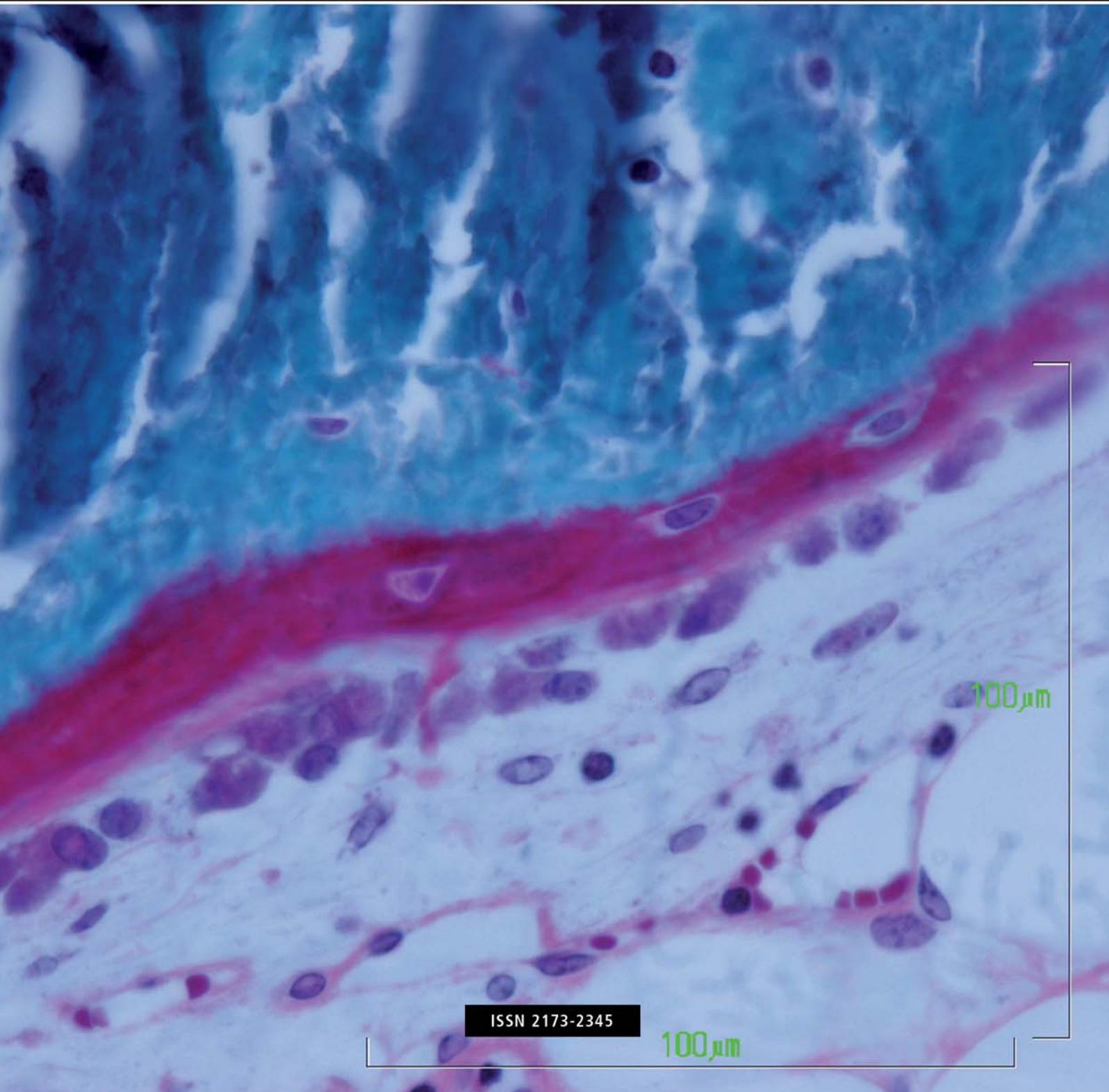


Volumen 11 · Número 2 · Abril-Junio 2019

Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com

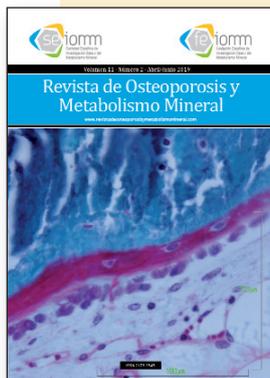


ISSN 2173-2345

100 μm

Director
Manuel Sosa Henríquez

Redactora
M^a Jesús Gómez de Tejada Romero



Nuestra portada: Detalle de ribete de osteoide sobre superficie ósea asociado a una hilera de osteoblastos activos. En el osteoide aparecen embebidos osteocitos inmaduros rodeados por matriz ósea no mineralizada (color rojo). Se pueden apreciar osteocitos maduros en la matriz ósea mineralizada (color azul). En la médula ósea se distinguen vasos sanguíneos (Tinción: Tricrómico de Goldner).

Autores: Dra. Lorena Benito Garzón. Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca; Dr. Francisco Collía Fernández. Departamento de Anatomía e Histología Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca (España).



Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)

Presidente
Josep Blanch Rubió

Vicepresidenta
M^a Jesús Moro Álvarez

Secretario
Enrique Casado Burgos

Tesorerera
Mercedes Giner García

Vocales
Guillermo Martínez Díaz-Guerra
Manel Ciria Recasens

Presidente Electo
Manuel Naves Díaz

Velázquez, 94 (1^a planta)
28006 Madrid

Tel: +34-625 680 737
Fax: +34-917 817 020

seiommm@seiommm.org
www.seiommm.org

Edición



Avda. Reina Victoria, 47
28003 Madrid
Telf. +34-915 538 297
correo@ibanezyplaza.com
www.ibanezyplaza.com

Maquetación
Concha García García

Traducción inglés
David Shea

ISSN: 2173-2345

Envío de originales:
romm@ibanezyplaza.com

Sumario

Vol. 11 - N^o 2 - Abril-Junio 2019

EDITORIAL

La osteonecrosis de maxilares: luces y sombras en el conocimiento de su fisiopatología
Gómez García A 37

ORIGINALES

La vía Wnt/ β -catenina disminuye la cantidad de osteoclastos en el hueso y favorece su apoptosis
Martín-Millán M, González-Martín MC, Ruíz P, Almeida M, Ros MA, González-Macías J 39

Regulación de la plasticidad celular y senescencia en condrocitos articulares: conexina 43 como diana terapéutica para el tratamiento de la artrosis
Varela-Eirín M, Varela-Vázquez A, Blanco A, Caeiro JR, Mayán MD .. 46

Estado cualitativo y cuantitativo óseo generalizado en la osteonecrosis de maxilares. Efecto de los bifosfonatos
García-Quintana M, Quintana-Montesdeoca P, Gómez de Tejada-Romero MJ, Saavedra-Santana P, Vicente-Barrero M, Bocanegra-Pérez S, Sosa-Henríquez M 55

Células osteogénicas afectadas por los factores solubles tumorales contribuyen a la formación del nicho pre-metastásico óseo
Álvarez Carrión L, Gutiérrez Rojas I, Ardura JA, Alonso V 64

IMÁGENES EN OSTEOLOGÍA

Fractura vertebral transversal metastásica por cáncer de pulmón
Molina Almela C, Sánchez Pardo M, Rueda Cid A, Campos Fernández C, Calvo Català J 72

REVISIÓN

Vitamina D e insuficiencia cardíaca. Fisiopatología, prevalencia, y asociación pronóstica
Groba Marco MV, García Quintana A, Galván Ruíz M, Rúa-Figueroa Erasquín D, Sosa Henríquez M 74

Indexada en las siguientes bases de datos: Scielo, Web of Sciences, IBECS, Scopus, SIIC Data Bases, embase, Redalyc, Emerging Sources Citation Index, Open J-Gate, DOAJ, Free Medical Journal, Google Academic, Medes, Electronic Journals Library AZB, e-revistas, WorldCat, Latindex, EBSCOhost, MedicLatina, Dialnet, SafetyLit, Mosby's, Encare, Academic Keys, ERIH plus, British Library, ROAD.

Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral ha sido aceptada para su inclusión en "Emerging Sources Citation Index", la nueva edición de Web of Sciences que funciona desde noviembre de 2015. Por ello, los artículos publicados en nuestra revista serán indexados en Web of Sciences desde el mismo momento de su publicación.

Comité Editorial

Dra. Teresita Bellido

Departamento de Anatomía y Biología Celular. Departamento de Medicina, División de Endocrinología. Universidad de Indiana. Facultad de Medicina. Richard Roudebush Centro Médico de la Administración de Veteranos de los Estados Unidos. Indianápolis, Indiana (Estados Unidos)
Correo electrónico: tbellido@iupui.edu

Dr. Ernesto Canalis

Director, Centro de Investigaciones del Hueso. Profesor de Ortopedia y de Medicina. Centro de Salud de la Universidad de Connecticut. Farmington, CT (Estados Unidos)
Correo electrónico: canalis@uchc.edu

Dra. Patricia Clark Peralta

Jefa de la Unidad de Epidemiología Clínica. Hospital Infantil Federico Gómez-Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad de México (México)
Correo electrónico: patriciaclark@prodigy.net.mx

Dr. Oswaldo Daniel Messina

Jefe de Reumatología. Hospital Argerich de Buenos Aires (Argentina). Profesor Asociado de Reumatología y Director de la carrera de post grado en Reumatología. Universidad de Buenos Aires (Argentina). Director Médico de Investigaciones Reumatológicas y Osteológicas de Buenos Aires (IRO SRL) (Argentina). Miembro del Board y del Comité de Asesores Científicos de la International Osteoporosis Foundation (IOF)
Correo electrónico: drosvaldodanielmessina@gmail.com

Dra. Lilian I Plotkin

Departamento de Anatomía y Biología Celular y Centro de Indiana para la Salud Muscoloesquelética. Facultad de Medicina, Universidad de Indiana. Indianápolis, Indiana (Estados Unidos)
Correo electrónico: lplotkin@iupui.edu

Dr. Josep Blanch Rubió

Unidad de Osteoporosis y de Metabolismo Óseo. Servicio de Reumatología. Departamento de Medicina. Hospital Universitario del Mar. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina. Barcelona (España)
Correo electrónico: JBlanch@parcdesalutmar.cat

Dr. Manuel Díaz Curiel

Ex-Director de la Cátedra de Enfermedades Metabólicas Óseas. Universidad Autónoma Madrid. Consultor de Enfermedades Metabólicas Óseas. Fundación Jiménez Díaz, Madrid. Presidente Honorífico de la Fundación Hispana de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas (FHOEMO) (España)
Correo electrónico: mdcuriel@fjd.es

Dr. Adolfo Díez Pérez

Instituto Hospital del Mar de Investigación Médica (IMIM) y Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario del Mar. Universidad Autónoma de Barcelona. CIBER en Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), Instituto Carlos III, Barcelona (España)
Correo electrónico: Adiez@parcdesalutmar.cat

Dr. José Antonio Riancho Moral

Departamento de Medicina y Psiquiatría, Universidad de Cantabria. Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Santander (España)
Correo electrónico: rianchoj@unican.es

Metodología, estudio de datos y estadística: Pedro Saavedra Santana

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Departamento de Matemáticas. Las Palmas de Gran Canaria (España)
Correo electrónico: pedro.saavedra@ulpgc.es

Dr. Manuel Sosa Henríquez (Director)

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS). Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral. Unidad Metabólica Ósea. Hospital Universitario Insular. Las Palmas de Gran Canaria (España)
Correo electrónico: manuel.sosa@ulpgc.es

Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero (Redactora)

Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla. Sevilla (España). Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (España)
Correo electrónico: mjtr@us.es

La osteonecrosis de maxilares: luces y sombras en el conocimiento de su fisiopatología

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000300001>

Gómez García A

Servicio de Rehabilitación - Hospital Universitario Dr. Negrín - Las Palmas de Gran Canaria (España)

La osteonecrosis de los maxilares (ONM) fue descrita por Marx *et al.*¹ en 2005. En los años sucesivos se publicó un buen número tanto de series de pacientes como de casos aislados, que con el paso de los años fue decreciendo, por una parte, por la saturación de las revistas y el escaso interés que pueda suscitar la descripción de nuevos casos, y, por otra, porque el conocimiento de esta patología ha motivado el desarrollo de medidas preventivas que han podido disminuir la incidencia de esta complicación.

Sobre la ONM se ha desarrollado todo un mundo de “temores, riesgos y peligros” que en su mayor parte no están justificados. La ONM fue señalada como una complicación del tratamiento prolongado con bifosfonatos y en este sentido se le igualó a las fracturas diafisarias², cuando ambos procesos con toda seguridad tienen mecanismos etiopatogénicos diferentes³. El miedo a la ONM o a las fracturas diafisarias desarrolló toda una doctrina sobre la necesidad de suspender el tratamiento con bifosfonatos o denosumab, las denominadas “vacaciones terapéuticas” que en realidad de lo que se trataba era sencillamente de suspender el tratamiento antirresortivo, antes de que aparecieran las posibles complicaciones de su uso⁴⁻⁶. Esto es especialmente frecuente en el ámbito de los odontólogos, quienes, en muchos casos, preocupados por el posible desarrollo de una ONM no realizan prácticamente ninguna intervención dental en los pacientes que reciben bifosfonatos o denosumab. Con ello, lo que se ha observado es un incremento de los abandonos del tratamiento con fármacos antirresortivos lo cual produce un aumento del riesgo de fracturas por fragilidad tras la suspensión del tratamiento con los bifosfonatos, riesgo que tiene una extrema gravedad en el

caso de la suspensión del tratamiento con denosumab, con aparición de fracturas vertebrales múltiples⁷⁻¹¹.

La ONM se produce sobre todo en pacientes que sufren un cáncer (más del 90% de los casos descritos) y que han recibido bifosfonatos potentes o denosumab a unas dosis que no son las utilizadas en el tratamiento de la osteoporosis^{3,12,13} y en los que se ha producido una intervención dental¹⁴. Entre los pacientes que reciben antirresortivos para el tratamiento de la osteoporosis, la aparición de casos, si bien es cierto que se ha descrito, es muy escasa, casi excepcional^{15,16}.

