

# ACTUALIZACIONES EN OSTEOLÓGÍA

2025 · VOL. 21 · N°2

ASOCIACIÓN ARGENTINA DE OSTEOLÓGÍA  
Y METABOLISMO MINERAL (AAOMM)



INDIZADA EN SCIMAGO, EBSCO, LATINDEX, LILACS, SCIELO, SCOPUS & EMBASE Y SIIC DATA BASES

ISSN EN LÍNEA 1669-8983

[HTTPS://OJS.OSTEOLOGIA.ORG.AR/](https://ojs.osteologia.org.ar/)

# ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Publicación de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

VOL. 21, Nº 2

Mayo / Agosto 2025

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

<https://ojs.osteologia.org.ar/ojs33010/index.php/osteologia/index>

Rosario, Santa Fe, Argentina

Aparición: cuatrimestral

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

## Editores responsables:

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

## Silvina Mastaglia

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

PROPIETARIO: Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral | Araoz 1028, (2000) Santa Fe, Argentina | [www.aaomm.org.ar/](http://www.aaomm.org.ar/) | [info@aaomm.org.ar](mailto:info@aaomm.org.ar)

## Perfil de la revista

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

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

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

## Scope

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

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

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

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



# ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Publicación de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

## EDITORES RESPONSABLES

### Virginia Massheimer

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

### Silvina Mastaglia

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

## EDITORAS ASOCIADAS

### Patricia Mandalunis

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

### Vivián M. Morán

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

### Gabriela Picotto

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

### Lilian I. Plotkin

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

## EDITOR ASOCIADO SENIOR

### Julio Ariel Sánchez

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

## COORDINACIÓN EDITORIAL

### Mariana Rapoport

rapoport.revista@gmail.com

## CORRECCIÓN DE TEXTOS

### Prof. María Isabel Siracusa

---

## CUERPO EDITORIAL

### Alicia Bagur

MAUTALEN, Salud e Investigación. Buenos Aires. Argentina.

### Ricardo A. Battaglini

Department of Orthopedics. Miller School of Medicine, University of Miami.

### Teresita Bellido

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

### Lucas R. Brun

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

### David Burr

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

### Marilia Buzalaf

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

### Jorge B. Cannata Andía

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

### Haraldo Claus Hermberg

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

### Gustavo Duque

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

### Adriana Dusso

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

### Pedro Esbrit

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

### Sara Feldman

Directora Lab Biología Osteoarticular, Ingeniería Tisular y Terapias Emergentes. Facultad Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario (CONICET-CIUNR), Rosario, Argentina.

**Ana María Galich**

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

**Diana González**

MAUTALEN, Salud e Investigación. Buenos Aires, Argentina.

**María Luisa Gonzalez Casaus**

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

**Arancha R. Gortázar**

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

**Nuria Guañabens**

Servicio de Reumatología del Hospital Clinic de Barcelona. España.

**Suzanne Jan de Beur**

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

**Patricia Jaurez Camacho**

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

**Carlos Mautalen**

MAUTALEN, Salud e Investigación. Buenos Aires, Argentina.

**Michael McClung**

Oregon Osteoporosis Center, Portland, OR, USA.

**José Luis Millán**

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

**Armando Negri**

Instituto de Investigaciones Metabólicas. Buenos Aires, Argentina.

**Beatriz Oliveri**

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

**Luisa Carmen Plantalech**

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

**Hans L. Porias Cuéllar**

Nuevo Sanatorio Durango. México.

**Alfredo Rigalli**

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

**Emilio Roldán**

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

**Ana Russo de Boland**

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

**Helena Salerni**

División Endocrinología del Hospital Durand. Buenos Aires, Argentina.

**Nori Tolosa de Talamoni**

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

**José R. Zanchetta**

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

**Susana Zeni**

Investigadora principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina.



# ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Vol 21, Nº 2, Mayo / Agosto 2025

## ÍNDICE

### EDITORIAL / Editorial

---

**Sarcopenia en Latinoamérica: desafíos actuales frente a un problema emergente de salud pública**

*Sarcopenia in Latin America: Current Challenges in the Face of an Emerging Public Health Problem*

Luciana B. Moine, Constanza Quiroga, Daniela J. Porta, María A. Rivoira

111

### ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

---

**Deformidad torsional persistente en genu varum pediátrico después de la corrección de la deformidad en el plano coronal mediante hemiepifisiodesis de 8 placas**

*Persistent Torsional Deformity in Paediatric Genu Varum after Coronal Plane Deformity Correction by 8-Plate Hemi-Epiphysiodesis*

Hesham M. Elbaseet, Andrew Nasseh, Abdel K. H. Ibrahim

117

**Hipertensión, comorbilidades y tipo de fractura en adultos mayores: un análisis de mediación**

*Hypertension, comorbidities, and fracture type in older adults: a mediation analysis*

Alberto Guevara Tirado

126

**Marcadores de remodelamiento y estructura ósea en diferentes etapas de la vida en ratas Wistar**

*Markers of Bone Remodeling and Bone Structure at Different Life Stages in Wistar Rats*

Estefania M. Zeni Coronel, Marina S. Bonanno, Hernán Mascias, Morena Longo, Susana Zeni, Mariana Seijo

138

**El tratamiento oral con metformina previene signos tempranos de arterioesclerosis aórtica inducida por AGE/RAGE en ratas con síndrome metabólico**

*Oral Treatment With Metformin Prevents Early Signs of AGE/RAGE-Induced Aortic Arteriosclerosis in Rats With Metabolic Syndrome*

Lucas Streckwall, Nancy Martini, Claudia Sedlinsky, León Schurman, María V. Gangoiti, Antonio D. McCarthy

150

### CARTAS AL EDITOR / Letter to editor

---

**Vidrio bioactivo en osteología: beneficios emergentes, seguridad y potencial aplicación en cirugía ortopédica**

*Bioactive Glass in Osteology: Emerging Benefits, Safety, and Potential Applications in Orthopedic Surgery*

Wolmark Xiques-Molina, Katrwin Pérez-Camacho, Johana Galván Barrios

168

EDITORIAL / *Editorial*

## SARCOPENIA EN LATINOAMÉRICA: DESAFÍOS ACTUALES FRENTE A UN PROBLEMA EMERGENTE DE SALUD PÚBLICA

Luciana B. Moine<sup>1\*</sup>, Constanza Quiroga<sup>2</sup>, Daniela J. Porta<sup>2</sup>, María A. Rivoira<sup>1</sup>

1. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina

2. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA) CONICET-UNC. Córdoba, Argentina.

La sarcopenia se define actualmente como una enfermedad del músculo esquelético generalizada, progresiva y potencialmente reversible, caracterizada principalmente por una reducción de la masa y fuerza muscular. Los criterios diagnósticos incluyen baja masa muscular y fuerza muscular y/o deterioro del rendimiento físico.<sup>1</sup>

Desde un enfoque de salud pública, la sarcopenia se asocia con un mayor riesgo de caídas y fracturas, limitaciones en la movilidad, discapacidad en las actividades de la vida diaria, mayores tasas de hospitalización y aumento de la mortalidad. Estos resultados contribuyen significativamente a la carga de enfermedad y a la vulnerabilidad de las poblaciones envejecidas en América Latina.<sup>2</sup>

Aunque la sarcopenia presenta una mayor prevalencia en adultos mayores, la reducción de la masa y la fuerza muscular se inicia en etapas más tempranas de la vida, generalmente a partir de la mediana edad y con frecuencia durante la cuarta década.<sup>1</sup> Esta perspectiva del curso de vida subraya la necesidad de ampliar la vigilancia epidemiológica

y las estrategias de prevención más allá de los grupos etarios de mayor edad, particularmente en contextos que atraviesan rápidas transiciones demográficas y epidemiológicas, como ocurre en los países de ingresos bajos y medios. En este sentido, la identificación temprana y la implementación de intervenciones a nivel poblacional pueden desempeñar un papel fundamental para mitigar el impacto de la sarcopenia a largo plazo.

### Sarcopenia, fragilidad y la necesidad de consolidar una sociedad científica en América Latina

La sarcopenia está estrechamente vinculada con el síndrome de fragilidad, una condición clínica multidimensional y potencialmente reversible, caracterizada por una mayor vulnerabilidad a factores estresantes como resultado de la desregulación biológica multisistémica.<sup>2</sup>

La progresión de la fragilidad se asocia con resultados adversos de salud, incluidos discapacidad, pérdida de independencia, institucionalización y mortalidad, así como una

\*E-mail: [lu.moine@unc.edu.ar](mailto:lu.moine@unc.edu.ar)



mayor utilización y costos de los servicios de salud.<sup>3</sup> En consecuencia, tanto la sarcopenia como el síndrome de fragilidad han sido reconocidas como prioridades importantes de salud pública en sociedades envejecidas.

La mayor parte de la evidencia que respalda los criterios diagnósticos actuales, las guías clínicas y las estrategias de manejo de la sarcopenia y el síndrome de fragilidad han sido generada en países de altos ingresos.<sup>4</sup> Esto representa una limitación crítica para regiones como América Latina, donde los datos epidemiológicos siguen siendo escasos y fragmentados (Tabla 1).

Esta brecha resulta especialmente preocupante si se considera que América Latina, a pesar de su tradicional caracterización como una región joven, está envejeciendo a un ritmo más rápido que Europa. Además, varios factores de riesgo bien establecidos para la sarcopenia y el síndrome de fragilidad, incluidos la pobreza, el acceso limitado a los servicios de salud, la alta carga de enfermedades crónicas no transmisibles, la discapacidad y el

estado nutricional inadecuado, son altamente prevalentes en la región.<sup>12</sup>

Los estudios epidemiológicos disponibles en América del Sur informan consistentemente una mayor prevalencia de fragilidad en mujeres en comparación con los hombres,<sup>6</sup> así como un peor estado de salud general entre las personas frágiles. Estas poblaciones suelen presentar una recuperación más lenta frente a factores estresantes agudos, mayor uso de servicios de cuidados críticos y mayores tasas de rehospitalización.<sup>3</sup> En conjunto, estos hallazgos resaltan la importancia de contextualizar la sarcopenia y el síndrome de fragilidad dentro de las realidades sociodemográficas y las estructuras de los sistemas de salud de los países latinoamericanos.

A nivel global, varias sociedades científicas han desempeñado un papel clave en el avance de la investigación y la estandarización de criterios diagnósticos de la sarcopenia. Sin embargo, nuestra revisión no identificó una sociedad científica regional dedicada específicamente a este campo en América Latina, lo

**Tabla 1.** Estudios epidemiológicos sobre prevalencia de la sarcopenia en países de América Latina (solo se incluyeron pacientes ambulatorios sin patologías asociadas)

Autor y año de publicación	Edad de la población	n	Distribución por sexo	País	Prevalencia de Sarcopenia
Karavaski N, et al. 2025 <sup>5</sup>	≤ 63 años	69	si	Argentina	8,6 %
Pinheiro LCHT, et al. 2023 <sup>6</sup>	≥ 60 años	418	si	Brasil	11,2 %
Pérez-Sousa MÁ, et al. 2020 <sup>7</sup>	≥ 60 años	5.237	si	Colombia	46,5 % (Probable Sarcopenia)
Godínez-Escobar K, et al. 2019 <sup>8</sup>	≥ 18 años	293	no	México	15,5 %
Samper-Ternent R, et al. 2017 <sup>9</sup>	≥ 60 años	1.444	no	Colombia	11,5 %
Lera L, et al. 2017 <sup>10</sup>	≥ 60 años	1.006	si	Chile	19,1 %
Arango-Lopera V, et al. 2012 <sup>11</sup>	≥ 70 años	345	no	México	33,6 %

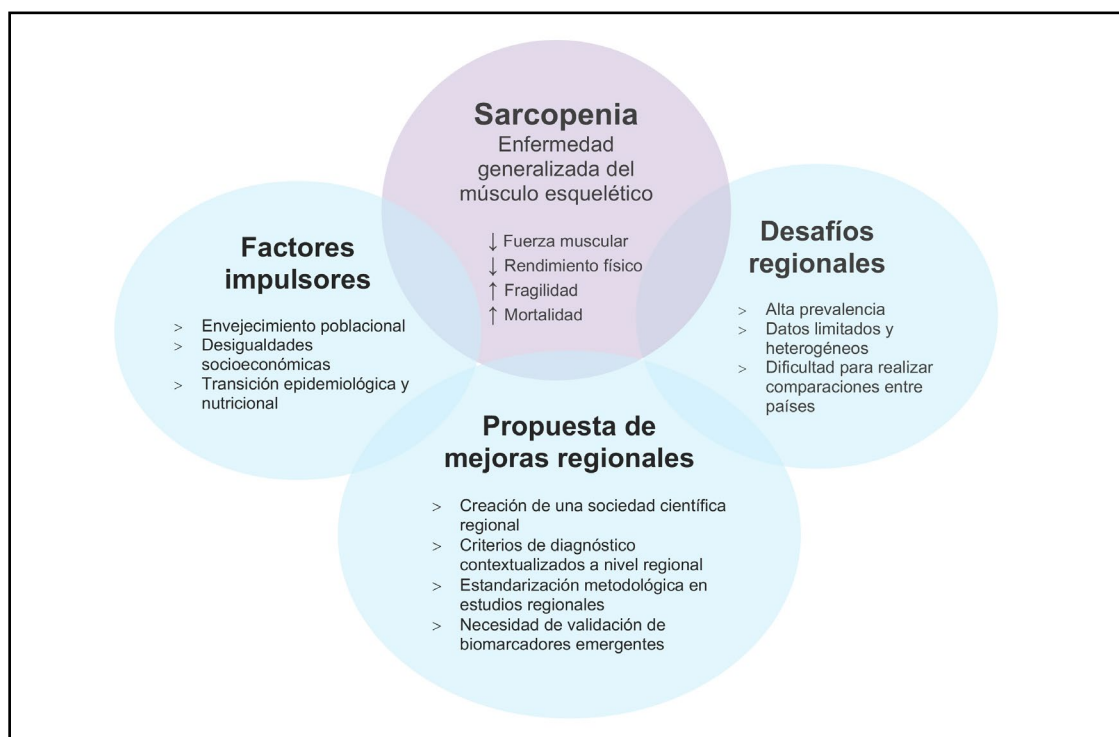
que remarca un importante vacío institucional que limita la generación de evidencia local, la formación profesional y la traducción de la investigación a la práctica clínica y a las políticas públicas. La creación de una red científica latinoamericana podría facilitar el desarrollo de criterios diagnósticos adaptados al contexto, estrategias preventivas y políticas de salud pública orientadas a reducir la carga de enfermedad y mejorar la calidad de vida de las poblaciones vulnerables (Fig. 1).

### Patrones dietarios, transición nutricional y hambre oculta

La alimentación es un determinante clave de la salud muscular a lo largo del curso de la vida, ya que una alimentación saludable garantiza un aporte adecuado de energía y de macro y micronutrientes esenciales para preservar la masa y fuerza muscular, y la fun-

ción física. Sin embargo, en América Latina, la transición nutricional ha dado lugar a la coexistencia paradójica de exceso de energía, sobrepeso y obesidad junto con deficiencias persistentes de micronutrientes, fenómeno conocido como hambre oculta.<sup>13</sup>

Aunque la ingesta energética total suele ser suficiente o incluso excesiva, la calidad global de la dieta es subóptima, caracterizada por bajo consumo de frutas, verduras, legumbres, lácteos, pescado y otras fuentes de proteínas de alta calidad. El escaso aporte de micronutrientes clave para el metabolismo muscular, como vitamina D, calcio, magnesio, hierro y vitaminas del complejo B, puede acelerar la pérdida de masa y fuerza muscular, especialmente en adultos mayores y poblaciones vulnerables.<sup>14</sup>



**Figura 1.** Esquema de la sarcopenia como enfermedad generalizada del músculo esquelético, organizada en tres ejes principales (factores impulsores, consecuencias clínicas y desafíos regionales) y una propuesta de mejora.



Los períodos de inestabilidad económica agravan esta situación, ya que los hogares tienden a priorizar alimentos de bajo costo y alta densidad energética, como carbohidratos refinados y productos ultraprocesados. Este patrón alimentario deteriora la calidad nutricional de la dieta y puede contribuir al desarrollo temprano y progresivo de la sarcopenia a lo largo del curso de la vida.<sup>15</sup>

### **Necesidad de biomarcadores para mejorar el tamizaje poblacional**

La sarcopenia continúa siendo subdiagnosticada en la práctica clínica, en gran medida porque su diagnóstico se basa en la evaluación de masa muscular, fuerza y rendimiento físico mediante técnicas que requieren equipamiento especializado, como la absorciometría de rayos X de energía dual (DXA) o la bioimpedancia eléctrica (BIA), además de pruebas funcionales no siempre disponibles en la atención primaria o en contextos con recursos limitados. Esta dependencia restringe la implementación de estrategias de detección temprana a gran escala y dificulta la vigilancia epidemiológica, especialmente en países de ingresos bajos y medios.<sup>1</sup>

En este contexto, la identificación de biomarcadores séricos accesibles, reproducibles y de bajo costo podría facilitar una detección más temprana y objetiva, permitiendo el tamizaje poblacional, la estratificación del riesgo y el monitoreo longitudinal de la respuesta a intervenciones nutricionales y de ejercicio. Idealmente, estos biomarcadores deberían poder determinarse mediante métodos analíticos ampliamente disponibles en laboratorios clínicos de rutina, lo que favorecería su incorporación en programas de salud pública y en estrategias de prevención a nivel poblacional. Entre los biomarcadores propuestos se incluyen mediadores del metabolismo muscular y del estado inflamatorio sistémico, como la miostatina, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), el factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF-15), así como

citocinas inflamatorias como la interleucina-6 (IL-6) y la proteína C reactiva (PCR). La inflamación crónica de bajo grado, característica del envejecimiento, desempeña un papel clave en la pérdida progresiva de masa y función muscular.<sup>16</sup>

No obstante, estos biomarcadores presentan limitaciones, como la heterogeneidad metodológica y la falta de valores de referencia estandarizados. En consecuencia, ha crecido el interés por analitos de uso rutinario. La relación creatinina/cistatina C se ha propuesto como marcador indirecto de masa muscular y se ha asociado con sarcopenia, síndrome de fragilidad y mortalidad. Asimismo, la PCR y la albúmina sérica reflejan inflamación y estado nutricional.<sup>17</sup> Aunque ninguno de estos marcadores por sí solo posee suficiente precisión diagnóstica para confirmar la enfermedad, su integración con herramientas clínicas simples y evaluaciones funcionales podría mejorar significativamente las estrategias de detección temprana.

En conjunto, estos hallazgos subrayan la necesidad de desarrollar y validar biomarcadores séricos accesibles y clínicamente aplicables, particularmente aquellos basados en analitos disponibles en laboratorios de rutina. La identificación de tales marcadores tendría un valor especial en regiones con recursos limitados, como América Latina, donde la implementación de métodos instrumentales para evaluar masa muscular puede ser restringida. En este contexto, la incorporación de biomarcadores bioquímicos en algoritmos de tamizaje podría contribuir a reducir la subdiagnóstico de la sarcopenia y facilitar la implementación de estrategias de prevención y manejo oportuno a nivel poblacional.

### **Conclusión**

La sarcopenia representa un desafío emergente de salud pública en América Latina en el contexto de un rápido envejecimiento poblacional, persistentes desigualdades socioeco-

nómicas y una marcada transición epidemiológica y nutricional. A pesar de los avances en su conceptualización y diagnóstico, la evidencia regional sigue siendo limitada y heterogénea, lo que dificulta estimar con precisión su carga y diseñar estrategias de intervención adaptadas al contexto local. La coexistencia de alimentación de baja calidad nutricional y deficiencias de micronutrientes puede contribuir al deterioro muscular a lo largo del curso de la vida, particularmente en poblaciones vulnerables. En este escenario, el desarrollo de estudios epidemiológicos estandarizados, la adaptación regional de criterios diagnósticos y la validación de biomarcadores acces-

bles para el tamizaje poblacional constituyen prioridades de investigación. El fortalecimiento de la colaboración científica regional y la eventual consolidación de una red o sociedad latinoamericana dedicada al abordaje de la sarcopenia y la fragilidad podrían contribuir a generar evidencia local y a promover políticas de salud pública orientadas a la prevención, detección temprana y manejo oportuno de esta condición.

Recibido: 2/03/2026

Aceptado: 27/03/2026

Publicado: 1/04/2026

## Referencias

1. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*. 2019;48(1):16-31. <https://www.doi.org/10.1093/ageing/afy169>. Erratum in: *Age Ageing*. 2019;48(4):601. <https://www.doi.org/10.1093/ageing/afz046>.
2. Prado CM, Anker SD, Coats AJS, Laviano A, von Haehling S. Nutrition in the spotlight in cachexia, sarcopenia and muscle: avoiding the wildfire. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2021;12(1):3-8. <https://www.doi.org/10.1002/jcsm.12673>.
3. Hsu YH, Jones G. Sarcopenia as a predictor of incident disability, institutionalization, and mortality in older adults (Concord Health and Ageing in Men Project). *J Am Med Dir Assoc*. 2019;16(7), 546–553.
4. Vaishya R, Gupta BM, Misra A, Mamdapurj GM, Vaish A. Global research in sarcopenia: High-cited papers, research institutions, funding agencies and collaborations, 1993-2022. *Diabetes Metab Syndr*. 2022;16(11):102654. <https://www.doi.org/10.1016/j.dsx.2022.102654>.
5. Karavaski N, Ernst G, Zuccotti A, Reynoso C, Young P, Curriá M. Prevalencia de sarcopenia en adultos sanos mediante el uso de bioimpedancia. *Medicina*. 2025;85(3):518-525.
6. Pinheiro L, Rossi M, Dos Santos C, et al. Prevalence of associations among sarcopenia, obesity, and metabolic syndrome in Brazilian older adults. *Front Med*. 2023;8;10:1206545. [HTTPS://WWW.DOI.ORG/10.3389/fmed.2023.1206545](https://www.doi.org/10.3389/fmed.2023.1206545).
7. Pérez-Sousa MÁ, Pozo-Cruz JD, Cano-Gutiérrez CA, Izquierdo M, Ramírez-Vélez R. High Prevalence of Probable Sarcopenia in a Representative Sample From Colombia: Implications for Geriatrics in Latin America. *J Am Med Dir Assoc*. 2021;22(4):859-864.e1. <https://www.doi.org/10.1016/j.jamda.2020.10.021>.
8. Godínez-Escobar K, Gallegos-De Luna C, Meneses-Acero I, y col Prevalencia de sarcopenia por grupos etarios en una población de la Ciudad de México. *Archivos en Medicina Familiar*. 2020;22(1):7-12.
9. Samper-Ternent R, Reyes-Ortiz C,



- Ottenbacher KJ, Cano CA. Frailty and sarcopenia in Bogotá: results from the SABE Bogotá Study. *Aging Clin Exp Res.* 2017;29(2):265-272. <https://www.doi.org/10.1007/s40520-016-0561-2>
10. Lera L, Albala C, Sánchez H, et al. Prevalence of Sarcopenia in Community-Dwelling Chilean Elders According to an Adapted Version of the European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) Criteria. *J Frailty Aging.* 2017;6(1):12-17. <https://www.doi.org/10.14283/jfa.2016.117>.
  11. Arango-Lopera V, Arroyo P, Gutiérrez-Robledo LM, Pérez-Zepeda MU. Prevalence of sarcopenia in Mexico City. *European Geriatric Medicine.* 2012;3(3):157-160. <https://www.doi.org/10.1016/j.eurger.2011.12.001>
  12. Swan L, Warters A, O'Sullivan M. Socioeconomic Inequality and Risk of Sarcopenia in Community-Dwelling Older Adults. *Clin Interv Aging.* 2021;16:1119-1129. <https://www.doi.org/10.2147/CIA.S310774>.
  13. Ruel-Bergeron JC, Stevens GA, Sugimoto JD, et al. Global Update and Trends of Hidden Hunger, 1995-2011: The Hidden Hunger Index. *PLoS One.* 2015;10(12):e0143497. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0143497>.
  14. Kovalskys I, Fisberg M, Gómez G, et al. Energy intake and food sources of eight Latin American countries: results from the Latin American Study of Nutrition and Health (ELANS). *Public Health Nutr.* 2018;21(14):2535-2547. <https://www.doi.org/10.1017/s1368980018001222>
  15. Fernández-Gaxiola AC, García-Guerra A, Neufeld LM. Persistent Challenges of Micronutrient Deficiencies in Latin America Need Action. *Food Nutr Bull.* 2024;45(2\_suppl):S7-S10. <https://www.doi.org/10.1177/03795721241262136>.
  16. Liu G, Jiang S, Xie W, et al. Biomarkers for sarcopenia, muscle mass, muscle strength, and physical performance: an umbrella review. *J Transl Med.* 2025;23(1):650. <https://www.doi.org/10.1186/s12967-025-06575-3>.
  17. Barreto EF, Poyant JO, Coville HH, et al. Validation of the sarcopenia index to assess muscle mass in the critically ill: A novel application of kidney function markers. *Clin Nutr.* 2019;38(3):1362-1367. <https://www.doi.org/10.1016/j.clnu.2018.05.031>.

ARTÍCULO ORIGINAL / Original

## PERSISTENT TORSIONAL DEFORMITY IN PAEDIATRIC GENU VARUM AFTER CORONAL PLANE DEFORMITY CORRECTION BY 8-PLATE HEMI-EPIPHYSIODESIS

Hesham M. Elbaseet\*,<sup>ORCID</sup> Andrew Nasseh,<sup>ORCID</sup> Abdel K. H. Ibrahim<sup>ORCID</sup>

*Paediatric Orthopaedic Unit, Orthopaedic and Traumatology Department, Faculty of Medicine, Assiut University. Egypt*

### Abstract

**Introduction:** Angular deformities around the knee, i.e., genu varum and genu valgum, are common in children and can arise from various underlying conditions. Surgical treatment options include temporary hemiepiphysiodesis (guided growth), which is less invasive and carries fewer risks compared to traditional osteotomies. While effective for coronal deformities, the impact of this technique on persistent torsional deformities remains underexplored.

**Objectives:** This study aims to assess the persistent torsional deformity following complete correction of varus coronal deformity in pediatric patients treated with 8-plate hemiepiphysiodesis.

