

García Miguel J<sup>1</sup>, Wright A<sup>3</sup>, Pérez-Edo L<sup>2</sup>, Blanch J<sup>2</sup>, Carbonell J<sup>2</sup>, Wehrli F<sup>3</sup>

1 Servicio de Reumatología - Hospital Universitari Sagrat Cor de Barcelona

2 Servicio de Reumatología - Hospital del Mar de Barcelona - IMAS

3 Laboratory for Structural NMR Imaging - University Hospital of Pennsylvania - Philadelphia

# Cambios en la microarquitectura ósea en la artritis reumatoide. Estudio mediante microCT

Correspondencia: Javier García-Miguel - Unidad de Reumatología - Hospital Universitari Sagrat Cor - Londres, 28 - 08029 Barcelona

Correo electrónico: jgarcia\_md@hotmail.com

Fecha de recepción: 15/02/2010

Fecha de aceptación: 16/06/2010

## Resumen

**Introducción:** El objetivo de este estudio es analizar la microarquitectura ósea en la artritis reumatoide (AR) en una serie de biopsias de cresta ilíaca ósea previamente realizadas en pacientes sin tratamiento previo con glucocorticoides, utilizando análisis mediante microCT.

**Material y método:** Se obtuvieron 14 especímenes óseos extraídos de la cresta ilíaca de pacientes con AR sin tratamiento previo con glucocorticoides. Ninguno de ellos estaba diagnosticado de enfermedades o tomaba medicaciones que pudieran comprometer al metabolismo mineral óseo. Se les realizó una historia clínica completa y análisis sanguíneo, incluyendo el factor reumatoide. Los especímenes fueron incluidos en metil-metacrilato y estudiados con un scanner microCT *eXplorer Locus* SP. Los parámetros de adquisición fueron: 80 kVp/80  $\mu$ A, grosor del filtro de aluminio: 10<sup>-3</sup> pulgadas, FOV  $\approx$  2x2 cm, modo de adquisición de 360°, 720 *views*, 4 *frame averages/view*, tiempo de exposición 1.700 ms, *voxel resolution*: 28  $\mu$ m. Se seleccionó una Región de Interés (ROI) mediante interpolación, evitando el hueso cortical. Se utilizó un proceso automático de segmentación (*thresholding*) para diferenciar y segmentar el tejido óseo del hematopoyético. Los parámetros microarquitecturales se generaron automáticamente por ordenador utilizando algoritmos *parallel-plate*. Los resultados fueron comparados con 14 especímenes procedentes de controles sanos de similar edad y sexo utilizando *t* de *Student* para muestras no pareadas. La significancia estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

**Resultados:** La fracción de volumen óseo (BV/TV) fue significativamente menor en los pacientes con AR que en los controles sanos ( $p < 0,05$ ). El grosor trabecular (Tb.Th) fue mayor en los controles. La separación trabecular (Tb.Sp) fue mayor en los especímenes con AR ( $p < 0,05$ ). La conectividad trabecular (Tb.N) fue significativamente mayor en los especímenes control ( $p < 0,05$ ).

**Conclusiones:** Los pacientes con AR tienen una peor calidad ósea trabecular y una baja conectividad trabecular. El escáner microCT es una herramienta rápida y potente para el estudio de la microestructura trabecular.

**Palabras clave:** Artritis reumatoide, Microarquitectura, Hueso, Tomografía computadorizada.

# Changes in bone microarchitecture in rheumatoid arthritis. Study using microCT

## Summary

**Introduction:** The objective of this study is to analyse the bone microarchitecture in rheumatoid arthritis (RA) in a series of biopsies of the iliac crest carried out previously in patients not having had earlier treatment with glucocorticoids, using microCT analysis.

**Material and method:** 14 bone specimens were obtained, taken from the iliac crest of patients with RA with no previous treatment with glucocorticoids. None of these patients was diagnosed with a disease or was taking medicines which could compromise bone mineral metabolism. A complete clinical history was taken, and a blood analysis carried out, including the rheumatoid factor. The specimens were embedded in methyl-methacrylate and studied with a microCT eXplorer Locus SP scanner. The acquisition parameters were: 80 kVp/80  $\mu$ A, thickness of aluminium filter:  $10^{-3}$  inches, FOV  $\approx$  2x2 cm, mode of acquisition of 360°, 720 views, 4 frame averages/view, exposure time 1.700 ms, voxel resolution: 28  $\mu$ m. A region of interest (ROI) was selected by means of interpolation, avoiding cortical bone. An automatic segmentation process (thresholding) was used to differentiate and segment the hematopoietic bone tissue. The microarchitectural parameters were generated automatically by computer using parallel-plate algorithms. The results were compared with 14 specimens from healthy controls of similar age and sex using Student's test for unpaired samples. The statistical significance was  $p < 0.05$ .

**Results:** The fraction of bone volume (BV/TV) was significantly lower in those patients with RA than in the healthy controls ( $p < 0.05$ ). The trabecular thickness (Tb.Th) was higher in the controls. The trabecular separation (Tb.Sp) was higher in those specimens with RA ( $p < 0.05$ ). The trabecular connectivity (Tb.N) was significantly greater in the control specimens ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** The patients with RA have worse trabecular bone quality and low trabecular connectivity. The microCT scanner is a quick and powerful tool for the study of trabecular microstructure.