En este número de la Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral, Quintana *et al.*¹⁷ presentan los hallazgos observados en una serie de pacientes afectados de ONM a los que han efectuado un completo estudio tanto de la cantidad de masa ósea, determinada por densitometría, como de la calidad del hueso, estimada por el *trabecular bone score* (TBS) y los ultrasonidos, una técnica injustamente infravalorada, inocua y sencilla que puede valorar la calidad ósea y que predice el riesgo de fractura tan bien como la densitometría tradicional^{18,19}. Los resultados obtenidos están en desacuerdo con otro de los mitos desarrollados sobre la ONM y es que el exceso de supresión producido por estos fármacos produciría un hueso “congelado” de poca calidad y débil. Tal y como se vislumbra en estos resultados, lo más probable es que la cantidad y calidad del hueso en la ONM no demuestre alteraciones generales, sino que la afectación sea local y por influencia de múltiples factores. Todo lo cual nos lleva a la conclusión de que todavía desconocemos muchos hechos sobre la etiología, patogenia y fisiopatología de la ONM, y que aún tenemos más sombras que luces sobre ella^{12,20,21}.



Conflicto de intereses: El autor declara no tener conflictos de intereses.



Correspondencia: Arturo Gómez García (artgomgar@hotmail.es)

Bibliografía

1. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: Risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(11):1567-75.
2. Adler RA, Fuleihan GE, Bauer DC, Camacho PM, Bart L, Clines GA, et al. Managing osteoporosis in patients on long-term bisphosphonate treatment: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2016;31(1):16-35.
3. Sosa-Henríquez M. Osteonecrosis de los maxilares: Documento de consenso. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2009;1(1):41-51.
4. Anagnostis P, Paschou SA, Mintziori G, Ceausu I, Depypere H, Lambrinou I, et al. Drug holidays from bisphosphonates and denosumab in postmenopausal osteoporosis: EMAS position statement. *Maturitas.* 2017;101:23-30.
5. Brown JP, Morin S, Leslie W, Papaioanou A, Cheung AM, Davison KS, et al. Bisphosphonates for treatment of osteoporosis: expected benefits, potential harms, and drug holidays. *Can Fam Physician.* 2014;60(4):324-33.
6. Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ, Malouf Sierra J. Caso clínico a debate: vacaciones terapéuticas: ¿sí o no? *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2014;6(2):63-9.
7. Lamy O, Gonzalez-Rodriguez E, Stoll D, Hans D, Aubry-Rozier B. Severe rebound-associated vertebral fractures after denosumab discontinuation: 9 clinical cases report. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(2):354-8.
8. McClung MR. Cancel the denosumab holiday. *Osteoporos Int.* 2016;27(5):1677-82.
9. McClung MR, Wagman RB, Miller PD, Wang A, Lewiecki EM. Observations following discontinuation of long-term denosumab therapy. *Osteoporos Int.* 2017;28(5):1723-32.
10. Popp AW, Zysset PK, Lippuner K. Rebound-associated vertebral fractures after discontinuation of denosumab-from clinic and biomechanics. *Osteoporos Int.* 2016;27(5):1917-21.
11. Polyzos SA, Terpos E. Clinical vertebral fractures following denosumab discontinuation. *Endocrine.* 2016;54(1):271-2.
12. Ruggiero S, Gralow J, Marx RE, Hoff AO, Schubert MM, Huryn JM, et al. Practical guidelines for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *J Oncol Pract.* 2017;2(1):7-14.
13. Rasmusson L, Abtahi J. Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: an update on pathophysiology, risk factors, and treatment. *Int J Dent.* 2014;2014:1-9.
14. Tsao C, Darby I, Ebeling PR, Walsh K, Brien-simpson NO, Reynolds E. Oral health risk factors for jaw osteonecrosis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(8):1360-6.
15. Assael LA. Oral Bisphosphonates as a cause of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: clinical findings, assessment of risks, and preventive strategies. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(Suppl 5):35-43.
16. Sosa-Henríquez M, Vicente Barrero M, Bocanegra-Pérez S. Osteonecrosis de los maxilares: nuevas evidencias sobre su etiopatogenia. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2011;3:5-6.
17. Quintana-González M, Quintana-Montesdeoca P, Gómez de Tejada-Romero MJ, Saavedra-Santana P, Vicente-Barrero M, Bocanegra-Pérez S, et al. Estado cualitativo y cuantitativo óseo generalizado en la osteonecrosis de maxilares. Efecto de los bifosfonatos. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2019;11(2):55-63.
18. Raum K, Grimal Q, Varga P, Barkmann R, Glüer CC, Laugier P. Ultrasound to assess bone quality. *Curr Osteoporos Rep.* 2014;12(2):154-62.
19. Glüer CC. Quantitative Ultrasound-It is time to focus research efforts. *Bone.* 2007;40(1):9-13.
20. Aspenberg P. Osteonecrosis of the jaw: what do bisphosphonates do? *Expert Opin Drug Saf.* 2006;5(6):743-5.
21. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(suppl 5):61-70.

La vía Wnt/ β -catenina disminuye la cantidad de osteoclastos en el hueso y favorece su apoptosis

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000300002>

Martín-Millán M^{1,3}, González-Martín MC², Ruíz P³, Almeida M⁴, Ros MA^{2,5}, González-Macías J^{1,3}

1 Departamento de Medicina Interna - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Santander (España)

2 Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec) - Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad de Cantabria - Sociedad para el Desarrollo de Cantabria (CSIC-UC-SODERCAN) - Parque Científico y Tecnológico de Cantabria (PCTCAN) - Santander (España)

3 Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL) - Santander (España)

4 División de Endocrinología y Metabolismo - Centro para Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas - Universidad de Arkansas de Ciencias Médicas - Sistema de Salud Central para Veteranos de Arkansas - Little Rock - Arkansas (EE.UU.)

5 Departamento de Anatomía y Biología Celular - Facultad de Medicina - Universidad de Cantabria - Santander (España)

Fecha de recepción: 19/07/2018 - Fecha de aceptación: 19/02/2019

Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM para asistir al 33º Congreso de la ASBMR (San Diego, 2011)

Resumen

La activación de la señalización de Wnt/ β -catenina en células del linaje osteoblástico conduce a un aumento en la masa ósea a través de un mecanismo dual: por una parte, aumentando la osteoblastogénesis, y por otra, disminuyendo la osteoclastogénesis. El predominio de un mecanismo sobre otro depende del estado madurativo del osteoblasto en el que produzca la acumulación de β -catenina. La activación de la señalización de Wnt/ β -catenina en células del linaje osteoclástico y sus posibles efectos en la regulación de la masa ósea es menos conocida. Estudios previos han demostrado que la ablación condicional de β -catenina en los osteoclastos induce una disminución de la masa ósea asociada a un aumento de los osteoclastos, y este hecho se ha atribuido a un incremento de la osteoclastogénesis. Sin embargo, no se han evaluado otras posibilidades alternativas como que una disminución de la apoptosis normal de los osteoclastos pueda también contribuir al mayor número de los mismos. En este trabajo, para obtener información sobre este hecho, generamos ratones en los que la β -catenina se eliminó selectivamente de las células del linaje de monocito/macrófago utilizando un alelo flanqueado de la β -catenina (*Catnb^f*) junto con la línea de delección LisozimaMCre (*LysMCre*). El análisis tridimensional de los huesos de los ratones *Catnb^{f/f};LysM* revelaron una disminución significativa del grosor de la cortical femoral, mientras que el hueso trabecular vertebral no se vio afectado. Este fenotipo se asoció con un mayor número de osteoclastos en la superficie ósea. El número de osteoclastos en los cultivos procedentes de los ratones *Catnb^{f/f};LysM* fue dos veces mayor que en los cultivos obtenidos de los ratones control. La administración de WNT3a atenuó la formación de osteoclastos inducida por M-CSF y RANKL *in vitro*. Además, WNT3a promovió la apoptosis de osteoclastos, y este efecto fue contrarrestado, tanto por la presencia de DKK1 como por la ausencia de β -catenina. En conjunto, estos resultados apoyan un efecto autónomo celular de la β -catenina en el osteoclasto, y proporcionan evidencia convincente del papel proapoptótico de β -catenina en estas células.

Palabras clave: hueso, osteoclastos, lisozima M, β -catenina, Wnt, WNT3a.

INTRODUCCIÓN

La evidencia acumulada durante los últimos años ha establecido que la vía Wnt/ β -catenina es crucial para la formación ósea y el mantenimiento de la homeostasis esquelética^{1,2}. Las proteínas Wnt ejercen sus funciones celulares activando diferentes rutas de señalización, comúnmente denominadas vía canónica y vías no canónicas³. La primera actúa controlando la cantidad de β -catenina no asociada a cadherina, mientras que las otras rutas no requieren la presencia de β -catenina⁴. En la actualidad, la vía de señalización mediada por la β -catenina es la mejor estudiada y comprendida. La activación de la ruta Wnt/ β -catenina comienza en la membrana celular con la unión

de ciertos ligandos Wnt, tales como Wnt3a, a los receptores transmembrana de la familia Frizzled. Esta unión recluta el correceptor LRP5/6 (*low-density-lipoprotein receptor-related protein 5/6*), para formar un complejo ternario que desestabiliza un conglomerado citoplásmico de proteínas que, de lo contrario, fosforilarían la β -catenina del citoplasma para su destrucción en el proteasoma⁵⁻⁷. De modo que, tras la unión del ligando al receptor, la β -catenina no es fosforilada ni destruida, y, por lo tanto, puede acumularse en el citoplasma, desde donde se trasladará al núcleo. Allí se une al factor de transcripción TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) e induce la expresión de genes diana⁸.

La demostración inicial de la implicación de la vía canónica de Wnt en la osteogénesis fue proporcionada por la identificación de las mutaciones de pérdida de función (LOF) y ganancia de función (GOF) del correceptor LRP5, como responsables del síndrome de osteoporosis-pseudoglioma y del fenotipo hereditario de masa ósea elevada, respectivamente^{9,10}. Los fenotipos óseos de estas mutaciones se pudieron reproducir en modelos de ratón con la función del receptor LRP5/6 genéticamente modificada. Estos estudios pusieron de manifiesto el papel osteo-anabolizante de la señalización de Wnt/ β -catenina¹¹. Más recientemente, estudios realizados con ratones en los que se había manipulado la actividad de la β -catenina en células de linaje osteoblástico han establecido que la β -catenina aumenta la masa ósea a través de diferentes mecanismos dependiendo de la etapa de diferenciación en la que se encuentre la célula osteoblástica¹²⁻¹⁴. De forma que la GOF de la β -catenina exclusivamente en las células precursoras estimula su proliferación y maduración, pero suprime el destino alternativo hacia la diferenciación condrocítica, produciendo así un aumento de la masa ósea¹⁵. Por otro lado, cuando la GOF de β -catenina se produce en una etapa posterior de la diferenciación, se logra también una masa ósea elevada, pero esta ocurre a expensas de un mecanismo indirecto, esto es, la β -catenina induce la expresión de osteoprotegerina (OPG) en el osteoblasto, y la OPG atenúa la osteoclastogénesis^{16,17}.

La participación indirecta de los osteoclastos como mediadores de algunos de los efectos de la señalización Wnt/ β -catenina en las células de estirpe osteoblástica, planteó la cuestión de si esta vía podría tener también un papel directo en la función de los osteoclastos cuando se activa en ellos. Otero *et al.*¹⁸ y Albers *et al.*¹⁹ eliminaron β -catenina de los precursores de osteoclastos utilizando el modelo de ratón LisoZimaMCre (*LysMCre*), y encontraron una disminución de la masa ósea en el compartimiento trabecular, con un aumento paralelo en el número de osteoclastos, mostrando así que la β -catenina de los osteoclastos está, de hecho, implicada en la homeostasis ósea. Estos autores, atribuyeron el aumento del número de osteoclastos a un incremento exclusivo en la osteoclastogénesis, sin considerar posibles efectos sobre la apoptosis. Creemos que es importante aclarar esta cuestión, ya que la β -catenina es parte de una vía de señalización que actualmente es considerada como un objetivo terapéutico interesante. Para obtener una idea de este problema, hemos generado un modelo de ratón similar, en el que hemos analizado su fenotipo, y también posibles efectos sobre la apoptosis de los osteoclastos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Reactivos

La proteína WNT3a, la proteína Dickkopf 1 (DKK1), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el activador de receptor soluble de proteínas recombinantes del ligando kappa-B de factor nuclear (sRANKL) se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, EE.UU.).

2. Ratones mutantes

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las normas de la Unión Europea y los principios 3R. Los experimentos fueron revisados y aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria. El ratón con el alelo de β -catenina flaqueado por la secuencia *lox*²⁰ y la línea *LysMCre*²¹ han sido descritos previa-

mente y se obtuvieron del Laboratorio Jackson. Los ratones se genotiparon mediante PCR, utilizando el ADN genómico extraído de biopsia de la cola. Los cebadores utilizados para la detección de *LysMCre* fueron los siguientes; *forward* GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC y *reverse*: GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT, y el tamaño del producto 102 pb. *Reverse*: CACCATGTCCTGTCTATTTC, y el tamaño del producto en este caso sería de 324 pb. Los ratones experimentales se generaron mediante una estrategia de apareamiento consistente en dos pasos. Los ratones heterocigotos *LysMCre* fueron cruzados con ratones cuyo gen de la β -catenina estaba flanqueado por secuencias *lox* en homocigosis (β -catenin^{fl/fl}). Para generar ratones homocigóticos para el alelo condicional de β -catenina con y sin el alelo *Cre*, los ratones β -catenin^{fl/+}; *LysMCre* se cruzaron con los ratones β -catenin^{fl/fl}.

