mediante el *knock-down* del receptor-sensor de calcio (CaSR) se disminuyó el efecto estimulador en hasta 46%. El aumento en la producción de OPG, y la menor producción de RANKL en la superficie osteoblástica respalda la noción de un efecto potencial indirecto inhibitorio de la osteoclastogénesis, pero no se obtuvo una demostración directa de esto. El CaSR puede participar en el aumento de la replicación de osteoblastos y en la apoptosis de osteoclastos inducida por el RE.

Otro estudio informó que el RE mejora la osteointegración de implantes.²³ Se trataron ratas con RE (625 mg/kg, 5/7 días, n=15), ALN (18 $\mu\text{g}/\text{kg.d}$, 2/7 días, n=15, control positivo) o vehículos (n=15) por 8 semanas. Los grupos control, RE y ALN tenían fuerza de extracción del implante (N) de 32.5, 43.5, y 48.4; dureza del hueso trabecular (mPa) 624, 721 y 654; y dureza del hueso

cortical de 837.3, 918.5 y 822.8, respectivamente. RE y ALN aumentaron la fuerza de extracción, y ambos agentes influenciaron positivamente la microarquitectura, pero la calidad intrínseca del tejido óseo mejoró con RE, no con ALN. La marcación con tetraciclina a lo largo del implante se vio con RE, pero no con ALN.

También se halló que el RE promueve la proliferación de células osteoblásticas murinas en parte a través de la activación del CaSR.²⁴ Se estudiaron pre-osteoblastos de calotas de ratones *CaSR(+/+)* y *CaSR(-/-)*. La IL-1, aumentó la apoptosis tanto en osteoblastos *CaSR(+/+)* como *CaSR(-/-)*. El RE (1-5 mM) amortiguó la apoptosis inducida por IL-1, o TNF· en ambos tipos de osteoblastos y aumentó también en ambos los niveles de fosfo-PI3K y fosfo-Akt, sugiriendo el compromiso de estas cascadas de señalización pro-sobrevivencia en el efecto anti-apoptótico. El CaSR no es esencial para el efecto anti-apoptótico del RE.

Otros Agentes

LRP5 y 6 son co-receptores para ligandos de Wnt y se unen a proteínas inhibitorias Dickkopf (DKK). Los anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-DKK1 bloquearon la interacción receptor-ligando, neutralizaron la función de DKK1 en la diferenciación osteoblástica y bloquearon la inhibición inducida por DKK1 de la señalización Wnt, resultando en aumentos de la DMO femoral de ratones jóvenes; y en neoformación ósea en superficies endocorticales trabeculares y aumento del P1NP sérico en ratones adultos.²⁵

1.389 hombres con cáncer de próstata fue asignados al azar para recibir 80 mg de toremifeno o placebo una vez al día por 24 meses.²⁶ Todos los pacientes habían estado en terapia de deprivación androgénica durante 36 meses. Se observó una reducción del 54% en nuevas fracturas vertebrales morfométricas ($p < 0,04$) en la población por intención-de-tratar.

El odanacatib (ODN) es un inhibidor selectivo de la catepsina K. Se informó que ODN incrementa la resistencia ósea en monas estrógenodeficientes.²⁷ La DMO fue mayor en monas tratadas con ODN que en las controles castradas, sugiriendo capacidad de prevenir la pérdida ósea. Las mediciones de

la resistencia ósea también se mantuvieron. También se presentaron resultados de un estudio en el cual se trataron conejos por 28 semanas con ODN.²⁸ El tratamiento usando ODN y ALN previno la pérdida ósea inducida por castración. El cociente BV/TV de L3 fue mayor (+13,4%, $P < 0,05$) con ODN vs. OVX ($P < 0,04$). La relación MS/BS fue menor con ALN comparada con OVX pero fue la misma o mayor que en castradas con ODN. La inhibición de la catepsina K fue acompañada por una formación ósea no inhibida, mientras que el ALN se asoció a inhibición de la misma.