**Methods:** A retrospective case series study was conducted in a tertiary center from March 2023 to January 2025. The study included skeletally immature patients aged 2.5 to 12 years with genu varum deformity who underwent 8-plate hemiepiphysiodesis

for varus deformity correction. Clinical and radiological assessments-including foot progression angle, thigh-foot angle and heel bisector line- were used to evaluate rotational deformities after varus correction.

**Results:** A total of 26 limbs of 14 patients with mean age 4.54 years were analyzed. The mean duration of epiphysiodesis was 10.46 months. Despite successful correction of coronal deformities, 61.5% of patients exhibited persistent intoeing. The persistent torsion was of tibial source which was manifested in the foot progression angle and the thigh-foot angle.

**Conclusion:** While 8-plate is effective for coronal deformity correction in pediatric genu varum, a significant proportion of patients retain persistent torsional deformities.

**Keywords:** Intoeing, torsional deformity, genu varum, 8-pate hemi-epiphysiodesis, guided growth.

**Levels of Evidence:** Level of Evidence: III-retrospective observational study.



## **DEFORMIDAD TORSIONAL PERSISTENTE EN GENU VARUM PEDIÁTRICO DESPUÉS DE LA CORRECCIÓN DE LA DEFORMIDAD EN EL PLANO CORONAL MEDIANTE HEMIEPIFISIODESIS DE 8 PLACAS**

### **Resumen**

**Introducción:** las deformidades angulares alrededor de la rodilla, es decir, el genu varo y el genu valgo, son comunes en niños y pueden deberse a diversas afecciones subyacentes. Las opciones de tratamiento quirúrgico incluyen la hemiepifisiodesis temporal (crecimiento guiado), que es menos invasiva y conlleva menos riesgos en comparación con las osteotomías tradicionales. Si bien es eficaz para las deformidades coronales, el impacto de esta técnica en las deformidades torsionales persistentes sigue siendo poco explorado.

**Objetivos:** Este estudio tiene como objetivo evaluar la deformidad torsional persistente tras la corrección completa de la deformidad coronal en varo en pacientes pediátricos tratados con hemiepifisiodesis de 8 placas.

**Métodos:** se realizó un estudio retrospectivo de series de casos en un centro terciario entre marzo de 2023 y enero de 2025. El estudio incluyó pacientes esqueléticamente

inmaduros de entre 2,5 y 12 años con deformidad de genu varo, sometidos a hemiepifisiodesis de 8 placas para la corrección de la deformidad en varo. Se utilizaron evaluaciones clínicas y radiológicas, incluido el ángulo de progresión del pie, el ángulo muslo-pie y la línea bisectriz del talón, para evaluar las deformidades rotacionales después de la corrección en varo.

**Resultados:** se evaluaron 26 extremidades de 14 pacientes con una edad media de 4,54 años. La duración media de la epifisiodesis fue de 10,46 meses. A pesar de la corrección exitosa de las deformidades coronales, el 61,5% de los pacientes presentó marcha convergente persistente. La torsión persistente fue de origen tibial, manifestándose en el ángulo de progresión del pie y en el ángulo muslo-pie.

**Conclusión:** si bien la placa de 8 es eficaz para la corrección de la deformidad coronal en el genu varo pediátrico, una proporción significativa de pacientes conserva deformidades torsionales persistentes.

**Palabras clave:** marcha convergente, deformidad torsional, genu varo, hemiepifisiodesis de 8 placas, crecimiento guiado.

**Nivel de evidencia:** III-estudio observacional retrospectivo.

### **Introduction**

Angular deformities around the knee, i.e., *genu varum* and *genu valgum*, are frequently found in children. These deformities may be idiopathic or may arise secondary to various conditions as developmental disorders, trauma, skeletal dysplasia, metabolic or endocrine disorders, inflammatory diseases, or neoplastic processes.<sup>1,2</sup>

Surgical treatment options include temporary hemiepifisiodesis (guided growth), which is less invasive and has a far lower rate of serious consequences, and osteotomies with either acute or gradual correction.<sup>3,4</sup>

Coronal plane deformities of the knee are commonly managed using guided growth through 8-plate hemiepifisiodesis. Since its introduction by Stevens in 2007, tension band plating has been widely adopted as a safe and effective alternative to corrective osteotomy in the pediatric population. Multiple studies have demonstrated its efficacy, safety profile, and advantages in managing angular knee deformities in growing children. Growth modulation acts to create unilateral inhibition in frontal plane. Coronal plane deformity is typically two-dimensional, whereas torsional deformity

represents a three-dimensional rotational abnormality assessed in the transverse (axial) plane. Growth modulation induces differential spiral growth inhibition along the longitudinal axis of the bone.<sup>5</sup>

The causes of intoeing in children include metatarsus adductus, internal tibial torsion, and increased femoral anteversion. Among these, internal tibial torsion is frequently associated with genu varum deformities of the lower limbs. Here, intoeing is a compensatory mechanism for balance and part of a complex 3-D deformity.<sup>4</sup>

However, there is a paucity of literature evaluating the extent to which torsional deformities are corrected following 8-plate hemi-epiphysiodesis used for coronal plane deformity correction. This study was conducted to assess the persistent torsional deformity remaining after complete correction of coronal plane malalignment using 8-plate hemi-epiphysiodesis on the hypothesis that persistent torsional deformities are present after coronal plane correction.

## Material and methods

A Retrospective case series study was carried out on patients operated with 8-plate hemi-epiphysiodesis from June 2022 to January 2025 in a tertiary center. Local IRB No.:17101877 and clinical trial Registration No.: NCT05334862 were obtained. All patients and their legal guardians provided written informed consent according to the Declaration of Helsinki and good clinical practice (GCP) for publishing clinical photos.

*Inclusion criteria:* The study enrolled skeletally immature patients over 2.5 years of age and less than 12 years of age, who present idiopathic genu varum. *Exclusion criteria:* Child with one or more of the following criteria was excluded; skeletal maturity, epiphyseal dysplasia, metabolic and neurologic disorders, and/or previous trauma.

Basic demographic information (name, sex, age, medical and surgical history) was

collected. Clinical evaluation of rotational profile was performed by the following items, using a goniometer:

*-Foot progression angle (FPA):* the angle between foot longitudinal axis and imaginary straight line while walking- was estimated by footprint by chlorohexidine stain on the floor for 6 steps (Figure 1 and 2). FPA was considered normal if it is -5 to +20 degrees and persistent intoeing was considered less than - 5 degrees.

*-Increased femoral anteversion:* identified by increased internal rotation of the hip with decreased external rotation.

*-Thigh-foot angle:* to quantify tibial torsion (range of -5° to +30°).

*-Heel bisector:* to identify metatarsus adductus (medial deviation of the forefoot and normal hindfoot).<sup>6-8</sup>

Radiological confirmation of varus correction was done by standing long film X rays of both lower limbs. *These outcomes were independently assessed by two experts, and in case of discrepancies consensus was reached by discussions between them.*

*Surgical technique:* Under general anesthesia, patients underwent surgery with a supine position and the application of a tourniquet. A 2-3 cm longitudinal incision was made over the physis, guided by fluoroscopy, followed by the insertion of a 1.2 mm Kirschner wire into the physis. An 8-plate was then applied extraperiosteally, tailored to the deformity site (lateral distal femur, proximal tibia, or both). Using fluoroscopic control, 1.6 mm guidewires were inserted into the metaphyseal and epiphyseal regions while avoiding periosteal damage. The plate was secured flush against the bone with 3.5 mm fully threaded self-tapping cannulated screws, which were carefully drilled into place using a 2.5 mm cannulated drill bit, ensuring screw lengths did not exceed the midpoint of the respective bone regions. Final positioning was verified through anteroposterior and lateral imaging to prevent sagittal plane deformities,



after which the incision was closed in layers and a compression bandage was applied postoperatively.<sup>9</sup>

**Follow up:** the patients were allowed to perform early movement and full weight bearing as tolerated one day after surgery. Visits after two weeks were scheduled to detect any wound complication, then regularly every 3 months until clinically full correction, confirmed by standing X ray long film. Targeted correction was assessed by straight mechanical axis alignment; normal mechanical axis deviation (MAD) (4+/-2 mm medial to the center of the knee joint).

**Outcomes:** The primary outcome was to clinically assess amount and source, i.e. femur, tibia or foot, of persistent torsional deformity after full varus correction. Secondary outcome was to detect any complications detected such as infection, broken screws, broken wires.

**Statistical analysis:** Based on determining the main outcome variable, the estimated minimum required sample size was 23 limbs. The sample size was calculated using G\*power software 3.1.9.7., based on the following assumptions: the clinical measurements showed a highly statistically significant postoperative improvement. Effect size was estimated to be 0.8., Alpha = 0.05, Power = 0.95. Each limb was independently analyzed in bilateral cases through GEE (Generalized Estimating Equations) to handle the correlation between limbs (the “cluster”) without needing to model the specific distribution of every individual child.

Data was collected and analyzed using SPSS (Statistical Package for the Social Science, version 26 IBM, and Armonk, New York). The data was normally distributed according to the normality test, so parametric tests were used. Quantitative data with normal distribution were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Nominal data were given as number (n) and percentage (%). Appropriate tests of significance were used.

The level of confidence was kept at 95% and hence, the *P value* was considered significant if  $< 0.05$ .

## Results

A total of 26 limbs of 14 (6 males and 8 females) patients were included. Twelve cases had bilateral varus deformity. Mean age at recruitment time was  $4.54 \pm 0.7$  years [Table 1]. The mean preoperative varus was  $26.8 \pm 10.97^\circ$ . Majority of them had epiphyseodesis by 8 plates both femoral and tibia ((24 out of 26 limbs) 92.3%) with average duration  $10.46 \pm 2.56$  months [Table 2]. After varus correction, all cases had normal average hip internal and external rotation and heel bisector line. The mean thigh foot angle was  $-9.9 \pm 7.6^\circ$ . At point of varus correction ten limbs (38.5%) had torsion corrected while others 16 limbs in 8 bilateral affected patients (61.5%) had persistent torsional deformity [Table 3, Figures 1-2]. There was a highly significant difference between patients with normal foot progression angle and those with persistent torsion in the following parameters; thigh foot angle (*P value* 0.002) and foot progression angle (*P value* 0.001). No complications were reported.

**Table 1.** Characteristics of the patients/ limbs

Category	Total
<b>Age in years, N</b>	14
Mean	$4.54 \pm 0.70$ SD
Min; Max	3-6
<b>Sex, N</b>	14
Male	6 (42.9%)
Female	8(57.1%)
<b>Laterality</b>	
Bilateral	12 (85.7%)
Unilateral	2 (14.3%)

Data expressed as frequency (percentage), and mean  $\pm$ SD (minimum to maximum)

**Table 2.** Coronal Deformity parameters

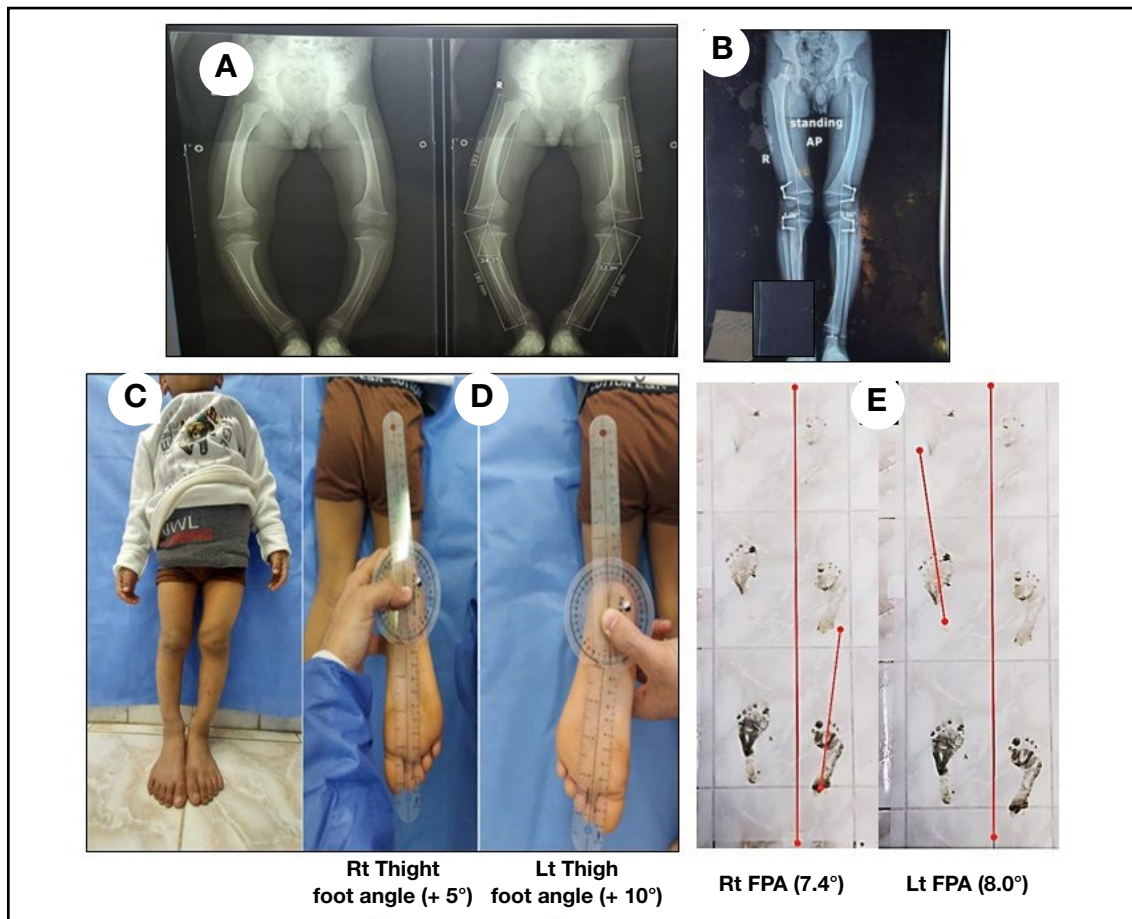
Category	Total
<b>MPTA (Preoperative), N</b>	26
Mean	76.65° ± 5.5° SD
Min; Max	(66.5-89°)
<b>LDFA (Preoperative), N</b>	26
Mean	107.7° ± 10.2° SD
Min; Max	(91-135°)
<b>Degree of varus (Preoperative), N</b>	26
Mean	26.8° ± 10.97° SD
Min; Max	(11-45.5°)
<b>Site of epiphysiodesis, N</b>	26
Femoral and tibial	24 (92.3%)
Femoral only	2 (7.7%)
<b>Duration of epiphysiodesis(months), N</b>	26
Mean	10.46 ± 2.56 SD
Min; Max	(7-15)
<b>Mechanical axis deviation (MAD)(Preoperative), N</b>	26
Mean	3.5±1.25 SD
Min; Max	(2-4.5)

Data expressed as frequency (percentage), mean ±SD (minimum to maximum), **MPTA** =Medial proximal tibial angle, **LDFA**=lateral distal femoral angle

**Table 3.** Rotational profile parameters

Category	Total
<b>Overall, Foot progression angle (FPA) (post),N</b>	26
Mean	-6.73 ° ± 8 SD
Min; Max	(-22 to 8)
<b>Limbs without intoeing after varus correction, N</b>	10 (38.5%)
FPA: Min; Max	(5 to 8°)
<b>Limbs with persistent torsion after varus correction, N</b>	16 (61.5%)
FPA: Min; Max	(-22 to-9 °)
<b>Hip internal rotation (post), N</b>	26
Mean	66° ± 6.6 SD
Min; Max	(45-75)
<b>Hip external rotation(post), N</b>	26
Mean	31° ± 2.6 SD
Min; Max	(30-40)
<b>Thigh foot angle (post), N</b>	26
Mean	-9.9° ± 7.6 SD
Min; Max	(-25 to 10)
<b>Heel bisector line (post), N</b>	26
Through 2nd and 3rd toe webspace	26 (100%)

Data expressed as frequency (percentage), and average±SD (minimum to maximum)



**Figure 1.** Improved case. Improved intoeing, with thigh-foot angle and foot progression angle within the normal range: (A) preoperative long-leg radiograph; (B) postoperative long-leg radiograph after final correction of genu varum; (C) clinical appearance after 8-plate removal following correction of genu varum; (D) thigh-foot angle; (E) foot progression angle.

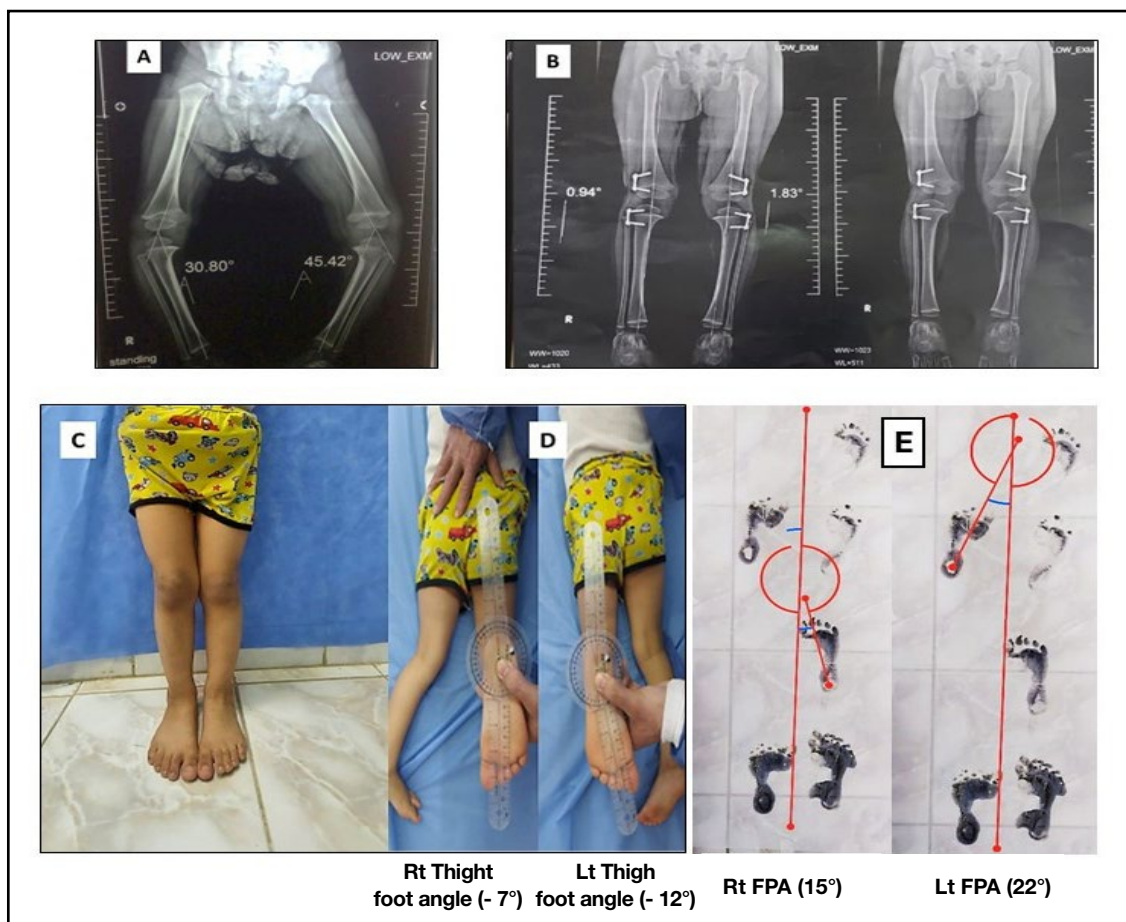
## Discussion

This study evaluated the effectiveness of 8-plate hemi-epiphysiodesis in correcting coronal plane deformities in pediatric patients with genu varum and assessed the persistence of persistent torsional deformities following correction. The mean age of participants was 4.54 years, which is within the optimal range for guided growth interventions. Normal children by age 4, the internal rotation seen in infancy should be usually corrected itself to a neutral position or a slight external rotation.<sup>5,4</sup>

Most cases involved bilateral genu varum, and the majority of patients underwent

epiphysiodesis at both the distal femur and proximal tibia. The average duration of implant placement was 10.46 months, representing a reasonable timeframe for achieving coronal alignment.<sup>5,10,11</sup>

While correction of the coronal plane deformity was successful across our study, persistent torsional deformities persisted in a significant proportion of patients (61.5%). A notable finding was the statistically significant difference in thigh-foot angle ( $p = 0.002$ ) and foot progression angle ( $p = 0.001$ ) between patients who achieved complete correction and those with persistent rotational



**Figure 2.** Case with persistent intoeing. Persistent torsion of tibial origin, with abnormal thigh-foot angle and foot progression angle: (A) preoperative long-leg radiograph; (B) postoperative long-leg radiograph after final correction of genu varum; (C) clinical appearance after 8-plate removal following correction of genu varum; (D) thigh-foot angle; (E) foot progression angle.

malalignment. These results suggest that isolated correction of the coronal plane does not necessarily result in resolution of coexisting torsional abnormalities.

This observation is consistent with prior studies indicating that rotational deformities may not spontaneously resolve following coronal alignment and may require targeted interventions, such as rotational osteotomy, in selected patients.<sup>12</sup>

Paley *et al.*<sup>13</sup> introduced a novel technique for rotational guided growth using inclined, counter-opposed peripheral flexible tethers. In their study involving eight bones in five

patients, this method achieved an average rotational correction of 30° in the femur and 9.5° in the tibia over a 12-month period, demonstrating promising potential for non-osteotomy-based torsional correction.

Halloum *et al.*<sup>12</sup> conducted a comprehensive review of 14 studies, encompassing both preclinical and clinical investigations, to evaluate the efficacy of rotational guided growth. Their findings indicated that while animal models demonstrated promising outcomes, clinical applications yielded inconsistent results. They emphasized the need for further clinical validation



of rotational guided growth techniques. While our study specifically assessed the persistence of torsional deformities after coronal alignment, our findings support their conclusion that guided growth, while effective for coronal correction, may not be sufficient as a standalone intervention for rotational deformities.

Zaidman et al.<sup>14</sup> investigated the use of rotational guided growth for the correction of femoral torsional deformities. Their study demonstrated significant clinical improvements through the use of obliquely placed 8-plates at the distal femur. Notably, they reported a reduction in the mean foot progression angle from 32° to 7°, and a correction in femoral version from an average of 60° to 22°, achieved over a mean treatment duration of 11 months. These results highlight the potential of guided growth techniques not only for coronal plane deformities but also for addressing femoral rotational malalignment.

Children younger than 6 years have higher liability to have axial deformity correction during guided growth for coronal plane deformity.<sup>13,9</sup>

One of the key strengths of this study is its focus on a clinically relevant and underexplored issue, tibial torsion correction in pediatric patients with genu varum using guided growth techniques. The use of objective, clinically validated outcome measures, such as foot progression angle and thigh-foot angle, enhances the methodological rigor and reliability of the findings.

This persistent torsional deformity is suggested to be regularly followed up and consideration of correction if not spontaneously resolved by rotational guide growths vs osteotomy if needed.

Several limitations must be acknowledged, including the fact that the study was conducted in a single center with relatively small sample size. Also, retrospective nature of the study increased the possibilities of recall bias. Major limitation was lack of preoperative

intoeing assessment to determine whether torsional deformity improved, worsened, or remained unchanged following surgery and non-independence of bilateral limbs. No longer duration of follow up to assess need for further intervention.

### Conclusion

This study demonstrated that while 8-plate hemi-epiphysiodesis is effective in correcting coronal plane deformities in pediatric patients with genu varum, a significant proportion of patients continue to exhibit persistent torsional deformities post-treatment without baseline rotational/intoeing data, the study can support persistence/prevalence, but not definitively that guided growth 'fails to correct' tibial torsion.

Future research should investigate the combined use of coronal and rotational guided growth techniques, assess long-term outcomes, and incorporate patient-reported functional measures to better evaluate the clinical impact of persistent deformities.

**Ethical approval:** IRB local approval number: 04-2022-300026

**Author Contributions:** Conceptualization, Methodology, Investigation (HME). Writing – Original Draft, Formal Analysis, Investigation (AN). Writing – Original Draft; Writing – Review & Editing (AKHI)

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Funding:** The authors declare that no funding or financial support was received for the conduct of this study or the preparation of this article.

Received: October 2025  
Accepted: February 2025  
Published: 1/04/2026

## References

1. Ding J, Dai ZZ, Li CY, Zhang ZQ, Wu ZK, Cai QX. A retrospective study of treatment of genu valgum/varum with guided growth: Risk factors for a lower rate of angular correction. *Sci Prog.* 2021 Jan-Mar;104(1):368504211002612. <https://doi.org/10.1177/00368504211002612>.
2. Kulkarni RM, Ilyas Rushnawala FM, Kulkarni GS, Negandhi R, Kulkarni MG, Kulkarni SG. Correction of coronal plane deformities around the knee using a tension band plate in children younger than 10 years. *Indian J Orthop.* 2015 Mar-Apr;49(2):208-18. <https://doi.org/10.4103/0019-5413.151585>.
3. Abood AA, Hellfritsch MB, Møller-Madsen B, Brüel A, et al. Controlled rotation of long bones by guided growth: A proof of concept study of a novel plate in cadavers. *J Orthop Res.* 2022 May;40(5):1075-82. <https://doi.org/10.1002/jor.25150>.
4. Kolbe N, Haydon F, Kolbe J, Dreher T. Single-Stage Tibial Osteotomy for Correction of Genu Varum Deformity in Children. *Children (Basel).* 2023 Feb 14;10(2): 377. <https://doi.org/10.3390/children10020377>.
5. Danino B, Rödl R, Herzenberg JE, et al. Growth modulation in idiopathic angular knee deformities: is it predictable? *J Child Orthop.* 2019 Jun 1;13(3):318-23. <https://doi.org/10.1302/1863-2548.13.190042>.
6. Cobb SC, James CR, Hjertstedt M, Kruk J. A digital photographic measurement method for quantifying foot posture: validity, reliability, and descriptive data. *J Athl Train.* 2011 Jan-Feb;46(1):20-30. <https://doi.org/10.4085/1062-6050-46.1.20>.
7. Saabye T, Colding-Rasmussen T, Balslev-Clausen A, Bødtker S, Wong C, Harsted S. Test-retest reliability of clinical measurements of lower extremity joint motion and alignment in the pediatric population. *J Child Orthop.* 2025 May 15;19(3):189-98. <https://doi.org/10.1177/18632521251322639>.
8. Scorcelletti M, Reeves ND, Rittweger J, Ireland A. Femoral anteversion: significance and measurement. *J Anat.* 2020 Nov;237(5):811-26. <https://doi.org/10.1111/joa.13249>
9. Vaishya R, Shah M, Agarwal AK, Vijay V. Growth modulation by hemi epiphysiodesis using eight-plate in Genu valgum in Paediatric population. *J Clin Orthop Trauma.* 2018 Oct-Dec;9(4):327-33. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2017.11.004>.
10. Jamali AA, Meehan JP, Moroski NM, Anderson MJ, Lamba R, Parise C. Do small changes in rotation affect measurements of lower extremity limb alignment? *J Orthop Surg Res.* 2017 May 22;12(1):77. <https://doi.org/10.1186/s13018-017-0571-6>.
11. Vogt B, Roelfing JD, Roedl R, Tretow H. Options and limits of leg length correction in paediatric orthopaedics. *Orthopadie (Heidelberg, Germany).* 2023 Aug 10, 52(9):719-28. <https://doi.org/10.1007/s00132-023-04432-5>.
12. Halloum A, Kold S, Rölfing JD, Abood AA, Rahbek O. Correction of rotational deformities in long bones using guided growth: a scoping review. *EFORT Open Rev.* 2024 Feb 1;9(2):119-28. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.9.230104>.
13. Paley D, Shannon C. Rotational Guided Growth: A Preliminary Study of Its Use in Children. *Children (Basel).* 2022 Dec 29;10(1):70. <https://doi.org/10.3390/children10010070>.
14. Zaidman M, Simanovsky N, Goldman V, Weisstub E. Correction of Femoral Torsional Deformities by Rotational Guided Growth. *J Clin Med.* 2024 Dec 10;13(24):7514. <https://doi.org/10.3390/jcm13247514>.