3. Micro-TAC

Se realizó un análisis de micro-TAC de la quinta vértebra lumbar después de disecar los huesos, limpiarlos, fijarlos en etanol, cargarlos en tubos de exploración de 12,3 mm de diámetro y obtener una imagen (μ CT40, Scanco Medical, Basserdorf, Suiza). Los escaneos se integraron en imágenes voxel 3-D (matrices de 1.024 x 1.024 píxeles para cada pila planar individual) y se usó un filtro gaussiano ($\sigma=0,8$, soporte=1) para reducir el ruido de la señal. Se aplicó un umbral de 200 a todos los escaneos analizados. Los escaneos se realizaron a una resolución media ($E=55$ kVp, $I=145$ μ A, tiempo de integración=200 ms). Se escaneó todo el cuerpo vertebral con una orientación transversal que excluía los pedículos y los procesos articulares. El análisis manual excluyó el hueso cortical del análisis. Todas las mediciones trabeculares se realizaron dibujando manualmente contornos cada 10 a 20 cortes y utilizando el conteo de voxel para el volumen óseo por volumen de tejido y los índices de transformación de distancia de relleno esférico sin suposiciones sobre la forma del hueso como varilla o placa para microarquitectura trabecular. El espesor cortical se midió en la mitad de la diáfisis femoral.

4. Histología ósea

Las vértebras lumbares (L1, L2 y L3) y el fémur izquierdo se fijaron en paraformaldehído al 4% durante toda la noche a 4°C y se descalcificaron durante ocho a nueve días en EDTA al 9% (pH 7,4) antes de la inclusión en parafina. El examen histomorfométrico se realizó en secciones longitudinales de 7 μ m del fémur para hueso cortical y en las secciones frontales de las vértebras para hueso esponjoso.

5. Cultivos celulares

Para cuantificar las células progenitoras de los osteoclastos, la médula ósea (MO) se purgó de los huesos largos y se sembró a una densidad de 50.000 células/cm² en placas de 48 pocillos. Tras permanecer 4-5 días en la placa de cultivo con medio α -MEM (Invitrogen), suplementado con 10% de SFB, 1% de PSG, 30 ng/ml de M-CSF y 30 ng/ml de sRANKL (R & D Systems), los osteoclastos se fijaron con 10% de formalina durante 15 min y teñida para fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). Los osteoclastos se cuantificaron teniendo en cuenta las células multinucleares y positivas para la tinción de TRAP. Para el resto de los cultivos, se usaron células de médula ósea purificadas, es decir no adheridas a la placa. Los macrófagos y osteoclastos se desarrollaron a partir de

células de la médula ósea (MO) no adheridas a la placa de cultivo, y cultivadas durante 4 días en presencia de M-CSF (130 ng/ml) para obtener macrófagos, o durante 4 días en presencia de M-CSF (30 ng/ml) y 30 ng/ml de RANKL para obtener osteoclastos.

6. PCR cuantitativa en tiempo real (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

El ARN total se extrajo con reactivos TRIzol (Life Technologies). Se usó 1 μ g de ARN total para producir ADNc de primera cadena usando la enzima m-MLV RT (Invitrogen). La qRT-PCR se llevó a cabo utilizando PreMix Ex taq (Takara) y los datos se analizaron utilizando el software Biorad. Los cebadores y las sondas para β -catenina [Mm01350385_g1 (fam)] y gapdh [Mm99999915_g1 (vic)] fueron fabricados por el servicio TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Los niveles relativos de expresión de ARNm se normalizaron con el gen de la proteína ribosómica S2 mediante el método Δ Ct²².

7. Analisis por Western blot

Los niveles de proteína de β -catenina y β -actina se analizaron usando un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce β -catenina (BD Biosciences), y un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce β -actina (Sigma-Aldrich).

8. Analisis de apoptosis

Se obtuvieron osteoclastos derivados de células de la MO no adheridas a la placa de cultivo extraídos de los ratones *Catnb*^{f/f};*LysMCre* y sus controles. Una vez desarrollados los osteoclastos en la placa de cultivo se trataron con WNT3a. Tras 24 horas de tratamiento, los cultivos se fijaron y se sometieron a tinción de TUNEL y TRAP. Se cuantificaron el número total de osteoclastos y el número de osteoclastos apoptóticos en cada placa. Se consideraron apoptóticos cuando al menos uno de sus núcleos era TUNEL positivo. El método TUNEL se realizó utilizando el kit de detección de fragmentación de ADN FragEL (EMD Chemicals. San Diego, California, EE.UU.) antes de la tinción para TRAP. Se enumeraron las células multinucleares TRAP positivas y TUNEL positivas.

La actividad de la caspasa-3 se midió determinando la degradación del sustrato fluorométrico DEVD (Biomol Research Laboratories, Plymouth Meeting. Pensilvania, EE.UU.), y se midió la concentración de proteína usando un kit compatible con detergente Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules. California, EE.UU.).

9. Analisis estadístico

Todos los datos se informan como la media \pm desviación estándar. Los valores medios de cada grupo se compararon mediante la prueba t de Student de dos colas.

RESULTADOS

1. La eliminación específica de la β -catenina de los precursores de los osteoclastos

La inactivación condicional de la β -catenina (*Catnb*) en células de linaje osteoclástico se realizó cruzando ratones que albergaban un alelo de β -catenina floxeado (*Catnb*^{f/f})²⁰ con ratones que expresaban la enzima Cre recombinasa bajo el control de los elementos reguladores del gen *LisozimaM* (*LysMCre*)²¹. Esta línea Cre induce la recombinación del alelo floxeado específicamente en las células del linaje monocito-macrófago y neutrófilos. A partir de este cruce, se generaron dos cohortes (machos y hembras) de

animales; una cohorte de experimentación, con genotipo *Catnb*^{f/f};*LysMCre* y otra control con genotipo *Catnb*^{f/f}.

Los ratones *Catnb*^{f/f};*LysMCre* nacieron en la proporción mendeliana esperada, con peso corporal similar (Figura 1A) a los controles de la misma camada y no mostraron ningún fenotipo evidente. La escisión del gen de β -catenina se confirmó por qRT-PCR. Los niveles de ARNm de β -catenina se analizaron en cultivos *ex vivo* de macrófagos y osteoclastos derivados de médula ósea (MO). Los macrófagos y osteoclastos obtenidos de ratones *Catnb*^{f/f};*LysMCre* exhibieron una disminución del 70% y del 60% en la expresión de β -catenina, respectivamente (Figura 1B). Atribuimos la eficacia limitada de la recombinación a la presencia de células de linajes distintos al mieloides en la placa de cultivo que expresaban niveles normales de β -catenina. Como se esperaba, el nivel de expresión de ARNm de β -catenina en riñón, hígado y bazo fue indistinguible entre los dos genotipos (Figura 1C).

2. Los animales carentes de β -catenina en los precursores de los osteoclastos presentan menor grosor del hueso cortical

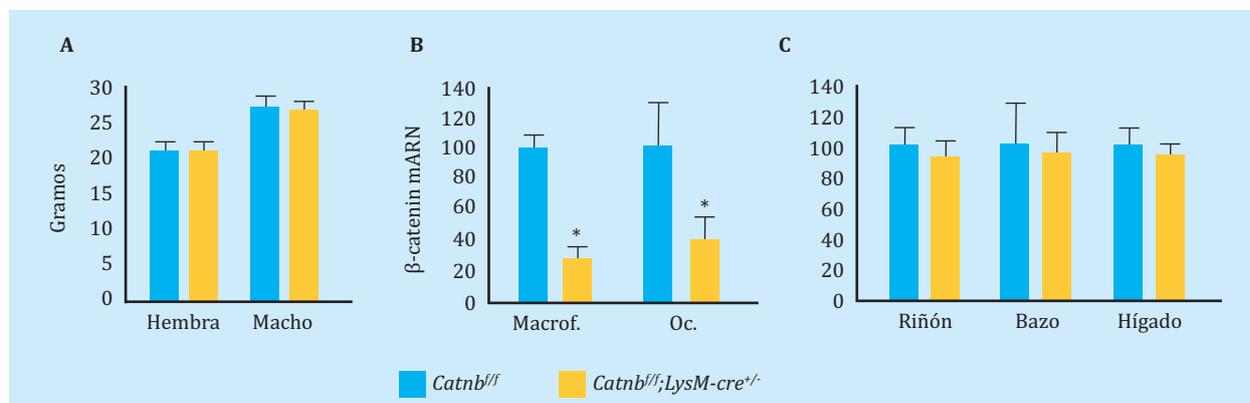
A las 28 semanas de vida se sacrificó una cohorte de 15 animales por sexo y genotipo y se examinó la arquitectura ósea de la quinta vértebra lumbar y el fémur derecho mediante micro-TC. El análisis reveló un grosor reducido del hueso cortical (Figura 2A), tanto en los machos como en las hembras *Catnb*^{f/f};*LysMCre*. Sin embargo, la ausencia de β -catenina en los precursores de los osteoclastos no alteró significativamente la masa ósea trabecular, ni en las vértebras, ni en el fémur (Figura 2B). Tampoco se vio afectado el espacio intertrabecular, el grosor trabecular y el número de trabeculas (no mostrado). Estos resultados sugieren que la señalización de Wnt/ β -catenina en los osteoclastos es importante para el mantenimiento de la masa ósea cortical.

3. Los ratones *Catnb*^{f/f};*LysMCre* presentan más osteoclastos en el endostio y más progenitores osteoclásticos en la médula ósea (MO)

A continuación, quisimos cuantificar el número de osteoclastos presentes en la superficie del hueso cortical. Lo que encontramos fue que, de acuerdo con un espesor cortical disminuido, el número de osteoclastos en la superficie endocortical del fémur de los ratones *Catnb*^{f/f};*LysMCre* estaba aumentado, en comparación con los animales control (Figura 3A). El hueso trabecular vertebral parecía mostrar la misma tendencia. Sin embargo, la diferencia no fue significativa ($p=0,06$).

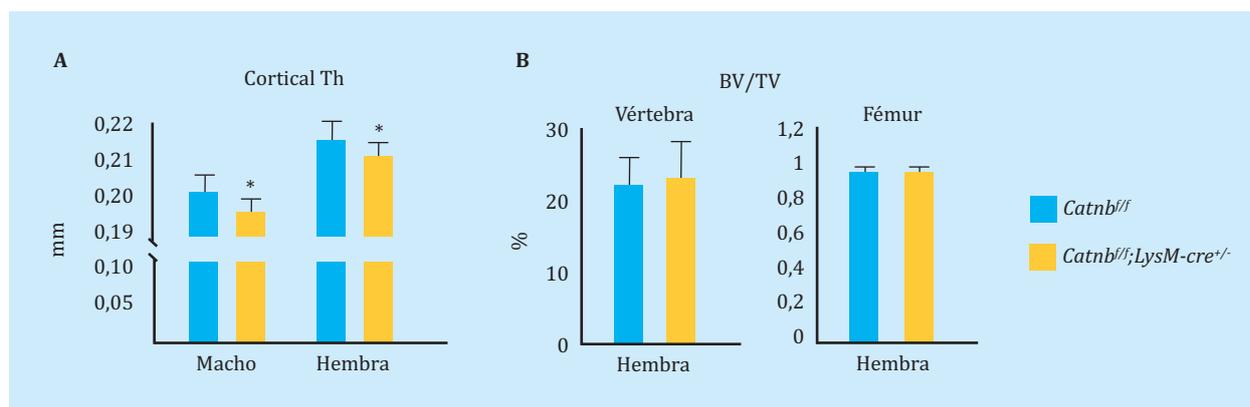
Para examinar si el mayor número de osteoclastos en el hueso podría explicarse por un aumento de la osteoclastogénesis, se cuantificó el número de estos progenitores en la MO. Con este propósito, las células de la MO obtenidas de los huesos largos de ratones de 28 semanas de edad se cultivaron en presencia de RANKL y M-CSF durante 5 días. Se utilizaron tres ratones por genotipo y se realizaron determinaciones por triplicado para cada uno de ellos. El número de osteoclastos que se desarrolló en los cultivos procedentes de ratones *Catnb*^{f/f};*LysMCre* mostraron una morfología normal (Figura 3B). Sin embargo, la cantidad fue dos veces mayor que en los cultivos procedentes de la camada control (426 ± 18 por pocillo frente a 238 ± 77 , $p=0,015$) (Figura 3B). Este resultado sugiere que la señalización de Wnt/ β -catenina en los precursores de osteoclastos y su descendencia atenúa la cantidad de osteoclastos maduros.

Figura 1. Los ratones *Catnb^{fl/fl};LysM-cre^{+/-}* expresan niveles más bajos de β -catenina en macrófagos y osteoclastos. **A:** peso corporal total de dos cohortes (15 animales por grupo) de ratones *Catnb^{fl/fl};LysM-cre^{+/-}* y su camada control *Catnb^{fl/fl}* de 28 semanas de edad. **B:** análisis cuantitativo de ARNm por PCR en tiempo real (*Real Time-PCR*) en macrófagos y osteoclastos desarrollados a partir de células de MO no adherentes cultivadas en presencia de M-CSF durante 4 días, y M-CSF más RANKL durante 5 días, respectivamente. **C:** análisis cuantitativo de ARNm de los tejidos blandos (indicados) obtenidos de ratones de 28 semanas de edad (n=5)



Barras: valores expresados como media \pm desviación estándar; Oc: osteoclasto; *p \leq 0,05.

Figura 2. Los ratones *Catnb^{fl/fl};LysM-cre^{+/-}* tienen menor masa ósea cortical. Mediciones de tomografía micro computarizada (μ -CT) realizadas en huesos de ratones de 28 meses (n=12-15 ratones por grupo). **A:** espesor cortical (Cortical th) determinado en fémures. **B:** BV/TV, volumen óseo por volumen total de tejido determinado en L5 y fémur derecho (solo se muestran las hembras)



Barras: valores expresados como media \pm desviación estándar; Oc: osteoclasto; *p=0,05.