Finalmente, se informó que ratones transgénicos que expresan constitutivamente receptores activos de PTH/PTHrP en células de estirpe osteoblástica (PPR*Tg) tienen mayor número de osteoclastos en hueso trabecular, y mayor porosidad cortical.²⁹ Ratones PPR*Tg de 3 meses que recibieron OPG-Fc exhibieron menor número de osteoclastos (-80%), mientras que ALN y ZOL no causaron reducciones. Todos los tratamientos causaron aumentos de casi el doble en el volumen del hueso trabecular. OPG-Fc impidió la fibrosis de la médula ósea, mientras que ALN o ZOL redujeron la fibrosis en 54% y 55%, respectivamente. Además, OPG-Fc impidió el aumento x10 en la porosidad cortical de ratones PPR*Tg. El ALN redujo la porosidad cortical en 39% ($p < 0,05$ vs. VEH), mientras que el ZOL no causó reducción en la porosidad. Sólo la OPG causó marcada disminución del número de osteoclastos, y total inhibición tanto de la fibrosis medular como de la porosidad cortical.

Conflicto de intereses: El Dr. Seeman informa que es miembro de consejos consultivos de Sanofi-Aventis, Eli Lilly, Merck Sharp & Dohme, Novartis, y Servier, y que ocasionalmente da conferencias en simposios para estas compañías.

Revisión: Este artículo ha sido sometido a revisión por pares.

Traducción del inglés: Dr. Ariel Sánchez.

Referencias

1. Cummings SR, McClung MR, Christiansen C, Siris E, Adami S, Kutilek S, Reid IR,



- Zanchetta JR, San Martin J, Libanati C, Sidhanti S, Wang A, Delmas PD. A phase III study of the effects of denosumab on vertebral, nonvertebral, and hip fracture in women with osteoporosis: results from the FREEDOM trial. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S80. [Abstract]
2. Ominsky MS, Jolette J, Smith SY, Vlasseros F, Samadfam R, Kostenuik PJ. Transition from alendronate to denosumab resulted in further reductions in local and systemic bone turnover parameters and reduced cortical porosity in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S61. [Abstract]
 3. Cummings SR, Eastell R, Ensrud K, Reid DM, Vukicevic S, LaCroix A, Sriram U, Thompson D, Thompson JR, Delmas PD. The effects of lasofoxifene on fractures and breast cancer: 3-year results from the PEARL trial. *J Bone Miner Res* 2008; 23 (Suppl 1):S81. [Abstract]
 4. Silverman SL, Christiansen C, Genant HK, Zanchetta JR, Vukicevic S, Valter I, de Villiers TJ, Ciesielska M, Chines AA. Efficacy of bazedoxifene in reducing the incidence of nonvertebral fractures in postmenopausal osteoporotic women at higher fracture risk. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S472. [Abstract]
 5. Li X, Chen HY, Warmington K, Liu XQ, Niu QT, Thway T, Stouch B, Grisanti M, Tan H, Simonet WS, Paszty C, Jee WS, Ke HZ. Anti-sclerostin antibody increases bone formation and decreases bone resorption in distal tibial metaphyseal trabecular bone in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S120-121. [Abstract]
 6. Jee WS, Li X, Tian XY, Paszty C, Ke HZ. Anti-sclerostin antibody increases bone mass by stimulating bone formation and inhibiting bone resorption in a hindlimb-immobilization rat model. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S40. [Abstract]
 7. Li X, Warmington K, Niu QT, Grisanti M, Tan H, Dwyer D, Stolina M, Simonet WS, Kostenuik PJ, Paszty C, Ke HZ. Increases in BMD observed with antisclerostin antibody treatment are reversible: a longitudinal ovariectomized rat study. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S60. [Abstract]
 8. Li X, Warmington K, Niu QT, Asuncion F, Grisanti M, Dwyer D, Tan H, Simonet WS, Ominsky M, Stolina M, Kostenuik PJ, Paszty C, Ke HZ. Effects of cotreatment with an anti-sclerostin monoclonal antibody and alendronate in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S60. [Abstract]
 9. Stepan JJ, Dobnig H, Burr DB, Li J, Ma YL, Sipos A, Petto H, Pavo I. Histomorphometric changes by teriparatide in alendronate pre-treated women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S6-7. [Abstract]
 10. Lindsay R, Cosman F, Bostrom M, Zhou H, Nieves J, Dempster DW. Histomorphometric and biochemical bone formation responses to first and second cycles of teriparatide treatment. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S48. [Abstract]
 11. Gooi JH, Pompolo S, McGregor NE, Walker E, Gillespie MT, Quinn JW, Martin TJ, Sims NA. Calcitonin attenuates the anabolic effect of PTH in vivo and rapidly upregulates sclerostin expression. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S101. [Abstract]
 12. Saag KG, Zanchetta JR, Devogelaer JP, Adler RA, See K, Dalsky GP, Krohn K, Krege JH, Warner MR. Teriparatide versus alendronate for treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: 36-month results. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S49. [Abstract]
 13. Ish Shalom S, Kenan Y, Matsumoto T, Neer R. Repetitive rapid delivery of pharmacologically-active hPTH 1-34 across human skin without injection. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S207. [Abstract]
 14. Colón-Emeric C, Mesenbrink P, Lyles K, Pieper C, Boonen S, Delmas P, Eriksen E, Magaziner J. Potential mediators of the reduction in mortality with zoledronic acid after hip fracture. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S10. [Abstract]
 15. Delmas PD, Munoz F, Cosman F, Boonen