**Key words:** *Rheumatoid arthritis, Microarquitecture, Bone, Computed Tomography.*

## Introducción

La osteoporosis es un problema de salud a nivel mundial<sup>1</sup>. Ha sido definida por el *National Institutes of Health* como una "enfermedad caracterizada por una baja masa ósea y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo que conduce a un aumento de la fragilidad del hueso y a un consiguiente aumento del riesgo de fractura"<sup>2</sup>. Es por ello que alteraciones en el hueso trabecular no sólo se caracterizan por reducciones de la densidad mineral ósea (DMO), sino también por cambios en la calidad ósea, término que engloba a la microarquitectura, el recambio óseo, las microfracturas y la mineralización ósea<sup>3</sup>.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica inflamatoria de origen autoinmune y etiología desconocida que ataca principalmente la sinovial articular produciendo artritis. En los pacientes con AR se han descrito disminuciones de la DMO en dos formas: osteoporosis yuxta-articular (uno de los hallazgos más tempranos) y osteoporosis generalizada, en localizaciones a distancia de las articulaciones inflamadas. Hasta la fecha se han descrito diferentes series de pacientes con AR con una gran prevalencia de osteoporosis generalizada<sup>4-13,34</sup>, así como un incremento en el riesgo de fractura<sup>14-16</sup>. Los factores más determinantes en la pérdida de hueso en estos pacientes

parecen ser la reducción de la actividad física en los estadios más avanzados de la enfermedad<sup>10,11,17</sup>, así como el tratamiento con glucocorticoides de forma crónica<sup>7-9,18,19</sup>. Además, niveles bajos de vitamina D han sido asociados con el encamamiento prolongado, clases funcionales muy limitadas y con dietas pobres en calcio<sup>20,21,39,40</sup>. Por otra parte, en los últimos años cada vez se habla más del papel que juegan citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1, que han demostrado incrementar la resorción osteoclástica por diferenciación de los macrófagos de la sinovial hacia osteoclastos<sup>22-26</sup>.

Hasta la fecha, se han llevado a cabo pocos estudios histomorfométricos en pacientes con AR. Mellish *et al.* estudiaron 48 especímenes óseos procedentes de pacientes con AR no tratados con corticoides, hallando una menor fracción de volumen óseo y un menor grosor trabecular que en los controles, hallazgos que sugieren que la AR no tratada con esteroides se asocia a pérdida de hueso prematura. Estos resultados sólo fueron significativos en mujeres<sup>35</sup>. Pérez-Edo *et al.* describieron una asociación entre la hipovitaminosis D y una disminución del recambio óseo en biopsias óseas transilíacas de pacientes con AR, confirmando los hallazgos publicados por Compston *et al.* en 1994<sup>21,44</sup>. Hanyu *et al.* encontraron una disminución en el grosor trabecular y en la conectividad ósea en pacientes postme-

nopáusicas con AR al compararlas con controles de similar edad con osteopenia<sup>45</sup>. Laan *et al.* por su parte, estudió diferentes cohortes de pacientes con AR tratadas con esteroides, describiendo un descenso de DMO cortical y trabecular en columna lumbar parcialmente reversible al interrumpirse el tratamiento corticoideo<sup>29-31</sup>. Resumiendo, parece ser que el descenso de masa ósea en los pacientes con AR es de etiología multifactorial, destacando el efecto de las citocinas proinflamatorias y el tratamiento glucocorticoideo prolongado.

A pesar de que la histomorfometría convencional nos permite caracterizar este tipo de osteoporosis, se trata de una exploración invasiva, por lo que buscar otras alternativas no cruentas constituye un objetivo fundamental. Excepto los estudios con histomorfometría convencional, hasta la fecha no se han publicado estudios que hayan estudiado específicamente la microestructura trabecular en la osteoporosis mediante técnicas multiplanares tridimensionales tales como microCT o p-QCT (*Peripheral Quantitative Computerized Tomography*), técnica que permite la medida de los parámetros microarquitecturales trabeculares (y también corticales) a nivel de radio y tibia distal de manera no invasiva<sup>28</sup>.

El objetivo principal de este estudio es valorar la capacidad discriminativa del microCT a la hora de diferenciar entre pacientes con AR sin tratamiento corticoideo y controles sanos a partir de biopsias de cresta ilíaca previamente realizadas. Dichos especímenes óseos pertenecen al fondo documental de biopsias del servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Mar. Nuestra hipótesis sostiene que las muestras óseas de los pacientes con AR reflejarán un deterioro de su calidad ósea.

## Material y método

Un total de 66 pacientes que cumplieran los criterios de la *American Rheumatism Association* de 1987 para el diagnóstico de AR<sup>36</sup> fueron escogidos aleatoriamente desde el total de pacientes del Servicio de Reumatología de los Hospitales del Mar y de la Esperanza de Barcelona. Ninguno de ellos tenía otras enfermedades o tomaba medicación alguna que pudiera afectar el metabolismo óseo, a excepción de 22 pacientes que recibían tratamiento corticoideo oral a dosis bajas (< 8 mg/d prednisona) por un periodo de  $47 \pm 61,8$  meses (rango 6-240 meses), con una dosis acumulada de  $6,34 \pm 8,76$ . En el resto de pacientes (44) jamás se inició tratamiento corticoideo. Todos los pacientes estaban en tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y un 67% estaba bajo tratamiento con fármacos antirreumáticos tipo DMARD (*Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs*). A todos los pacientes se les realizó un mismo protocolo diagnóstico que incluyó una historia clínica completa, haciendo especial hincapié en la existencia de enfermedades que pudieran afectar el metabolismo óseo y el uso de fármacos tóxicos para el tejido óseo.

Se realizó un perfil bioquímico completo, incluyendo parámetros de actividad inflamatoria. El grado de funcionalidad se midió mediante el índice de funcionalidad de *Steinbrocker*<sup>37</sup>. Se midió la

DMO a nivel de columna lumbar mediante densitometría (DXA)<sup>38</sup> en 41 pacientes (34 mujeres y 7 hombres) utilizando un densitómetro *Hologic QDR-1000* (Hologic Inc. Waltham, MA, USA). La precisión del aparato es de 0,45% con un coeficiente de variación *in vivo* de 1,2% en espina lumbar.