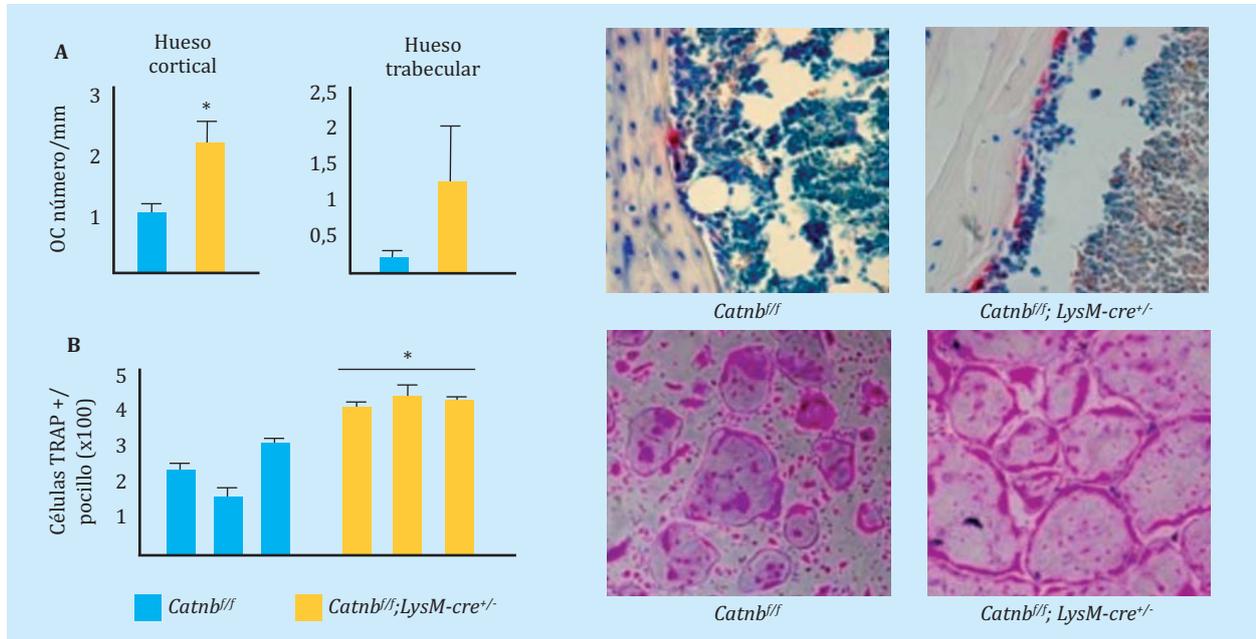
4. El efecto proapoptótico de WNT3a requiere la presencia de β -catenina

Para examinar los mecanismos celulares a través de los cuales Wnt/ β -catenina disminuía el número de osteoclastos, primero determinamos si la adición de WNT3a a la placa de cultivo de los precursores de osteoclastos interfería con el desarrollo de los mismos. Como se muestra en la figura 4A, la presencia de WNT3a en el medio de cultivo disminuyó el número de osteoclastos inducidos por la presencia de M-CSF y RANKL. Además, este hecho parecía ser dosis dependiente. El análisis por Western blot confirmó un aumento de los niveles de β -catenina en los osteoclastos expuestos a WNT3a (Figura 4B). Además, el tratamiento del cultivo con DKK1, un inhibidor del receptor LRP5/6 evitó el aumento de β -catenina inducido por WNT3a. El conjunto de estos hallazgos indica que WNT3a inhibe el desarrollo de los osteoclastos mediante la estimulación de la vía canónica de Wnt.

Es bien sabido que la vida media de los osteoclastos es muy breve, y que mueren por apoptosis. A continuación examinamos el efecto de la señalización de Wnt en la apoptosis de los macrófagos y de los osteoclastos.

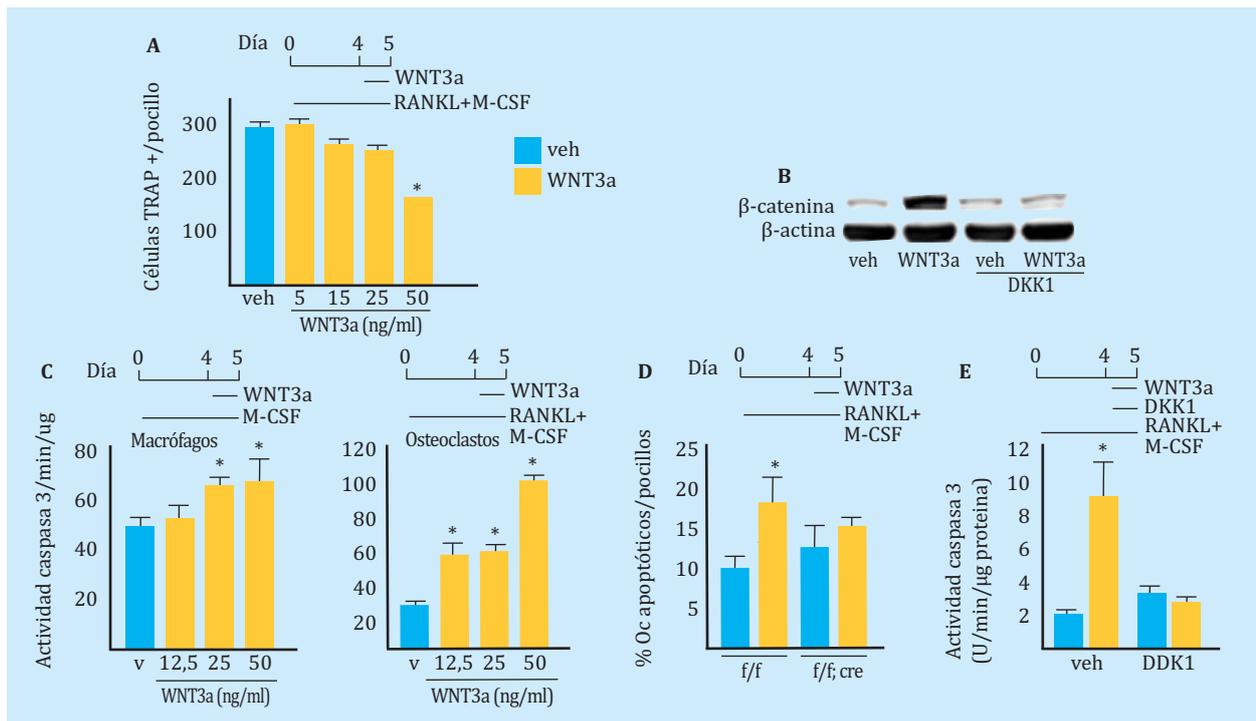
Como se muestra en la figura 4C, se determinó la apoptosis midiendo la actividad de la caspasa-3 tras la administración de dosis crecientes de WNT3A a los cultivos de macrófagos y de osteoclastos. Los resultados mostraron que WNT3a inducía la apoptosis tanto en los macrófagos, como en los osteoclastos. El efecto proapoptótico de WNT3 era también dependiente de la dosis utilizada. El efecto de WNT3a sobre la apoptosis de los osteoclastos también se analizó mediante TUNEL (Figura 4D), y, de la misma forma que se observó en el experimento anterior, vimos que el tratamiento con WNT3a aumentaba el porcentaje de osteoclastos TUNEL positivos. Sin embargo, la presencia de WNT3 no tuvo ningún efecto deletéreo sobre los cultivos de osteoclastos obtenidos de los ratones *Catnb^{fl/fl};LysMCre* (Figura 4D), carentes de β -catenina. Igualmente, la adición de DKK1 a los cultivos anuló las acciones proapoptóticas de WNT3a (Figura 4D), indicando que el efecto proapoptótico de WNT3a requiere la presencia de β -catenina. En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que la vía de señalización canónica de Wnt/ β -catenina ejerce efectos proapoptóticos en los osteoclastos.

Figura 3. Los ratones *Catnb^{f/f}; LysM-cre^{+/-}* tienen mas osteoclastos que la camada control. A: análisis histomorfométrico de secciones longitudinales descalcificadas de fémur y vértebras L1-L3 de ratones hembra de 28 meses (n=5 ratones por grupo). Las fotomicrografías (x40) muestran áreas representativas de la superficie ósea endosteal tras la tinción de TRAP. B: número de células positivas para TRAP desarrolladas a partir de células de MO, obtenidas de fémures de ratones de 28 semanas de edad, y cultivadas en presencia de M-CSF y RANKL durante 5 días. Se realizaron cultivos por triplicado de cada uno de tres animales por separado. Cada barra representa triplicados de cada ratón, n=3 por grupo. Las fotomicrografías (x40) muestran áreas representativas de la placa de cultivo



Barras: valores expresados como media \pm desviación estándar; Oc: osteoclasto; *p=0,05.

Figura 4. WNT3a induce la apoptosis de los osteoclastos a través de la vía canónica de Wnt. A: número de células positivas para TRAP generadas a partir de células de MO no adheridas a la placa obtenidas de ratones C57BL/6 y cultivadas con M-CSF, RANKL y placebo (veh) o dosis crecientes de proteína recombinante WNT3a como se indica. B: análisis de Western blot de β -catenina en osteoclastos maduros tratados con veh, WNT3a, DKK1 o ambos. C: actividad de caspasa 3 en macrófagos y osteoclastos maduros generados a partir de células de MO no adherentes obtenidas de ratones C57BL/6 y tratados con veh o con diferentes dosis de WNT3a durante 16 horas. D: ensayo TUNEL realizado en cultivos de osteoclastos maduros generados a partir de células de MO de ratones *Catnb^{f/f}; LysM-cre* cultivadas con M-CSF y RANKL durante 5 días y tratados con veh o WNT3a (50 ng/ml) durante 24 horas. E: actividad de la caspasa 3 en osteoclastos maduros generados a partir de células de MO no adherentes de ratones C57BL/6, y tratada con veh, WNT3a (50 ng/ml) o DKK1 (1 μ g/ml) durante 24 h. AFU, unidades fluorescentes arbitrarias



Barras: valores expresados como media \pm desviación estándar; Oc: osteoclasto; * p=0,05.

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos analizado las características óseas de animales que carecen de β -catenina en las células del linaje monocito/macrófago, que son los precursores de los osteoclastos. Estos animales muestran un grosor cortical reducido que se asocia a mayor cantidad de osteoclastos en la superficie del endostio y un mayor número de progenitores osteoclasticos en la MO. Además, demostramos que la estimulación de la señalización de Wnt/ β -catenina en los osteoclastos atenúa la cantidad de osteoclastos desarrollados inducida por la presencia de M-SCF y RANKL, y promueve su apoptosis.

Otero *et al.*¹⁸ y Albers *et al.*¹⁹ utilizaron la misma línea *LysMCre* para eliminar la β -catenina de los precursores de osteoclastos. Ambos grupos describieron una disminución de la masa ósea en el compartimento trabecular, con un aumento paralelo en el número de osteoclastos, que atribuyeron a un aumento exclusivo de la osteoclastogénesis. Sin embargo, no abordaron la posibilidad de que una disminución en la apoptosis osteoclastica estuviera también implicada. En nuestro estudio, demostramos un aumento de los osteoclastos en la superficie endocortical del hueso femoral, y un aumento en el número de osteoclastos generados en los cultivos celulares obtenidos de animales *Catnb^{fl/fl};LysMCre*, en comparación con los controles. También observamos que la estimulación de la señalización de Wnt/ β -catenina en las células de MO obtenidas de ratones salvajes disminuye el número de osteoclastos desarrollados en la placa de cultivo. Nuestros resultados, por lo tanto, coinciden con los de Otero *et al.*¹⁸ y Albers *et al.*¹⁹. Además, nosotros hemos abordado la cuestión de una posible implicación de la apoptosis osteoclastica como parte del mecanismo de acción subyacente a los hallazgos fenotípicos observados. Nuestros hallazgos, en este sentido, indican que la disminución en el número de osteoclastos inducida por la activación de Wnt/ β -catenina se debe claramente a la estimulación de la apoptosis de los macrófagos y osteoclastos.

Varios estudios han demostrado que alteraciones en la supervivencia de los osteoclastos modifican la masa ósea²³⁻²⁶. De hecho, está bien establecido que los estrógenos protegen el esqueleto, en parte, a través de los efectos proapoptóticos sobre los osteoclastos^{27,28}. La eliminación del receptor de estrógeno alfa en las células del linaje osteoclastico, similar a la eliminación de β -catenina, aumenta el número de osteoclastos y disminuye la masa ósea. A diferencia de los estrógenos, los glucocorticoides promueven

la pérdida de masa ósea, al menos en parte, a través de la prolongación de la vida útil de los osteoclastos²⁹.

Las proteínas Wnts ejercen un efecto positivo sobre la supervivencia de los osteoblastos y también sobre los progenitores osteoblásticos que aún no se han comprometido³⁰. Esta acción antiapoptótica de las proteínas Wnts sobre los osteoblastos se ha postulado como uno de los mecanismos por los cuales la señalización de Wnt aumenta la masa ósea³¹. Aunque la vía Wnt/ β -catenina es mejor conocida por sus efectos pro-supervivencia, también puede ejercer acciones proapoptóticas. Por ejemplo, la apoptosis de los cardiomioblastos de rata inducida por la reoxigenación tras la hipoxia está regulada por WNT3a, a través de un mecanismo dependiente de β -catenina³². Además, en línea con estos hallazgos, la señalización de Wnt/ β -catenina disminuye la invasividad celular del melanoma³³, potenciando la expresión de proteínas proapoptóticas, como BIM y PUMA, y disminuyendo los niveles de proteínas antiapoptóticas, como MCL³⁴.

En nuestro estudio, mediante el análisis de actividad de la caspasa, o ensayos de TUNEL, hemos encontrado que WNT3a induce la apoptosis de los osteoclastos. Este efecto es contrario a su efecto de pro-supervivencia previamente mencionado sobre los osteoblastos³⁰. Curiosamente, al igual que Wnts, los estrógenos y los glucocorticoides ejercen efectos opuestos sobre la apoptosis de osteoblastos y osteoclastos^{29,35,36}.

Para concluir, nuestros hallazgos sugieren que los efectos inhibidores de la β -catenina sobre los osteoclastos se deben a mecanismos proapoptóticos y apoyan la hipótesis de que los efectos osteoprotectores de la vía canónica de Wnt son también el resultado de la acción directa a través de las células del linaje osteoclastico. Por lo tanto, la señalización Wnt/ β -catenina en el entorno óseo tiene un efecto osteoprotector ejercido tanto a través de las células de linajes osteoblásticos como osteoclasticos.

Agradecimientos: Reconocemos la excelente asistencia técnica de Marisa Junco y Mar Rodríguez y el apoyo de todos los miembros del Laboratorio de Ros.