ARTÍCULO ORIGINAL / Original

## HIPERTENSIÓN, COMORBILIDADES Y TIPO DE FRACTURA EN ADULTOS MAYORES: UN ANÁLISIS DE MEDIACIÓN

Alberto Guevara Tirado 

Universidad Científica del Sur. Lima, Perú

### Resumen

**Introducción:** las fracturas por fragilidad en adultos mayores suelen coexistir con comorbilidades, afectando su localización y gravedad.

**Objetivo:** analizar si el número de comorbilidades actúa como mediador entre hipertensión arterial y fracturas por fragilidad en adultos mayores.

**Materiales y métodos:** estudio de corte de datos secundarios de 719 adultos  $\geq 50$  años con fracturas por fragilidad no vertebrales. Se utilizó el modelo 4 de PROCESS de Hayes para analizar si el total de comorbilidades media la relación entre hipertensión arterial y tipo de fractura (miembro superior vs. inferior). Se usaron regresiones lineales y logísticas ajustadas por edad, sexo, diabetes, dislipidemia, tabaquismo y uso de calcio/vitamina D. Se aplicó remuestreo *bootstrap* con 5000 iteraciones. Los resultados se representaron en un diagrama del modelo de mediación para representar la hipótesis analítica planteada.

**Resultados:** La hipertensión ( $B=1,35$ ;  $p<0,001$ ), diabetes mellitus ( $B=1,09$ ;  $p<0,001$ ),

dislipidemia ( $B=1,36$ ;  $p<0,001$ ) y uso de vitamina D ( $B=0,73$ ;  $p<0,001$ ) se asociaron con mayor número de comorbilidades. En la regresión logística se observó una asociación directa positiva entre hipertensión y fractura en miembro superior ( $B=0,43$ ;  $p=0,042$ ), así como una asociación indirecta negativa mediada por comorbilidades ( $B=-0,48$ ; IC 95%:  $-0,73$  a  $-0,28$ ). El número de comorbilidades se relacionó con mayor probabilidad de fractura en miembro inferior ( $B=-0,36$ ;  $p<0,001$ ). También fueron significativos el sexo ( $B=-0,50$ ;  $p=0,012$ ), la dislipidemia ( $B=0,82$ ;  $p<0,001$ ), el tabaquismo ( $B=0,42$ ;  $p=0,033$ ) y el bajo consumo de calcio ( $B=-0,71$ ;  $p=0,008$ ).

**Conclusiones:** la hipertensión arterial se asocia con fracturas en miembro superior; sin embargo, esta asociación se atenúa o se invierte en presencia de mayor carga de comorbilidades, favoreciendo fracturas en miembros inferiores.

**Palabras clave:** fracturas óseas, hipertensión, comorbilidad, salud del adulto, análisis de mediación

## **HYPERTENSION, COMORBIDITIES, AND FRACTURE TYPE IN OLDER ADULTS: A MEDIATION ANALYSIS**

### **Abstract**

**Introduction:** Fragility fractures in older adults often coexist with comorbidities, affecting their location and severity.

**Objective:** To analyze whether the number of comorbidities acts as a mediator in the association between hypertension and fragility fracture type in older adults.

**Materials and methods:** A cross-sectional study based on secondary data from 719 adults aged  $\geq 50$  years with non-vertebral fragility fractures. Hayes' PROCESS model 4 was used to assess whether the total number of comorbidities mediated the association between hypertension and fracture type (upper vs. lower limb). Linear and logistic regressions were adjusted for age, sex, diabetes, dyslipidemia, smoking, and calcium/vitamin D supplementation. Bootstrap resampling with 5000 iterations was applied. Results were illustrated in a mediation model diagram to

represent the theoretical analytical framework.

**Results:** Hypertension ( $B=1.35$ ;  $p<0.001$ ), diabetes mellitus ( $B=1.09$ ;  $p<0.001$ ), dyslipidemia ( $B=1.36$ ;  $p<0.001$ ), and vitamin D use ( $B=0.73$ ;  $p<0.001$ ) were associated with a higher number of comorbidities. In the logistic regression, a direct positive association between hypertension and upper limb fractures was observed ( $B=0.43$ ;  $p=0.042$ ), along with a significant indirect association mediated by comorbidities ( $B=-0.48$ ; 95% CI:  $-0.73$  to  $-0.28$ ). A higher number of comorbidities was associated with lower limb fractures ( $B=-0.36$ ;  $p<0.001$ ). Sex ( $B=-0.50$ ;  $p=0.012$ ), dyslipidemia ( $B=0.82$ ;  $p<0.001$ ), smoking ( $B=0.42$ ;  $p=0.033$ ), and low calcium intake ( $B=-0.71$ ;  $p=0.008$ ) were also significant.

**Conclusions:** Hypertension was associated with upper limb fractures; however, this association was attenuated or reversed in the presence of multiple comorbidities, favoring lower limb fractures.

**Keywords:** fractures, bone, hypertension, comorbidity, adult health, mediation analysis.

### **Introducción**

Las fracturas por fragilidad constituyen una de las principales causas de morbilidad, discapacidad y pérdida de calidad de vida en adultos mayores, especialmente en contextos con alta prevalencia de enfermedades crónicas y acceso limitado a servicios de salud.<sup>1</sup> Estas fracturas, que ocurren típicamente tras caídas de bajo impacto, afectan con mayor frecuencia a sitios como la cadera, el húmero, el radio distal y el tobillo, y se encuentran estrechamente relacionadas con condiciones como la osteoporosis, el deterioro funcional y la multimorbilidad.<sup>2</sup>

La hipertensión arterial (HTA) es una de las comorbilidades más frecuentes en personas de 50 años o más y ha sido asociada con un

mayor riesgo de caídas, alteraciones en la microcirculación ósea y disminución de la masa mineral ósea.<sup>3,4</sup> Sin embargo, su relación con el tipo específico de fractura no ha sido claramente establecida. Por otro lado, la carga de comorbilidades podría modificar esta asociación, dado que las enfermedades que suelen coexistir en edades avanzadas pueden alterar tanto la estabilidad postural como la fragilidad ósea, pudiendo afectar la localización y gravedad de las fracturas.

Los estudios que analizan la relación entre hipertensión arterial, comorbilidades y fracturas en adultos mayores siguen siendo limitados, a pesar de que esta población concentra una elevada carga de enfermedades crónicas



y un mayor riesgo de fracturas por fragilidad.<sup>5</sup> En el contexto del envejecimiento poblacional global, estas condiciones representan un desafío creciente para los sistemas de salud, tanto por sus implicaciones clínicas como por los costos asociados a la atención y rehabilitación<sup>6</sup>. Ciertos factores como las barreras estructurales al acceso a servicios preventivos y el subtratamiento de enfermedades como la osteoporosis agravan aún más la vulnerabilidad de los adultos mayores, especialmente en entornos con recursos limitados.<sup>7</sup>

Asimismo, la HTA ha sido asociada con alteraciones en la perfusión ósea, disfunción endotelial, inflamación crónica y mayor riesgo de caídas, lo cual podría influir en la aparición de fracturas osteoporóticas. A su vez, se vincula frecuentemente con otras enfermedades crónicas como la diabetes, la dislipidemia y la movilidad reducida, configurando un perfil de multimorbilidad en adultos mayores. Estas comorbilidades pueden afectar tanto la estabilidad postural como la integridad del hueso, modificando potencialmente el patrón anatómico de las fracturas. Bajo este marco tiene sentido explorar un modelo causal donde la HTA se relacione con el tipo de fractura, y este vínculo pueda estar mediado por el número total de comorbilidades, como mecanismo explicativo relevante en contextos clínicos con alta carga de enfermedades crónicas.

En ese sentido, el presente estudio tuvo como objetivo analizar si el número de comorbilidades actúa como mediador en la relación entre HTA y tipo de fractura por fragilidad (miembro superior versus miembro inferior) en una muestra de adultos mayores. Se espera que este enfoque permita comprender mejor cómo la HTA contribuye directa o indirectamente a la localización anatómica de las fracturas a través de la acumulación de condiciones clínicas coexistentes, lo que podría facilitar la identificación de perfiles de riesgo más precisos y mejorar las estrategias de prevención y manejo integral en adultos mayores con múltiples comorbilidades.

## **Materiales y método**

### **Diseño y población**

Se realizó un estudio de tipo analítico y transversal utilizando una base de datos secundaria de acceso abierto, originalmente publicada en la plataforma F1000Research®. Esta base de datos corresponde a una cohorte retrospectiva de tres años (enero de 2017 a diciembre de 2019) obtenida a partir de registros médicos electrónicos.<sup>8</sup> La base de datos estuvo conformada por 719 pacientes adultos de 50 años o más, de ambos sexos, que acudieron a servicios ambulatorios u hospitalarios a causa de fracturas por fragilidad no vertebrales.

La base de datos incluyó fracturas de bajo impacto ocurridas en el húmero, cintura escapular, radio, cúbito, cuello femoral, región intertrocanterica/subtrocanterica, tibia y maléolos. No se tuvieron en cuenta fracturas vertebrales, aquellas debidas a mecanismos de alta energía (como proyectiles, accidentes automovilísticos o caídas desde más de un metro de altura), fracturas relacionadas con cáncer y fracturas previamente tratadas en otra institución o con diagnóstico de no unión. Los datos analizados incluyeron información sociodemográfica, clínica y sobre el consumo de suplementos (calcio y vitamina D), así como antecedentes médicos relevantes registrados al momento del evento fracturario.

### **Variables y mediciones**

La variable dependiente principal fue el tipo de fractura por fragilidad, categorizada en miembro superior (que comprendió fracturas del húmero, muñeca y antebrazo) y miembro inferior (incluyendo cadera, tibia y tobillo). Estas fracturas habían sido codificadas según la Clasificación Internacional de Enfermedades, décima revisión (CIE-10), utilizando los códigos S42.2 y S42.9 para fracturas del húmero y del hombro; S52.5, S52.60 y S52.9 para radio, cúbito y antebrazo; S72.0, S72.1 y S72.2 para cuello femoral e intertrocantericas/subtrocantericas y S82.3, S82.5, S82.6 y S82.8

para maléolos, par tibia distal y maléolos. Esta variable fue dicotomizada como fractura en miembro superior = 1 y miembro inferior = 0.

La variable mediadora fue el número total de comorbilidades, definida como el recuento de diagnósticos médicos crónicos registrados en la historia clínica al ingreso. Esta se trató como una variable de conteo modelada analíticamente como continua. Entre las comorbilidades documentadas se incluyeron hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemia, enfermedad tiroidea, enfermedad renal crónica, enfermedad cardiovascular, cáncer, osteoporosis, artritis y movilidad reducida, entre otras.

Las variables independientes seleccionadas para el análisis incluyeron condiciones clínicas y conductuales registradas como antecedentes o diagnósticos activos en el momento de la fractura, tales como hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, uso de suplementos de calcio, suplementación con vitamina D y antecedente de tabaquismo. La hipertensión arterial fue considerada según el diagnóstico clínico registrado en la historia médica electrónica al momento del ingreso por fractura. La base de datos no incluyó valores específicos de presión arterial ni el criterio diagnóstico utilizado (por ejemplo, umbral  $\geq 140/90$  mmHg), por lo que esta variable se analizó en forma dicotómica (presente/ausente).

Estas variables fueron dicotomizadas (presente = 1; ausente = 0) en función de su presencia en los registros. Asimismo, se incluyeron como covariables de control la edad (expresada en años, variable continua) y el sexo (femenino = 1; masculino = 0).

La información fue extraída por los responsables del estudio original mediante reportes del sistema de inteligencia empresarial del hospital y herramientas automatizadas como *DI Report Writer*. Los datos sobre diagnóstico de fractura, uso de medicamentos y antecedentes clínicos fueron validados por personal clínico y técnico en el estudio primario, y no

se recolectaron datos directamente de los pacientes para el presente análisis.

### Análisis estadístico

Para evaluar la relación entre HTA y tipo de fractura (miembro superior vs. miembro inferior) se utilizó un análisis de mediación simple correspondiente al modelo 4 del macro-PROCESS® de Andrew F. Hayes, el cual permite estimar componentes directos e indirectos dentro de un marco analítico teórico, considerando una variable mediadora.<sup>9</sup> En este caso, la variable independiente fue la presencia de HTA; la variable dependiente, el tipo de fractura (codificada como fractura en miembro superior = 1, inferior = 0); y la variable mediadora, el número total de comorbilidades. Todos los modelos fueron ajustados por edad, sexo, diabetes, dislipidemia, uso de suplementos de calcio y vitamina D y antecedente de tabaquismo.

Primero, se aplicó un modelo de regresión lineal para examinar los predictores del número total de comorbilidades. En este modelo, los coeficientes B representan el cambio promedio en el número de comorbilidades asociado a una unidad de cambio en la variable independiente. El valor t evalúa si cada coeficiente es significativamente diferente de cero; el valor p indica si esa diferencia es estadísticamente significativa. El coeficiente de determinación R<sup>2</sup> refleja el porcentaje de la varianza total del mediador explicado por el modelo (R<sup>2</sup> = 0,64), y el estadístico F evalúa la significancia global del modelo (p global < 0,001).

Luego, se utilizó una regresión logística binaria para modelar la probabilidad de fractura en miembro superior según hipertensión, comorbilidades y otras covariables. En este modelo, los coeficientes B indican el logaritmo del *odds ratio* (log-OR) para cada variable independiente. El estadístico Z (similar al t en regresión lineal) evalúa la significancia individual de cada predictor y los intervalos de confianza (IC 95%) indican el rango de valores plausibles para cada efecto. Se reportaron



también indicadores de ajuste del modelo como el  $-2$  Log Likelihood y las pseudo- $R^2$  de Cox & Snell y Nagelkerke, siendo esta última útil para interpretar la proporción de varianza explicada.

Se aplicó el procedimiento de mediación utilizando el método de remuestreo *bootstrap* con 5000 iteraciones, lo que permitió estimar con precisión los componentes directo e indirecto de la asociación entre hipertensión y tipo de fractura, mediado por las comorbilidades. Un componente indirecto significativo, con un intervalo de confianza que no incluye el valor cero, indica una mediación estadísticamente relevante.

Finalmente, se elaboró un diagrama esquemático (con el programa Microsoft Power Point 2016®) para representar gráficamente el modelo de mediación especificado. En esta figura se incluyen la variable independiente, el mediador y la variable dependiente, así como las covariables clínicas, sociodemográficas y conductuales incluidas en los modelos, con el objetivo de facilitar la comprensión de las relaciones modeladas y del papel del mediador dentro del esquema analítico planteado.

Se consideró un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$  en todos los análisis. El procedimiento completo se realizó en SPSS 27® con el macro-PROCESS 4.3 de Hayes.

Dado el diseño transversal basado en registros secundarios, el análisis de mediación se utilizó como un modelo estadístico para explorar asociaciones estructuradas entre variables, sin implicar relaciones causales.

### Consideraciones éticas

Los datos utilizados en este estudio fueron obtenidos de la plataforma de acceso abierto F1000Research.com®, la cual opera bajo una licencia *Creative Commons*, por lo que no fue necesario solicitar permisos o autorizaciones adicionales al tratarse de una base de datos secundaria. La investigación se llevó a cabo conforme a los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. La base de datos

y el material complementario están disponibles en el siguiente enlace:<sup>7</sup> <https://f1000research.com/articles/10-175#ref-7>.

### Resultados

La mayoría de los adultos mayores con fracturas por fragilidad no tenía diagnóstico previo de osteoporosis, a pesar de la ocurrencia del evento clínico, lo que podría sugerir un subdiagnóstico o infratratamiento en esta población. La mayor proporción de casos correspondió a personas entre 66 y 83 años y de sexo femenino. Más de la mitad presentaba hipertensión arterial y obesidad, mientras que un tercio tenía antecedentes de diabetes o dislipidemia. El hábito de fumar actual o pasado fue menos frecuente que la ausencia total de consumo, y solo uno de cada tres pacientes recibía suplementación con vitamina D. En cuanto a la carga de enfermedades crónicas, cerca del 60% informó entre dos y cuatro comorbilidades. Las fracturas se localizaron predominantemente en miembros inferiores, particularmente en tobillo y cadera, frente a las de miembro superior como hombro o muñeca (Tabla 1).

El modelo de regresión lineal para el total de comorbilidades presentó un ajuste adecuado ( $R=0,80$ ;  $R^2=0,64$ ;  $F=157,96$ ;  $gl=8;703$ ;  $p < 0,001$ ), explicando el 64% de la varianza del mediador. Se observó que la hipertensión arterial ( $B=1,35$ ; IC 95%: 1,15-1,54;  $p < 0,001$ ), la diabetes ( $B=1,09$ ; IC 95%: 0,89-1,28;  $p < 0,001$ ), la dislipidemia ( $B=1,36$ ; IC 95%: 1,17-1,55;  $p < 0,001$ ) y el uso de vitamina D ( $B=0,73$ ; IC 95%: 0,52-0,95;  $p < 0,001$ ) se asociaron significativamente con un mayor número de comorbilidades. En cambio, edad, sexo, consumo de calcio y tabaquismo no mostraron asociaciones estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), lo que sugiere que la carga comórbida en esta población hispana adulta mayor está más vinculada a condiciones clínicas específicas que a factores socio-demográficos o conductuales (Tabla 2).

En el modelo de regresión logística

**Tabla 1.** Características clínicas y sociodemográficas de adultos  $\geq 50$  años con fracturas por fragilidad (N = 719)

Variable	Categoría	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Osteoporosis	No	657	91,4
	Sí	62	8,6
Grupo etario	50-65 años	187	26
	66-83 años	355	49,4
	84 años o más	177	24,6
Sexo	Mujer	550	76,5
	Hombre	169	23,5
Hipertensión arterial	No	294	40,9
	Sí	425	59,1
Obesidad	No	376	52,3
	Sí	343	47,7
Diabetes mellitus	No	458	63,7
	Sí	261	36,3
Dislipidemia	No	452	62,9
	Sí	267	37,1
Consumo de cigarro	Fumador / Exfumador	175	24,3
	Nunca	537	74,7
Vitamina D	No	472	65,6
	Sí	247	34,4
Número total de comorbilidades	0	57	7,9
	1	131	18,2
	2	138	19,2
	3	143	19,9
	4	98	13,6
	5	84	11,7
	6	37	5,1
	7	23	3,2
	8	6	0,8
	10	2	0,3
Zona de fractura por fragilidad	Miembro inferior (cadera o tobillo)	423	58,8
	Miembro superior (hombro o muñeca)	296	41,2

multivariado, la hipertensión arterial se asoció significativamente con mayor probabilidad de fractura en miembro superior frente a inferior (B=0,4291; IC 95%: 0,0158-0,8424; p=0,042). En cambio, el número total de comorbilidades

se asoció inversamente (B=-0,356; IC 95%: -0,5040 a -0,2080; p < 0,001), sugiriendo que una mayor carga comórbida favorece fracturas en miembros inferiores. Asimismo, el sexo femenino presentó menor probabilidad



**Tabla 2.** Modelo de regresión lineal para el número total de comorbilidades

Variable	Coefficiente (B)	Error estándar	Valor t	Valor p	IC 95%
Constante	0,9454	0,1533	6,17	<0,001	0,6445-1,2464
HTA	1,346	0,1001	13,45	<0,001	1,1495-1,5426
Edad	0,0491	0,0626	0,78	0,433	-0,0738-0,1720
Sexo	0,0024	0,1029	0,02	0,982	-0,1996-0,2043
Diabetes	1,0851	0,0981	11,06	<0,001	0,8925-1,2778
Dislipidemia	1,3637	0,0964	14,14	<0,001	1,1743-1,5531
Calcio	0,012	0,1343	0,09	0,929	-0,2516-0,2756
Fumador	-0,1014	0,1021	-0,99	0,321	-0,3018-0,0990
Vitamina D	0,7312	0,1101	6,64	<0,001	0,5151-0,9473

Estadísticos del modelo: R=0,8016; R<sup>2</sup>=0,6425; F=157,96; gl (df)=8; 703; p global del modelo < 0,001

de fractura superior (B=-0,4982; IC 95%: -0,8854 a -0,1111; p=0,012). La dislipidemia (B=0,8223; p < 0,001), el antecedente de tabaquismo (B=0,417; p=0,033) y niveles bajos de calcio (B=-0,7079; p=0,008) también fueron predictores significativos. Edad, diabetes mellitus y vitamina D no mostraron asociaciones relevantes (p > 0,05). El modelo presentó ajuste aceptable (-2LL=908,93) y capacidad

explicativa moderada (Nagelkerke R<sup>2</sup>=0,1014), con significancia global ( $\chi^2=55,69$ ; gl=9; p < 0,001) (Tabla 3).

Con el fin de evaluar la robustez del modelo se realizó un análisis de sensibilidad excluyendo la hipertensión arterial de la regresión logística multivariada. El número total de comorbilidades mantuvo una asociación significativa e inversa con fractura en miembro superior

**Tabla 3.** Modelo de regresión logística para tipo de fractura (miembro superior vs. miembro inferior)

Variable	Coefficiente (B)	Error estándar	Z	Valor p	IC 95%
Constante	0,1942	0,2928	0,66	0,507	-0,3797- 0,7682
HTA	0,4291	0,2109	2,04	0,042	0,0158-0,8424
Número de comorbilidades	-0,356	0,0755	-4,71	<0,001	-0,5040- -0,2080
Edad	-0,137	0,1167	-1,17	0,241	-0,3658- 0,0918
Sexo	-0,4982	0,1975	-2,52	0,012	-0,8854- -0,1111
Diabetes mellitus	0,0685	0,1989	0,34	0,731	-0,3213- 0,4582
Dislipidemia	0,8223	0,2102	3,91	<0,001	0,4102- 1,2343
Calcio	-0,7079	0,2658	-2,66	0,008	-1,2288- -0,1870
Fumador	0,417	0,1954	2,13	0,033	0,0339- 0,8000
Vitamina D	0,1768	0,2123	0,83	0,405	-0,2392- 0,5928

-2 Log likelihood=908,93; McFadden R<sup>2</sup>=0,0577; Cox & Snell R<sup>2</sup>=0,0752; Nagelkerke R<sup>2</sup>=0,1014; p global del modelo ( $\chi^2$ )=< 0,001; df=9

Variable dependiente: fractura en miembro superior (1) vs. miembro inferior (0).

(OR=0,745; IC 95%: 0,655-0,847;  $p < 0,001$ ), evidenciando consistencia en la dirección y magnitud del efecto (Tabla 4).

En el análisis de mediación se observó un componente directo positivo de la asociación entre hipertensión y probabilidad de fractura en miembro superior frente a inferior (B=0,4291; IC 95%: 0,0158-0,8424;  $p=0,042$ ), indicando que los adultos mayores con hipertensión presentaron mayor probabilidad de este tipo de fractura. Asimismo, se evidenció un componente indirecto negativo significativo mediado por el número total de comorbilidades (B=-0,4791; IC 95%: -0,7310 a -0,2828), lo que sugiere que, al incrementar la carga comórbida, la asociación entre

hipertensión y tipo de fractura se orienta hacia mayor probabilidad de fractura en miembro inferior. Estos hallazgos indican la coexistencia de asociaciones en direcciones opuestas dentro del modelo analítico planteado (Tabla 5).