Los datos clínicos y epidemiológicos más relevantes del global de pacientes con AR inicialmente seleccionados para el estudio se muestran de manera retrospectiva en la Tabla 1.

**Realización de biopsia ósea:** Se obtuvieron catorce biopsias óseas de pacientes (4 hombres, 10 mujeres) diagnosticados de AR sin tratamiento glucocorticoideo procedentes del fondo documental de biopsias del servicio de Anatomía Patológica. Dichos especímenes óseos son los mismos que utilizaron Pérez-Edo *et al.*<sup>21</sup> en su estudio. No hubo diferencias significativas entre estos pacientes y el resto de pacientes que sí habían seguido tratamiento esteroideo en cuanto a la edad ( $59,1 \pm 10,7$  vs.  $59,9 \pm 12,6$  años;  $p < 0,05$ ) e índice de *Steinbrocker* ( $2,2 \pm 0,6$  vs.  $2,4 \pm 0,6$ ;  $p < 0,05$ ). Cada biopsia ósea transilíaca se obtuvo mediante anestesia local con un trepano *Bordier-Meunier* de 8 mm de diámetro interior (Lepine, Lyon-Cedex, Francia)<sup>32</sup>. Cada espécimen fue fijado en etanol al 70%, deshidratado en concentraciones decrecientes de alcohol etílico e incluido en un cilindro de metil-metacrilato de 2 cm de diámetro. Se obtuvieron secciones de 5  $\mu$ m de grosor mediante microtomía (*Supercut2050*, Reichert Jung, Alemania), posteriormente teñidas con *Von Kossa* y tricómico de *Goldner*.

Finalmente se calcularon los siguientes parámetros estáticos histomorfométricos: volumen óseo trabecular ( $BV/TV_H$ ; %) y grosor trabecular medio ( $Tb.Th_H$ ;  $\mu$ m) mediante medida microscópica directa. Parámetros derivados tales como la densidad trabecular media ( $Tb.N_H$ ;  $\mu$ m<sup>-1</sup>) y la separación trabecular media ( $Tb.Sp_H$ ;  $\mu$ m) se calcularon de acuerdo a las siguientes fórmulas<sup>22</sup>:

$$Tb.N = (BV/TV)/Tb.Th$$

$$Tb.Sp = (1/Tb.N) - Tb.Th$$

Describimos de manera retrospectiva los valores histomorfométricos obtenidos de los 14 especímenes con AR:  $BV/TV_H$  (%):  $13,52 \pm 5,39$ ;  $Tb.Th_H$  ( $\mu$ m):  $152,44 \pm 37,87$ ;  $Tb.Sp_H$  ( $\mu$ m):  $1157,3 \pm 639,84$  y  $Tb.N_H$  ( $\mu$ m<sup>-1</sup>):  $0,8650 \pm 0,2617$ .

## Adquisición de imágenes mediante microCT:

Los especímenes óseos incluidos en metal-metacrilato fueron introducidos en el cilindro de muestras, fijándolos con una tira de espuma de polietileno para asegurar su inmovilización. La captación de imágenes se realizó con el microCT para especímenes *eXplore Locus SP* (GE Healthcare). La adquisición de datos se utilizó los siguientes parámetros: voltaje del tubo: 80 kVp, corriente del tubo: 80  $\mu$ A, grosor del filtro de aluminio: 0,010 pulgadas, FOV  $\approx 2 \times 2$  cm<sup>2</sup> –dependiendo del tamaño del espécimen–, modo de adquisición en 360°, 720 *views* (proyecciones), incremento de 0,5° entre cada proyección, 4 imágenes/proyección, tiempo de exposición: 1.700

Tabla 1. Datos clínicos y epidemiológicos de la totalidad de pacientes con AR (n=66)

	<b>Hombres (n=16) Media ± SD (rango)</b>	<b>Mujeres (n=50) Media ± SD (rango)</b>
Edad, años	57,6 ± 12,2 (34-74)	60,5 ± 11,9 (33-85)
Años desde menopausia; n=43	---	16 ± 9,6 (0-45)
Índice de masa corporal	24,9 ± 3,1 (18,1-32,5)	25,5 ± 4 (16,8-38)
Duración de la enfermedad, meses	68,1 ± 78,05 (6-240)	84 ± 87,6 (6-360)
Prednisolona, dosis acumulada (g)	12,0 ± 14,2 (1,1-34,5)	5,3 ± 7,3 (0,7-28)
Índice de <i>Steinbrocker</i>	2,1 ± 0,5 (1-3)	2,4 ± 0,5 (1-3)
Factor reumatoide (IU/mL)	521 ± 640 (69-2015)	353 ± 514,2 (65-2150)
VSG (mm/1ªhora)	31,3 ± 16,6 (4-60)	41,7 ± 23,2 (7-85)
PCR (mg/dL)	1,2 ± 0,9 (0,5-3,6)	2,9 ± 2,8 (0,5-10,2)
25-OH-vitamina D, ng/mL	12,57 ± 14,9 (2,2-48,9)	7,45 ± 5,62 (1,5-33,6)
DXA lumbar (g/cm <sup>2</sup> )	0,764 ± 0,118 (0,491-0,935)	0,592 ± 0,129 (0,091-0,792)

ms. El tiempo de escaneado para cada espécimen fue de aproximadamente 2 horas, más un tiempo de reconstrucción de 1 hora.