Financiación: MCG-M fue beneficiario de la beca JAE-Doc 2008 cofinanciada por FSE. Este trabajo fue apoyado por la subvención ISCIII PI12/01405 a JGM, BFU2011-24972 a MAR del gobierno español y R01 AR56679 a MA del National Institutes of Health, EE.UU.



Conflicto de intereses: Lo autores declaran no tener conflicto de intereses

Bibliografía

- Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol.* 2006;16(3):151-8.
- Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013;19(2):179-92.
- Eisenmann DM. Wnt signaling. *Worm-Book.* 2005 Jun 25:1-17.
- Gómez-Orte E, Sáenz-Narciso B, Moreno S, Cabello J. Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway. *Trends Genet.* 2013;29(9):545-53.
- Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature.* 2000;407(6803):530-5.
- He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way. *Development.* 2004;131:1663-77.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, et al. Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell.* 2002;108(6):837-47.
- Bierny M, Clevers H. Armadillo/ β -catenin signals in the nucleus--proof beyond a reasonable doubt? *Nat Cell Biol.* 2003;5(3):179-82.
- Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001;107(4):513-23.
- Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* 2002;346:1513-21.
- Zylstra CR, Wan C, VanKoeveering KK, Sanders AK, Lindvall C, Clemens TL, et al. Gene targeting approaches in mice: assessing the roles of LRP5 and LRP6 in osteoblasts. *J Musculoskelet Neural Interact.* 2008;8(4):291-3.
- Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development.* 2005;132:49-60.
- Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/ β -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.* 2005;8:739-50.
- Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell.* 2005;8:727-38.
- Rodda SJ, McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development.* 2006;133:3231-44.
- Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 2005;8:751-64.
- Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, et al. Mol Osteocyte Wnt/ β -catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Cell Biol.* 2010;30(12):3071-85.
- Otero K, Shinohara M, Zhao H, Cella M, Gilfillan S, Colucci A, et al. TREM2 and β -catenin regulate bone homeostasis by controlling the rate of osteoclastogenesis. *J Immunol.* 2012;188(6):2612-21.
- Albers J, Keller J, Baranowsky A, Beil FT, Catala-Lehnen P, Schulze J, et al. Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. *J Cell Biol.* 2013;200(4):537-49.
- Brault V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon AP, et al. Inactivation of the β -catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development.* 2001;128(8):1253-64.
- Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 1999;8(4):265-77.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- Jilka RL. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol.* 2003;41(3):182-5.
- Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med.* 2000;108(2):153-64.
- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000;21(2):115-37.
- Xing L, Boyce BF. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328(3):709-20.
- Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell.* 2007;130(5):811-23.
- Martin-Millan M, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Zhao H, Weinstein RS, et al. The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Mol Endocrinol.* 2010;24(2):323-34.
- Jia D, O'Brien CA, Stewart SA, Manolagas SC, Weinstein RS. Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density. *Endocrinology.* 2006;147(12):5592-9.
- Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by β -catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem.* 2005;280(50):41342-51.
- Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1202-9.
- Zhang Z, Deb A, Zhang Z, Pachori A, He W, Guo J, et al. Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt3a. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(3):370-7.
- Smalley KS, Contractor R, Haass NK, Kulp AN, Atilla-Gokcumen GE, Williams DS, et al. An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Res.* 2007;67(1):209-17.
- Zimmerman ZF, Kulikauskas RM, Bomsztyk K, Moon RT, Chien AJ. Activation of Wnt/ β -catenin signaling increases apoptosis in melanoma cells treated with trail. *PLoS One.* 2013;8(7):e69593.
- Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(12):699-712.
- O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA, et al. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology.* 2004;145(4):1835-41.

Regulación de la plasticidad celular y senescencia en condrocitos articulares: conexina 43 como diana terapéutica para el tratamiento de la artrosis

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000300003>

Varela-Eirín M¹, Varela-Vázquez A¹, Blanco A², Caeiro JR³, Mayán MD¹

¹ Grupo de Investigación Traslacional en Comunicación y Señalización Celular (CellCOM) - Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) - Servicio Gallego de Salud (SERGAS) - Universidad de A Coruña (UDC) - A Coruña (España)

² Tecnologías Principales de Citometría de Flujo del Instituto Conway de Investigación Biomédica y Biomolecular - Universidad de Dublín - Dublín (Irlanda)

³ Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología - Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) - Universidad de Santiago de Compostela (USC) - Santiago de Compostela (España)

Fecha de recepción: 06/10/2018 - Fecha de aceptación: 25/02/2019

Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM de Investigación Básica 2016

Resumen

Introducción: La artrosis (OA) es una enfermedad musculoesquelética degenerativa que afecta aproximadamente al 13% de la población occidental. A día de hoy no existe un tratamiento eficaz que evite el progreso de la misma o facilite la regeneración del cartílago articular. La conexina43 (Cx43) es una proteína transmembrana que se encuentra en niveles elevados en el cartílago y en la membrana sinovial de pacientes con OA. Esta proteína forma canales que permiten el intercambio de moléculas e iones entre dos células en contacto o entre la célula y su entorno, denominados uniones comunicantes (UCs) y hemicanales, respectivamente. En este estudio se investigó la función de la Cx43 y de las UCs en la degradación del cartílago articular de pacientes con OA.

Material y métodos: Se han aislado condrocitos primarios del cartílago de donantes OA y sanos. Se evaluaron los niveles proteicos mediante *Western blot*, inmunofluorescencia y citometría de flujo. La expresión génica se ha evaluado mediante RT-qPCR, mientras que la comunicación celular se estudió mediante el ensayo *scrape loading/dye transfer*. La senescencia celular se evaluó midiendo la actividad de la β -galactosidasa mediante citometría celular o microscopía.

Resultados: Los resultados obtenidos indican que la sobreactividad de la Cx43 y de la comunicación intercelular a través de UCs detectadas en OA están implicadas con el progreso de la enfermedad al activar procesos de desdiferenciación celular hacia un estado inmaduro y senescencia celular. Utilizando condrocitos en cultivo aislados del cartílago de donantes con OA hemos demostrado que el incremento de la Cx43 activa factores implicados en la transición epitelio-mesénquima (TEM), como el factor de transcripción Twist-1. El incremento en el número de células desdiferenciadas y con altos índices de proliferación celular desencadena en senescencia celular vía p53/p16^{INK4a}, activando el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, del inglés *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) que incluye la síntesis y liberación de factores inflamatorios como la interleuquina 6 (IL-6). La disminución de los niveles de la Cx43 utilizando pequeñas moléculas como la oleuropeína o técnicas de edición genética como CRISPR/Cas9 revirtió el proceso dando lugar a rediferenciación celular, mejorando el fenotipo celular con incremento en proteínas implicadas en formación del tejido y disminuyendo la síntesis de MMPs y del componente inflamatorio y senescencia.

Conclusiones: La disminución de la Cx43 en condrocitos artrósicos restaura regeneración tisular, por activación de rediferenciación celular y disminución de senescencia. Estos resultados corroboran el uso de la Cx43 como una diana terapéutica eficaz para restaurar regeneración del cartílago en pacientes con OA y evitar la progresión de la enfermedad.

Palabras clave: conexina43, artrosis, desdiferenciación, senescencia, regeneración tisular.



INTRODUCCIÓN

La artrosis (OA) es una enfermedad crónica que se caracteriza por una degradación progresiva del cartílago articular que recubre la superficie de las articulaciones sinoviales, que permiten el movimiento del esqueleto sin que se produzca dolor. Los condrocitos de pacientes con artrosis sufren cambios en el fenotipo asociados con un incremento en la actividad catabólica e inflamatoria^{1,2}, junto con un incremento en la senescencia celular y del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)^{2,3}. Nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente que los condrocitos en el cartílago articular poseen largas proyecciones citoplasmáticas que atraviesan la matriz extracelular (MEC)⁴, capaces de formar conexiones y uniones comunicantes (UCs) a través de canales de conexina-43 (Cx43)^{4,5}. En el año 2013, nuestro grupo de investigación publicó resultados relevantes asociados con alteraciones de la actividad de la Cx43 en artrosis, indicando que desde estadios muy tempranos de la enfermedad existe un incremento y cambios en la localización de la proteína en el cartílago de pacientes con artrosis⁶. Posteriormente, utilizando modelos animales observamos que el dominio C-terminal de la Cx43 juega un papel fundamental en la estructura y composición del cartílago articular⁷.

La Cx43 está implicada en procesos de regeneración tisular en piel, corazón y en otros tejidos^{8,9}. Varios autores han puesto de manifiesto que la artrosis podría incluirse dentro de enfermedades relacionadas con alteraciones en el proceso de regeneración tisular^{10,11}. De hecho, los condrocitos artrósicos sufren desdiferenciación celular y presentan mayores niveles de proliferación celular^{12,13}, probablemente debido a un intento de reparar el daño producido en el cartílago. La presencia de condrocitos desdiferenciados de forma crónica, desencadena la sustitución progresiva de cartílago articular por fibrocartílago asociado a degeneración y pérdida funcional en la articulación¹⁴⁻¹⁹. En esta línea de trabajo, es importante destacar que el uso de moléculas que promueven la condrogénesis, y por tanto la re-diferenciación del condrocito, poseen un efecto protector en modelos de OA²⁰. Estas moléculas reciben el nombre de fármacos modificadores de la OA (DMOADs, del inglés *Disease-Modifying Osteoarthritis Drugs*), entre los que se encuentra la kartogenina, la cual se ha visto que promueve la condrogénesis en células madre mesenquimales humanas y también mejora la regeneración del cartílago en ratones sometidos a daño inflamatorio y/o mecánico en la articulación²⁰. Otras DMOADs, como TD-198946, TAK-778 o AG-041R, también se han descrito como moléculas promotoras de la condrogénesis con potencial terapéutico en reparación del cartílago articular²¹⁻²³. El cartílago de pacientes con OA presenta niveles elevados de la Cx43 junto con alteraciones en el proceso de regeneración tisular. Nuestro objetivo ha sido estudiar si alteraciones en la actividad de la Cx43 y de la comunicación intercelular a través de UCs estarían relacionadas con cambios en el fenotipo celular y senescencia asociados a progreso de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recogida de muestras y cultivo celular

Las muestras de cartílago se recogieron y procesaron como se ha descrito previamente⁴ después de que los donantes firmaran el consentimiento informado y de la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de

Galicia (C.0003333, 2012/094 y 2015/029). Se utilizó la línea celular de condrocitos humanos T/C-28a2, procedente de condrocitos sanos primarios que fueron transfectados con la partícula vírica SV40, generosamente donada por la Dra. Goldring (*The Hospital for Special Surgery*, Nueva York – EE.UU.). Los condrocitos se cultivaron en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's Medium*, Lonza) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*, Gibco) y una mezcla de antibióticos al 1% (P/S; Penicilina 100 U/mL, Estreptomina 100 µg/mL, Gibco).

Western blot

El análisis de niveles proteicos totales o nucleares se llevó a cabo mediante la técnica de *Western blot*. Cantidades equivalentes de proteínas fueron separados en geles de acrilamida desnaturizantes al 10% y transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Tras el bloqueo con leche desnatada diluida en tris salino tamponado (TBS), las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios anti α -tubulina (Sigma-Aldrich, T9026), Cx43 (Sigma-Aldrich, C6129) Twist-1 (SCBT, sc-81417), antígeno nuclear de proliferación celular o PCNA (SCBT, sc-56), p53 (SCBT, sc-126), factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas o NF- κ B (SCBT, sc-8008) o Lamina A (SCBT, sc-20680). Después de la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron las membranas con TBS y se incubaron con sus correspondientes anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez eliminado el exceso de anticuerpo con TBS la señal se visualizó en una cámara de revelado LAS-3000 (Fujifilm).

Immunofluorescencia

Para la detección de proteínas por inmunofluorescencia, las células previamente fijadas con paraformaldehído al 2% fueron incubadas con glicina 0,1 M (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos. Posteriormente, se realizó una permeabilización de las membranas celulares con Triton X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,2% en tampón fosfato salino (PBS), durante 10 minutos. Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas mediante una incubación de 30 minutos con 1% de suero de albúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich) en PBS. Posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 10 minutos con PBS, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo durante 1 hora, en oscuridad y a temperatura ambiente. Se realizaron otros tres lavados de 10 minutos con PBS, seguido de una tinción de núcleos con 4',6-diamidino-2-fenilindol -DAPI- (Sigma-Aldrich). Las imágenes se realizaron en un microscopio Olympus BX61 con un cámara DP71.

Inmunohistoquímica

Las micromasas de condrocitos fueron embebidas en O.C.T.TM (*Optimum Cutting Temperature*) y cortadas en secciones de 4 µm, las cuales fueron incubadas con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-colágeno tipo II durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras realizar tres lavados con PBS, las secciones se incubaron con *OptiView HQ Universal Linker* (Roche) durante 10 minutos. Posteriormente, se incubaron du-

rante 8 minutos con *OptiView HRP Multimer* (Roche), se lavó el exceso de reactivo y se reveló la señal en una solución de DAB al 0,1% en peróxido de hidrógeno al 0,02%.

Citometría de flujo

Para la medida de los niveles proteicos mediante citometría de flujo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 1% durante 10 minutos, se lavaron con una solución de lavado (PBS + 0.5% BSA + 2mM EDTA), y se tiñeron con anticuerpos anti Cx43-APC (R&D Systems, FAB7737A), endoglina o CD105 - PE (Immunostep, 105PE-100T) o antígeno CD166 (ALCAM) o CD166- APC (Immunostep, 1399990314). El análisis se llevó a cabo en un citómetro FACSCalibur™.

Transfección celular

La línea celular T/C-28a2 fue transfectada mediante electroporación con el *kit* Amaxa® Cell Line Nucleofector® *kit* V (Lonza) en un aparato Cell Line Nucleofector™ (Lonza). Se electroporó 1 millón de células con 3 µg del plásmido pIRESpuo2 (Clontech) que contiene la secuencia del gen de la Cx43 humana, generosamente donado por la Dra. Arantxa Taberner (INCYL, Universidad de Salamanca, España). A las 24 horas el medio fue cambiado por medio con P/S y antibiótico para la selección de los condrocitos que contienen el plásmido.