El diagrama (Figura 1) representa las asociaciones significativas del modelo de mediación, donde la HTA es la variable independiente; el tipo de fractura, la dependiente, y el número total de comorbilidades, el mediador. Las flechas rojas indican asociaciones positivas, relacionadas con mayor probabilidad de fractura en el miembro superior; las azules indican asociaciones negativas, vinculadas con fracturas en el miembro inferior. La HTA mostró un componente directo positivo

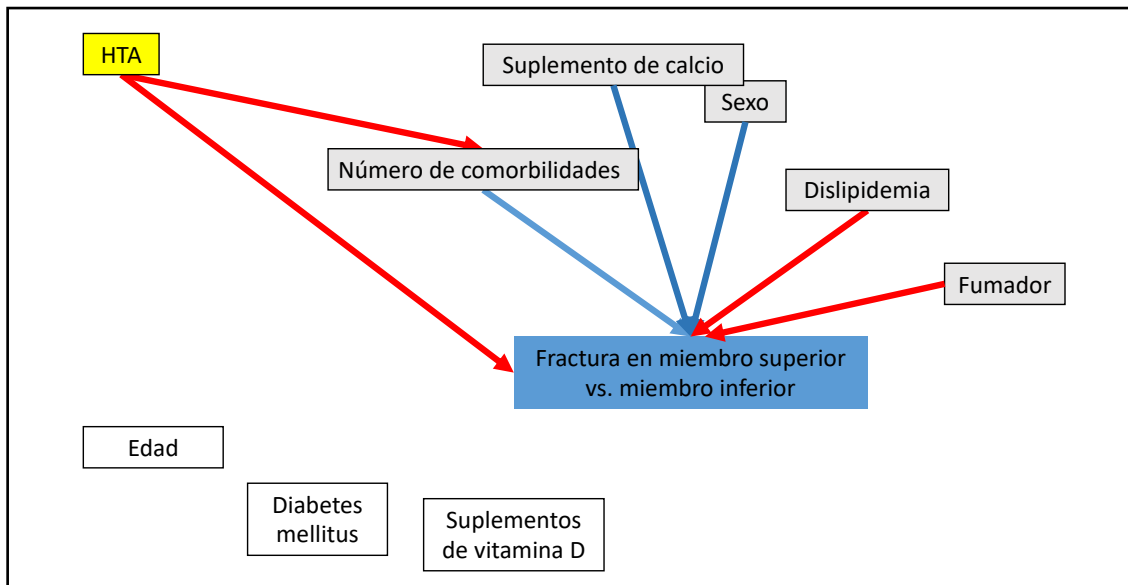
**Tabla 4.** Análisis de sensibilidad: Modelo logístico para tipo de fractura excluyendo hipertensión arterial

Variable	B	OR	IC 95%	p
Número total de comorbilidades	-0,295	0,745	0,655- 0,847	<0,001
Diabetes mellitus	0,131	1,14	0,775- 1,675	0,506
Dislipidemia	0,783	2,189	1,456- 3,291	<0,001
Calcio	-0,698	0,497	0,299- 0,829	0,007
Vitamina D	0,116	1,123	0,746-- 1,690	0,578
Fumador	-0,395	0,674	0,461- 0,985	0,042
Sexo femenino	0,502	1,652	1,124- 2,427	0,011

**Tabla 5.** Componentes directo e indirecto de la asociación entre hipertensión y tipo de fractura

Tipo de efecto	Efecto	Error bootstrap	IC 95%	Valor p
<b>Directo (HTA → fractura en miembro superior vs. inferior)</b>	0,4291	0,2109	0,0158- 0,8424	0,042
<b>Indirecto (HTA → comorbilidades → fractura en miembro superior vs. inferior)</b>	-0,4791	0,1136	-0,7310--0,2828	—

Nota: ajustado por edad, sexo, diabetes, dislipidemia, consumo de suplementos de calcio, fumador, consumo de suplementos de vitamina D.



**Figura 1.** Modelo de mediación de la asociación entre HTA y fracturas en miembro superior vs. miembro inferior, con comorbilidades como mediador.

de la asociación con el tipo de fractura, y un componente indirecto negativo mediado por comorbilidades. Además, dislipidemia y tabaquismo se asociaron con mayor riesgo de fractura superior, mientras que el sexo femenino y el calcio, con fractura inferior. Edad, diabetes y vitamina D se incluyen sin flechas por no haber mostrado significación estadística, aunque fueron controladas como covariables. Este esquema resume la coexistencia de efectos contrapuestos que contribuyen al riesgo diferencial de fractura según la localización anatómica.

### Discusión

Los resultados mostraron que ciertas condiciones clínicas, particularmente la HTA, la diabetes mellitus, la dislipidemia y el uso de suplementos de vitamina D, se asociaron significativamente con un mayor número de comorbilidades en adultos mayores de este estudio. Tal hallazgo sugiere que la carga comórbida en esta población está determinada

principalmente por enfermedades crónicas de base metabólica, más que por factores socio-demográficos como la edad o el sexo, o conductuales como el tabaquismo o el consumo de suplementos de calcio. Esto podría explicarse por el hecho de que algunas patologías como la hipertensión, la diabetes mellitus y la dislipidemia comparten mecanismos fisiopatológicos comunes, como la inflamación crónica, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial,<sup>10</sup> que tienden a coexistir y acumularse en el mismo individuo, generando un perfil clínico complejo. En contraste, variables como la edad o el sexo podrían influir de forma indirecta o estar moduladas por el contexto clínico general, mientras que el consumo de suplementos no siempre refleja una deficiencia previa ni sugiere necesariamente un estado de salud adverso.<sup>11</sup>

Adicionalmente, el sexo femenino mostró menor probabilidad de fractura en el miembro superior, hallazgo consistente con estudios previos que informan mayor prevalencia de

fracturas de cadera en mujeres mayores, posiblemente debido a la mayor pérdida de masa ósea trabecular en sitios como la cadera tras la menopausia<sup>12</sup>, lo que aumenta su vulnerabilidad a fracturas en miembros inferiores. La dislipidemia y el antecedente de tabaquismo se asociaron con mayor riesgo de fractura en el miembro superior, probablemente por su efecto negativo acumulativo sobre la calidad del hueso, ya que ambas condiciones se han vinculado con alteraciones en el metabolismo óseo, reducción de la densidad mineral y deterioro de la microarquitectura ósea<sup>13-14</sup>. Por su parte, el uso de suplementos de calcio se asoció inversamente con las fracturas en el miembro superior, lo cual podría reflejar una mayor fragilidad ósea general en quienes los consumen o un posible sesgo de prescripción, dado que estos suplementos son más frecuentemente indicados en personas con antecedentes de fractura previa o con mayor riesgo percibido de fracturas osteoporóticas, muchas de las cuales se producen en miembros inferiores.

El modelo de mediación reveló la coexistencia de asociaciones en direcciones opuestas dentro del esquema analítico planteado: aunque la hipertensión se asoció directamente con fracturas en miembro superior, esta asociación se orientó hacia fracturas en miembro inferior en presencia de múltiples comorbilidades. Esta variación en la dirección de la asociación podría explicarse por el deterioro funcional acumulativo que generan las comorbilidades en conjunto, como la sarcopenia, la disminución de la movilidad, el deterioro del equilibrio o el uso de múltiples fármacos,<sup>15</sup> que incrementan el riesgo de caídas graves, típicamente asociadas con fracturas en cadera o tobillo. Es posible que, en ausencia de una carga comórbida elevada, las caídas comprometan con mayor frecuencia las extremidades superiores; mientras que, en presencia de múltiples condiciones clínicas, la fragilidad general aumente la probabilidad de impactos en miembros inferiores. Este patrón

subraya la importancia de evaluar el perfil clínico global del paciente en lugar de centrarse en diagnósticos individuales.

Desde una perspectiva clínica, estos hallazgos resaltan la utilidad del análisis de mediación como herramienta para explorar posibles rutas de asociación en poblaciones envejecidas. A diferencia de los modelos tradicionales que evalúan asociaciones independientes entre variables, el enfoque de mediación permite examinar cómo una variable puede influir en otra a través de un tercer factor intermedio, facilitando una comprensión más integrada del perfil clínico del paciente. Este marco analítico no implica causalidad, sino que ofrece una aproximación estructurada para interpretar asociaciones complejas en estudios observacionales.

Los hallazgos de este estudio tienen implicaciones relevantes para la práctica clínica y la prevención de fracturas en adultos mayores. La identificación de la HTA como un factor asociado a fracturas en miembro superior sugiere que el control adecuado de la presión arterial debería considerarse no solo por sus beneficios cardiovasculares, sino también por su posible impacto en la salud musculoesquelética. Además, dado que una mayor carga comórbida se relacionó con fracturas en miembro inferior, los programas de atención geriátrica integral deberían priorizar la evaluación y manejo simultáneo de múltiples enfermedades crónicas para reducir el riesgo de caídas graves. En conjunto, estos resultados resaltan la necesidad de un abordaje multidimensional del riesgo de fracturas osteoporóticas, incorporando tanto factores individuales como el perfil clínico global del paciente.

Estos resultados también abren diversas interrogantes que merecen exploración en investigaciones futuras. ¿Por qué la hipertensión se asocia directamente con fracturas en miembros superiores, pero este efecto se revierte en presencia de comorbilidades? ¿Existen patrones específicos de caída o mecanismos biomecánicos distintos en personas



hipertensas que expliquen este fenómeno? Además, la asociación inversa entre el uso de suplementos de calcio y las fracturas en miembro superior plantea dudas sobre el momento, dosis y motivo de la suplementación: ¿se trata de un marcador de fragilidad previa o de un efecto protector real limitado a ciertos grupos?

Este estudio presenta limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados. Al tratarse de un análisis transversal basado en datos secundarios, no es posible establecer relaciones causales entre las variables evaluadas. Además, la información sobre el uso de suplementos de calcio y vitamina D proviene de autoinforme, lo que puede estar sujeto a sesgos de recuerdo o subregistro. Otra limitación fue la ausencia de mediciones clínicas directas como densitometría ósea, información sobre el mecanismo o tipo de caída, o marcadores de fragilidad, que podrían ayudar a precisar los mecanismos fisiopatológicos detrás de las fracturas y su localización anatómica. Asimismo, la base de datos no incluyó el índice de masa corporal como variable continua ni las mediciones de peso y talla necesarias para su cálculo, lo que impidió evaluar el coeficiente ponderoestatural en forma cuantitativa. Finalmente, aunque el análisis incluyó diversas covariables, no se pudo ajustar por factores como la actividad física, el estado nutricional o la adherencia terapéutica, que podrían influir en el riesgo de fractura o en la carga comórbida.

En conclusión, en este estudio la hipertensión arterial en adultos mayores se asoció con fracturas en miembro superior; sin embargo, tal asociación mostró una orientación diferente en presencia de mayor carga de comorbilidades, favoreciendo fracturas en miembros inferiores. Este hallazgo resalta el papel mediador del estado comórbido dentro del modelo analítico planteado y subraya la necesidad de un abordaje clínico integral que considere no solo enfermedades aisladas, sino la coexistencia de múltiples condiciones crónicas. Asimismo, algunos factores como el sexo femenino, la dislipidemia, el tabaquismo y el uso de suplementos de calcio se asociaron diferencialmente con el tipo de fractura, aportando nuevas perspectivas para el tamizaje de riesgo y la planificación de intervenciones preventivas más personalizadas en esta población envejecida.

**Conflictos de intereses:** el autor declara no tener conflictos de intereses.

**Financiamiento:** el autor declara que no ha recibido ningún financiamiento o apoyo económico para la realización de este estudio y la preparación de este artículo.

Recibido: 8/09/2025

Aceptado: 13/02/2026

Publicado: 1/04/2026

## Referencias

1. Hurtado Y, Hernández OA, De Leon DPA, Duque G. Challenges in delivering effective care for older persons with fragility fractures. *Clin Interv Aging* [Internet]. 2024;19:133-40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2147/CIA.S433999>
2. Jha SS. Fragility fracture: 10 commandments. *Indian J Orthop* [Internet]. 2025;59(3):244-55. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s43465-025-01356-y>
3. Li C, Zeng Y, Tao L, et al. Meta-analysis of hypertension and osteoporotic fracture risk in women and men. *Osteoporos Int* [Internet]. 2017;28(8):2309-18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-017-4050-z>
4. Hu Z, Yang K, Hu Z, et al. Determining the

- association between hypertension and bone metabolism markers in osteoporotic patients. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2021;100(24):e26276. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000026276>
5. Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int* [Internet]. 2005;16(2):155-62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-004-1640-3>
  6. Jones CH, Dolsten M. Healthcare on the brink: navigating the challenges of an aging society in the United States. *NPJ Aging* [Internet]. 2024;10(1):22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41514-024-00148-2>
  7. Onizuka N, Onizuka T. Disparities in osteoporosis prevention and care: Understanding gender, racial, and ethnic dynamics. *Curr Rev Musculoskelet Med* [Internet]. 2024;17(9):365-72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s12178-024-09909-8>
  8. Torres-Reveron A, Serra-Torres M. Retrospective analysis of the use of osteoporosis medication at the presentation of non-vertebral fragility fractures in a predominantly Hispanic population. *F1000Res* [Internet]. 2021 [citado 13 de noviembre de 2024];10(175):175. Disponible en: <https://f1000research.com/articles/10-175/pdf>
  9. Jung SJ. Introduction to mediation analysis and examples of its application to real-world data. *J Prev Med Public Health* [Internet]. 2021;54(3):166-72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3961/jpmph.21.069>
  10. Dąbrowska E, Narkiewicz K. Hypertension and dyslipidemia: The two partners in endothelium-related crime. *Curr Atheroscler Rep* [Internet]. 2023;25(9):605-12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11883-023-01132-z>
  11. Nagpal AK, Muthukrishnan J. The calcium and vitamin D dilemma: To D or not to D? *Med J Armed Forces India* [Internet]. 2015;71(4):315-6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mjafi.2015.09.011>
  12. Whittier DE, Manske SL, Billington E, et al. Hip fractures in older adults are associated with the low density bone phenotype and heterogeneous deterioration of bone microarchitecture. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2022;37(10):1963-72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.4663>
  13. Trevisan C, Alessi A, Girotti G, et al. The impact of smoking on bone metabolism, bone mineral density and vertebral fractures in postmenopausal women. *J Clin Densitom* [Internet]. 2020;23(3):381-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocd.2019.07.007>
  14. Anagnostis P, Florentin M, Livadas S, Lambrinouadaki I, Goulis DG. Bone health in patients with dyslipidemias: An underestimated aspect. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022;23(3):1639. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23031639>
  15. Rodrigues F, Domingos C, Monteiro D, Morouço P. A review on aging, sarcopenia, falls, and resistance training in community-dwelling older adults. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2022;19(2):874. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph19020874>



ARTÍCULO ORIGINAL / Original

## MARCADORES DE REMODELACIÓN Y ESTRUCTURA ÓSEA EN DIFERENTES ETAPAS DE LA VIDA EN RATAS WISTAR<sup>§</sup>

Estefanía M. Zeni Coronel\*,<sup>ORCID</sup> Marina S. Bonanno,<sup>ORCID</sup> Hernán Mascías,<sup>ORCID</sup> Morena Longo,<sup>ORCID</sup> Susana Zeni,<sup>ORCID</sup> Mariana Seijo<sup>ORCID</sup>

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM). Buenos Aires, Argentina

### Resumen

**Introducción:** la masa ósea experimenta cambios dinámicos a lo largo del crecimiento. El objetivo fue evaluar variaciones en los marcadores de remodelación ósea, la microarquitectura trabecular y las propiedades densitométricas y biomecánicas del fémur en ratas Wistar hembras.

**Materiales y métodos:** se estudiaron seis grupos etarios (recién nacidas, 21, 45, 90, 105 y 180 días; n=6/grupo). Se determinaron los niveles séricos de calcio (Ca), fósforo (Pi) osteocalcina (OCN) y telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (CTX); se evaluó la estructura ósea mediante histomorfometría (BV/TV), densidad (DMOft) y contenido mineral óseo femoral (CMOft) mediante densitometría (DXA) y la biomecánica (CSMI, Rigidez, Fuerza de fractura, Módulo de Young) mediante ensayo de flexión a tres puntos.

**Resultados:** los resultados mostraron que el

Ca fue más alto a los 21 y 180 días y el menor valor de Pi se observó a los 90 días (p<0.05). La OCN disminuyó y el CTX aumentó desde 21 hasta 180 días de vida. El BV/TV aumentó significativamente desde el nacimiento hasta los 45 días. La DMOft y CMOft aumentaron hasta los 180 días. Las propiedades biomecánicas alcanzaron sus valores máximos en la adultez temprana.

**Discusión:** en conjunto, estos hallazgos describen la secuencia fisiológica de maduración ósea, donde inicialmente predomina el recambio óseo, seguido por una fase de ganancia estructural y, finalmente, la consolidación mecánica del hueso. **Conclusión:** estos datos pueden servir como referencia para estudios experimentales que evalúen intervenciones sobre la salud ósea durante el crecimiento.

**Palabras clave:** marcadores óseos, remodelación, crecimiento.

E-mail: ezenicoronel@fvvet.uba.ar

<sup>§</sup>Este artículo forma parte de la tesis doctoral de la veterinaria Estefanía M. Zeni Coronel.

## MARKERS OF BONE REMODELLING AND BONE STRUCTURE AT DIFFERENT LIFE STAGES IN WISTAR RATS

### Abstract

**Introduction:** bone mass undergoes dynamic changes throughout growth. The objective was to evaluate variations in bone remodeling markers, trabecular microarchitecture, and densitometric and biomechanical properties of the femur in female Wistar rats.

**Materials and methods:** six age groups were studied (newborn, 21, 45, 90, 105, and 180 days;  $n=6/\text{group}$ ). Serum levels of calcium (Ca), phosphorus (Pi), osteocalcin (OCN), and C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) were determined. Bone structure was evaluated by histomorphometry (BV/TV), density (BMDft), and femoral bone mineral content (BMOft) by densitometry (DXA), and biomechanics (CSMI,

stiffness, fracture strength, Young's modulus) by three-point bending test.

**Results:** the results showed that Ca was highest at 21 and 180 days, and the lowest Pi value was observed at 90 days ( $p<0.05$ ). OCN decreased and CTX increased from 21 to 180 days of age. BV/TV increased significantly from birth to 45 days. DMOft and CMOft increased up to 180 days. Biomechanical properties reached their maximum values in early adulthood.

**Discussion:** taken together, these findings describe the physiological sequence of bone maturation, where bone turnover initially predominates, followed by a phase of structural gain and, finally, mechanical consolidation of the bone.

**Conclusions:** these data may serve as a reference for experimental studies evaluating interventions on bone health during growth.

**Keywords:** bone markers, remodelling, growth.

### Introducción

La masa ósea (MO) es un tejido en constante renovación que experimenta cambios significativos a lo largo de la vida. Desde el nacimiento hasta el final de la adolescencia, la MO aumenta progresivamente hasta alcanzar su punto máximo, conocido como pico de masa ósea (PMO).<sup>1</sup> Este valor depende de múltiples factores, incluyendo la especie, la edad, el sexo, la nutrición y el nivel de actividad física. A partir de la adultez, la MO comienza a disminuir de manera gradual, con una aceleración marcada en mujeres durante la posmenopausia debido a la disminución estrogénica. Una adquisición insuficiente de MO durante el desarrollo, o una pérdida acelerada en la adultez, puede derivar en condiciones como osteopenia u osteoporosis.<sup>2</sup>

El mantenimiento del tejido óseo está mediado por dos procesos biológicos clave: la

modelación y el remodelación ósea. La modelación ocurre principalmente durante el crecimiento, cuando la formación ósea no está necesariamente precedida por resorción, lo que permite el aumento del tamaño y forma del hueso. En cambio, la remodelación, que predomina en la adultez, es un proceso acoplado: la resorción ósea llevada a cabo por osteoclastos es seguida por la formación de nuevo tejido por parte de osteoblastos, manteniéndose así la homeostasis ósea. Sin embargo, como la fase de resorción es más rápida (aproximadamente 12 días) que la de formación (alrededor de 30 días), cualquier alteración en este equilibrio puede derivar en una pérdida neta de MO con el tiempo.<sup>3</sup>

Tanto el modelamiento como el remodelamiento óseo son llevados a cabo por la actividad de las células óseas en paquetes celulares denominados unidad de remodelamiento



óseo (URO). Los osteoclastos degradan el hueso y los osteoblastos forman el nuevo tejido. La actividad de las células óseas de todas las URO pueden evaluarse mediante los marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo (MRO). Estos incluyen marcadores de resorción como el telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (CTX-I), y de formación como la osteocalcina (OCN), la fosfatasa alcalina ósea específica (FAO) y el propéptido aminoterminal del colágeno tipo I (P1NP).<sup>4,5</sup>

A diferencia de las mediciones estructurales, los MRO permiten detectar cambios metabólicos óseos en períodos relativamente cortos (1 a 3 meses), por lo que son útiles para identificar individuos con remodelamiento acelerado, incluso antes de que se evidencie pérdida ósea estructural.<sup>4,6</sup> En función de esto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar los cambios en los niveles de MRO y la estructura y calidad ósea femoral de ratas hembra de la cepa Wistar a lo largo de distintas etapas de la vida.

## Materiales y métodos

### Animales y condiciones de alojamiento

El estudio fue realizado en ratas hembras de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes del Laboratorio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA). En todos los diseños experimentales, el alojamiento se realizó utilizando jaulas abiertas con piso de malla de acero inoxidable, con pisos de malla para mantener condiciones higiénicas y evitar la coprofagia. Los animales fueron mantenidos bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas c/u, con una temperatura ambiente de  $21 \pm 1$  °C y una humedad relativa del 50-60%. Se permitió el libre acceso a la comida y al agua.<sup>7</sup> Finalizados los tiempos experimentales, los animales se les aplicó eutanasia siguiendo las directrices American Veterinary Medical Association (AVMA).<sup>8</sup>

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Río Negro (Certificado

CICUAL UNRN N.º 002/2023) y de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (Res. CS. 4081/04; 0074160/2017).

### Diseños experimentales

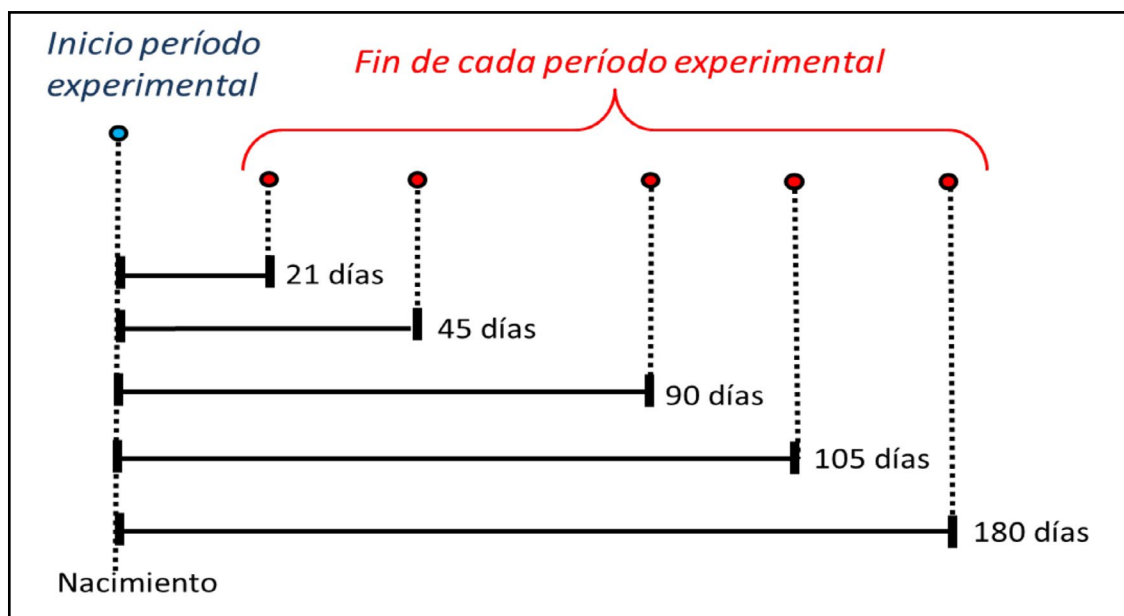
El diseño experimental fue realizado utilizando animales hembras normales de diferentes edades (n=6/grupo): recién nacidos (RN), al destete (21 días), al inicio de la madurez sexual (45 días), en la adultez (90 días y 105 días) y adultez tardía (180 días). En este protocolo, los animales fueron alimentados con dieta comercial. Al finalizar los tiempos experimentales se extrajo sangre por punción cardíaca bajo anestesia total y fémures.

### Determinaciones bioquímicas séricas

El suero fue separado por centrifugación a 3500RPM durante 10 minutos y permaneció a -20 °C hasta su análisis. Los niveles séricos de fósforo (P) (mg/dL) se determinó por el método colorimétrico UV-visible, usando un kit comercial (Phosphorus®, BioSystems S.A., España). La calcemia (Ca) (mg/dL) se determinó por espectrofotometría de absorción atómica a 423nm, utilizando cloruro de lantano (6500mg/L en la solución final) como supresor de interferencias. Los niveles séricos OCN (ng/mL) y CTX (Pg/mL) se determinaron por metodología ELISA (*Rat osteocalcin* y *Rat C-telopeptide of collagen Elisa Kit*, respectivamente, MyBioSource®, USA).<sup>4</sup>

### Determinaciones densitométricas

Se determinó la densidad mineral ósea de fémur total (DMOf<sub>t</sub>) con un equipo de absorciometría dual de rayos X (DXA) equipado con un *software* específicamente diseñado para pequeños animales (Hologic®, Waltham, MA, USA).<sup>9</sup> Las mediciones fueron llevadas a cabo por el Laboratorio de Biología ósea de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. A partir de la imagen sobre la pantalla se delimitó la región de interés (ROI) del fémur. Todas las ratas fueron escaneadas



**Figura 1.** Diseño experimental del estudio. Nacimiento=Recién nacido (RN).

mediante un procedimiento idéntico. La precisión del ensayo se obtuvo mediante cinco mediciones repetidas en un mismo día y en diferentes jornadas.<sup>10</sup> El coeficiente de variación fue de 1,0 g/cm<sup>2</sup>.

### Determinaciones histológicas

Para el análisis histológico convencional, los fémures se limpiaron de tejido blando y se fijaron en una solución *buffer* de formol-PBS al 10% durante 48 horas. Posteriormente, los huesos fueron descalcificados en EDTA a pH 7 durante 25 días. Finalizado el período de descalcificación se incluyeron en parafina y se realizaron cortes subcondrales (8-10µm) longitudinales del fémur en distal, incluida la capa esponjosa primaria y secundaria. Los cortes se colorearon con hematoxilina-eosina y fueron analizados con el microscopio vertical Nikon Eclipse Ni-U® (Cat N.º 940544, Japón) y microfotografiadas con NIS Elements Imagine software® (versión 4.0, Nikon, Japón) con la cámara de color de alta definición (Nikon DS-Fi2®, Japón).

Se evaluó el volumen trabecular sobre el área de hueso trabecular evaluado (BV/TV%) en la región ubicada por debajo de la zona central del cartílago de crecimiento del fémur. Este parámetro fue determinado utilizando el programa Image Pro Plus®, versión 4.5.0.29.

### Determinaciones biomecánicas

Se realizó el ensayo de flexión a tres puntos en el fémur derecho. Se determinó la longitud de cada fémur y se realizó una marca al 50% de la diáfisis. En este sitio se ejerció la fuerza, empleando un punto de apoyo superior. Para la realización del ensayo, el hueso fue colocado en un soporte metálico de 2 puntos de apoyo inferiores con una separación de 8,5 -14,5mm en función de la longitud del fémur, quedando así establecidos los tres puntos de apoyo del ensayo.