Los datos volumétricos se reconstruyeron a una resolución de 28- $\mu\text{m}$  *voxels* isotrópicos (2,2 x 10<sup>5</sup> mm<sup>3</sup> por *voxel*) mediante el algoritmo cónico de *Feldkamp*. Se eligió 28  $\mu\text{m}$  con el objetivo de mejorar el cociente señal-ruido de las imágenes obtenidas, reducir el tiempo de escaneado y aligerar el volumen de datos obtenido. El análisis de imágenes y la generación de los parámetros microarquitecturales se realizó mediante *software MicroView*® (GE Healthcare).

Debido a que la cantidad de volumen óseo trabecular tiende a variar espacialmente, decreciendo en profundidad desde la superficie endosteal, la región de interés (*region of interest*) (ROI) a cuantificar se seleccionó en hueso trabecular usando dos métodos diferentes: uno restringiendo el análisis a sólo las trabéculas centrales de la muestra biopsiada, y otro incluyendo todas las trabéculas desde la superficie endosteal. El primer método empleó un ROI cilíndrico alineado paralelamente a las superficies corticales externas de un diámetro exactamente el 50% entre ambas superficies endosteales. En el segundo método se utilizó un trazado curvo (*spline fitting draw*) que englobaba el conjunto de trabécu-

las en cada uno de los cortes, creando posteriormente el ROI mediante interpolación. El hueso cortical fue excluido del análisis en ambos métodos. Para evitar artefactos se omitieron del estudio las secciones o *slices* cercanas a los bordes de corte.

Para cada ROI, el tejido óseo se segmentó de la médula ósea mediante una aplicación informática que diferencia la intensidad de cada uno de los *voxels* (*bimodal histogram thresholding*). Los parámetros microarquitecturales BV/TV<sub>CIL</sub>, Tb.Th<sub>CIL</sub>, Tb.Sp<sub>CIL</sub> y Tb.N<sub>CIL</sub> (para ROI cilíndrico) y BV/TV<sub>SPL</sub>, Tb.Th<sub>SPL</sub>, Tb.Sp<sub>SPL</sub> y Tb.N<sub>SPL</sub> (para ROI curvo) se calcularon automáticamente usando los mismos algoritmos *parallel-plate* descritos anteriormente para histomorfometría convencional, recalando que Tb.Th fue determinado mediante un algoritmo procesador de imágenes incluido en *MicroView*®. Los pasos en la adquisición y procesamiento de las imágenes se resumen en la Figura 1.

El número de *Euler-Poincaré* y el volumen de *Euler* (EulerV<sub>CIL</sub> and EulerV<sub>SPL</sub>) también fueron calculados. Todos los resultados histomorfométricos y de microCT de los pacientes con AR fueron comparados con un grupo control de similar sexo y edad formado por biopsias óseas procedentes de 14 donantes sanos procedentes del fondo documental de biopsias del servicio de Anatomía Patológica.

Tabla 2. Parámetros estructurales de los pacientes con AR y sus controles medidos mediante microCT

	Parámetro		AR (n=14)	Controles (n=14)	p*
ROI cilíndrico (ROI <sub>CIL</sub> )	Volumen de ROI (mm <sup>3</sup> )	Total	23,55 ± 11,5	52,47 ± 53,47	
		Sólo óseo	4,33 ± 2,51	13,29 ± 12,68	
	BV/TV <sub>CIL</sub> (%)		18,92 ± 6,29	25,15 ± 7,46	0,024
	Tb.Th <sub>CIL</sub> (µm)		123,33 ± 16,91	136,46 ± 21,41	0,083
	Th.Sp <sub>CIL</sub> (µm)		593,84 ± 249,91	426,73 ± 99,72	0,028
	Tb.N <sub>CIL</sub> (µm <sup>-1</sup> )		1,52 ± 0,43	1,82 ± 0,31	0,051
	EV <sub>CIL</sub>		3,15 ± 2,24	5,94 ± 2,42	0,004
ROI curvo (ROI <sub>SPL</sub> )	Volumen de ROI (mm <sup>3</sup> )	Total	154,52 ± 108	154,52 ± 108	
		Sólo óseo	20,90 ± 8,13	40,26 ± 26,4	
	BV/TV <sub>SPL</sub> (%)		20,44 ± 6,22	27,45 ± 7,27	0,011
	Tb.Th <sub>SPL</sub> (µm)		130,04 ± 13,68	140,29 ± 13,97	0,060
	Th.Sp <sub>SPL</sub> (µm)		554,95 ± 203,51	393,03 ± 101,86	0,013
	Tb.N <sub>SPL</sub> (µm <sup>-1</sup> )		1,56 ± 0,40	1,95 ± 0,47	0,027
	EV <sub>SPL</sub>		83,33 ± 2,66	6,92 ± 5,28	0,031

\*Significativo si p < 0,05

**Análisis estadístico:** Los datos se compilaron en una hoja de cálculo (Microsoft Excel 2002) y se analizaron estadísticamente mediante JMP software (versión 5.1.2, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Se realizó un estudio estadístico descriptivo básico, aplicando el test de normalidad de *Shapiro-Wilk* para variables continuas (tamaño muestral ≤ 2000). La significación estadística se fijó en p < 0,05, y los resultados se expresaron como media ± DE. La comparación de datos microarquitecturales obtenidos en pacientes con AR y en donantes sanos se realizó mediante el test t de *Student* no pareado para múltiples comparaciones.