Por otro lado, también se llevó a cabo la electroporación de la línea T/C-28a2 con un vector CRISPR (modificado de Addgene #48138) con la enzima Cas9 VP12 (derivada de Addgene #72247) unido a un marcador GFP (proteína verde fluorescente), con una guía que tiene como diana 20 nucleótidos del gen de la Cx43. Este vector ha sido generosamente donado por el Dr. Trond Aasen (Instituto de Investigación Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, España). Células electroporadas y positivas para GFP fueron sembradas en una placa de 96 pocillos y expandidas como clones.

Expresión génica

Los niveles de expresión génica se llevaron a cabo mediante la extracción de ARNm con TRIzol (Invitrogen), retrotranscripción con el *kit* SuperScript® VILO™ (Invitrogen) y cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real en un LightCycler®480 (Roche). Se utilizaron cebadores para:

- *hipoxantina fosforibosiltransferasa-1 -HPRT-1* (5' - TTGAGTTTGGAAACATCTGGAG - 3'; 5' - GCCCAAAGGGAAGTATAGTC - 3'),
- *GJA1* (5' - ACATGGGTGACTGAGCGCC - 3'; 5' - ATGATCTGCAGGACCCAGAA - 3'),
- *interleukina-1β-IL-1β* (5' - CGAATCTCCGACCACACTAC - 3'; 5' - TCCATGGCCACAACAACCTGA - 3'),
- *interleukina-6 -IL-6* (5' - TGTAGCCGCCACACA - 3'; 5' - GGATGTACCGAATTTGTTTGTA - 3'),
- *prostaglandina-endoperóxido sintasa-2 -PTGS2* (5' - CTTCACGCATCAGTTTTTCAAG - 3'; 5' - TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC - 3'),
- *metaloproteasa 3 -MMP-3* (5' - CCCTGGGTCTCTTTCACTCA - 3'; 5' - GCTGACAGCATCAAAGGACA - 3'),
- *inhibidor-2 de quinasa dependiente de ciclina -CDKN2* (5' - GAGCAGAACGATAGGGCTTG - 3'; 5' -CATGTGCCCTCT CCTCCTAA - 3').

Actividad de las UCs

La comunicación celular a través de uniones comunicantes se evaluó mediante un ensayo *Scrape Loading/Dye Transfer* (SL/DT). Para ello se realiza un corte sobre cé-

lulas confluentes con un bisturí y la punta de una aguja en presencia del compuesto fluorescente Lucifer Yellow (LY, Cell Projects Ltd® Kent, UK), incubando a 37°C durante 5 minutos. Las células dañadas que logran reparar la membrana toman del medio el compuesto fluorescente. Se evaluó la transferencia de LY desde la línea de corte en un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Eclipse Ti) y se calculó la *ratio* entre células no dañadas positivas para LY entre el número de células que toman el compuesto a través de un daño en la membrana.

Senescencia

La senescencia celular se evaluó según la actividad β-galactosidasa con un *kit* comercial con X-gal como sustrato (*Senescence Cells Histochemical Kit*, Sigma-Aldrich) y también mediante citometría de flujo con el sustrato di-β-galactopiranosido, que da lugar a fluorescencia verde al ser hidrolizado (Invitrogen). En el caso del X-gal, las células con actividad β-galactosidasa se teñirán de azul verdoso, con lo que se pueden analizar en un microscopio de luz visible. Por otro lado, la hidrólisis del sustrato di-β-galactopiranosido se detectó en un citómetro FACSCalibur™, y la fluorescencia media se normalizó a los niveles de las células no tratadas.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism (versión 5.00). Para las variables cuantitativas analizadas se utilizó la *t* de Student o *U* de Mann-Whitney. Se consideraron las diferencias estadísticamente significativas ante valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

La Cx43 activa la actividad catabólica en condrocitos de pacientes con OA

En concordancia con lo observado en tejido⁶, los condrocitos articulares en cultivo primario procedentes de donantes con OA (OAc) presentaron niveles de Cx43 significativamente mayores que aquéllos aislados de donantes sanos (N) detectados por citometría de flujo (Figura 1A). Los niveles elevados de Cx43 se correlacionaron con mayores niveles de comunicación intercelular a través de UCs, cuantificada mediante un ensayo SL/DT de transferencia de LY (Figura 1B). Con el objetivo de estudiar el efecto en el fenotipo celular de niveles elevados de la Cx43 y de comunicación intercelular a través de UCs, se utilizó como modelo de estudio una línea celular de condrocitos de una donante sana, T/C-28a2. La Cx43 fue sobreexpresada utilizando un vector con el gen de la Cx43 humana bajo el promotor del CMV²⁴ (Figura 1C). El incremento de la Cx43 en la línea celular de condrocitos humanos T/C-28a2 se correlacionó con un aumento de la actividad de las UCs detectada por el ensayo SL/DT (Figura 1D). El ensayo de expresión génica mediante RT-PCR mostró un incremento significativo en la expresión génica de interleukina 1-β (IL-1β), ciclooxigenasa-2 (COX-2) y metaloproteasa-3 (MMP-3) cuando la Cx43 fue sobreexpresada en la línea de condrocitos sana (T/C - Cx43) (Figura 1E).

Activación/desdiferenciación celular en OA

Mediante ensayos de citometría de flujo estudiamos los niveles de marcadores de desdiferenciación celular en condrocitos de pacientes con artrosis y condrocitos aislados de donantes sanos, con el objetivo de confirmar la pre-

sencia de condrocitos inmaduros en muestras de cartilago de pacientes con OA. Mediante citometría de flujo, se detectaron mayores niveles del marcador "Stem" CD166 en OAc en cultivo primario en comparación con condrocitos sanos (Figura 2A). En concordancia con estos resultados, el incremento de la Cx43 en condrocitos sanos (línea celular) utilizando un vector de expresión (T/C-Cx43 o línea T/C-28a2 transflectada con un plásmido para sobreexpresar la Cx43) desencadenó en un incremento significativo en los niveles de los dos marcadores "stem-like" CD166 y CD105, respecto a las células control con niveles bajos de Cx43 (T/C-28a2) (Figura 2B).

La disminución de la actividad de la Cx43 y de las UCs activa re-diferenciación celular en OA

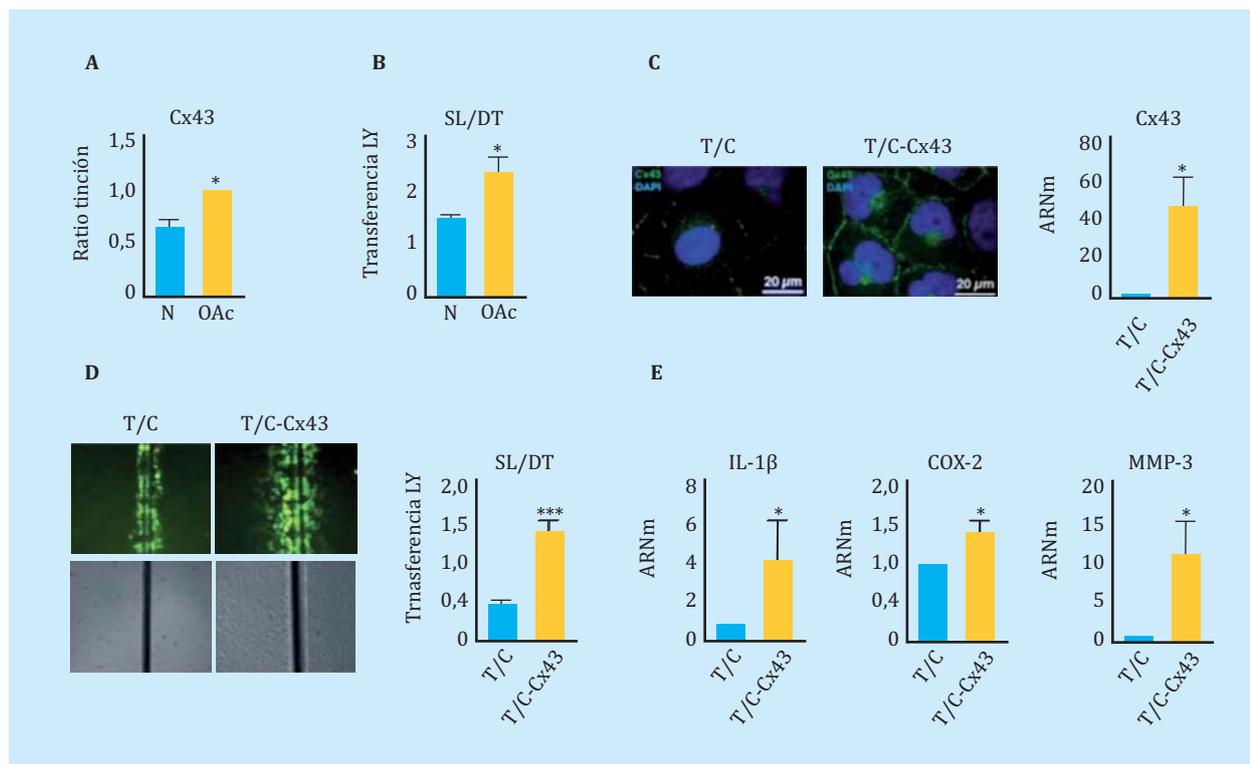
Con el objetivo de disminuir la actividad de la Cx43 en OAc, se estudió el efecto de diferentes moléculas en los niveles y actividad de la Cx43. En este estudio, observamos que el polifenol oleuropeína disminuye los niveles de la Cx43 en OAc (Figura 3A). La disminución de los niveles de la Cx43 mejoró el fenotipo del condrocito OA detectado por un incremento en el principal marcador de condrocitos articulares, el colágeno II (Figura 3B). El tratamiento de OAc con una concentración de 10 µM de oleuropeína durante 7 días dio lugar a una disminución significativa de los niveles de marcadores de desdiferen-

ciación CD105 y CD166 (Figura 3C), así como de la expresión génica de IL-1β, IL-6, COX-2 y MMP-3 detectados por citometría de flujo y análisis de la expresión génica respectivamente (Figura 3D). El efecto de la Cx43 en plasticidad celular en OAc fue confirmado en cultivo 3D. La modulación de los niveles de Cx43 en presencia de oleuropeína 10 µM en micromasas y en medio condrogénico mejoró la estructura de la matriz extracelular, detectándose un incremento significativo en los depósitos de colágeno II y proteoglicanos en la matriz de la estructura 3D (Figura 4).

La Cx43 activa TEM y senescencia celular en OAc

La sobreexpresión de la Cx43 en la línea de condrocitos T/C-28a2, se correlacionó con un incremento en el núcleo de PCNA, proteína utilizada como marcador de proliferación celular; y con activación del factor de transcripción relacionado con TEM, Twist-1, detectado por translocación e incremento de los niveles del factor de transcripción a nivel nuclear (Figura 5A). Los condrocitos transflectados para sobreexpresar la Cx43 también mostraron mayores niveles nucleares de NF-kβ, uno de los factores de transcripción más importantes en la regulación de síntesis del componente SASP (Figura 5A). Niveles elevados de la Cx43 se correlacionaron con elevados niveles de los factores implicados en senescencia celular p53 (Figura 5B)

Figura 1. (A) Niveles de Cx43 analizados por citometría de flujo comparando condrocitos humanos sanos (N) y artrósicos (OAc) en cultivo monocapa. n=3, media ± error estándar de la media (EEM); *p<0,0001; test t de Student. (B) Cuantificación del ensayo de comunicación celular *Scrape Loading/Dye Transfer* (SL/DT) comparando condrocitos de donantes sanos (N) y artrósicos (OAc). n=8, media ± EEM; **p<0,01; test de Mann-Whitney. (C) A la izquierda, inmunofluorescencia para la Cx43 (verde) en condrocitos T/C-28a2 (T/C) y la misma línea transflectada con un plásmido para sobreexpresar la Cx43 (T/C-Cx43). Los núcleos han sido teñidos con DAPI (azul). A la derecha, niveles de expresión génica de la Cx43 en estas dos líneas de condrocitos. n=5, media ± EEM; *p<0,05; test de Mann-Whitney. (D) Cuantificación del ensayo de comunicación celular SL/DT, comparando la línea T/28a2 (T/C) y transflectada con un plásmido para sobreexpresar la Cx43 (T/C-Cx43). n=10, media ± EEM; ***p<0,0001; test de Mann-Whitney. (E) Niveles de expresión génica de IL-1β, COX-2 y MMP-3 en la línea T/C-28a2 que sobre-expresa la Cx43 (T/C-Cx43) en comparación a la línea transflectada con un plásmido control (T/C). n=4, media ± EEM; *p<0,05; test de Mann-Whitney**



y p16 (Figura 5C). El tratamiento de OAc con oleuropeína 10 μ M redujo los niveles de Cx43 (Figura 3A) y de senescencia celular detectada por la actividad β -galactosidasa mediante microscopía óptica y por citometría de flujo (Figura 5D). Con el objetivo de confirmar el efecto de la disminución de Cx43 en TEM y senescencia celular, se transfectó la línea T/C-28a2 con un plásmido CRISPR/Cas9, obteniendo células heterocigotas para el gen de la Cx43 (Figura 6A). Niveles reducidos de Cx43 en la línea T/C-28a2 se correlacionó con una disminución significativa de los marcadores "stem-like" CD166 y

CD105 (Figura 6B). La disminución de los niveles de Cx43 en estas células, desencadenó en una disminución en los niveles de los factores de transcripción Twist-1 (TEM) y NF- κ B (SASP) a nivel nuclear (Figura 6C), disminuyendo los niveles de senescencia celular, detectada mediante actividad β -galactosidasa y citometría de flujo (Figura 6D). Los condrocitos T/C-28a2 con bajos niveles de Cx43 (CRISPR-Cx43) mostraron niveles significativamente menores de síntesis de los mediadores pro-inflamatorios IL-1 β e IL-6, y de la proteasa MMP-3, con respecto a la línea T/C-28a2 sin transfectar.