El voltaje desarrollado por la celda de carga es proporcional a la fuerza aplicada en el rango de 0 a 200N. El voltaje se mide por un conversor analógico digital cuya señal es transferida a una computadora a través de un



puerto RS232 y un *software* diseñado por el LBO (Biomedical Data Acquisition Suite 1.0®, Rosario, Argentina), que permite transformar los datos en pares fuerza-desplazamiento.<sup>11</sup>

Los parámetros evaluados en el ensayo de flexión a 3 puntos fueron los siguientes:

1. *CSMI (mm<sup>4</sup>) o momento de inercia de sección transversal*: describe cómo la forma y el tamaño del hueso afectan su resistencia a las fuerzas de torsión.
2. *Rigidez o stiffness (N/mm)*: es la fuerza aplicada para producir una unidad de desplazamiento
3. *Fuerza de fractura (N)*: fuerza a la cual el hueso se rompe.
4. *Módulo de Young (GPa)*: rigidez del material, correspondiente al tejido óseo trabecular, considerando el grosor del corte y el área del cono de compresión.

#### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desvío estándar (DE). La normalidad de las variables fue evaluada mediante el test de Shapiro-Wilks y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene. Los datos normales fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y aquellos que no

presentaron distribución normal mediante el test de Kruskal-Wallis. Cuando se constató la diferencia entre los distintos grupos se aplicó el test de Tukey para determinar entre cuáles de aquellos se encontraban diferencias significativas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* Infostat® (versión libre 2020). Un  $p \leq 0,05$  fue considerado significativo.

#### Resultados

La Tabla 1 muestra los cambios observados de las variables bioquímicas evaluadas en los tiempos experimentales.

La calcemia tuvo los valores más altos a los 21 y 180 días ( $p < 0,05$ ), sin diferencias significativas entre el resto de los grupos. La fosfatemia presentó el valor más bajo a los 90 días ( $p < 0,05$ ), sin diferencias significativas entre el resto de los grupos.

La OCN aumentó desde RN hasta los 90 días, disminuyendo sus valores a los 105 y 180 días ( $p < 0,05$ ). Contrariamente, el CTX disminuyó desde RN hasta los 105 días y aumentó el valor a los 180 ( $p < 0,05$ ).

Tanto la DMOft como el CMOft mostraron un aumento progresivo a lo largo del experimento (Figura 2), aumentando sus valores

**Tabla 1.** Análisis bioquímicos séricos en los diferentes grupos evaluados (media $\pm$ DE). n=6/grupo

Grupo	Ca (mg/dL)	Pi (mg/dL)	OCN (ng/dL)	B-CTX (pg/mL)
RN	8,35 $\pm$ 0,84 <sup>A</sup>	5,33 $\pm$ 0,37 <sup>AB</sup>	2,52 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>	77,9 $\pm$ 10,5 <sup>C</sup>
21 días	13,04 $\pm$ 0,86 <sup>C</sup>	5,38 $\pm$ 0,05 <sup>AB</sup>	3,11 $\pm$ 0,05 <sup>B</sup>	70,5 $\pm$ 10,6 <sup>BC</sup>
45 días	12,20 $\pm$ 0,50 <sup>B</sup>	5,44 $\pm$ 0,21 <sup>AB</sup>	3,39 $\pm$ 0,15 <sup>B</sup>	52,5 $\pm$ 7,4 <sup>A</sup>
90 días	12,05 $\pm$ 0,71 <sup>B</sup>	4,60 $\pm$ 0,51 <sup>A</sup>	3,71 $\pm$ 1,06 <sup>B</sup>	58,8 $\pm$ 5,6 <sup>A</sup>
105 días	11,31 $\pm$ 1,82 <sup>B</sup>	5,02 $\pm$ 0,68 <sup>A</sup>	2,68 $\pm$ 0,06 <sup>A</sup>	56,7 $\pm$ 11,1 <sup>A</sup>
180 días	13,13 $\pm$ 1,88 <sup>C</sup>	5,19 $\pm$ 1,05 <sup>AB</sup>	2,57 $\pm$ 0,09 <sup>A</sup>	74,1 $\pm$ 10,8 <sup>C</sup>

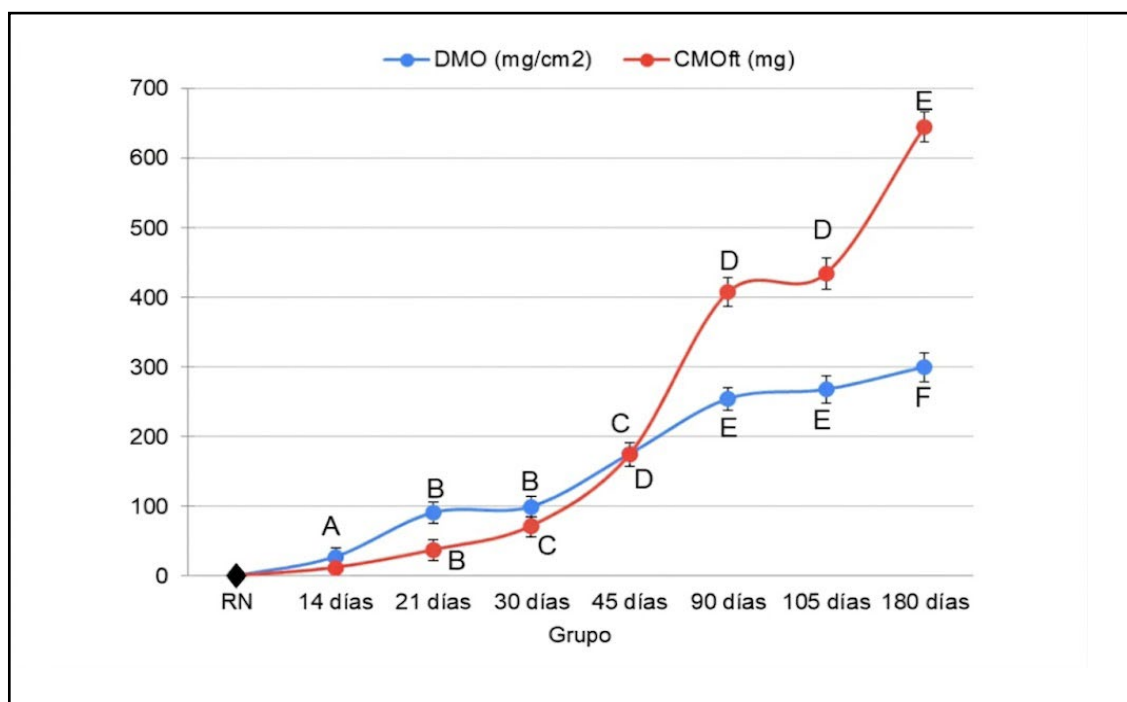
Letras diferentes indican un  $p < 0,05$ . Abreviaturas: Ca: calcemia; Pi: fosfatemia; OCN: osteocalcina; CTX: B-cross *lapp*.

desde los 21 días hasta los 180 días de vida. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de 90 y 105 días de edad. En el grupo RN, ambos parámetros no fueron detectables.

La Tabla 2 y la Figura 3 representan el volumen óseo (VO) al final del experimento. Los resultados obtenidos muestran que volumen óseo / volumen total (BV/TV) aumenta de manera significativa y progresiva desde RN hasta los 45 días donde alcanza

un valor máximo ( $p < 0,05$ ). Sin diferencias significativas entre los grupos 90, 105 y 180 días.

La Tabla 3 muestra los resultados del ensayo de flexión a tres puntos. Todos los parámetros evaluados tienen un comportamiento similar: se observa que, a los 21 días, los valores son significativamente más bajos con respecto al resto de los grupos ( $p < 0,05$ ) y que estos aumentan hasta alcanzar valores máximos a los 180 días ( $p < 0,05$ ).

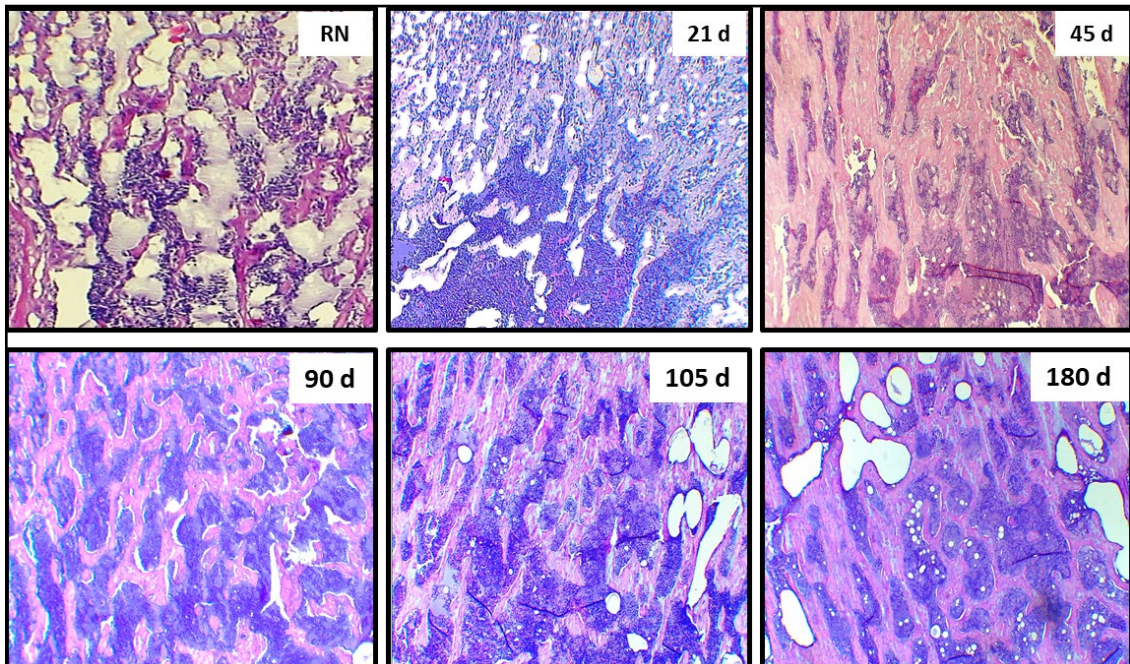


**Figura 2.** Evolución de la densidad mineral ósea y contenido mineral óseo de fémur total en los diferentes grupos evaluados (media  $\pm$  DE). Letras diferentes corresponden a una  $p < 0,05$ . DMOft: densidad mineral ósea, CMOf: contenido mineral óseo.

**Tabla 2.** Volumen óseo del fémur distal en los diferentes grupos evaluados (media  $\pm$  DE).  $n=6$ /grupo

Grupo	RN	21 días	45 días	90 días	105 días	180 días
VO (%)	7,89 $\pm$ 0,11 <sup>A</sup>	41,3 $\pm$ 8,3 <sup>A</sup>	53,4 $\pm$ 18,6 <sup>C</sup>	48,1 $\pm$ 11,3 <sup>BC</sup>	47,2 $\pm$ 4,2 <sup>BC</sup>	50,9 $\pm$ 0,9 <sup>C</sup>

Letras diferentes indican una diferencia significativa de  $p < 0,05$ .



**Figura 3.** Histología del fémur distal sobre hueso descalcificado de los distintos grupos etarios evaluados. La tinción con hematoxilina-eosina muestra las trabéculas en color rosa (40x). Abreviaturas: d: días; RN: recién nacido.

**Tabla 3.** Ensayo de flexión a tres puntos en los tiempos experimentales ensayados (media  $\pm$  DE)

Grupo	RN	21 días	45 días	90 días	105 días	180 días
<b>CSMI (mm<sup>4</sup>)</b>	NR	1,18 $\pm$ 0,23 <sup>A</sup>	2,19 $\pm$ 0,13 <sup>AB</sup>	3,33 $\pm$ 0,62 <sup>B</sup>	2,50 $\pm$ 0,82 <sup>B</sup>	5,87 $\pm$ 1,08 <sup>C</sup>
<b>Fuerza de FX (N)</b>	NR	8,38 $\pm$ 1,97 <sup>A</sup>	31,52 $\pm$ 4,73 <sup>B</sup>	80,06 $\pm$ 4,55 <sup>C</sup>	74,7 $\pm$ 46,49 <sup>D</sup>	113,47 $\pm$ 9,42 <sup>E</sup>
<b>Rigidez (N/mm)</b>	NR	21,96 $\pm$ 13,35 <sup>A</sup>	127,56 $\pm$ 15,07 <sup>AB</sup>	391,69 $\pm$ 69,64 <sup>C</sup>	389,36 $\pm$ 225,17 <sup>C</sup>	632,34 $\pm$ 234,55 <sup>D</sup>
<b>Módulo de Young (MPa)</b>	NR	229 $\pm$ 110 <sup>A</sup>	1840 $\pm$ 194 <sup>A</sup>	4824 $\pm$ 678 <sup>B</sup>	5673 $\pm$ 301 <sup>B</sup>	6863 $\pm$ 2119 <sup>B</sup>

Letras diferentes corresponden a una  $p < 0,05$ . NR: no realizable; FX: fractura.

## DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó de manera integrada la evolución del tejido óseo desde el período neonatal hasta la adultez temprana en

ratas Wistar hembras, a través del análisis de MRO, volumen óseo porcentual mediante histomorfometría, densitometría y propiedades biomecánicas del fémur distal. Este abordaje

permitió comprender cómo varían la formación, la mineralización y la resistencia ósea a lo largo del crecimiento, aportando una caracterización completa del proceso de maduración esquelética.

*Desarrollo temprano (recién nacidos y 21 días): predominio metabólico y organización tisular incipiente*

Durante el período neonatal hasta el destete, el tejido óseo atraviesa una fase de intensa actividad metabólica y de progresiva organización estructural. En este estudio, los niveles de CTX fueron elevados, lo que sugiere una intensa resorción ósea, compatible con la alta tasa de recambio que caracteriza esta etapa temprana del crecimiento.<sup>12-14</sup> Este perfil es congruente con la dinámica del crecimiento posnatal temprano, en la que la remodelación primaria y el recambio acelerado acompañan la sustitución del tejido cartilaginoso y la formación del hueso trabecular inicial.

En paralelo, el VO fue significativamente menor en los animales RN y aumentó de forma pronunciada al destete. Este incremento refleja un esqueleto aún en proceso de osificación, con una arquitectura trabecular en consolidación y alta plasticidad tisular. En esta etapa, el hueso presenta una matriz aún en proceso de mineralización y una arquitectura poco organizada, que es propia de un tejido primario sometido a modelado intensivo.

Estos hallazgos son concordantes con estudios que describen que, en las primeras fases del crecimiento, el esqueleto se caracteriza por una elevada actividad osteoclástica asociada a la resorción inicial del cartílago de crecimiento y a la remodelación del hueso primario. Asimismo, se ha señalado que los MRO se encuentran aumentados en neonatos tanto en los seres humanos como en modelos animales, lo que confirma el predominio metabólico del modelamiento en este período. Del mismo modo, algunos estudios de biología tisular del crecimiento óseo describen una estructura trabecular escasamente consolidada en etapas

tempranas, acompañada de una rápida expansión del modelado óseo y una elevada tasa de sustitución del tejido primario por hueso laminar más organizado.<sup>15-18</sup>

En conjunto, la combinación de un bajo BV/TV y altos niveles de CTX observados en nuestro estudio sugiere que el hueso, en esta fase, prioriza el recambio y la reorganización tisular por sobre la ganancia estructural y mecánica. Esto confirma que el período entre el nacimiento y el destete constituye una ventana crítica de desarrollo de la arquitectura ósea futura, en la que el esqueleto se encuentra altamente sensible a estímulos metabólicos y mecánicos.

*Transición de crecimiento rápido (45 días): máxima interacción entre metabolismo, masa y función*

A los 45 días, etapa de transición puberal en la rata, se evidenció que los niveles de OCN se incrementaron con respecto a etapas previas, lo que sugiere un predominio creciente de la actividad osteoblástica y, por ende, de la formación de matriz ósea. Paralelamente, se registró un aumento del VO, indicando una mayor proporción de tejido óseo consolidado. Este incremento estructural se acompañó de una mejora en los parámetros densitométricos (DMO y CMO), reflejando un avance en la mineralización del tejido.<sup>15</sup>

Estos hallazgos se alinean con el período de crecimiento acelerado descrito en la literatura, caracterizado por un incremento en la formación de tejido nuevo, acompañado de progresiva mineralización y consolidación estructural.<sup>3,16,18</sup> El aumento en CMO y DMO en esta fase se caracteriza por una alta tasa de formación ósea y una intensificación de la mineralización primaria, aunque el hueso aún mantiene cierta inmadurez estructural y susceptibilidad a variaciones en la composición de la matriz y en la geometría ósea.<sup>17,19,20</sup>

Desde el punto de vista funcional, si bien se observaron mejoras en los parámetros biomecánicos en esta ventana de desarrollo, la



literatura reporta que el hueso en esta edad aún no alcanza la máxima eficiencia mecánica, probablemente debido a que la maduración de la matriz y la mineralización secundaria requieren más tiempo para estabilizarse<sup>20</sup>. En nuestro estudio, a los 45 días, el hueso se encuentra en una fase de integración entre metabolismo, estructura y función: ha incrementado su masa y mineralización, pero la organización tisular y el remodelado secundario aún no han completado la maduración necesaria para lograr la máxima eficiencia mecánica.

#### *Consolidación (90 y 105 días): del metabolismo a la estructura funcional*

A los 90 y 105 días, los resultados indican un claro avance hacia la formación del hueso. En este período, los MRO evidenciaron un equilibrio más estable entre formación y resorción en comparación con etapas previas, reflejando una desaceleración del recambio y una progresiva maduración del tejido óseo. El incremento del VO, junto con la mejora sostenida en la densitometría, respalda la interpretación de que el tejido óseo ingresa en una fase de estabilización estructural y mineral.<sup>18,20</sup> En este período, los parámetros biomecánicos (CSMI, rigidez, fuerza de fractura y módulo de Young) mostraron una progresión hacia valores característicos de un hueso con mayor capacidad de carga y menor vulnerabilidad a deformaciones. Estos hallazgos son consistentes con estudios que identifican este rango etario como una etapa crítica para la adquisición de competencia mecánica, en la cual la maduración tisular y la optimización geométrica del hueso contribuyen de manera sinérgica al desempeño funcional.<sup>22,23</sup>

#### *Adulthood temprana (180 días): la masa y la geometría como determinantes principales de la resistencia*

Finalmente, en la adulthood temprana (180 días), el conjunto de indicadores revela un hueso con mayor grado de consolidación y

estabilidad funcional. En esta etapa, el perfil bioquímico reflejó una menor dinámica de recambio en comparación con los períodos de crecimiento, lo que concuerda con un hueso más maduro y con predominio de procesos de mantenimiento<sup>24</sup>. Tanto el VO como la CMO/DMO alcanzaron valores elevados en relación con etapas previas, evidenciando una mayor consolidación tisular y un estado de mineralización avanzada.<sup>25,26</sup> El desempeño biomecánico evaluado mediante el ensayo de flexión a tres puntos evidenció valores superiores a los observados en etapas anteriores, mostrando un hueso más resistente, rígido y eficiente desde el punto de vista funcional.

Este patrón coincide con lo reportado en la literatura, que describe que, una vez alcanzada la adulthood temprana, la resistencia mecánica está fuertemente determinada por la masa total lograda durante el crecimiento, la mineralización secundaria y la organización estructural del tejido óseo.<sup>27</sup> La resistencia mecánica del hueso no depende únicamente de la masa mineralizada, sino de la combinación de la rigidez y la tenacidad del tejido, junto con la calidad arquitectónica de la distribución cortical y trabecular.<sup>28</sup> De esta forma, la calidad y la geometría alcanzadas actúan como los principales determinantes de la competencia mecánica.<sup>15,29</sup>

#### **Conclusiones**

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto que la calidad ósea es un fenómeno que no puede ser interpretado aisladamente, mientras que los biomarcadores reflejan con alta sensibilidad el estado del recambio óseo en etapas tempranas –cuando el modelado y remodelado óseo son intensos–, su valor explicativo disminuye en la adulthood debido a la reducción fisiológica del recambio y a la menor amplitud biológica de estos marcadores,<sup>4,30</sup> momento en el cual el remodelado se estabiliza entre individuos, reduciendo la capacidad discriminativa de estas determinaciones. Es entonces cuando la densidad mineral

y las propiedades biomecánicas se convierten en indicadores más robustos del estado funcional del esqueleto. Por lo tanto, los hallazgos de este estudio pueden contribuir como marco de referencia para futuras investigaciones que busquen caracterizar intervenciones nutricionales, farmacológicas o ambientales orientadas a optimizar la salud ósea durante el crecimiento.

**Agradecimientos:** A la cátedra de Histología de FOUBA. A las Histotécnicas Sra. Mariela Lacave y Srta. Paula Rocha. A los Bioteristas Sr. Carlos Bárcena y Sr. Ricardo Orzuza.

**Contribuciones de autores:** Conceptualización, Administración del proyecto: MS, SZ, EMZC. Curación de datos, Visualización: MS,

MSB, EMZC. Análisis formal, Software: EMZC, MSB. Investigación, Metodología: EMZC, MSB, ML, HM. Supervisión, Validación, Redacción – revisión y edición: MS. Redacción – borrador original: EMZC.

**Conflictos de intereses:** las autoras manifiestan que no presentan conflictos de intereses en relación con el presente artículo.

**Declaración de financiamiento:** las autoras declaran que no han recibido ningún financiamiento o apoyo económico para la realización de este estudio y la preparación de este artículo.

Recibido: 9/12/2025  
Aceptado: 16/03/2026  
Publicado: 1/04/2026

## Referencias

1. Akhilarova K, Khusainova R, Minniakhmetov I, Mokrysheva N, Tyurin A. Peak Bone Mass Formation: Modern View of the Problem. *Biomedicines* 2023; 11 (11): 2982. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112982>.
2. Walker MD, Shane E. Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med* 2023; 389(21):1979-91. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp2307353>.
3. Bolamperti S, Villa I, Rubinacci A. Bone Remodeling: An Operational Process Ensuring Survival and Bone Mechanical Competence. *Bone Res* 2022; 10(1): 48. <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00219-8>.
4. Schini M, Vilaca T, Gossiel F, Salam S, Eastell R. Bone Turnover Markers: Basic Biology to Clinical Applications. *Endocr Rev* 2022; 44 (3): 417-73. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnac031>.
5. Vasikaran SD, Miura M, Pikner R, Bhattoa HP, Cavalier E; IOF-IFCC Joint Committee on Bone Metabolism (C-BM). Practical Considerations for the Clinical Application of Bone Turnover Markers in Osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2023; 112 P(2):148-57. <https://doi.org/10.1007/s00223-021-00930-4>.
6. Szulc, P Bauer DC, Eastell R. Chapter 65 - Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. In: Dempster DW, Cauley JA, Bouxsein ML, Cosman F (eds). *Marcus and Feldman's Osteoporosis 5th ed* (Chapter 65). Cambridge, MA: Academic Press; 2021. pp. 1545-588. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813073-5.00065-4>.
7. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. The National Academies Collection: Reports



- funded by National Institutes of Health; National Academies Press (US): Washington (DC), 2011.
8. Leary S, Pharmaceuticals F, Underwood W, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. 2020.
  9. Shepherd JA. Positions of The International Society for Clinical Densitometry and Their Etiology: A Scoping Review. *J Int Soc Clin Densitom* 2023;26 M(3): 101369. <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2023.101369>.
  10. Seijo, Bryk G, Zeni Coronel M, et al. Effect of Adding a Galacto-Oligosaccharides/Fructo-Oligosaccharides (GOS/FOS®) Mixture to a Normal and Low Calcium Diet, on Calcium Absorption and Bone Health in Ovariectomy-Induced Osteopenic Rats. *Calcif Tissue Int* 2019; 104(3):30112. <https://doi.org/10.1007/s00223-018-0490-5>.
  11. Brun LR, Brance ML, Lombarte M, Maher MC, Di Loreto VE, Rigalli A. Effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*) on Histomorphometry, Biomechanics, and Densitometry on Bones in the Rat. *Calcif Tissue Int* 2015; 97(5): 527-34. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-0043-0>.
  12. Seeman E. Bone Modeling and Remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009; 19(3):219-33. <https://doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v19.i3.40>.
  13. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Am Soc Bone Miner Res* 1987; 2(6):595-610. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650020617>.
  14. Chavassieux P, Chapurlat R. Interest of Bone Histomorphometry in Bone Pathophysiology Investigation: Foundation, Present, and Future. *Front Endocrinol* 2022; 13:907914. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.907914>.
  15. Zeni Coronel EM, Bryk G, Bonanno MS, Seijo M, Zeni SN, Remodelamiento óseo: cambios en los marcadores de formación y resorción ósea en función de la edad y asociados a la caída en los niveles de estrógenos en ratas hembras. In *Vet Investig Vet* 2025; 27: 1-11. <https://doi.org/10.62168/invet.v27i1.47>.
  16. Allen MR, Burr DB. Bone Growth, Modeling, and Remodeling. In: *Basic and Applied Bone Biology*; Cambridge, MA: Academic Press, 2019. pp. 85-100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00005-1>.
  17. Turner CH, Burr DB. *Basic Biomechanical Measurements of Bone: A Tutorial*. *Bone* 1993; 14(4):595-608. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(93\)90081-k](https://doi.org/10.1016/8756-3282(93)90081-k).
  18. Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW. Bone Modeling and Remodeling: Potential as Therapeutic Targets for the Treatment of Osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2016; 8(6):225-35. <https://doi.org/10.1177/1759720X16670154>.
  19. Bonjour JP, Chevalley T, Ferrari S, Rizzoli R. The Importance and Relevance of Peak Bone Mass in the Prevalence of Osteoporosis. *Salud Publica Mex* 2009; 51(Suppl 1):S5-17. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342009000700004>.
  20. Chevalley T, Rizzoli R. Acquisition of Peak Bone Mass. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2022;36 (2):101616. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2022.101616>.
  21. Seeman E, Delmas PD. Bone Quality--the Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. *N Engl J Med* 2006; 354(21): 2250-61. <https://doi.org/10.1056/NEJMra053077>.
  22. Portal-Núñez S, Lozano D, de la Fuente M, Esbrit P. Fisiopatología del Envejecimiento Óseo. *Rev. Esp. Geriatria Gerontol.* 2012; 47 (3), 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2011.09.003>.
  23. Halloran BP, Ferguson VL, Simske SJ, Burghardt A, Venton LL, Majumdar S. Changes in Bone Structure and Mass with Advancing Age in the Male C57BL/6J Mouse. *J Am Soc Bone Miner Res* 2002; 17(6): 1044-50. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.6.1044>.
  24. Wang Y, Zheng S, Luo Y, Xiao W, Huang

- C, Li, Y. Osteoimmunology and Aging: Mechanisms, Implications, and Therapeutic Perspectives. *Ageing Res Rev* 2025; 111: 102822. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2025.102822>.
25. Zhang R, Gong H, Zhu D, Ma R, Fang J, Fan Y. Multi-Level Femoral Morphology and Mechanical Properties of Rats of Different Ages. *Bone* 2015; 76: 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.03.022>.
26. Puelker SM, Castro SRR de, Souza RR de, Maifrino LBM, Nucci RAB, Sitta M do C. Age-Related Effects on Right Femoral Bone of Male Wistar Rats: A Morphometric and Biomechanical Study. *J Health Allied Sci NU* 2021; 12 (1): 67-70. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1730107>.
27. Cao AB, McGrady LM, Wang M. Effect of Age on Femur Whole-Bone Bending Strength of Mature Rat. *Clin Biomech Bristol Avon* 2023; 101: 105828. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2022.105828>.
28. Ferretti JL, Nocciolino LM, Lüscher SH, Mackler L, Beribé RS, González R, et al. Masa, calidad, direccionalidad. ¿Cuál es la verdadera diferencia entre “osteopenias” y “osteoporosis”? *Rev Fac Cienc. Médicas Univ Nac Rosario* 2020;39-57. <https://doi.org/10.35305/fcm.v1i.19>.
29. Hernandez-Becerra E, Londoño-Restrepo SM, Hernández-Urbiola MI, Jiménez-Mendoza D, Aguilera-Barreiro M de L Á, Pérez-Torrero E, et al. Determination of Basal Bone Mineral Density in the Femur Bones of Male and Female Wistar Rats. *Lab Anim* 2021; 55 (1): 30-42. <https://doi.org/10.1177/0023677220922566>.
30. Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, Kapelari K, Falkensammer G, Griesmacher A, et al. Sex- and Age-Specific Reference Curves for Serum Markers of Bone Turnover in Healthy Children from 2 Months to 18 Years. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(2): 443-9. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1706>.