- S, Black D, Watts NB, Kendler D, Eriksen EF, Mesenbrink P, Eastell R. Relationship of bone turnover marker (PINP) and changes in femoral neck bone mineral density to fracture risk in women with postmenopausal osteoporosis treated with once-yearly zoledronic acid 5 mg (ZOL): the HORIZON-PFT study. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S9. [Abstract]
16. Boivin G, Bala Y, Chapurlat RD, Delmas PD. Long-term treatment with oral bisphosphonates in postmenopausal women: effects on the degree of mineralization and microhardness of bone. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S10. [Abstract]
17. Vashishth D, Bertholon C, Gineyts E, Chavassieux P, Boivin G, Delmas PD. Increased non-enzymatic glycation of cancellous bone due to decrease in remodeling during alendronate therapy of osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S22. [Abstract]
18. Odvina CV, Qui S, Palnitkar S, Rao DS. Effect of severe suppression of bone turnover on osteocyte viability. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S122. [Abstract]
19. Allen MR, Phipps RJ, Koivuniemi AS, Koivuniemi MC, Burr DB. Risedronate has a more rapid onset of remodeling suppression than alendronate in rabbit vertebral trabecular bone. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S340. [Abstract]
20. Allen MR, Kubek DJ, Burr DB. Monthly intravenous zoledronate suppresses tissue-level remodeling significantly more than daily oral alendronate in the mandible and rib of skeletally mature female dogs. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S340. [Abstract]
21. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Stuck A, Staehelin HB, Orav JE, Thoma A, Kiel DP, Henschkowski J. Prevention of non-vertebral fractures with oral vitamin D is dose dependent: a meta-analysis of RCTs. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S68. [Abstract]
22. Brennan TC, Rybchyn MS, Conigrave AD, Mason RS. Strontium ranelate decreases osteoblast-induced osteoclastogenesis through the involvement of the calcium-sensing receptor. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S120. [Abstract]
23. Maimoun L, Rizzoli R, Ammann P. Oral strontium ranelate treatment markedly improves implant osseointegration. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S229. [Abstract]
24. Fromigué O, Barbara A, Haÿ E, Marie PJ. Strontium ranelate protects osteoblasts from apoptosis independently of the calcium sensing receptor. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S375. [Abstract]
25. Glantschnig H, Hampton R, Wei N, Scott K, Nantermet P, Zhao J, Chen F, Fisher J, Su Q, Pennypacker B, Cusick T, Sandhu P, Reszka A, Strohl W, Flores O, Wang F, Kimmel D, An Z. Fully human anti-DKK1 antibodies increase bone formation and resolve osteopenia in mouse models of estrogen-deficiency induced bone loss. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S60-S61. [Abstract]
26. Smith MR, Morton RA, Hancock ML, Barnette G, Rodriguez D, Veverka KA, Steiner M. C-telopeptide and bone alkaline phosphatase predict morphometric vertebral fracture risk in a pivotal phase III trial of toremifene in men on ADT. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S82. [Abstract]
27. Scott KR, Pennypacker B, Samadfan R, Smith SY, Kimmel DB. Odanacatib increases bone strength and maintains bone quality in estrogen deficient adult rhesus monkeys. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S130. [Abstract]
28. Pennypacker BL, Cusick TE, Kimmel DB. Bone effects of odanacatib in adult ovariectomized rabbits. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S148. [Abstract]
29. Ohishi M, Chiusaroli R, Asuncion F, Ominsky M, Kostenuik P, Schipani E. OPG and bisphosphonates had differential effects on osteoclast numbers, bone marrow fibrosis and cortical porosity in a mouse model of constitutive activation of the PTH/PTHrP receptor. *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl 1):S392. [Abstract]