**Resultados**

Finalmente se incluyeron un total de 14 muestras óseas procedentes de 10 mujeres y 4 hombres. No se hallaron diferencias significativas en edad entre los pacientes y los donantes sanos (p < 0,05). Si bien el volumen de las ROI generadas fue entre 5-5,4 veces más grande en el trazado curvo que en el cilíndrico, se halló una concordancia excelente ambos métodos (ROI<sub>CIL</sub> and ROI<sub>SPL</sub>) para todos los parámetros microarquitecturales (r<sup>2</sup>= 0,83-0,91), especialmente para Tb.Sp y Tb.N (r<sup>2</sup>= 0,91). Todos los resultados obtenidos mediante microCT en pacientes y controles para cada modelo de ROI se describen a continuación en la Tabla 2.

La masa ósea trabecular medida mediante los dos métodos (BV/TV<sub>CIL</sub> y BV/TV<sub>SPL</sub>) en los pacientes con AR fue significativamente más baja que en el grupo control (p < 0,05). Tb.Th<sub>CIL</sub> en los especímenes con AR fue menor que el grupo control, pero esta diferencia no fue significativa (p= 0,083). De todas maneras, al calcular Tb.Th<sub>SPL</sub> el resultado estuvo al borde de la significación estadística (p= 0,06), probablemente debido a la inclusión de trabéculas periféricas más gruesas en el momento de la selección de la ROI. Es probable que ello justifique unos valores ligeramente superiores (aunque no significativos) para BV/TV y Tb.Th cuando se analiza un mismo espécimen utilizando ambos modelos de selección de ROI.

Como era de esperar, los especímenes con AR obtuvieron mayores valores para Tb.Sp<sub>CIL</sub> y Tb.Sp<sub>SPL</sub> que los controles sanos (p= 0,028 y p= 0,013, respectivamente). Tb.N, o número trabecular, es un parámetro que representa el número medio de trabéculas por µm. Como se esperaba, los controles obtuvieron valores mayores para este parámetro, pero esta diferencia sólo fue estadísticamente significativa cuando se utilizó el modelo con ROI curvo (p= 0,027). Las reconstrucciones volumétricas de tres *cores* cilíndricos óseos procedentes de dos paciente con AR y de un sujeto con-

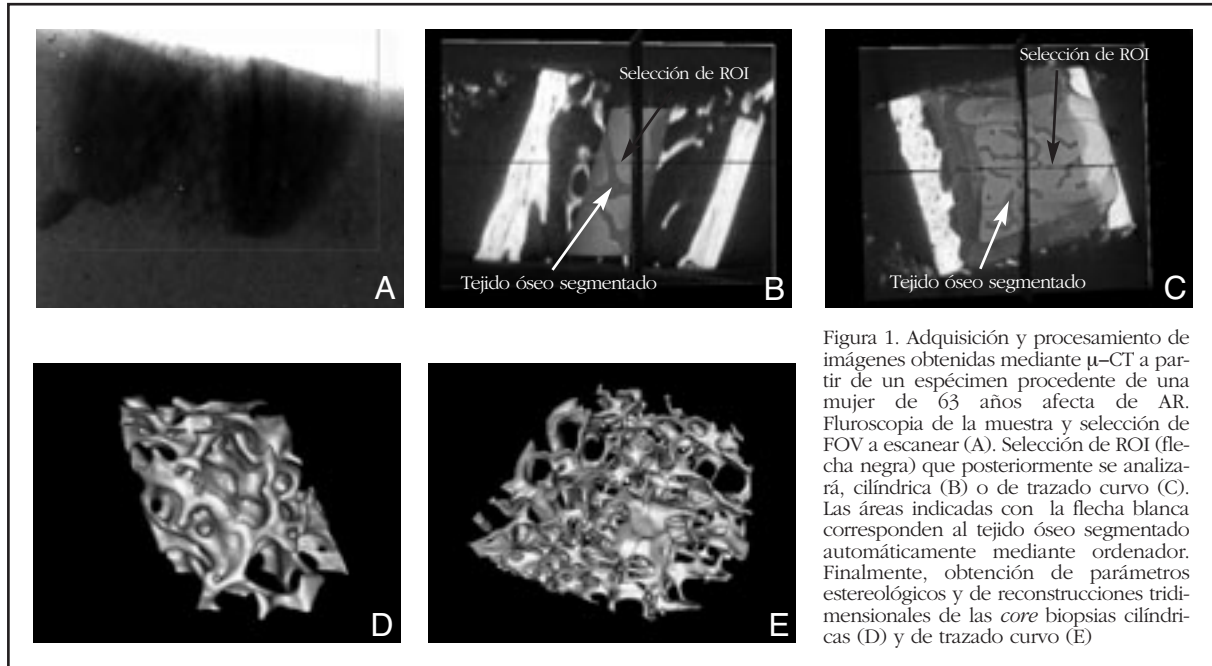


Figura 1. Adquisición y procesamiento de imágenes obtenidas mediante  $\mu$ -CT a partir de un espécimen procedente de una mujer de 63 años afecta de AR. Fluoroscopia de la muestra y selección de FOV a escanear (A). Selección de ROI (flecha negra) que posteriormente se analizará, cilíndrica (B) o de trazado curvo (C). Las áreas indicadas con la flecha blanca corresponden al tejido óseo segmentado automáticamente mediante ordenador. Finalmente, obtención de parámetros estereológicos y de reconstrucciones tridimensionales de las *core* biopsias cilíndricas (D) y de trazado curvo (E)

trol ejemplifican visualmente el predominio de la estructura trabecular en cada grupo (Figura 2).