ARTÍCULO ORIGINAL / Original

## EL TRATAMIENTO ORAL CON METFORMINA PREVIENE SIGNOS TEMPRANOS DE ARTERIOESCLEROSIS AÓRTICA INDUCIDA POR AGE/RAGE EN RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO

Lucas Streckwall\*,<sup>ORCID</sup> Nancy Martini,<sup>ORCID</sup> Claudia Sedlinsky,<sup>ORCID</sup> León Schurman,<sup>ORCID</sup> María Virginia Gangotti,<sup>ORCID</sup> Antonio Desmond McCarthy<sup>ORCID</sup>

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

### Resumen

**Introducción:** El síndrome metabólico (SM) se asocia al aumento de estrés carbonílico y productos de glicación avanzada (AGE) y favorece la calcificación arterial (CA) por transdiferenciación osteogénica de células de músculo liso vascular (CMLV). La metformina (MET) inhibe esa transdiferenciación in vitro. Evaluamos si MET oral previene CA en un modelo experimental de SM.

**Materiales y métodos:** Ratas Wistar macho jóvenes adultos fueron separadas en dos grupos: uno recibió agua como bebida (C) y el otro una solución 20% de fructosa (F). Tras dos semanas, y por cuatro más, cada grupo original se dividió, agregándose MET (100 mg/kg/día) a la bebida de la mitad de cada grupo (así, M y FM). Se midieron parámetros metabólicos y corporales. La aorta se disecó para análisis histomorfométrico e inmunohistoquímico. Se aislaron CMLV aórticas para evaluar la actividad de fosfatasa alcalina (FAL), producción de colágeno, mineralización extracelular y expresión génica de Runx2 y receptor para AGE (RAGE).

**Resultados:** El grupo F desarrolló rasgos compatibles con SM: mayor adiposidad, hiperglucemia, dislipemia y aumento de fructosamina. Las aortas de F evidenciaron reducción de la relación capa elástica/muscular, aumento de colágeno, acumulación de AGE y sobreexpresión de RAGE. Las CMLV de F mostraron mayor actividad FAL, incremento de colágeno y mineralización, junto a aumento de expresión de Runx2 y RAGE. El cotratamiento con MET previno estas alteraciones. In vitro, MET bloqueó la inducción de RAGE por AGE; efecto que se anuló con un inhibidor de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK).

**Conclusión:** Estos resultados indican que MET atenúa la glicación extracelular, la activación AGE/RAGE y el remodelado vascular asociado al SM experimental.

**Palabras clave:** síndrome metabólico, productos finales de glicación avanzada, receptor para productos finales de glicación avanzada, arterioesclerosis, metformina, transdiferenciación osteoblástica, quinasa dependiente de AMP.

## **ORAL TREATMENT WITH METFORMIN PREVENTS EARLY SIGNS OF AGE/RAGE-INDUCED AORTIC ARTERIOSCLEROSIS IN RATS WITH METABOLIC SYNDROME**

### **Abstract**

**Introduction:** Metabolic syndrome (MS) is associated with increased carbonyl stress, accumulation of advanced glycation end products (AGE), and induction of arterial calcifications (AC) through the osteoblastic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells (VSMC). Metformin (MET) inhibits this transdifferentiation *in vitro*. We evaluated whether oral MET can prevent AC in an experimental model of MS.

**Materials and Methods:** Young adult male Wistar rats were divided into two groups: one received water as the drinking source (C) and the other a 20% fructose solution (F). After two weeks, and for an additional four weeks, each group was subdivided, and MET (100 mg/kg/day) was added to the drinking water of one half (thus, M and FM). Metabolic and body parameters were measured. The aorta was dissected for histomorphometric and immunohistochemical analyses. Aortic VSMC were isolated to assess alkaline phosphatase

(ALP) activity, collagen production, extracellular matrix mineralization, and gene expression of Runx2 and the receptor for AGE (RAGE).

**Results:** Group F developed features consistent with MS, including increased adiposity, non-fasting hyperglycemia, dyslipidemia, and elevated serum fructosamine. Aortas from F animals showed a reduced elastic-to-muscular ratio, increased collagen content, AGE accumulation, and RAGE overexpression. VSMC from F rats displayed higher ALP activity, increased collagen production and mineralization, and elevated expression of Runx2 and RAGE. Cotreatment with MET prevented all these MS-induced alterations. *In vitro*, MET blocked AGE-induced RAGE upregulation by VSMC, an effect abolished by an AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibitor.

**Conclusion:** These findings indicate that oral MET treatment attenuates extracellular glycation, AGE/RAGE activation, and vascular remodeling associated with experimental MS.

**Keywords:** metabolic syndrome, advanced glycation end-products, receptor for advanced glycation end-products; arteriosclerosis, metformina, osteoblastic transdifferentiation, AMP-dependent kinase.

### **Introducción**

El síndrome metabólico (SM) es una entidad patológica caracterizada por un conjunto de alteraciones metabólicas interrelacionadas, como obesidad central, dislipidemia, hiperglucemia, insulinoresistencia e hipertensión, que incrementan significativamente el riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo 2.<sup>1</sup> La creciente prevalencia del SM, impulsada principalmente por el consumo de dietas ricas en fructosa y grasas saturadas (predominantes en los países occidentales y estrechamente asociadas al aumento global

de la obesidad) representa un importante desafío sanitario. En este contexto, la combinación de resistencia a la insulina, dislipidemia aterogénica, hipertensión, estado protrombótico y disfunción endotelial eleva notablemente el riesgo de enfermedad cardiovascular y favorece la acumulación de calcificaciones arteriales (CA).<sup>2</sup> Diversos estudios clínicos han demostrado una clara asociación entre la presencia de CA y el desarrollo del SM o de sus componentes individuales, como la obesidad, hipertensión, dislipidemia, resistencia a la insulina o hiperglucemia, e incluso con niveles



elevados de hemoglobina glicada.<sup>3,4</sup> En concordancia, el suero de individuos con SM y CA presenta concentraciones aumentadas de factores promotores de la biomineralización extracelular, tales como fosfato inorgánico,<sup>5</sup> fosfatasa alcalina (FAL),<sup>6</sup> osteoprotegerina,<sup>7</sup> esclerostina<sup>8</sup> y osteocalcina.<sup>9</sup>

La arterioesclerosis y la calcificación vascular emergen como complicaciones estructurales clave que vinculan las alteraciones metabólicas con la disfunción y la pérdida de elasticidad arterial. Este proceso está mediado, en parte, por la transdiferenciación osteoblástica de las células de músculo liso vascular (CMLV) presentes en la túnica media, las cuales pierden su fenotipo contráctil y adquieren características propias de los osteoblastos, las células formadoras de hueso.<sup>10</sup>

Entre los componentes del SM, la hiperglucemia crónica desempeña un papel central, ya que induce estrés carbonílico por acumulación de compuestos dicarbonílicos altamente reactivos, como metilglioxal (MGO) y 3-desoxiglucosona (3-DG), derivados de la glucólisis o de la vía de los polioles.<sup>11</sup> Estos compuestos promueven la glicación no enzimática de proteínas y la consecuente acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGE) en la pared vascular. Los AGE generan modificaciones estructurales irreversibles en la matriz extracelular, especialmente sobre colágeno y elastina, provocando rigidez y pérdida de distensibilidad arterial debido al entrecruzamiento (*crosslinking*) de las fibras. Además, interactúan con el receptor para productos de glicación avanzada (RAGE), expresado en múltiples tipos celulares, incluidas las CMLV, activando vías de señalización inflamatorias y procalcificantes.<sup>12</sup>

La activación del eje AGE/RAGE desencadena la translocación del factor de transcripción NFκB,<sup>13</sup> promoviendo un estado de inflamación crónica, estrés oxidativo intracelular y la expresión de genes osteogénicos, entre ellos el factor de transcripción relacionado con runt 2 (Runx2), el cual desempeña

un papel crítico en la respuesta procalcificante. Runx2 induce la transdiferenciación osteoblástica de las CMLV, facilitando la remodelación de la matriz arterial y la mineralización ectópica en la túnica media, lo que contribuye a la progresión de la calcificación vascular.<sup>10</sup> Particularmente, si la activación de NFκB mediada por RAGE es sostenida y prolongada, superando los mecanismos endógenos de inhibición, esto conduce a una respuesta inflamatoria persistente y a la disfunción celular, al tiempo que estimula la sobreexpresión del propio RAGE, generando un bucle de retroalimentación positiva.<sup>13</sup>

El entrecruzamiento de las fibras de colágeno con AGE incrementa su resistencia a la degradación por colagenasas, promoviendo el engrosamiento de la pared; mientras que la acumulación de AGE sobre la elastina (proteína clave para la distensibilidad arterial) induce pérdida de elasticidad aórtica. Asimismo, la rigidez inducida por AGE favorece la migración, proliferación y diferenciación osteoblástica de las CMLV mediante la inducción de Runx2.<sup>14,15</sup> De esta manera, el colágeno y la elastina modificados por AGE no solo pierden su función estructural normal, sino que adquieren un papel activo en la progresión de la CA.

La elastina también resulta alterada por la acción de diversas metaloproteinasas de matriz (MMP), cuya expresión aumenta en condiciones de hiperglucemia y estrés oxidativo.<sup>12,16</sup> La degradación de elastina genera péptidos bioactivos (elastoquinas), que promueven la proliferación y transdiferenciación osteogénica de las CMLV,<sup>16,17</sup> contribuyendo a una matriz extracelular más rígida, propensa a la mineralización y con menor capacidad de amortiguación del flujo pulsátil, características que contribuyen al deterioro progresivo de la función arterial.

La metformina (MET), una biguanida, es uno de los tratamientos farmacológicos más utilizados para prevenir alteraciones metabólicas asociadas a la diabetes mellitus tipo 2, SM y/o intolerancia a la glucosa, debido a su

acción euglucemiante mediada por activación de la quinasa dependiente de AMP (AMPK), una enzima clave en la regulación del metabolismo, sobre todo a nivel hepático<sup>18</sup> En ensayos *in vitro*, la MET ha demostrado inhibir la transdiferenciación osteoblástica de CMLV mediante diversos mecanismos, como la producción de óxido nítrico (NO) mediante la activación de la vía AMPK/eNOS/NO<sup>19</sup>, inhibiendo la translocación del factor NFκB<sup>20</sup> o desestabilizando al factor Runx2 al aumentar su proteólisis.<sup>21</sup>

En el presente trabajo buscamos evaluar la eficacia de un tratamiento oral con MET para prevenir alteraciones arterioescleróticas en la aorta, estudiando mecanismos que involucran el estrés metabólico inducido por carbohidratos, tales como la acumulación de productos de glicación avanzada o AGE extracelulares, y su interacción/modulación con el receptor RAGE expresado por CMLV, utilizando para tal fin un modelo preclínico de SM inducido por fructosa en ratas.

## Materiales y métodos

### Diseño experimental y tratamiento

Ratas macho Wistar adultas jóvenes de 12 semanas de edad al inicio, fueron alojadas y mantenidas en un ambiente controlado a 23 °C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h:12 h, y alimentadas con alimento estándar para ratas. Inicialmente, 20 animales fueron divididos al azar en dos grupos de 10 animales cada uno: un grupo recibió agua como fuente de bebida y el otro recibió una solución de fructosa al 20% para inducir síndrome metabólico (Biopack®, Argentina), ambos *ad libitum*. Después de 14 días, y durante 4 semanas adicionales, se agregó metformina (MET) a razón de 100 mg/kg de peso corporal por día (Química Montpellier, Argentina) a la fuente de bebida de la mitad de los animales de cada grupo<sup>22</sup>. De esta manera, se establecieron cuatro grupos (n=5): C (solo agua), F (solución de fructosa al 20%), M (agua + MET 100 mg/kg/día) y FM (solución de fructosa al 20% + MET 100 mg/kg/día). Este tamaño muestral

reducido podría limitar la capacidad de detectar diferencias más sutiles, especialmente en parámetros con alta variabilidad biológica. Sin embargo, y de acuerdo con lo establecido en las Guías indicadas más adelante, al observarse diferencias significativas entre los grupos en varios parámetros de relevancia fisiopatológica se tomó la decisión de no ampliar el tamaño muestral. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para el Manejo y Entrenamiento de Animales de Laboratorio publicada por la Universities Federation for Animal Welfare,<sup>23</sup> y el estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (protocolo CI-CUAL 001-00-15).

### Obtención de parámetros bioquímicos y corporales

Las ratas no fueron privadas de agua ni sometidas a ayuno antes de la anestesia y eutanasia. Previo al sacrificio, las ratas fueron anestesiadas por inhalación de vapores de Sevoflurano 100%® (Cristalia, Argentina), luego se obtuvieron sus pesos y se tomaron muestras de sangre para obtención de suero, en los cuales se midió glucosa, triglicéridos (TG) y colesterol HDL (HDLc), utilizando un analizador automático de química clínica CM250 Metrolab® y kits comerciales (Wiener Lab. Group, Argentina). La relación TG/HDLc se determinó como marcador subrogante de resistencia a la insulina y riesgo cardiovascular.<sup>24</sup> Además, se cuantificó fructosamina sérica mediante un kit comercial (BioSystems, España) como marcador de glicación extracelular. Luego de la extracción de sangre, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia, tras lo cual la aorta y los tejidos adiposos mesentérico y epididimario fueron disecados.

### Análisis histológico de la pared arterial

Porciones de la aorta abdominal se fijaron durante 24 horas, se incluyeron en parafina y



se obtuvieron cortes transversales de 4  $\mu\text{m}$  de espesor utilizando un micrótopo RMT-20 Type Erma® (TechLabs, India). Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), Sirius Red, fucsina-resorcina de Weigert y rojo de Alizarina. Las fotografías se tomaron con una cámara digital Nikon Coolpix 4500® acoplada a un microscopio Nikon ECLIPSE Ei® (Nikon, Japón). Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ® (<https://imagej.net/ij/>) utilizando la escala del microscopio y complementos de deconvolución de color. El grosor de la túnica media (calculado como el promedio de la distancia entre las membranas elásticas interna y externa) y la relación capa elástica/capa muscular (calculada como la relación entre el espesor promedio de la membrana elástica y el espesor promedio de la capa muscular) se midieron en cortes teñidos con H&E, mientras que el porcentaje del área ocupada por fibras de colágeno y elastina se cuantificó en cortes teñidos con Sirius Red y fucsina-resorcina, respectivamente.<sup>25</sup> Las secciones teñidas con rojo de Alizarina se utilizaron para evidenciar la presencia de depósitos de calcio.

### **Análisis inmunohistoquímico de AGE y RAGE en pared arterial**

La acumulación de carboximetil-lisina (CML, estructura AGE muy prevalente de origen glicoxidativo), así como la expresión del receptor RAGE, se evaluaron en la pared aórtica mediante inmunohistoquímica cromogénica. Brevemente, se desparafinaron y rehidrataron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de aorta abdominal en gradiente alcohólico, bloqueando la actividad de peroxidasa endógena con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,5%. La recuperación antigénica se realizó con el reactivo Trilogy® (Cell Marque, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Las secciones se trataron con una solución bloqueante, se incubaron con anticuerpos primarios anti-CML o anti-RAGE® (1:500; Abcam, Reino Unido) durante 48 horas a 4 °C, se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios

específicos (1:1000; Vector Laboratories, EE. UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras otro lavado, las secciones se incubaron con los reactivos del kit Vectastain Elite ABC® (Vector Laboratories, EE. UU.) durante 1 hora adicional. Finalmente, las muestras se revelaron con solución de 3,3'-diaminobencidina, se lavaron y se montaron. Las fotografías se adquirieron con una cámara digital Nikon Coolpix 4500® acoplada a un microscopio Nikon ECLIPSE Ei® (Nikon, Japón) bajo las mismas condiciones de iluminación y en áreas comparables.

### **Aislamiento y cultivo de células de músculo liso vascular**

Los miocitos vasculares se aislaron a partir de anillos de aorta toracoabdominal según lo descrito previamente.<sup>22,26</sup> En resumen, bajo condiciones estériles, se separó la túnica adventicia y parte de la aorta restante se cortó en anillos de aproximadamente 1 mm. Los anillos individuales se colocaron en frascos de cultivo y se incubaron con DMEM suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (penicilina/estreptomocina), a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire. Después de 24 horas, el medio se reemplazó por DMEM con 10% de SFB y antibióticos, renovándolo cada 2-3 días. Tras dos semanas, las células fueron caracterizadas como CMLV por su morfología cilíndrica y alargada de extremos ahusados y por la expresión de  $\alpha$ -actina mediante inmunofluorescencia. Brevemente, las células se cultivaron sobre cubreobjetos durante 24 horas, se lavó con PBS, se fijaron con p-formaldehído en PBS al 4%, se permeabilizaron con etanol absoluto y luego se bloqueó con 10% de SFB-PBS. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario de ratón anti- $\alpha$ -actina de músculo liso® (1:200, Santa Cruz Biotechnology, EEUU) y se incubó a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se lavó con PBS-Tween 20 0,01%, y se agregó el anticuerpo secundario marcado con FITC anti-IgG de ratón® (1:200, Santa

Cruz Biotechnology, EE.UU.) y se incubó con agitación suave a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 horas. Finalmente se lavó con PBS y en uno de los lavados se incluyó Hoechst 33258 (tiñe los núcleos de azul). Se montaron los cubres sobre portaobjetos con glicerina/PBS 80%. Se obtuvieron las imágenes con Microscopio confocal Espectral Leica TCS SP5® con objetivo de 63Xoil utilizando la línea de excitación láser 495 para el FITC® (color verde). Este microscopio no posee láser para poder observar emisión azul.

Cuando las CMLV alcanzaron la confluencia, se recolectaron mediante la adición de tripsina al 0,05% y se subcultivaron en placas multipocillo para los diferentes experimentos descriptos a continuación.

#### **Análisis del fenotipo osteoblástico de las CMLV**

Las CMLV se sembraron a una densidad de  $1,5 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 24 pocillos que contenían DMEM suplementado con 10% SFB y antibióticos, e incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Una vez alcanzada la confluencia (a los 5 días), se evaluó el potencial osteogénico midiendo la actividad de fosfatasa alcalina (FAL), la producción de colágeno tipo 1 y la mineralización de la matriz extracelular, según se describe a continuación.

Para la determinación de FAL, las monocapas celulares se lavaron con PBS y se solubilizaron en 500 µL de Tritón X-100 al 0,1%. Tras una centrifugación, se tomaron alícuotas del extracto celular total para determinar proteínas por el método de Bradford y para evaluar espectrofotométricamente, a 405 nm, la velocidad inicial de hidrólisis del p-nitrofenil fosfato en p-nitrofenol a 37 °C.<sup>22</sup>

Para evaluar la producción de colágeno tipo 1, las células se fijaron con solución de Bouin y se tiñeron con colorante Sirius Red durante 1 hora. El material teñido se disolvió en 1 mL de hidróxido de sodio 0,1 N y la absorbancia

de la solución se midió a 550 nm.<sup>26</sup> En pocillos replicados, las células se extrajeron con 500 µL de Tritón X-100 al 0,1% para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

El calcio extracelular se evaluó mediante tinción con rojo de Alizarina. El colorante unido a los depósitos minerales se disolvió con 1 mL de hidróxido de sodio 0,1 N y se cuantificó espectrofotométricamente a 540 nm.<sup>27</sup> En pocillos replicados, las células se extrajeron con 500 µL de Tritón X-100 al 0,1% para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

#### **Análisis de expresión génica de las CMLV**

La expresión génica de las CMLV para el factor Runx2 (marcador clave de la transdiferenciación osteoblástica) y para RAGE (receptor para AGE, implicado en dicha transdiferenciación) se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Las células se sembraron en placas de seis pocillos y se cultivaron en DMEM con 10% SFB hasta alcanzar la confluencia. Luego se extrajo el ARN total utilizando el reactivo QUICK-ZOL® según las instrucciones del fabricante (Kalium Technologies, Argentina). La retrotranscripción se realizó empleando transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney® (Productos Bio-Lógicos, Argentina). Los *primers* específicos (Tabla 1) se diseñaron a partir de la base de datos de secuencias del NCBI utilizando el *software* CLC Genomics Workbench® (QIAGEN) y fueron sintetizados por Macrogen® (República de Corea). Tras la separación de los productos de RT-PCR por electroforesis en gel de agarosa y su visualización con GelRed, la intensidad de las bandas se cuantificó con el programa ImageJ utilizando β-actina como gen de referencia. Aunque hubiera sido relevante complementar esta evaluación semicuantitativa de la expresión génica por métodos genómicos y proteómicos cuantitativos, esto no fue posible por



**Tabla 1.** Primers utilizados para RT-PCR

Marcador	Genbank Code	Tamaño (bp)		Secuencia
$\beta$ -actina	NM_031144.3	345	Fw	CCTTCAACACCCAGCCAT
			Rv	CATAGCTCTTCTCCAGGGA
Runx2 (2 bandas)	NM_001278483.2	598/424	Fw	GCCGGGAATGATGAGAATA
			Rv	TGAGAGAGGAAGGCCAGA
RAGE	NM_053336.2	1109	Fv	GTCAGAACATCACAGCC
			Rv	CGCTTCCTCTGACTGATT

limitaciones de equipamiento y/o insumos de nuestro laboratorio.

#### **Análisis del efecto *in vitro* de MET y AGE sobre la expresión génica de RAGE en CMLV**

La albúmina sérica bovina (BSA) modificada por productos finales de glicación avanzada (AGE-BSA) se obtuvo incubando BSA libre de ácidos grasos® (Sigma-Aldrich, EE. UU.) en una concentración de 10 mg/mL bajo condiciones estériles, con 33 mM de D-glicolaldehído en PBS 150 mM, pH 7,4, a 37 °C durante 3 días. El exceso del azúcar se eliminó mediante centrifugación/filtración con cartuchos de 10 kDa de *cutoff*. La formación de AGE se confirmó y cuantificó por emisión de fluorescencia a 420 nm tras excitación a 340 nm. La BSA no glicada (control) se obtuvo excluyendo el D-glicolaldehído de la mezcla de incubación.<sup>28</sup>

Para estos experimentos, las CMLV control (del grupo C) se cultivaron en placas de seis pocillos hasta alcanzar la confluencia. Luego se reemplazó el medio y las células se incubaron durante 72 horas en DMEM con 5% SFB, en presencia de 100  $\mu$ g/mL de AGE-BSA o BSA no glicada, con o sin la adición de 500  $\mu$ M de MET y/o 0,5  $\mu$ M de compuesto C o dorsomorfina, un potente inhibidor de la activación/fosforilación de AMPK.<sup>29</sup> Tras las 72 horas de incubación, la expresión génica de RAGE se evaluó mediante RT-PCR y electroforesis en gel de agarosa, según lo descrito anteriormente.

#### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Los supuestos de distribución normal y homocedasticidad se verificaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con prueba *post hoc* de Tukey utilizando el software GraphPad® (San Diego, EE. UU.); se consideraron como estadísticamente significativos valores de  $p < 0,05$ .

#### **Resultados**

##### **Parámetros bioquímicos y corporales de los grupos experimentales**

Aunque no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal entre los grupos al final del estudio, los animales tratados únicamente con fructosa (grupo F) mostraron varios cambios compatibles con el SM (Tabla 2): un aumento significativo en la adiposidad (Figura 1), en la glucemia posprandial, en los niveles de triglicéridos (TG) y en la relación TG/HDLc (vs. grupo C). Todos estos efectos fueron total o parcialmente prevenidos por el cotratamiento Fructosa+MET (grupo FM).