CASUÍSTICAS / Case Reports

OSTEOMA DE LA REGIÓN MASTOIDEA

Ariel Sánchez,⁽¹⁾ Gustavo Lembo Micó⁽²⁾

1) Centro de Endocrinología, Rosario. 2) Consultorio de Patología Osteoarticular y de Tejidos Blandos, Laboratorio CIBIC; Servicio de Anatomía Patológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

Informe casuístico

NC, mujer de 45 años, se presentó con una masa retroauricular derecha de duración desconocida, que fue descubierta por su peluquera como "un bulto extraño". No había dolor ni otros síntomas subjetivos. La paciente creía que la tumoración había crecido en los últimos meses. La radiografía mostró una zona de

ostecondensación en región temporal. La tomografía confirmó la tumoración densa en región mastoidea derecha (Figura 1). El examen físico (incluido el neurológico) y el laboratorio de rutina fueron normales; el laboratorio fosfo-cálcico también. Se realizó una biopsia incisional, que mostró un osteoma osteoide compacto (Figura 2).

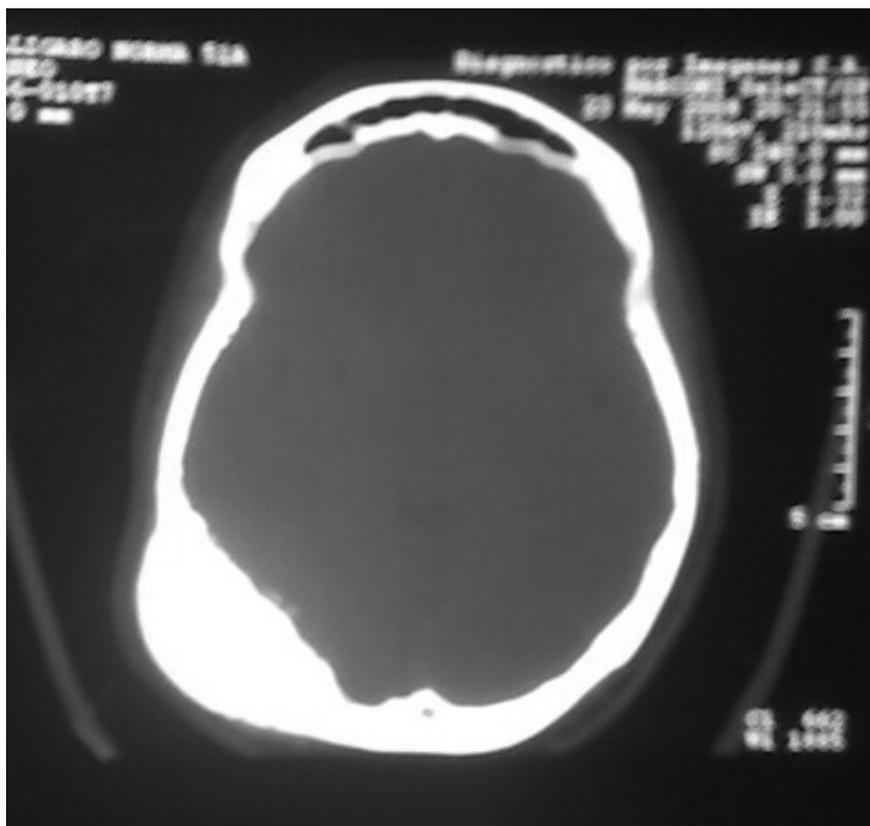


Figura 1. Tomografía computada de cráneo mostrando la tumoración compacta en la región mastoidea derecha.