Como se ha mencionado anteriormente, el Volumen de *Euler* mide la conectividad por unidad de volumen. Tal y como se esperaba, los controles sanos tuvieron volúmenes de *Euler* mayores que los pacientes con AR en ambos modelos ( $EV_{CIL}$   $p < 0,01$ ;  $EV_{SPL}$   $p = 0,031$ ). En los especímenes con AR, se halló una relación moderada-alta entre  $EV_{SPL}$  y  $Tb.N_{SPL}$  ( $r^2 = 0,69$ ;  $p < 0,01$ ).

## Discusión

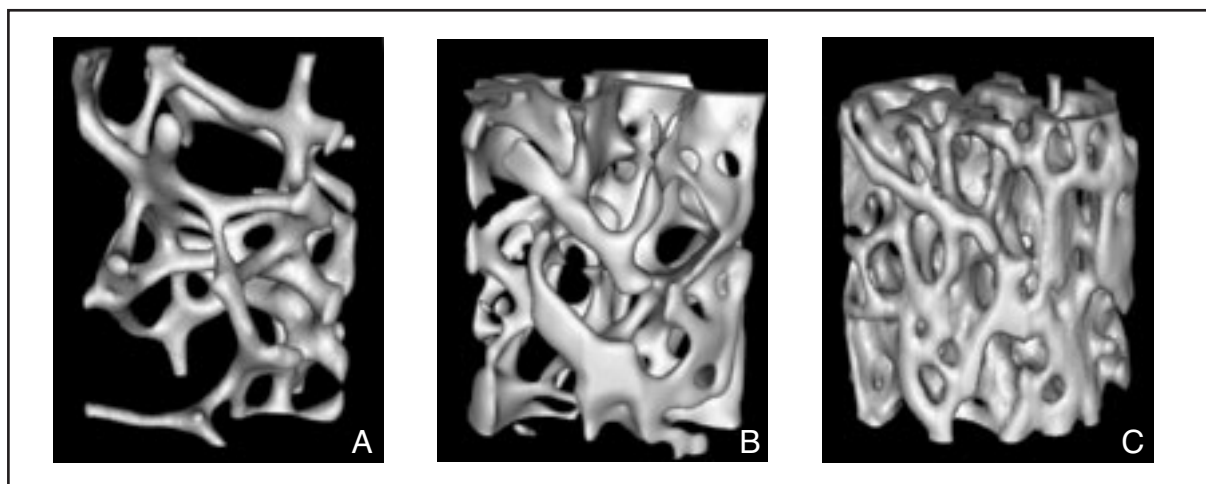
Hasta la fecha, estudios previos habían demostrado claramente la asociación entre la AR y una densidad mineral ósea disminuida, pero ninguno de ellos había examinado directamente los cambios microarquitecturales en humanos mediante una técnica como el microCT. En este estudio hemos utilizado esta técnica tridimensional para determinar si la microestructura trabecular de biopsias transilíacas de pacientes con AR difiere de aquellas procedentes de donantes sanos. Los resultados muestran una menor fracción de volumen óseo trabecular (BV/TV) y un menor grosor trabecular medio (Tb.Th) en los especímenes con AR en comparación con los controles, así como una mayor separación trabecular media (Tb.Sp) para ambos modelos de selección de ROI. Respecto a los parámetros de conectividad, los especímenes de control mostraron mayores valores de densidad trabecular y de volúmenes de *Euler*. Dichos hallazgos son consistentes con la existencia de una osteoporosis trabecular avanzada en estos pacientes libres de tratamiento con esteroides, y reflejan una calidad ósea alterada y una pobre conectividad trabecular relacionada con el estímulo

inflamatorio continuo que ocurre en la AR.

Se decidió seleccionar dos ROI diferentes (cilíndrica y de trazado curvo) para cada espécimen ya que en publicaciones previas no existía ninguna preferencia por ninguno de los dos tipos. Los dos ROI modelos fueron útiles, pero el de trazado curvo alcanzó mejores niveles de significación estadística debido a la inclusión del volumen trabecular entero (es decir, no se restringió el análisis a sólo el *core* de la biopsia). Este hecho sugiere que la región central trabecular del ROI cilíndrico no refleja los cambios microestructurales de la osteoporosis adecuadamente, y que se deben considerar las regiones trabeculares periféricas en este tipo de estudios ya que también son importantes a la hora de estudiar la microarquitectura.

No obstante, nuestra mayor limitación en este estudio fue el pequeño número de pacientes y controles, debido a la dificultad inherente de obtener biopsias óseas. Por ello, probablemente las diferencias entre los valores de algunos parámetros microarquitecturales entre muestras de pacientes y control sanos sólo muestran una tendencia estadística, y no una significación estadística clara. Ésta es una limitación ya conocida en este tipo de estudios, debido a que este tipo de biopsias son difíciles de obtener ya que los pacientes no tienden a aceptar de buen grado procedimientos invasivos como una biopsia. Otra limitación importante fue la generación del ROI de trazado curvo basado en un método de interpolación a partir de una selección de mano alzada en cada uno de los cortes realizados. Sin embargo, creemos que éste es un problema relativo considerando que se trata de una metodología necesaria a la hora de evitar la inclusión de hueso cortical.