Figura 2. (A) Medida del marcador de desdiferenciación CD166 por citometría de flujo en condrocitos artrósicos (OAc) y condrocitos de donantes sanos (n=9, media \pm EEM; *p<0,0001; test de Mann-Whitney). (B) Niveles de los marcadores CD105 (n=5) y CD166 (n=7) medidos por citometría de flujo en la línea celular T/C-28a2 que sobreexpresa la Cx43 (T/C-Cx43) en comparación a la misma línea transfectada con un plásmido control (T/C). Media \pm EEM; *p<0,05; test de Mann-Whitney**

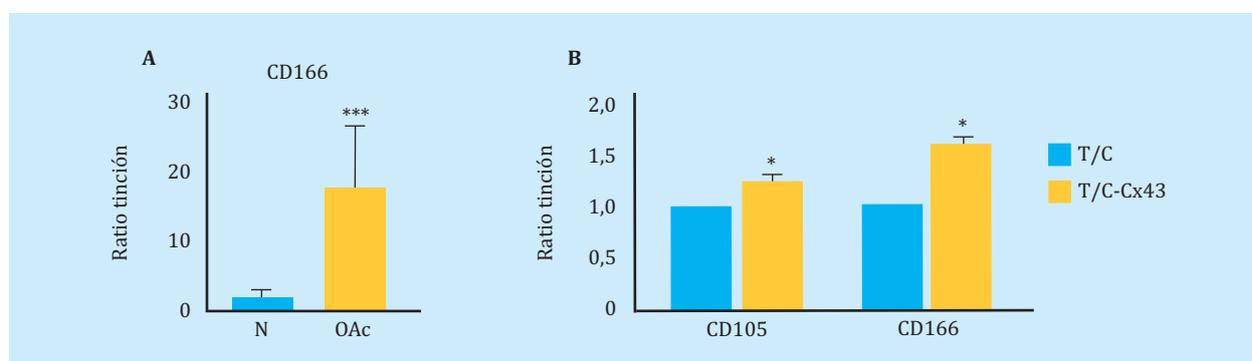


Figura 3. (A) Western blot para detectar Cx43 en condrocitos artrósicos (OAc) en cultivo primario no tratados (NT) o tratados con 10 μ M oleuropeína (Oleu) durante 2 horas. (B) Co-inmunofluorescencia de Cx43 (verde) y colágeno tipo II (rojo) de OAc tratados con 10 μ M oleuropeína durante 2 h. Los núcleos celulares aparecen en azul debido a la tinción con DAPI. Las flechas blancas indican Cx43 localizada en la membrana celular. (C) Niveles de los marcadores CD105 y CD166 medidos por citometría de flujo en OAc tratados con oleuropeína 10 μ M durante 7 días (n=5, media \pm EEM; **p<0,01; test de Mann-Whitney). (D) Niveles de expresión génica de IL-1 β , IL-6, COX-2 y MMP-3 en OAc tratados con 10 μ M oleuropeína durante 2 horas (n=3-7, media \pm E.E.M; *p<0,05, *p<0,0001; test de Mann-Whitney)**

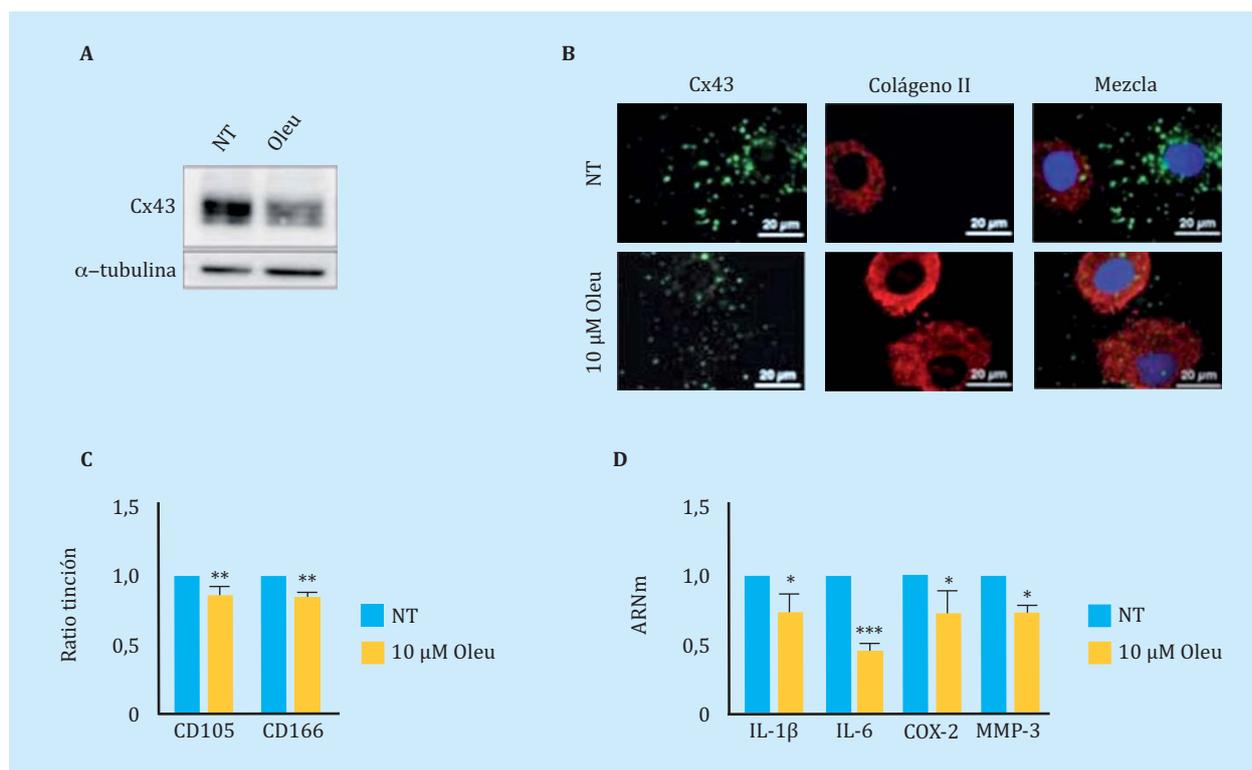


Figura 4. Secciones del cultivo tridimensional de condrocitos artrósicos (OAc) cultivados en medio condrogénico (MC) con/sin oleuropeína 10 μ M durante 30 días. En el panel superior, inmunohistoquímica de una micromasa para colágeno tipo II (n=4-6, media \pm EEM; *p<0,05; test *t* de Student). Abajo, tinción de azul de toluidina para detectar proteoglicanos, que producen viraje de color azul a rosa-violeta (n=6, media \pm EEM; **p<0,01; test de Mann-Whitney)

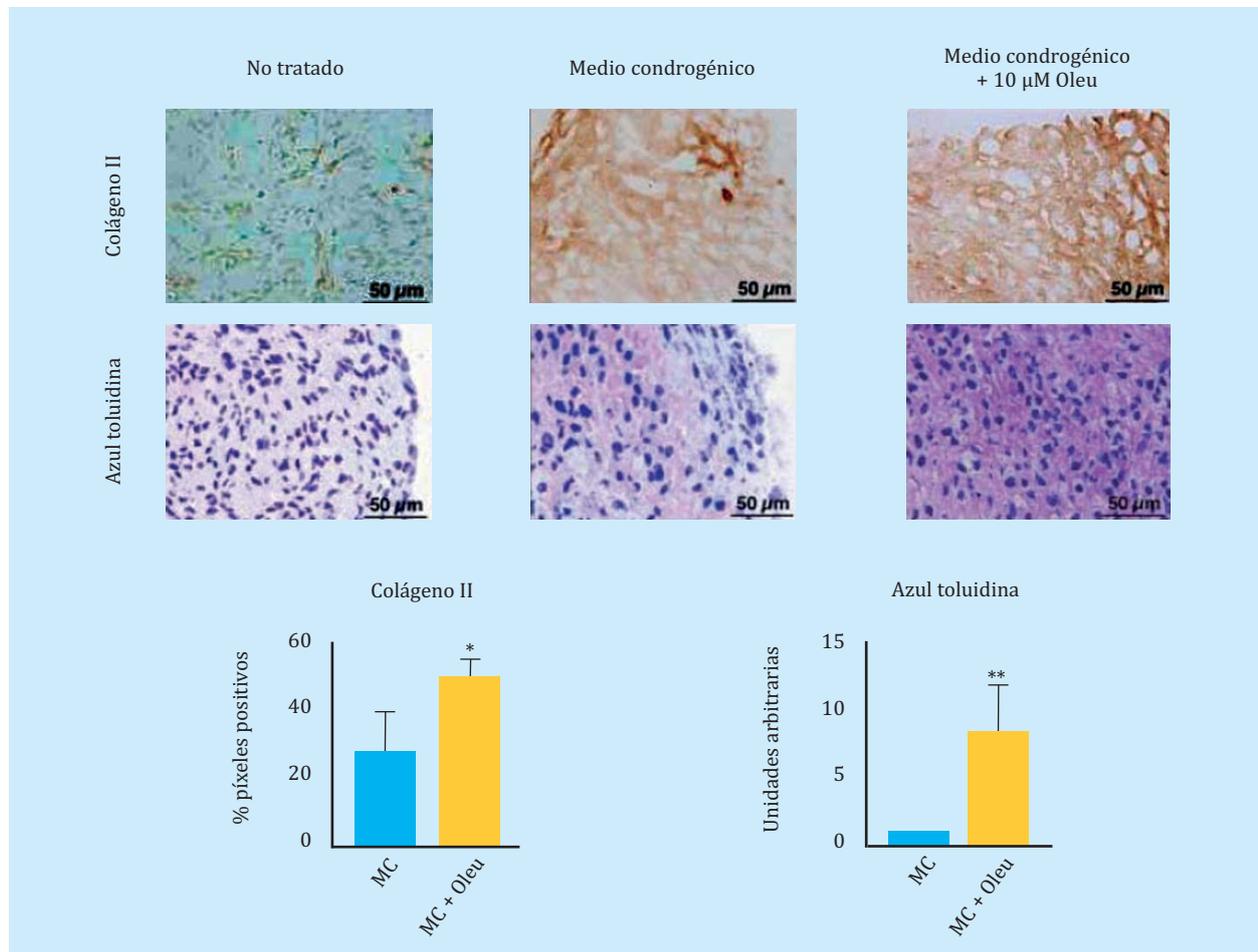


Figura 5. (A) *Western blot* comparando los niveles de PCNA, NF- κ B, y Twist-1 nuclear en los condrocitos que sobreexpresan la Cx43 (T/C-Cx43) con respecto a los mismos condrocitos transfectados con un plásmido control (T/C). (B) *Western blot* comparando los niveles totales de p53 entre condrocitos que sobreexpresan Cx43 (T/C-Cx43) y condrocitos control (T/C). (C) Expresión génica de p16 de condrocitos sobreexpresando la Cx43 con respecto a las células control (n=4, media \pm EEM; *p<0,05; test de Mann-Whitney). (D) Arriba, tinción de β -galactosidasa asociada a senescencia medida por la ruptura de X-gal en condrocitos artrósicos (OAc) tratados con oleuropeína 10 μ M durante 7 días. Abajo, cuantificación mediante citometría de flujo de niveles de β -galactosidasa tras el mismo tratamiento (n=5, media \pm EEM; *p<0,05; test de Mann-Whitney)

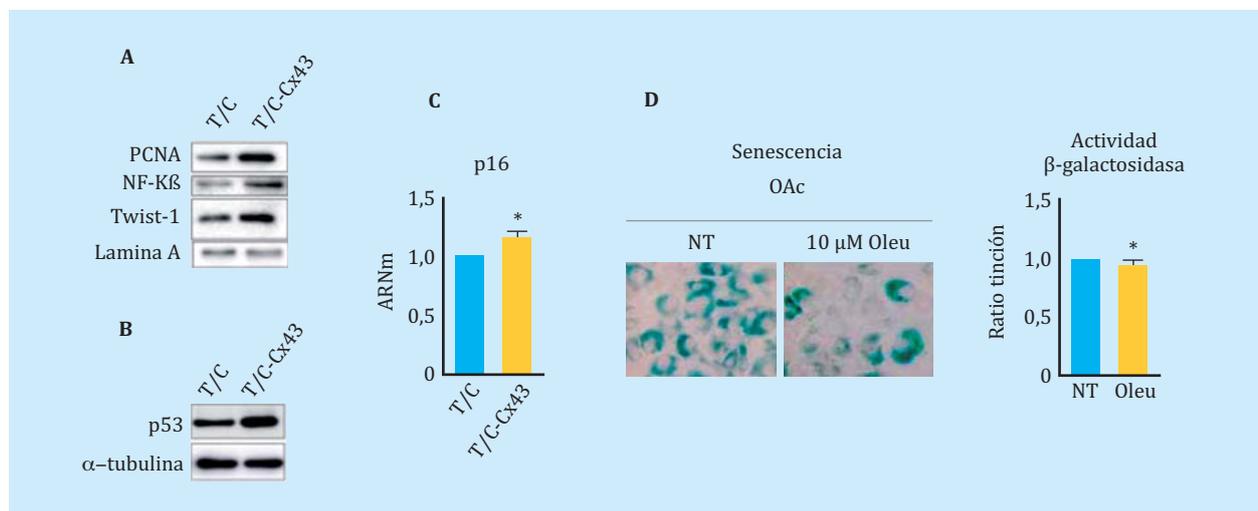
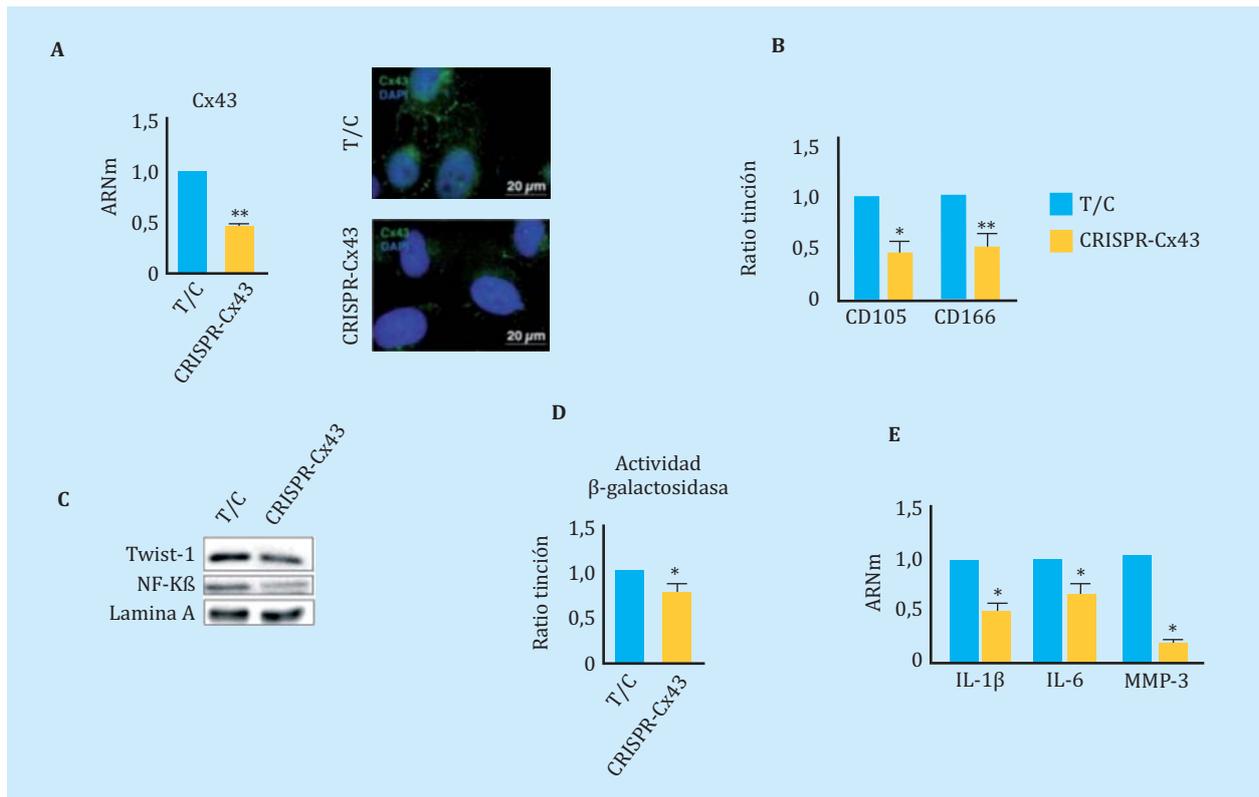