Los osteomas son verdaderas neoplasias que se originan en tejido conectivo pre-óseo. Los osteomas de cabeza y cuello generalmente se dan en la región fronto-etmoidal. Los del hueso temporal usualmente están en el canal auditivo externo; los extracanaliculares tienen predilección por la

región mastoidea, y en segundo lugar por la escama temporal.¹ Los osteomas temporales causan solamente una deformación que preocupa desde el punto de vista estético, pero a veces dan lugar a cefaleas generalizadas, dolor local, pérdida de la audición, acúfenos o vértigo.

* Dirección postal: Centro de Endocrinología. San Lorenzo 876, Rosario, Santa Fe, Argentina. Correo electrónico: asanchez@cimero.org.ar

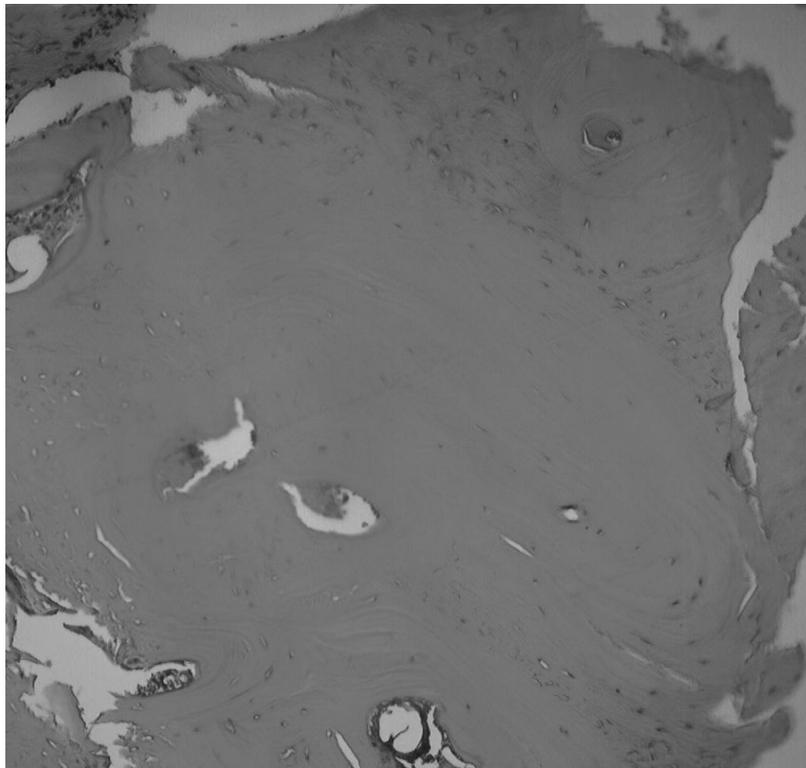


Figura 2. Microfotografía de la biopsia del tumor óseo.

El diagnóstico diferencial debe considerar el mieloma localizado, el granuloma eosinófilo, la displasia fibrosa monostótica y el tumor de células gigantes.²

La forma histopatológica más común es la compacta o ebúrnea, que presenta sólo hueso lamelar, como en este caso. Se reconocen también un *osteoma cartilagineum* (que tiene una cubierta cartilaginosa) y un *osteoma cancellare*, muy raro, de hueso esponjoso con médula ósea.²

La cirugía se recomienda solamente cuando la deformación cosmética lo justifica, o cuando hay síntomas agregados. Debido al compromiso o a la vecindad de estructuras nobles, pueden presentarse complicaciones quirúrgicas como la sordera (generalizada o selectiva).^{3,4}

Referencias

1. Denia A, Perez F, Canalis RR, Graham MD. Extracanalicular osteomas of the temporal bone. *Arch Otolaryngol* 1979; 105:706-9.
2. Marlowe FI, Dave U, Wolfson RJ. Giant osteoma of the mastoid. *Am J Otolaryngol* 1980; 1:191-3.
3. Gupta OP, Samant HC. Osteoma of the mastoid. *Laryngoscope* 1972; 82:172-6.
4. Lee RE, Balkany TJ. Giant mastoid osteoma with post-operative high-frequency sensorineural hearing loss. *Ear Nose Throat J* 2008; 87:23-5.