Figura 2. Microestructura trabecular de biopsias transilíacas obtenidas mediante microCT con una resolución isotrópica de 28  $\mu\text{m}$ . A: *Cores* cilíndricos de pacientes con AR C: *Core* cilíndrico de un control sano. El volumen ROI seleccionado fue el mismo en los 3 casos. (A) Edad: 68 a. BV/TV<sub>CIL</sub>: 8,8%; Tb.Th<sub>CIL</sub>: 118,43  $\mu\text{m}$ ; (B) Edad: 54 a. BV/TV<sub>CIL</sub>: 17,98%; Tb.Th<sub>CIL</sub>: 124,59  $\mu\text{m}$ ; (C) Edad: 38 a. BV/TV<sub>CIL</sub>: 26,3%; Tb.Th<sub>CIL</sub>: 137,56  $\mu\text{m}$



En conclusión, creemos que el microCT es una técnica de imagen relativamente nueva que permite una cuantificación plena de la microestructura trabecular, siendo más rápida que la histología convencional y permitiendo un examen no destructivo del espécimen óseo previo al análisis patológico. No obstante, quizá la más importante de sus limitaciones es que, si bien permite el examen no destructivo del espécimen óseo, aún sigue siendo una técnica invasiva para el paciente pues no permite realizar diagnósticos ni seguimientos post-tratamiento de manera rutinaria en la vida real. Por ello, creemos importante el papel jugado por una técnica no invasiva como la p-QCT, al haber demostrado discriminar *in vivo* entre pacientes osteoporóticos y controles sanos, predecir el riesgo de fractura en pacientes con osteoporosis y haber demostrado excelentes correlaciones con resultados obtenidos mediante microCT<sup>47-49</sup>. Cabe mencionar, por otra parte, la ausencia de estudios específicos acerca de la microarquitectura ósea mediante p-QCT en pacientes adultos con AR.

Por ello, hacemos hincapié en el deterioro de la microestructura ósea en los pacientes con AR, ya que: 1) son pacientes que acostumbran a tratarse con glucocorticoides, hecho que agrava más en deterioro óseo; y 2) se ha de tener en cuenta el incremento de riesgo de fractura de cadera y/o vertebral, ya que cuando ocurren son un agravante más para un paciente ya limitado funcionalmente debido a su enfermedad de base. Asimismo, creemos que son necesarios más estudios en el futuro debido a la incidencia en la población de las fracturas óseas y las implicaciones económicas que ello conlleva, y que dichos estudios deberían ser llevados a cabo utilizando técnicas tridimensionales multiplanares como microCT o p-QCT, pues ambas han demostrado caracterizar la microarquitectura ósea adecuadamente.

## Bibliografía

1. Amarshi N, Scoggin JA, Ensworth S. Osteoporosis: review of guidelines and consensus statements. *Am J Manag Care* 1997;3:1077-84.
2. Consensus Development Conference on Osteoporosis. Hong Kong, 1-2 April 1993. *Am J Med* 1993;95:1-78.
3. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. *JAMA* 2001 14;285:785-95.
4. Saario R, Sonninen P, Mottonen T, Viikari J, Toivanen A. Bone mineral density of the lumbar spine in patients with advanced rheumatoid arthritis. Influence of functional capacity and corticosteroid use. *Scand J Rheumatol* 1999;28:363-7.
5. Keller C, Hafstrom I, Svensson B. BARFOT study group. Bone mineral density in women and men with early rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2001;30:213-20.
6. Lodder MC, Bakker SM, Dijkmans BA, Kvien TK, Woolf AD, Lems WF. Osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis: tip of the iceberg? *Scand J Rheumatol* 2000;29:203.
7. Butler RC, Davie MW, Worsfold M, Sharp CA. Bone mineral content in patients with rheumatoid arthritis: relations hip to low dose steroid therapy. *Br J Rheumatol* 1991;30:86-90.
8. Laan RFJM, van Riel PLCM, van Erning LJ, Lemmens JA, Ruijs SHJ, van de Putte LBA. Vertebral osteoporosis in rheumatoid arthritis effect of low dose prednisone therapy. *Br J Rheumatol* 1992;31:91-6.
9. Hall GM, Spector TD, Griffin AJ, Jawad ASM, Hall ML, Doyle DV. The effect of rheumatoid arthritis and steroid therapy on bone density in postmenopausal women. *Arthritis Rheum* 1993;36:1510-6.
10. Laan RF, Buijs WC, Verbeek AL, Draad MP, Corstens FH, van de Putte LB, et al. Bone mineral density in patients with recent onset rheumatoid arthritis: influence of disease activity and functional capacity. *Ann Rheum Dis* 1993;52:21-6.
11. Sambrook PN, Spector TD, Seeman E, Bellamy M, Buchanan RR, Duffy DL, et al. Osteoporosis in rheumatoid arthritis. A monozygotic co-twin control study. *Arthritis Rheum* 1995;28:806-9.
12. Hansen M, Florescu A, Stolzenberg M, Podenphant J, Pedersen-Zbinden B, Horslev-Petersen K, et al. Bone