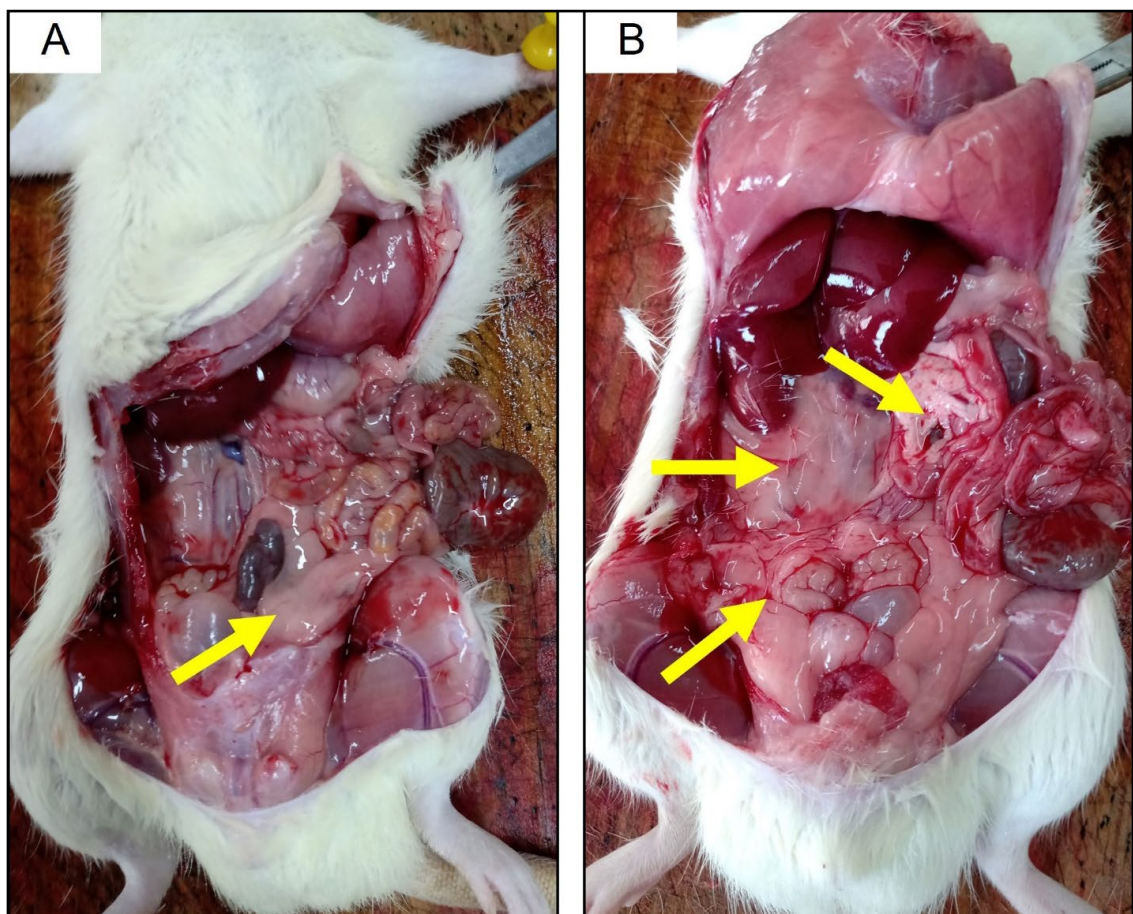
##### **MET previene alteraciones histológicas aórticas inducidas por el SM**

Aunque no se encontraron diferencias significativas en el grosor total de la túnica media entre los grupos, los animales expuestos

**Tabla 2.** Parámetros anatómicos y perfiles séricos tras tratamientos de 6 semanas de fructosa y/o 4 semanas de metformina

	C	F	M	FM
<b>Peso corporal (g)</b>	284 ± 22	268 ± 39	278 ± 26	261 ± 48
<b>Tejido adiposo (% de peso corporal)</b>	3,30 ± 0,25	4,14 ± 0,15 <sup>#</sup>	3,57 ± 0,21	3,58 ± 0,13
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	178 ± 9,00	322 ± 1900 <sup>***</sup>	212 ± 7,00	218 ± 14,00
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	48,0 ± 5,6	121,8 ± 22,6 <sup>#</sup>	87,8 ± 18,4	97,2 ± 12,8
<b>TG/HDLc</b>	2,5 ± 0,2	5,6 ± 1,1 <sup>#</sup>	2,82 ± 0,8	4,7 ± 0,7

C: grupo control; F: ratas que recibieron solución de 20% fructosa; M: ratas que recibieron metformina 100 mg/kg/día; FM: ratas que recibieron fructosa y metformina. Diferencias: <sup>#</sup>p<0,05 vs. C; <sup>\*\*\*</sup>p<0,001 vs. C, M y FM. Resultados expresados como media ± SEM, n=5.



**Figura 1.** Fotografías representativas de la cavidad abdominal de animales experimentales. Las flechas amarillas marcan acumulación de tejido adiposo. (A) Grupo control. (B) Ratas que recibieron solución 20% de fructosa.



únicamente a fructosa mostraron una disminución significativa en la relación entre las capas elástica y muscular de la túnica media. Este efecto deletéreo fue completamente prevenido por el cotratamiento *in vivo* con MET (Tabla 3).

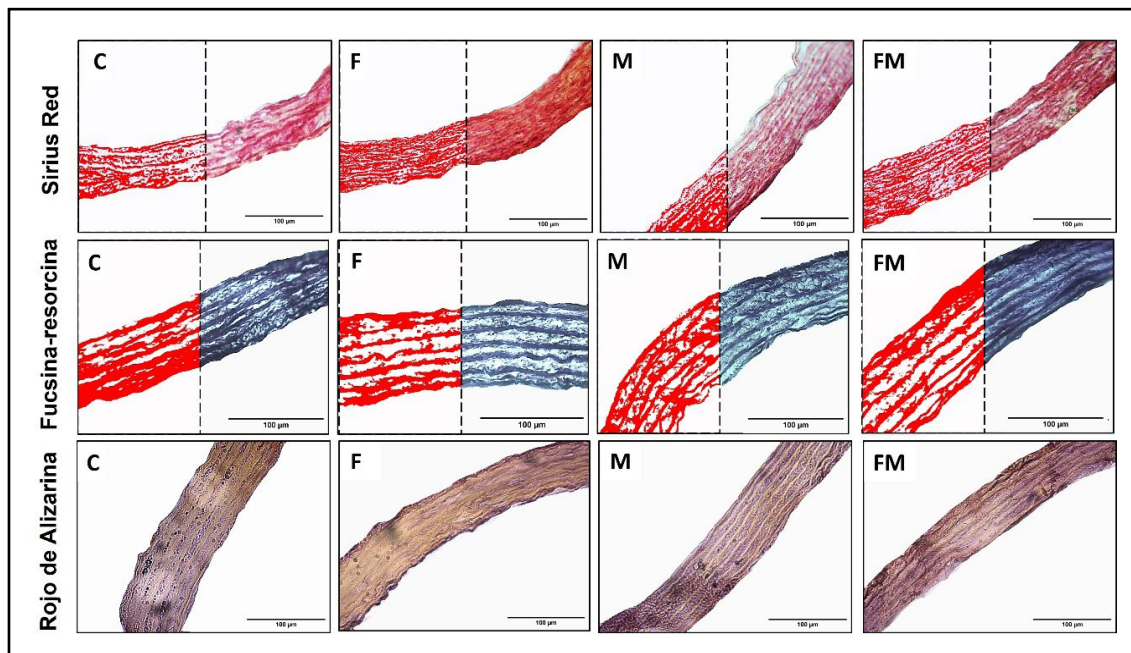
No se encontraron diferencias significativas entre grupos en el contenido de elastina en las secciones aórticas teñidas con fucsina-resorcina (Figura 2).

Mediante tinción con Sirius Red se encontró, en secciones de aorta de los animales del grupo F, un aumento significativo en el contenido de colágeno de la pared arterial, en comparación con el grupo C. El cotratamiento oral con MET (grupo FM) previno completamente este efecto (Figura 2).

No se evidenció la presencia de macrocalcificaciones en ninguno de los grupos experimentales al analizar los cortes teñidos con rojo de Alizarina (véase Figura 2).

### **Efecto de SM y MET oral sobre el potencial osteogénico de CMLV**

Las CMLV aisladas de los animales del grupo F presentaron un aumento significativo en la actividad de fosfatasa alcalina (FAL) (Figura 3A) junto a una tendencia a mayor producción de colágeno tipo 1 (Figura 3B) y mineralización de la matriz extracelular (Figura 3C). Además, presentaron un incremento significativo en la expresión del marcador osteogénico Runx2 (Figura 3D). El cotratamiento con fructosa y MET por vía oral (grupo FM) previno completamente estos efectos.

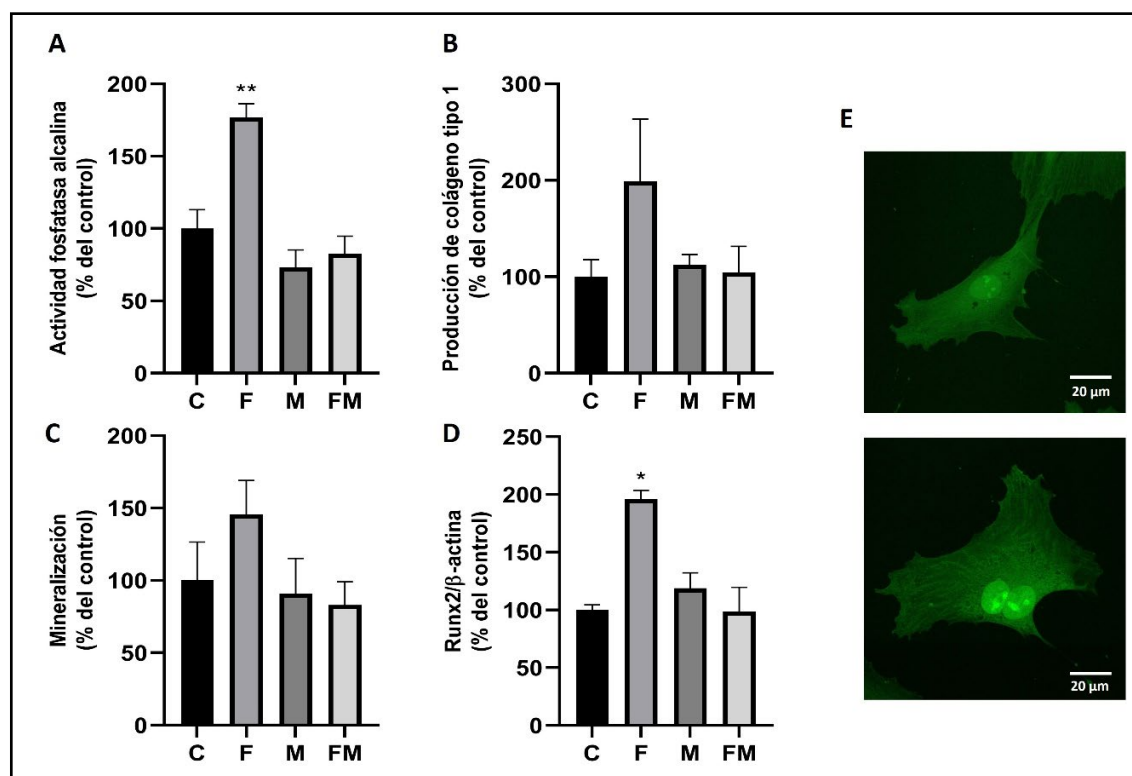


**Figura 2.** Micrografías representativas del análisis histomorfométrico de la pared arterial (Obj. 40x); la porción a la izquierda de la línea punteada marca las regiones ricas en colágeno o elastina. La fila superior corresponde a secciones teñidas con Sirius Red para colágeno. La fila del medio corresponde a secciones teñidas con fucsina-resorcina de Weigert para elastina. La fila inferior corresponde a secciones teñidas con rojo de Alizarina para depósitos de calcio. C: grupo control; F: ratas que recibieron solución de 20% fructosa; M: ratas que recibieron metformina 100 mg/kg/día; FM: ratas que recibieron fructosa y metformina.

**Tabla 3.** Histomorfometría aórtica tras tratamientos de 6 semanas de fructosa y/o 4 semanas de metformina

	C	F	M	FM
<b>Grosor túnica media (% del control)</b>	100 ± 10	112 ± 5	107 ± 8	118 ± 4
<b>Relación capa elástica/muscular (% del control)</b>	100 ± 3	73 ± 3*	102 ± 7	92 ± 1
<b>Contenido de colágeno (% del control)</b>	100 ± 7	132 ± 5*	89 ± 9	96 ± 4
<b>Contenido de elastina (% del control)</b>	100 ± 6	92 ± 6	106 ± 7	94 ± 5

C: grupo control; F: ratas que recibieron solución de 20% fructosa; M: ratas que recibieron metformina 100 mg/kg/día; FM: ratas que recibieron fructosa y metformina. Diferencias: \*p<0,05 vs. C, M y FM. Resultados expresados como media ± SEM, n=3.



**Figura 3.** Efectos del tratamiento con fructosa y/o metformina sobre marcadores del potencial osteoblástico de CMLV aisladas. (A) Actividad de fosfatasa alcalina. (B) Producción de colágeno tipo 1. (C) Mineralización de la matriz extracelular y (D) expresión génica relativa de Runx2 por RT-PCR. Las imágenes (E) corresponden a microfotografías de inmunofluorescencia utilizando anticuerpo anti- $\alpha$ -actina en CMLV aisladas del grupo control. C: grupo control; F: ratas que recibieron solución de 20% fructosa; M: ratas que recibieron metformina 100 mg/kg/día; FM: ratas que recibieron fructosa y metformina. Diferencias: \*p<0,05 vs. C, M y FM; \*\*p<0,01 vs. C, M y FM. Resultados expresados como media ± SEM, n=3-5.



**Efecto de SM y MET oral sobre la glicación extracelular y expresión de RAGE**

Los animales del grupo F presentaron niveles significativamente más altos de fructosamina sérica, un marcador temprano de la glicación extracelular sistémica de proteínas (Tabla 4).

Asimismo, se realizó la detección inmunohistoquímica de CML (una estructura AGE prevalente) y del receptor RAGE en las secciones aórticas de todos los grupos experimentales. Se observó un aumento notorio de CML y RAGE (vs. grupo C) en la túnica media

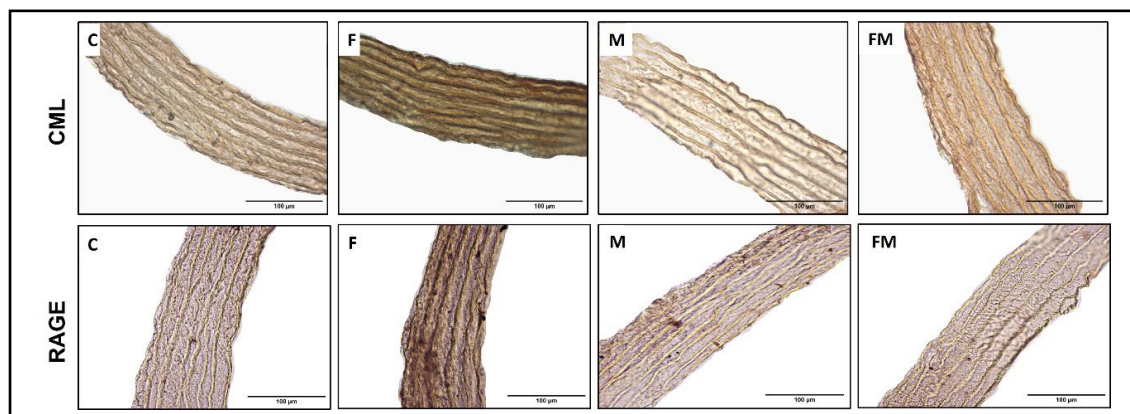
de los animales expuestos a fructosa (grupo F). El cotratamiento oral con MET (grupo FM) previno completamente ambos aumentos (Figura 4).

En experimentos con cultivos primarios de CMLV en los cuales se evaluó la expresión génica de RAGE en todos los grupos experimentales, se observó para las CMLV del grupo F un aumento significativo en la expresión de RAGE (respecto del grupo C). El cotratamiento oral con MET (grupo FM) previno completamente este efecto (Tabla 4).

**Tabla 4.** Niveles de fructosamina sérica y expresión génica basal de RAGE en CMLV cultivadas *in vitro*.

	C	F	M	FM
<b>Fructosamina (mmol/L)</b>	1,33 ± 0,13	2,28 ± 0,07***	1,32 ± 0,15	1,05 ± 0,08
<b>RAGE/<math>\beta</math>-actina (% del control)</b>	100 ± 8	612 ± 95**	179 ± 61	205 ± 63

C: grupo control; F: ratas que recibieron solución de 20% fructosa; M: ratas que recibieron metformina 100 mg/kg/día; FM: ratas que recibieron fructosa y metformina. Diferencias: \*\*p<0,01 vs. C, M y FM; \*\*\*p<0,001 vs. C, M y FM. Resultados expresados como media ± SEM, n=3-5.



**Figura 4.** Micrografías representativas del análisis inmunohistoquímico posttinción con DAB, en secciones de la pared aórtica (Obj. 40x). La fila superior corresponde a acumulación extracelular de carboximetil-lisina (CML) en la pared aórtica. La fila inferior corresponde a expresión de RAGE en la pared aórtica. C: grupo control; F: ratas que recibieron solución de 20% fructosa; M: ratas que recibieron metformina 100 mg/kg/día; FM: ratas que recibieron fructosa y metformina.

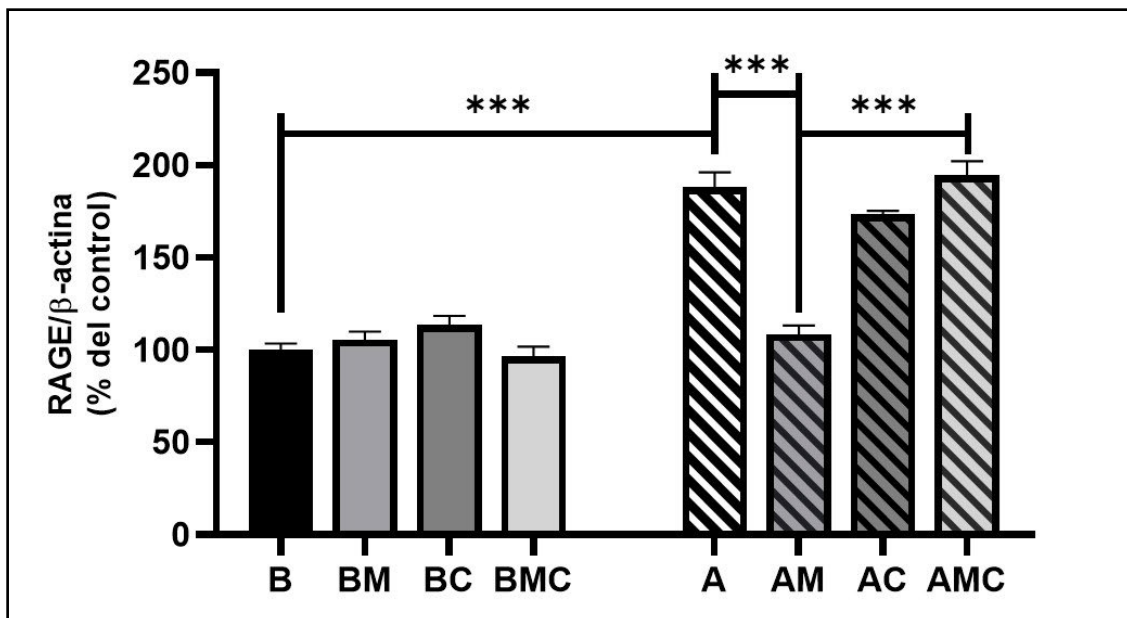
**La MET reduce vía AMPK la sobreexpresión génica de RAGE inducida por AGE en CMLV aórticas**

Realizamos experimentos *in vitro* en los que se cultivaron CMLV obtenidas de animales control con AGE-BSA o BSA y/o MET y/o compuesto C (dorsomorfina, un potente inhibidor de la activación/fosforilación de AMPK). La exposición a AGE-BSA incrementó significativamente la expresión génica relativa de RAGE en las CMLV (en comparación con la BSA no glicada). Este aumento fue completamente prevenido cuando las células se coincubaron con AGE-BSA y MET. Sin embargo, la prevención mediada por MET

de la sobreexpresión de RAGE inducida por AGE, fue abolida por el inhibidor de AMPK dorsomorfina (Figura 5).

**Discusión**

El SM agrupa factores de riesgo cardiometabólicos que aumentan la probabilidad de enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Se ha demostrado que duplica el riesgo de enfermedad cardiovascular y eleva 1,5 veces la mortalidad por todas las causas,<sup>2,31</sup> y constituye un predictor independiente de eventos cardiovasculares futuros.<sup>32</sup> El sistema arterial es un sitio relevante de mineralización ectópica.<sup>10</sup> Algunas patologías



**Figura 5.** Efectos de metformina y/o compuesto C (inhibidor de la fosforilación/activación de AMPK) sobre la expresión génica relativa de RAGE inducida por AGE *in vitro* sobre CMLV controles (del grupo C). Las CMLV fueron incubadas 72 horas en: B: 100 µg/mL de albúmina sérica bovina no glicada (BSA); BM: 100 µg/mL de BSA más metformina 500 µM; BC: 100 µg/mL de BSA más compuesto C 0,5 µM; BMC: 100 µg/mL de BSA más metformina 500 µM más compuesto C 0,5 µM; A: 100 µg/mL de BSA glicada (AGE-BSA); AM: 100 µg/mL de AGE-BSA más metformina 500 µM; AC: 100 µg/mL de AGE-BSA más compuesto C 0,5 µM; y AMC: 100 µg/mL de AGE-BSA más metformina 500 µM más compuesto C 0,5 µM. Diferencias: \*\*\*p<0,001. Resultados expresados como media ± SEM, n=4.



como DM2, SM e insuficiencia renal, así como el envejecimiento, se asocian con depósitos de calcio en la pared arterial.<sup>33</sup> Estas alteraciones reducen la distensibilidad vascular y aumentan el riesgo de eventos graves, principales causas de muerte en el mundo.<sup>34,35</sup>

La calcificación arterial es un proceso regulado y complejo,<sup>36</sup> en el que la transdiferenciación osteogénica de las CMLV desempeña un papel central.<sup>37,38</sup> Varias condiciones propias del SM, como hiperglucemia y acumulación de AGE, favorecen este cambio fenotípico y promueven rigidez y depósito de calcio en la matriz vascular.<sup>10</sup>

En este trabajo hemos empleado un modelo experimental de SM inducido por fructosa al 20% en el agua de bebida, previamente caracterizado en nuestro laboratorio.<sup>27</sup> En el grupo tratado únicamente con fructosa observamos alteraciones metabólicas comparables a las del SM humano, incluyendo hiperglucemia, hipertrigliceridemia, aumento de la relación TG/HDLc, mayor adiposidad y niveles elevados de fructosamina como marcador de glicación temprana. A nivel vascular, la exposición a fructosa durante seis semanas generó alteraciones histológicas compatibles con disfunción de la túnica media: reducción en la relación entre el grosor de la capa elástica y la muscular, aumento de colágeno y acumulación de AGE.

Aunque no se detectaron diferencias significativas en el grosor total de la túnica media ni en el contenido de elastina o calcio *in vivo*, estos hallazgos concuerdan con modelos preclínicos de calcificación incipiente, como la inducida por vitamina D3/nicotina,<sup>39</sup> y con cambios observados en arterias envejecidas o con aterosclerosis temprana, donde la disminución relativa de elastina suele deberse a un incremento de otros componentes de la matriz más que a una reducción absoluta de su contenido.<sup>40</sup> Por otro lado, la técnica de tinción por rojo de Alizarina, si bien es apta para la detección de macrocalcificaciones, no resulta lo suficientemente sensible para la identificación de microcalcificaciones que

podrían estar presentes en estadios tempranos, para lo que sería más pertinente el uso de técnicas más sensibles como la tinción de Von Kossa o la cuantificación de calcio total en tejido aórtico mediante reacción colorimétrica.<sup>41</sup>

La metformina (MET), una biguanida euglicemizante de primera línea para el tratamiento del SM y DM2, ejerce sus efectos principalmente mediante activación de AMPK por inhibición del complejo I mitocondrial, reduciendo lipogénesis y gluconeogénesis, y mejorando la sensibilidad a la insulina. Además, actúa por vías independientes de AMPK modulando el metabolismo redox y el microbioma intestinal.<sup>42, 43</sup> Desde que se demostró que la MET reduce complicaciones cardiovasculares en pacientes con DM2 con sobrepeso en el *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS, 1998),<sup>44</sup> múltiples estudios han evidenciado su papel en disminuir la carga de CA en pacientes con SM y/o diabetes.

En nuestro modelo, el tratamiento oral con MET revirtió las alteraciones metabólicas inducidas por fructosa (grupo FM vs. F), normalizando glucemia posprandial, trigliceridemia, relación TG/HDLc, fructosamina y adiposidad, alcanzando valores comparables a los controles. A nivel vascular, MET previno los cambios deletéreos sobre la túnica media inducidos por la fructosa oral, restaurando la relación elastina/colágeno, reduciendo la fibrosis y la acumulación de AGE. Sin embargo, el tratamiento con MET de animales no expuestos a fructosa (grupo M) no indujo diferencias significativas en ningún parámetro evaluado, respecto de los animales control (grupo C).

En concordancia con las modificaciones histológicas *in vivo*, las CMLV aisladas de animales con SM (grupo F) mostraron *in vitro* un fenotipo osteogénico, evidenciando aumento de la expresión génica de Runx2, mayor actividad FAL, y tendencia al incremento de colágeno y mineralización de la matriz extracelular. Este fenómeno coincide con hallazgos previos en CMLV de ratas diabéticas, donde niveles elevados de AGE inducen transdiferenciación

osteogénica, efecto completamente prevenido por MET *in vivo* o *in vitro*.<sup>22</sup> En estudios con células estromales de médula ósea de ratas diabéticas, también se ha demostrado que la glicación extracelular incrementa la expresión de RAGE, y que MET la previene.<sup>45</sup>

De manera relevante, las CMLV de animales tratados con fructosa presentaron aumento de marcadores osteogénicos incluso en condiciones basales de cultivo, sin inductores osteogénicos externos, y dicho efecto fue completamente prevenido por la coadministración de MET *in vivo*. Estos resultados podrían reflejar la presencia de subpoblaciones celulares con fenotipos específicos, fenómeno descrito en lesiones ateroscleróticas.<sup>46</sup> El aumento de AGE está estrechamente asociado con obesidad, hiperglucemia, dislipidemia y resistencia a la insulina, contribuyendo a las complicaciones a largo plazo tanto del SM como de la diabetes. Los AGE, dietarios o endógenos, inducen estrés oxidativo e inflamación sostenida tanto de manera directa como mediante activación de RAGE y su consecuente señalización inflamatoria mediada por NFκB.<sup>47</sup> En nuestro trabajo, las ratas tratadas con fructosa mostraron aumento de fructosamina sérica (precursora de AGE) y, mediante inmunohistoquímica, incremento de CML y RAGE en la túnica media. Estas observaciones se correlacionaron con un aumento en la expresión génica de RAGE en CMLV aisladas y cultivadas *in vitro*. Tanto los niveles séricos de fructosamina como la expresión tisular de CML y RAGE, y la expresión génica aumentada de RAGE, retornaron a valores control con el tratamiento con MET.