COMENTARIOS BIBLIOGRÁFICOS / *Bibliographical Comments*

Ariel Sánchez

Centro de Endocrinología, Rosario.

En la Sección *Perspectives* de la revista *Bone*, y como parte de la serie *Misconceptions*, Allan Need y Christopher Nordin presentan su visión sobre la influencia de la hipovitaminosis D sobre la absorción de calcio.¹

Generalmente se asume que el efecto negativo de la hipovitaminosis D sobre el esqueleto es debido a una menor absorción intestinal de calcio. Como hay malabsorción de calcio en la deficiencia severa de vitamina D, se ha extendido el concepto de que cualquier grado de hipovitaminosis D es capaz de causar también una menor absorción de calcio. Los autores creen que esto es incorrecto. En su experiencia, la correlación entre niveles séricos de 25OHD y la absorción de calcio casi siempre se pierde cuando la asociación se corrige para los niveles de calcitriol sérico. La producción de calcitriol está ajustadamente regulada por PTH, la que aumenta en la deficiencia de vitamina D y mantiene así la absorción de calcio. La baja absorción de calcio que se ve en la hipovitaminosis D severa (raquitismo y osteomalacia) se debe a que los niveles de 25OHD caen tanto que no hay suficiente sustrato para sintetizar calcitriol, y éste baja a pesar de la máxima estimulación de la PTH sobre la 1-alfa hidroxilasa renal.

Los autores reanalizan dos series propias ya publicadas y concluyen que no hay relación entre absorción de calcio y niveles séricos de 25OHD (hasta un valor mínimo de 8 ng/ml). Por el contrario, hay una fuerte asociación positiva entre los niveles séricos de calcitriol y la absorción de calcio. La relación entre 25OHD y calcitriol séricos es bifásica,

con asociación positiva a niveles de 25OHD superiores a 16 ng/ml y negativa por debajo: esta aparente paradoja se explica por la acción homeostática de la PTH, que sube a bajos niveles de 25OHD y estimula la síntesis de calcitriol.

La caída de la calcemia iónica asociada a la hipovitaminosis D no sería debida a malabsorción de calcio en el intestino, sino a la falta del "efecto calcémico" de la vitamina D en hueso, ya descrito por Carlsson y Linqvist en 1955.

En ausencia de insuficiencia renal, la deficiencia de vitamina D debe ser muy severa para producir déficit de calcitriol y malabsorción de calcio. En la mayoría de los casos de malabsorción intestinal de calcio documentados en mujeres postmenopáusicas y ancianas, la causa es la "resistencia" intestinal al calcitriol, más que una deficiencia de éste, y sería más apropiadamente tratada con dosis bajas de calcitriol (0,25 mcg/día) que con vitamina D.

Aunque una deficiencia leve o moderada de vitamina D no cause malabsorción de calcio, sí puede afectar la histología ósea. Varios estudios de la histomorfometría ósea han demostrado aumento invernal del osteoide, implicando que la mineralización ósea depende más de los niveles séricos de 25OHD que de los niveles de calcitriol, los que no varían estacionalmente.

Referencia

1. Need AG, Nordin BEC. Misconceptions – Vitamin D insufficiency causes malabsorption of calcium. *Bone* 2008; 42: 1021-4.