- loss in rheumatoid arthritis. Influence of disease activity, duration of the disease, functional capacity and corticosteroid treatment. *Scand J Rheumatol* 1996;25:367-76.
13. Gough AKS, Lelley J, Eyre S, Holder RL, Emery P. Generalized bone loss in patients with early rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994;344:23-7.
  14. Hooyman JR, Melton LJ III, Nelson AM, O'Fallon WM, Riggs BL. Fractures after rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 1984;27:1353-61.
  15. Cooper C, Coupland C, Mitchell M. Rheumatoid arthritis, corticosteroid therapy and hip fracture. *Ann Rheum Dis* 1995;54:49-52.
  16. Peel Nf, Moore DJ, Barrington NA, Bax DE, Eastell R. Risk of vertebral fractures and relationship to bone mineral density in steroid treated rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995;54:801-6.
  17. Sambrook PN, Eisman JA, Champion GD, Yeates MG, Pocock NA, Eberl S. Determinants of axial bone loss in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30:721-8.
  18. Lane NE, Pressman AR, Star VL, Cummings SR, Nevitt MC. Rheumatoid arthritis and bone mineral density in elderly women. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *J Bone Miner Res* 1995;10:257-63.
  19. Laan R, van Riel P, Van Erning L, Lemmens A, Ruijs S, van de Putte L. Short-term effect of low dose prednisone therapy on bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991;34:90.
  20. Oelzner P, Muller A, Deschner F, Huller M, Abendroth K, Hein G, Stein G. Relationship between disease activity and serum levels of vitamin D metabolites and PTH in rheumatoid arthritis. *Calcif Tissue Int* 1998;62:193-8.
  21. Pérez-Edo L, Díez-Pérez A, Marinoso L, Valles A, Serrano S, Carbonell J. Bone metabolism and histomorphometric changes in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2002;31:285-90.
  22. Deodhar AA, Woolf AD. Bone mass measurement and bone metabolism in rheumatoid arthritis: a review. *Br J Rheumatol* 1995;35:309-22.
  23. Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N, Suda T. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002;4:281-9.
  24. Gradaigh DO, Ireland D, Bord S, Compston JE. Joint erosion in rheumatoid arthritis: interactions between tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1 and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclasts. *Ann Rheum Dis* 2004;63:354-9.
  25. Haynes DR, Crotti TN, Loric M, Bain GI, Atkins GJ, Findlay DM. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. *Rheumatology* 2001;40:623-30.
  26. Goldring SR, Gravallesse EM. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2002;4:226-31.
  27. Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van del Perre G, Dequeker J, Hildebrandt T, Ruegsegger P. Morphometric analysis of human bone biopsies: A quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 1998;1:59-66.
  28. Engelke K, Adams JE, Armbrrecht G, Augat P, Bogado CE, Bouxsein ML, Felsenberg D, Ito M, Prevrhal S, Hans DB, Lewiecki EM. Clinical use of quantitative computed tomography and peripheral quantitative computed tomography in the management of osteoporosis in adults: the 2007 ISCD Official Positions. *J Clin Densitom* 2008;11:123-62.
  29. Laan RF, Buijs WC, van Erning LJ, Lemmens JA, Corstens FH, Ruijs SH, van de Putte LB, van Riel PL. Differential effects of glucocorticoids on cortical appendicular and cortical vertebral bone mineral content. *Calcif Tissue Int* 1993;52:5-9.
  30. Laan RF, van Riel PL, van Erning LJ, Lemmens JA, Ruijs SH, van de Putte LB. Vertebral osteoporosis in rheumatoid arthritis patients: effect of low dose prednisone therapy. *Br J Rheumatol* 1992;31:91-6.
  31. Laan RF, van Riel PL, van de Putte LB, van Erning LJ, Van't Hof MA, Lemmens JA. Low-dose prednisone induces rapid reversible axial bone loss in patients with rheumatoid arthritis. A randomized, controlled study. *Ann Intern Med* 1993;119:963-8.
  32. Vigorita VJ. The bone biopsy protocol for evaluation of osteoporosis and osteomalacia. *Am J Surg Pathol* 1984;8:925-30.
  33. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Report of the ASBMR, Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987;2:595-610.
  34. Haugeberg G, Uhlig T, Falch JA, Halse JI, Kvien TK. Bone mineral density and frequency of osteoporosis in female patients with rheumatoid arthritis: results from 394 patients in the Oslo County Rheumatoid Arthritis register. *Arthritis Rheum* 2000;43:522-30.
  35. Mellish RW, O'Sullivan MM, Garrahan NJ, Compston JE. Iliac crest trabecular bone mass and structure in patients with non-steroid treated rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1987;46:830-6.
  36. Arnet FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:5-24.
  37. Steinbrocker O, Traeger CH, Batterman RC. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *JAMA* 1994;271:659-62.
  38. Wahner HW, Dunn WL, Brown ML, Morin RL, Riggs BL. Comparison of dual-energy x-ray absorptiometry and dual photon absorptiometry for bone mineral measurements of the lumbar spine. *Mayo Clin Proc* 1988;63:1075-84.
  39. O'Driscoll S, O'Driscoll M. Osteomalacia in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1980;39:1-6.
  40. Ralston SH, Willocks L, Pitkeathly DA, Morton R, Smith GD. High prevalence of unrecognized osteomalacia in hospital patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1988;27:202-5.
  41. Ulrich D, van Rietbergen B, Laib A, Ruegsegger P. The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone* 1999;25:55-60.
  42. Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Ruegsegger P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res* 1999;14:1167-74.
  43. Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the micro-anatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest* 1983;72:1396-409.
  44. Compston JE, Vedi S, Croucher PI, Garrahan NJ, O'sullivan MM. Bone turnover in non-steroid treated rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:163-6.
  45. Hanyu T, Arai K, Takahashi HE. Structural mechanisms of bone loss in iliac biopsies: comparison between rheumatoid arthritis and postmenopausal osteoporosis. *Rheumatol Int* 1999;18:193-200.
  46. Greenspan S, Luckey M. Evaluación de la osteoporosis posmenopáusica. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 6th Edition (Spanish Edition). Ed Medical Trends 2007 p.324-9.
  47. Boutroy S, Bouxsein ML, Munoz F, Delmas PD. In vivo assessment of trabecular bone microarchitecture by high-resolution peripheral quantitative computed tomography. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6508-15.
  48. Niedhart C, Braun K, Graf Stenbock-Fermor N, Bours F, Schneider P, Zilkens KW, Niethard FU. The value of peripheral quantitative computed tomography (pQCT) in the diagnosis of osteoporosis. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2003;141:135-42.
  49. van Rietbergen B, Majumdar S, Pistoia W, Newitt DC, Kothari M, Laib A, Ruegsegger P. Assessment of cancellous bone mechanical properties from micro-FE models based on micro-CT, pQCT and MR images. *Technol Health Care* 1998;6:413-20.