Para profundizar en las implicaciones del eje AGE/RAGE en la transdiferenciación osteogénica y en el papel protector de MET, realizamos ensayos *in vitro* con CMLV incubadas con AGE-BSA. AGE-BSA, en comparación con BSA no glicada, incrementó la expresión de RAGE, pero este efecto fue completamente prevenido por MET. Asimismo, la inhibición de AMPK mediante compuesto C abolió dicha prevención, indicando un mecanismo dependiente de AMPK.

Estos hallazgos coinciden con lo estudiado por otros autores; por ejemplo, Ma y cols. demostraron en un modelo de cultivo de CMLV en medio osteogénico (sin adición de AGE ni glucosa elevada) que la MET previene la transdiferenciación osteogénica de manera dosis dependiente, suprimiendo la expresión de Runx2, FAL, BMP2, osteocalcina y el depósito de calcio, al tiempo que favorece la expresión de SM22-α, marcador de fenotipo contráctil. Estos efectos se asociaron a la inhibición del piruvato deshidrogenasa quinasa-4 inducida por β-glicerofosfato a través de la activación de AMPK, acompañada de una reducción en el estrés oxidativo. Además, la MET indujo directamente la biogénesis mitocondrial mediada por AMPK y favoreció la activación de la mitofagia, proceso necesario para sostener dicha biogénesis y atenuar la transformación fenotípica de las células.<sup>48</sup> Recientemente se ha descrito que la proteasa específica de ubiquitina 10 inhibe la transdiferenciación osteogénica de miocitos vasculares inducida por CML al promover la activación de la AMPK,<sup>49</sup> asimismo, se ha demostrado que la delección de la subunidad α2 de AMPK potencia la transdiferenciación fenotípica de las CMLV, lo que pone de manifiesto el papel central de esta quinasa, que constituye un efector clave de la acción de la MET en la regulación de la fisiopatología de la calcificación vascular.<sup>50</sup> En conjunto, nuestros resultados sugieren que el SM inducido por fructosa genera un ambiente vascular procalcificante caracterizado por acumulación de AGE, sobreexpresión de RAGE e inducción de un fenotipo osteoblástico en las CMLV aórticas, propenso al remodelado patológico. La MET puede prevenir completamente estos fenómenos a nivel sistémico, tisular y celular mediante un mecanismo dependiente de AMPK. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la MET posee propiedades vasculoprotectoras independientes de su efecto euglucemiante, actuando sobre el eje AGE/RAGE, modulando el metabolismo energético celular y limitando la amplificación de señales inflamatorias.



En conclusión, nuestros experimentos actuales parecerían indicar que un tratamiento con metformina podría contribuir a la prevención de la arterioesclerosis asociada a un síndrome metabólico. Sin embargo, dadas las limitaciones inherentes a todo modelo experimental, se resalta que no es posible una extrapolación directa de nuestros resultados a situaciones clínicas concretas en seres humanos.

**Agradecimientos:** agradecemos a Laboratorios Montpellier Argentina por su generosa provisión de metformina. LS es becario doctoral de la UNLP; NM es becaria posdoctoral del CONICET; MVG es miembro de la Carrera del Investigador del CICPBA. ADM es director del LIOMM y profesor titular de Química Clínica en la UNLP.

**Contribuciones de autores:** Conceptualización (CS, LSc, MVG, ADM). Curación de datos, Análisis formal, Investigación (LS, NM).

Obtención de financiación, Administración del proyecto (ADM). Metodología, Supervisión (MVG, ADM). Recursos (LSc, ADM). Validación (MCG, ADM). Visualización, Redacción –borrador original (LS). Redacción – revisión y edición (MVG, CS, ADM).

**Conflictos de intereses:** los autores manifiestan que no presentan conflictos de intereses en relación con el presente artículo.

**Financiamiento :** Proyecto I+D Biental 2023 (Director Categoría I, II o III) UNLP 11/X945 Proyecto I+D Biental 2025 (Director Categoría I, II o III) UNLP 11/X1033 Proyecto I+D (Director Categoría SICADI) SX003.

Recibido: 26/12/2025

Aceptado: 13/03/2026

Publicado: 1/04/2026

## Referencias

1. Liang X, Or B, Tsoi MF, Cheung CL, Cheung BM. Prevalence of metabolic syndrome in the United States National Health and Nutrition Examination Survey 2011–18. *Postgrad Med J* 2023;99(1175):985–92. <https://doi.org/10.1093/postmj/qgad008>.
2. Dhondge RH, Agrawal S, Patil R, Kadu A, Kothari M. A Comprehensive Review of Metabolic Syndrome and Its Role in Cardiovascular Disease and Type 2 Diabetes Mellitus: Mechanisms, Risk Factors, and Management. *Cureus* 2024;16(8):e67428. <https://doi.org/10.7759/cureus.67428>.
3. Chang Y, Yun KE, Jung HS, Kim CW, Kwon MJ, Sung E, et al. A1C and coronary artery calcification in nondiabetic men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(8):2026–31. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301587>.
4. Yang SW, Yang HF, Chen YY, Chen WL. Unraveling the link between metabolic syndrome and abdominal aortic calcification. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2021;31(2):464–71. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.10.003>.
5. Turner ME, Beck L, Hill Gallant KM, Chen Y, Moe OW, Kuro-O M, et al. Phosphate in Cardiovascular Disease: From New Insights Into Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2024;44(3):584–602. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.123.319198>
6. Cheung CL, Tan KC, Lam KS, Cheung BM. The relationship between glucose metabolism, metabolic syndrome, and bone-specific alkaline phosphatase: a structural equation modeling approach. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(9):3856–63. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2024>.
7. Pérez de Ciriza C, Moreno M, Restituto

- P, Bastarrika G, Simón I, Colina I, et al. Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification. *Clin Biochem* 2014;47(18):272-8. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.09.004>.
8. Morales-Santana S, García-Fontana B, García-Martín A, Rozas-Moreno P, García-Salcedo JA, Reyes-García R, et al. Atherosclerotic disease in type 2 diabetes is associated with an increase in sclerostin levels. *Diabetes Care* 2013;36(6):1667-74. <https://doi.org/10.2337/dc12-1691>
  9. Okura T, Kurata M, Enomoto D, Jotoku M, Nagao T, Desilva VR, et al. Undercarboxylated osteocalcin is a biomarker of carotid calcification in patients with essential hypertension. *Kidney Blood Press Res* 2010;33(1):66-71. <https://doi.org/10.1159/000289575>.
  10. Martini N, Streckwall L, McCarthy AD. Osteoporosis and vascular calcifications. *Endocr Connect* 2023;12(11):e230305. <https://doi.org/10.1530/EC-23-0305>.
  11. Bora S, Shankarrao Adole P. Carbonyl stress in diabetics with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 2021;520:78-86. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.06.002>.
  12. Ngai D, Lino M, Bendeck MP. Cell-Matrix Interactions and Matricrine Signaling in the Pathogenesis of Vascular Calcification. *Front Cardiovasc Med* 2018;5:174. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00174>.
  13. Dong H, Zhang Y, Huang Y, Deng H. Pathophysiology of RAGE in inflammatory diseases. *Front Immunol* 2022;13:931473. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.931473>.
  14. Ge C, Yang Q, Zhao G, Yu H, Kirkwood KL, Franceschi RT. Interactions between extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAP kinase pathways in the control of RUNX2 phosphorylation and transcriptional activity. *J Bone Miner Res* 2012;27(3):538-51. <https://doi.org/10.1002/jbmr.561>.
  15. Lino M, Wan MH, Rocca AS, Ngai D, Shobeiri N, Hou G, et al. Diabetic Vascular Calcification Mediated by the Collagen Receptor Discoidin Domain Receptor 1 via the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt/Runt-Related Transcription Factor 2 Signaling Axis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018;38(8):1878-89. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311238>.
  16. Sinha A, Vyavahare NR. High-glucose levels and elastin degradation products accelerate osteogenesis in vascular smooth muscle cells. *Diabetes Vasc Dis Res* 2013;10(5):410-9. <https://doi.org/10.1177/1479164113485101>
  17. Tembely D, Henry A, Vanalderwiert L, Toussaint K, Bennisroune A, Blaise S, et al. The Elastin Receptor Complex: An Emerging Therapeutic Target Against Age-Related Vascular Diseases. *Front Endocrinol* 2022;13:815356. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.815356>.
  18. LaMoia TE, Shulman GI. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. *Endocr Rev* 2021;42(1):77-96. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa023>.
  19. Cao X, Li H, Tao H, Wu N, Yu L, Zhang D, et al. Metformin inhibits vascular calcification in female rat aortic smooth muscle cells via the AMPK-eNOS-NO pathway. *Endocrinology* 2013;154(10):3680-9. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1002>.
  20. Goel S, Singh R, Singh V, Singh H, Kumari P, Chopra H, et al. Metformin: Activation of 5' AMP-activated protein kinase and its emerging potential beyond anti-hyperglycemic action. *Front Genet* 2022;13:1022739. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1022739>.
  21. Lee J, Hong SW, Kim MJ, Kwon H, Park SE, Rhee EJ, et al. Metformin, resveratrol, and exendin-4 inhibit high phosphate-induced vascular calcification via AMPK-RANKL signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;530(2):374-80. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.136>.
  22. Molinuevo MS, Cortizo AM, Sedlinsky C. Effects of advanced glycation end-products, diabetes and metformin on the



- osteoblastic transdifferentiation capacity of vascular smooth muscle cells: In vivo and in vitro studies. *J Diabetes Complications* 2023;37(11):108626. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2023.108626>.
23. Universities Federation for Animal Welfare. Guidelines on handling and training of laboratory animals. In: UFAW, ed. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington D. C.: The National Academies Press; 2011.
  24. Salazar MR, Carbajal HA, Espeche WG, Leiva Sisniegues CE, March CE, Balbin E, et al. Comparison of the abilities of the plasma triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio and the metabolic syndrome to identify insulin resistance. *Diabetes Vasc Dis Res* 2013;10(4):346-52. <https://doi.org/10.1177/1479164113479809>.
  25. Chen Y, Yu Q, Xu CB. A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software. *Int J Clin Exp Med* 2017;10:14904-10.
  26. Molinuevo MS, Fernández JM, Cortizo AM, McCarthy AD, Schurman L, Sedlinsky C. Advanced glycation end products and strontium ranelate promote osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells in vitro: Preventive role of vitamin D. *Mol Cell Endocrinol* 2017;450:94-104. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.022>.
  27. Wanionok NE, Molinuevo MS, Fernández JM, Lucas B, Cortizo AM, Castillo EJ, et al. Skeletal effects of a prolonged oral metformin treatment in adult Wistar rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2024;132(10):547-56. <https://doi.org/10.1055/a-2324-8661>.
  28. Gangoiti MV, Arnol V, Cortizo AM, McCarthy AD. Advanced glycation endproducts and alendronate differentially inhibit early and late osteoclastogenesis in vitro. *J Diabetes Metab* 2013;4:274. <https://doi.org/10.4172/2155-6156.1000274>.
  29. Handa N, Takagi T, Saijo S, Kishishita S, Takaya D, Toyama M, et al. Structural basis for compound C inhibition of the human AMP-activated protein kinase  $\alpha 2$  subunit kinase domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011;67(Pt 5):480-7. <https://doi.org/10.1107/S0907444911010201>.
  30. Lee H, Rhee TM, Park HE, Han K, Choi SY. Association between cumulative metabolic risk exposure and cardiovascular disease: A nationwide cohort of over 3.6 million young adults. *Eur J Prev Cardiol* 2024;31(10):1288-300. <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwae088>.
  31. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk: A systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;56(14):1113-32. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.05.034>.
  32. Guembe MJ, Fernández-Lazaro CI, Sayon-Orea C, Toledo E, Moreno-Iribas C, RIVANA Study Investigators. Risk for cardiovascular disease associated with metabolic syndrome and its components: A 13-year prospective study in the RIVANA cohort. *Cardiovasc Diabetol* 2020;19(1):195. <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01166-6>.
  33. Vidavsky N, Kunitake JAMR, Estroff LA. Multiple pathways for pathological calcification in the human body. *Adv Healthc Mater* 2021;10(4):e2001271. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001271>.
  34. Juutilainen A, Lehto S, Suhonen M, Rönnemaa T, Laakso M. Thoracoabdominal calcifications predict cardiovascular disease mortality in type 2 diabetic and nondiabetic subjects: 18-year follow-up study. *Diabetes Care* 2010;33(3):583-5. <https://doi.org/10.2337/dc09-1813>.
  35. Chen J, Radjabzadeh D, Medina-Gómez C, Voortman T, van Meurs JBJ, Ikram MA, et al. Advanced glycation end products (AGEs) in diet and skin in relation to stool microbiota: The Rotterdam Study. *Nutrients* 2023;15(11):2567. <https://doi.org/10.3390/nu15112567>.
  36. Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular

- calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(4):715-23. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302070>.
37. Tyson J, Bundy K, Roach C, Douglas H, Ventura V, Segars MF, et al. Mechanisms of the osteogenic switch of smooth muscle cells in vascular calcification: WNT signaling, BMPs, mechanotransduction, and EndMT. *Bioengineering* 2020;7(3):88. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030088>.
38. Yamazoe M, Hisamatsu T, Miura K, Kadowaki S, Zaid M, Kadota A, et al. Relationship of insulin resistance to prevalence and progression of coronary artery calcification beyond metabolic syndrome components: Shiga Epidemiological Study of Subclinical Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36(8):1703-8. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307612>.
39. Ameer OZ, Salman IM, Avolio AP, Phillips JK, Butlin M. Opposing changes in thoracic and abdominal aortic biomechanical properties in rodent models of vascular calcification and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;307(2):H143-H151. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00139.2014>.
40. Tsamis A, Krawiec JT, Vorp DA. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: A review. *J R Soc Interface* 2013;10(83):20121004. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.1004>
41. Smith ER, Hewitson TD, Holt SG. Diagnostic tests for vascular calcification. *Adv Chronic Kidney Dis* 2019;26(6):445-63. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2019.07.001>.
42. Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia* 2017;60(9):1566-76. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4318-z>
43. Smiles WJ, Ovens AJ, Oakhill JS, Kofler B. The metabolic sensor AMPK: Twelve enzymes in one. *Mol Metab* 2024;90:102042. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2024.102042>
44. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352(9131):837-53. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)07019-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07019-6).
45. Sedlinsky C, Molinuevo MS, Cortizo AM, Tolosa MJ, Felice JI, Sbaraglini ML, et al. Metformin prevents anti-osteogenic in vivo and ex vivo effects of rosiglitazone in rats. *Eur J Pharmacol* 2011;668(3):477-85. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.07.033>.
46. Chen R, McVey DG, Shen D, Huang X, Ye S. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2023;12(20):e031121. <https://doi.org/10.1161/JAHA.123.031121>.
47. Kavitha SA, Zainab S, Muthyalaiyah YS, John CM, Arockiasamy S. Mechanism and implications of advanced glycation end products (AGE) and its receptor RAGE axis as crucial mediators linking inflammation and obesity. *Mol Biol Rep* 2025;52(1):556. <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10632-x>.
48. Ma WQ, Sun XJ, Wang Y, Zhu Y, Han XQ, Liu NF. Restoring mitochondrial biogenesis with metformin attenuates  $\beta$ -GP-induced phenotypic transformation of VSMCs into an osteogenic phenotype via inhibition of PDK4/oxidative stress-mediated apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 2019;479:39-53. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.08.012>.
49. Mushajiang M, Li Y, Sun Z, Liu J, Zhang L, Wang Z. USP10 alleviates N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine-induced vascular calcification and atherogenesis in diabetes mellitus by promoting AMPK activation. *Cell Signal* 2024;120:111211. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2024.111211>.
50. Ding Y, Zhang M, Zhang W, Lu Q, Cai Z, Song P, et al. AMP-activated protein kinase alpha 2 deletion induces VSMC phenotypic switching and reduces features of atherosclerotic plaque stability. *Circ Res* 2016;119(6):718-30. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308689>.



CARTA AL EDITOR / Letter to editor

## VIDRIO BIOACTIVO EN OSTEOLOGÍA: BENEFICIOS EMERGENTES, SEGURIDAD Y POTENCIAL APLICACIÓN EN CIRUGÍA ORTOPÉDICA

Wolmark Xiques-Molina<sup>1</sup>, Katrwin Pérez-Camacho<sup>1</sup>, Johana Galván Barrios<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación y Desarrollo, Cure Latam Health Technologies. Barranquilla, Colombia.

<sup>2</sup>Unidad de Cienciometría Biomédica e Investigación Basada en la Evidencia, Universidad de la Costa. Barranquilla, Colombia.

Estimadas editoras:

La búsqueda de biomateriales innovadores que permitan mejorar los resultados en cirugía ortopédica constituye un eje central de la investigación traslacional contemporánea.<sup>1</sup> En este campo, el vidrio bioactivo ha despertado un renovado interés como opción capaz de integrar biocompatibilidad, seguridad antimicrobiana y propiedades regenerativas en un mismo material.<sup>2</sup> A pesar de que su desarrollo se inició hace más de cinco décadas, la reciente evidencia clínica y experimental sugiere que este biomaterial podría ampliar su espectro de uso en osteología, ofreciendo beneficios relevantes en escenarios donde persisten importantes desafíos: defectos óseos complejos, osteomielitis crónica y la prevención de infecciones asociadas a implantes.<sup>3-5</sup>

Uno de los principales atributos del vidrio bioactivo es su perfil de seguridad.<sup>4,6</sup> Numerosos estudios han demostrado que este material es biocompatible, no citotóxico y presenta una integración adecuada con los tejidos óseos y blandos circundantes.<sup>4,6,7</sup> En contacto con fluidos corporales, el vidrio bioactivo libera iones de calcio, sodio y silicato, lo que genera un entorno alcalino que inhibe la proliferación

bacteriana y favorece la formación de una capa de hidroxiapatita similar a la del hueso natural.<sup>7</sup> Esta característica lo diferencia de otros materiales de relleno óseo, al combinar una acción osteoconducciona con un efecto antimicrobiano intrínseco que no depende del uso de antibióticos y que, por lo tanto, no se asocia con el riesgo de generar resistencia bacteriana.<sup>6,7</sup>

En el ámbito de la osteología se ha documentado que el vidrio bioactivo es capaz de estimular la diferenciación osteoblástica y la proliferación de células madre mesenquimales, promoviendo tanto la osteoconducción como la osteoinducción.<sup>1,2</sup> Esta doble acción explica por qué ha sido considerado un sustituto óseo alternativo o un complemento a de los injertos autólogos y aloinjertos, con la ventaja de evitar la morbilidad asociada a la toma de injertos.<sup>1,2</sup> Adicionalmente, la evidencia reciente en modelos experimentales muestra que puede modular la respuesta inflamatoria, reducir el dolor posoperatorio y contribuir a una integración más estable de prótesis y dispositivos implantables.<sup>1,7,8</sup>

Desde la perspectiva clínica, los avances más significativos se han observado en el

\*E-mail: [jgalvan11@cuc.edu.co](mailto:jgalvan11@cuc.edu.co)

tratamiento de la osteomielitis crónica, en donde formulaciones específicas de vidrio bioactivo (como S53P4) han alcanzado tasas de curación superiores al 85%, con reducción en la necesidad de antibióticos sistémicos y menor riesgo de recidiva.<sup>4,6</sup> Estos resultados no solo sugieren un beneficio directo para los pacientes, sino que además se alinean con la necesidad global de reducir el uso indiscriminado de antibióticos en cirugía ortopédica.<sup>4,5</sup> Paralelamente, se explora su utilización como material de relleno en defectos óseos postraumáticos, en artroplastias y en cirugías reconstructivas complejas, donde los desenlaces a largo plazo dependen en gran medida de la osteointegración y la prevención de infecciones.<sup>3-6</sup>

No obstante, es necesario reconocer que, pese a los beneficios señalados, el vidrio bioactivo carece todavía de estudios clínicos a gran escala en cirugía ortopédica, especialmente en procedimientos de reemplazo articular y reconstrucción ósea. La mayor parte de la evidencia disponible proviene de estudios *in vitro*, modelos animales y series clínicas limitadas. Por ello, resulta fundamental que la comunidad científica y clínica impulse

investigaciones multicéntricas, comparativas y a largo plazo que permitan establecer su verdadero papel en la práctica quirúrgica rutinaria. Esto representa un importante nicho de investigación, orientado a una necesidad en investigación clínica y de ortopedia y osteología.<sup>9,10</sup>

Más allá de los retos metodológicos, la incorporación del vidrio bioactivo en cirugía ortopédica puede interpretarse como una apuesta estratégica hacia la innovación responsable. Su potencial para reducir complicaciones infecciosas, acelerar la regeneración ósea y mejorar la calidad de vida de los pacientes lo posiciona como un biomaterial prometedor. En un contexto donde los sistemas de salud buscan alternativas costo-efectivas y seguras, el desarrollo de evidencia sólida sobre este material no debe verse como un interés aislado, sino como una oportunidad para transformar el abordaje de las patologías osteoarticulares más complejas.

En conclusión, el vidrio bioactivo representa un campo emergente en osteología que conjuga propiedades antimicrobianas, osteogénicas y de seguridad, con posibles aplicaciones directas en cirugía ortopédica (Tabla 1).

**Tabla 1.** Aspectos prácticos del vidrio bioactivo para su uso en cirugía ortopédica.<sup>1,2,4-7</sup>

Variable	Evidencia y beneficios descriptos
Seguridad y biocompatibilidad	No citotóxico, integración estable con el hueso, ausencia de reacciones adversas significativas
Propiedades antimicrobianas	Cambio de pH local que inhibe bacterias, eficacia frente a biofilms, sin riesgo de resistencia bacteriana
Capacidad osteogénica	Estimula osteoblastos y células madre mesenquimales, favorece osteoconducción y osteoinducción
Aplicaciones clínicas	Osteomielitis crónica, defectos óseos, artroplastias, cirugías reconstructivas
Resultados documentados	Curación en osteomielitis > 85%, menor necesidad de antibióticos sistémicos, mejor integración protésica
Limitaciones actuales	Escasez de ensayos clínicos a gran escala, evidencia aún limitada en reemplazo articular



Reconocer su potencial y, al mismo tiempo, señalar la necesidad de estudios clínicos robustos es el primer paso para abrir un debate académico y científico que contribuya a definir su verdadero lugar en la práctica quirúrgica.

**Conflictos de intereses:** los autores declaran no tener conflictos de intereses

Recibido: 9/09/2025

Aceptado: 10/12/2025

Publicado: 1/04/2026

## Referencias

1. Ren Z, Tang S, Wang J, et al. Bioactive Glasses: Advancing Skin Tissue Repair through Multifunctional Mechanisms and Innovations. *Biomater Res* [Internet]. 2025;29:0134. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.34133/bmr.0134>.
2. Workie AB, Shih SJ. A study of bioactive glass-ceramic's mechanical properties, apatite formation, and medical applications. *RSC Adv* [Internet]. 2022;12(36):23143-52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/d2ra03235j>.
3. Van Vugt TAG, Heidotting J, Arts JJ, Ploegmakers JJW, Jutte PC, Geurts JAP. Mid-term clinical results of chronic cavitary long bone osteomyelitis treatment using S53P4 bioactive glass: a multi-center study. *J Bone Jt Infect* [Internet]. 2021;6(9):413-21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5194/jbji-6-413-2021>.
4. Kwon BT, Kim HJ, Lee S, et al. Feasibility and safety of a CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> bioactive glass ceramic spacer in posterior lumbar interbody fusion compared with polyetheretherketone cage: a prospective randomized controlled trial. *Acta Neurochir (Wien)* [Internet]. 2023;165(1):135-44. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00701-022-05429-x>.
5. Gatti SD, Gaddi D, Turati M, et al. Clinical outcomes and complications of S53P4 bioactive glass in chronic osteomyelitis and septic non-unions: a retrospective single-center study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2024;43(3):489-99. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-023-04737-z>.
6. Xu H, Zhu Y, Xu J, et al. Injectable bioactive glass/sodium alginate hydrogel with immunomodulatory and angiogenic properties for enhanced tendon healing. *Bioeng Transl Med* [Internet]. 2022;8(1):e10345. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/btm2.10345>.
7. Hung GY, Wang CY, Feng KC, et al. Manipulating Mg/Ca ratios in MgO-CaO-SiO<sub>2</sub> bioactive glass for achieving accelerated osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomater Adv* [Internet]. 2025;169:214189. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioadv.2025.214189>.
8. Schmidt V, Polgár B, Nemes VÁ, et al. Interaction of MG63 Human Osteosarcoma-Derived Cells on S53P4 Bioactive Glass: An In Vitro Study. *J Funct Biomater* [Internet]. 2025;16(8):275. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/jfb16080275>.
9. Lozada-Martínez ID, Hernández-Páez D, Zárate YEJ, Delgado P. Scientometrics and meta-research in medical research: approaches required to ensure scientific rigor in an era of massive low-quality research. *Rev Assoc Med Bras (1992)* [Internet]. 2025;71(4):e20241612. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.20241612>.
10. Lozada-Martínez ID, Neira-Rodado D, Martínez-Guevara D, Cruz-Soto HS, Sánchez-Echeverry MP, Liscano Y. Why is it important to implement meta-research in universities and institutes with medical research activities? *Front Res Metr Anal* [Internet]. 2025;10:1497280. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/frma.2025.1497280>.