COMENTARIOS BIBLIOGRÁFICOS / Bibliographical Comments**Nori Tolosa de Talamoni**

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

Los ratones knockout (KO) para el VDR desarrollan hipocalcemia, raquitismo y alteración en la absorción intestinal de calcio (Ca^{2+}). Los autores estudiaron el efecto de VDR en la absorción intestinal de Ca^{2+} e investigaron si la reposición de VDR intestinal era suficiente para recuperar el fenotipo del ratón KO para VDR. Para ello, generaron ratones con expresión transgénica de VDR humano específica de intestino y los cruzaron con ratones KO para VDR. La expresión transgénica de VDR en el intestino de los ratones KO normalizó la absorción intestinal de Ca^{2+} regulada por vitamina D, como también la expresión de calbindina D_{9k} y del gen del canal de Ca^{2+} TRPV6 en el duodeno y en el colon proximal. Tanto el crecimiento como los niveles de PTH y de calcemia se normalizaron. Cuando el metabolismo del Ca^{2+} se normalizó, los niveles séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fueron más altos que en los animales normales debido a reducida expresión de la enzima CYP24, la excre-

ción de Ca^{2+} urinario fue mayor y se asoció con expresión más baja de calbindina D_{28k} y de calbindina D_{9k} que en el animal normal y con volumen y densidad óseos incrementados también con respecto a los animales normales, a causa del incremento en la velocidad de aposición mineral y en el número de osteoblastos. Los autores concluyen que el VDR y la absorción intestinal de Ca^{2+} son críticos para el control del metabolismo del Ca^{2+} en el cuerpo entero en ratones en crecimiento. La normalización de la absorción intestinal de Ca^{2+} y del metabolismo son indicadores de que el VDR es esencial para el control de la formación del hueso, el control renal del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sérico y la excreción urinaria de Ca^{2+} .

Referencia

Xue Y, Fleet JC. Intestinal vitamin D receptor is required for normal calcium and bone metabolism in mice. *Gastroenterology*. 2009;136(4):1317-27.



INSTRUCCIONES PARA AUTORES

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLÓGÍA

Presentación de manuscritos

Los manuscritos serán enviados por correo electrónico a editor@aaomm.org.ar y/o actualizaciones@aaomm.org.ar. En la primera página debe figurar: (a) el título, informativo aunque conciso; (b) los nombres completos de los autores (primero el nombre y luego el apellido) y de las instituciones en que se desempeñan; (c) un título abreviado para cabeza de página; (d) el nombre y dirección completa, con fax y dirección electrónica, del autor con quien se deba mantener correspondencia.

Para las **Actualizaciones, Artículos Originales, Comunicaciones Breves Casuísticas, Imágenes en Osteología, Editoriales, Cartas al editor, Comentarios Bibliográficos** deberá usarse el castellano o el inglés.

Los trabajos se prepararán en un procesador de textos (preferiblemente en una versión reciente de Microsoft Word), en hoja medidas 212 x 297 mm (A4), con márgenes de al menos 25 mm, a doble espacio, en letra de tipo *Times New Roman* 12 o *Arial* 10. Las páginas deben numerarse en forma consecutiva comenzando con la del título.

Abreviaturas, siglas y símbolos Sólo se emplearán 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 emplea el sistema métrico decimal. Las medidas hematológicas y de química clínica se harán en los términos del Sistema Internacional de Unidades (SI), empleando puntos para los decimales.

Los **Trabajos Originales** estarán divididos en **Introducción, Materiales y métodos, Resultados y Discusión**, además de un **Resumen** en castellano y otro en inglés (**Abstract**), precedido por el correspondiente título.

Ambos **Resúmenes** se ubicarán a continuación de la primera página, y cada uno de ellos no deberá exceder las 250 palabras, evitando la mención de tablas y figuras. El Resumen es independiente del texto del artículo. Al final del mismo se precisarán 3 a 6 **palabras clave** en inglés y en castellano, recurriendo para su elección a los términos incluidos en la lista del Index Medicus (**Medical Subject Headings, MeSH**). Para cada sección o componente del trabajo se iniciará una nueva página.

Las **Comunicaciones Breves**, los **Artículos Especiales** y las **Casuísticas** incluirán resúmenes en castellano y en inglés (no más de 150 palabras) y lista de palabras clave.

La **Bibliografía** debe limitarse a aquellos artículos directamente relacionados con el trabajo mismo, evitándose las revisiones bibliográficas extensas, sólo aceptables en la sección **Actualizaciones**. Se numerarán las referencias consecutivamente, en el orden en que se las menciona en el trabajo. 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* (la lista puede obtenerse en <http://www.nlm.nih.gov>). Los nombres de las revistas deben ir en bastardilla. En el texto las citas serán mencionadas por sus números en superíndices. En la lista de referencias, las revistas, los libros y los capítulos de libros, actas de reuniones científicas e información disponible en *World Wide Web* deben presentarse de acuerdo a los siguientes ejemplos:

1. Schroeder JS, Hunt SA. Chest pain in heart transplanted recipients. *N Engl J Med* 1991; 324: 1805-7.
2. Capowski JJ. Computer techniques in neuroanatomy. New York: Plenum Press, 1989.

3. 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.
4. 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.
5. World Health Organization (WHO). The Stop TB Web Alert. (2000 December 6- 12, week 48)
<http://www.stoptb.org/updates/index.html>

Las **Tablas**, presentadas en hojas individuales, y numeradas con números arábigos, deben ser indispensables y comprensibles por sí mismas, y poseer un título claramente explicativo de su contenido. Las notas aclaratorias deben ir al pie, y no en el título. No deben emplearse 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.

Todas las **Figuras** (dibujos o fotografías en blanco y negro) han de permitir una reproducción adecuada y serán numeradas correlativamente con una inscripción al dorso que permita identificarlas, y una leyenda explicativa en hoja aparte. En las **microfotografías** se debe indicar la escala (marcador). Además, las flechas, símbolos o letras incluidas deben presentar buen contraste con el fondo. Emplee tamaños de letra y grosor de líneas que se reproduzcan con claridad en la publicación. Deben presentarse en formato de imágenes (.jpg o .tif) con una resolución no menor a 300 dpi.

Las **Comunicaciones Breves** corresponden a resultados que, si bien preliminares, por su interés justifiquen una temprana difusión. Como el manuscrito no podrá exceder las ocho páginas, se prescindirá de la división en secciones, aunque manteniendo la secuencia habitual, con hasta 15 referencias y no más de dos Tablas o Figuras. La publicación de Comunicaciones Breves se concretará en un lapso menor a los tres meses de su aceptación.

Las **Cartas al Comité de Redacción** estarán referidas a comentarios de naturaleza editorial, preferentemente con relación a artículos publicados en la revista. No deben exceder las tres páginas, pudiendo incluir hasta seis referencias y una Tabla o Figura.

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 y prestigio 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 90 días. Luego de que el Comité de Redacción haya completado el proceso de evaluación se notificará por correo electrónico al autor responsable sobre la aceptación (con o sin correcciones) o el rechazo del manuscrito. La decisión de éste 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 a 30 días.

Seguiremos los lineamientos expuestos por el *International Committee of Medical Journal*



Editors (ICMJE, <http://www.icmje.org>) sobre otros aspectos no mencionados aquí, y también en lo referente a **Conflicto de intereses** de revisores, autores y editores, a las relaciones con la industria, al apoyo financiero de ella recibido, a la confidencialidad de los manuscritos y a las relaciones entre revistas médicas y los medios populares de difusión.

La **versión final** de un trabajo, ya aceptado para publicación, con las modificaciones que hubiera sufrido en su proceso editorial, deberá ser enviada en un CD o DVD. La versión impresa debe ir adjunta a la versión electrónica. La versión electrónica no será devuelta a los autores.

Siga exactamente las instrucciones para autores al escribir cada sección del artículo. Tome como guía un número de la revista disponible en www.aaomm.org.ar/Actualizaciones.htm.

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.

Transferencia de Derechos de Autor

Una vez aceptado el manuscrito y previo a la publicación del mismo, se debe enviar al editor una carta de concesión de los derechos de autor y consentimiento de publicación, firmada por todos los autores.

Título del artículo:

Autor (es):

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.

Firma de todos los autores

Lugar y fecha:

Para mayor información

Consultar a actualizaciones@aaomm.org.ar