Figura 6. (A) A la izquierda, niveles de expresión génica de la Cx43 en los condrocitos T/C-28a2 (T/C) y la misma línea con sólo una copia de Cx43 (CRISPR-Cx43). n=4, media \pm EEM; *p<0,05; test de Mann-Whitney. A la derecha, inmunofluorescencia para la Cx43 (verde) en condrocitos T/C-28a2 (T/C) y la misma línea transfectada con sólo una copia de Cx43 (CRISPR-Cx43). Los núcleos han sido teñidos con DAPI (azul). (B) Niveles de los marcadores CD105 y CD166 medidos por citometría de flujo en la línea celular T/C-28a2 con una sola copia de Cx43 (CRISPR-Cx43) en comparación a la misma línea sin transfectar (T/C). n=7, media \pm EEM; *p<0,05, **p<0,01; test de Mann-Whitney (C) *Western blot* para detectar Twist-1, NF-k β y N-Cadherina comparando un extracto nuclear de la línea T/C-28a2 (T/C) y de la misma línea con baja cantidad de Cx43 (CRISPR-Cx43). Se ha utilizado la proteína lamina A como control de carga. (D) Cuantificación mediante citometría de flujo de niveles de β -galactosidasa en la línea T/C-28a2 (T/C) y la misma línea con sólo una copia de Cx43 (CRISPR-Cx43). n=4, media \pm EEM; *p<0,05; test de Mann-Whitney. (E) Niveles de expresión génica de IL-1 β , IL-6 y MMP-3 medidos en las mismas células. n=4, media \pm EEM; *p<0,05; test de Mann-Whitney)



DISCUSIÓN

Durante la artrosis, los condrocitos presentan niveles incrementados de la proteína transmembrana Cx43⁶ y su fenotipo se ve alterado impidiendo que puedan participar en la regeneración del tejido y llevar a cabo su función, desencadenando en la progresiva degeneración del tejido. La desdiferenciación relacionada con fenómenos de transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso celular que participa en la regeneración de tejidos al permitir a las células desdiferenciarse a un estado más inmaduro para activar procesos entre los que se incluyen proliferación celular y migración, con el objetivo de reemplazar las células dañadas y remodelar la matriz extracelular^{25,26}. Sin embargo, cuando esta desdiferenciación ocurre de forma crónica puede ocasionar el desarrollo de fibrosis en el contexto de regeneración tisular^{27,28}. En este estudio hemos descrito que los niveles de Cx43 y comunicación intercelular a través de UCs en artrosis se correlacionan positivamente con los marcadores de desdiferenciación celular CD105 y CD166. Además, hemos comprobado que este estado puede ser revertido parcialmente mediante el uso de moléculas que disminuyen los niveles de Cx43, mejorando el fenotipo de los condrocitos artrósicos y de la MEC en ensayos *in vitro*. La disminución de la Cx43 dio lugar a re-diferenciación celular y, por tanto, a una menor expresión de

citoquinas pro-inflamatorias y enzimas degradadoras de la matriz del cartílago articular. Nuestros resultados también ponen de manifiesto que niveles elevados de la Cx43 en condrocitos se relacionan con un incremento en senescencia asociada a una mayor expresión de p16^{INK4a} y altos niveles de p53. Estudios recientes remarcan la importancia de la senescencia en artrosis²⁹⁻³³. De hecho, Jeon *et al.* publicaron un artículo en *Nature Medicine* donde mostraron la senescencia como una nueva diana terapéutica para tratar la artrosis y promover la regeneración del cartílago^{33,34}. En este estudio demostramos por primera vez la relación entre la sobre-actividad de la Cx43 en condrocitos humanos y la activación de desdiferenciación y senescencia celular que desembocan en alteraciones en el proceso de regeneración y favorecen el progreso de la enfermedad. A partir de estos resultados, terapias dirigidas a disminuir los niveles de Cx43 en artrosis surgen como una interesante aproximación terapéutica para la artrosis.

En conclusión, estos hallazgos sugieren que el incremento en la actividad de la Cx43 que se alcanza desde estadios muy tempranos de la OA⁶ podría contribuir a la degeneración del cartílago articular y de la articulación al activar desdiferenciación celular vía TEM y senescencia celular, contribuyendo a la síntesis de enzimas que degradan la liberación de citoquinas que contribuyen al

proceso degenerativo en la articulación. Estos resultados demuestran que la Cx43 y las UCs actúan como regulador de la desdiferenciación/re-diferenciación y senescencia en condrocitos, probablemente activando proteínas relacionadas con TEM, como Twist-1, y de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β . La disminución en los niveles de Cx43 en OAc promueve su re-diferenciación disminuyendo la expresión de mediadores inflamatorios y senescencia, y a su vez se acompaña de mayor depósito de Col2A1 y proteoglicanos en la matriz extracelular. El uso de moléculas como la oleuropeína y el diseño de estudios que permitan disminuir la actividad de la Cx43 *in vivo* probablemente constituya un primer paso en el desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras para el tratamiento eficaz de la artrosis desde estadios tempranos de la enfermedad al restaurar la regeneración del tejido.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida por un proyecto de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (FEIOMM 2016) y gracias al proyecto PI16/00035 cofinanciado por el ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación - Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) "Una manera de hacer Europa" concedidos a M.D.M. También ha sido financiado por un proyecto PRECIPITA (PRECIPITA - 2015 - 000139) otorgado por el Ministerio de Economía y Competitividad y FECYT y un proyecto financiado por la Xunta de Galicia (IN607B, 2017/21) otorgado A M.D.M. Por último, gracias a la concesión de un contrato pre-doctoral de la Xunta de Galicia y una beca de estancia predoctoral de la Universidade da Coruña - INDITEX y de la agrupación CICA-INIBIC a M.V-E.



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

Bibliografía

- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(1):33-42.
- Loeser RF, Collins JA, Diekmann BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(7):412-20.
- Philipot D, Guerit D, Platano D, Chuchana P, Olivotto E, Espinoza F, et al. p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(1):R58.
- Mayán MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernández P, Fernández-Puente P, Filgueira-Fernández P, Goyanes N, et al. Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann Rheum Dis.* 2013.
- Chi SS, Rattner JB, Matyas JR. Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J Anat.* 2004;205(5):363-70.
- Mayán MD, Carpintero-Fernández P, Gago-Fuentes R, Martínez-de-Illarduya O, Wang HZ, Valiunas V, et al. Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol.* 2013;182(4):1337-46.
- Gago-Fuentes R, Bechberger JF, Varela-Eirín M, Varela-Vázquez A, Acea B, Fonseca E, et al. The C-terminal domain of connexin43 modulates cartilage structure via chondrocyte phenotypic changes. *Oncotarget.* 2016;7(45).
- Mendoza-Naranjo A, Cormie P, Serrano AE, Wang CM, Thrasivoulou C, Sutcliffe JE, et al. Overexpression of the gap junction protein Cx43 as found in diabetic foot ulcers can retard fibroblast migration. *Cell Biol Int.* 2012;36(7):661-7.
- Brandner JM, Houdek P, Husing B, Kaiser C, Moll I. Connexins 26, 30, and 43: differences among spontaneous, chronic, and accelerated human wound healing. *J Invest Dermatol.* 2004;122(5):1310-20.
- Rai MF, Schmidt EJ, McAlinden A, Cherverud JM, Sandell LJ. Molecular insight into the association between cartilage regeneration and ear wound healing in genetic mouse models: targeting new genes in regeneration. *G3.* 2013;3(11):1881-91.
- Rai MF, Sandell LJ. Regeneration of articular cartilage in healer and non-healer mice. *Matrix Biol.* 2014;39:50-5.
- Grogan SP, Miyaki S, Asahara H, D'Lima DD, Lotz MK. Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):R85.
- Kim AC, Spector M. Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human articular cartilage. *J Orthop Res.* 2000;18(5):749-55.
- Bae DK, Yoon KH, Song SJ. Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees. *Arthroscopy.* 2006;22(4):367-74.
- Bank RA, Soudry M, Maroudas A, Mizrahi J, TeKoppele JM. The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation. *Arthritis Rheum.* 2000;43(10):2202-10.
- Barley RD, Adesida AB, Bagnall KM, Jomha NM. Immunohistochemical characterization of reparative tissue present in human osteoarthritic tissue. *Virchows Archiv.* 2010;456(5):561-9.
- Heinegard D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(1):50-6.
- Garciadiego-Cazares D, Aguirre-Sanchez HI, Abarca-Buis RF, Kouri JB, Velasquillo C, Ibarra C. Regulation of alpha5 and alphaV Integrin Expression by GDF-5 and BMP-7 in Chondrocyte Differentiation and Osteoarthritis. *PLoS One.* 2015;10(5):e0127166.
- Grenier S, Bhargava MM, Torzilli PA. An in vitro model for the pathological degradation of articular cartilage in osteoarthritis. *J Biomech.* 2014;47(3):645-52.
- Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, Payette JN, Wang J, Bouchez LC, et al. A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science.* 2012;336(6082):717-21.
- Yano F, Hojo H, Ohba S, Fukai A, Hosaka Y, Ikeda T, et al. A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(5):748-53.
- Kitamura H, Okazaki M. AG-041R, a novel indoline-2-one derivative, stimulates chondrogenesis in a bipotent chondroprogenitor cell line CL-1. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(4):287-96.
- Bellesini LS, Beloti MM, Crippa GE, Bombonato-Prado KF, Junta CM, Marques MM, et al. The effect of TAK-778 on gene expression of osteoblastic cells is mediated through estrogen receptor. *Exp Biol Med (Maywood).* 2009;234(2):190-9.
- Gangoso E, Thirant C, Chneiweiss H, Medina JM, Tabernero A. A cell-penetrating peptide based on the interaction between c-Src and connexin43 reverses glioma stem cell phenotype. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1023.
- Cheng F, Shen Y, Mohanasundaram P, Lindstrom M, Ivaska J, Ny T, et al. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF-beta-Slug signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(30):E4320-7.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453(7193):314-21.
- Li M, Luan F, Zhao Y, Hao H, Zhou Y, Han W, et al. Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in tissue fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016;241(1):1-13.
- Ye X, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol.* 2015;25(11):675-86.
- Price JS, Waters JG, Darrach C, Pennington C, Edwards DR, Donnell ST, et al. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell.* 2002;1(1):57-65.
- Zhou HW, Lou SQ, Zhang K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA in vitro. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43(5):555-68.
- Gao SG, Zeng C, Li LJ, Luo W, Zhang FJ, Tian J, et al. Correlation between senescence-associated beta-galactosidase expression in articular cartilage and disease severity of patients with knee osteoarthritis. *Int J Rheum Dis.* 2016;19(3):226-32.
- Xu M, Bradley EW, Weivoda MM, Hwang SM, Pirtskhalava T, Deckleaver T, et al. Transplanted Senescent Cells Induce an Osteoarthritis-Like Condition in Mice. *J Gerontol A S Biol Sci Med Sci.* 2017;72(6):780-5.
- Jeon OH, Kim C, Laberge RM, Demaria M, Rathod S, Vasserot AP, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med.* 2017;23(6):775-81.
- Toh WS, Brittberg M, Farr J, Foldager CB, Gomoll AH, Hui JH, et al. Cellular senescence in aging and osteoarthritis. *Acta Orthop.* 2016;87(sup363):6-14.

Estado cualitativo y cuantitativo óseo generalizado en la osteonecrosis de maxilares. Efecto de los bifosfonatos

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000300004>

García-Quintana M¹, Quintana-Montesdeoca P², Gómez de Tejada-Romero MJ^{1,3}, Saavedra-Santana P², Vicente-Barrero M^{1,4}, Bocanegra-Pérez S^{1,4}, Sosa-Henríquez M^{1,5}

1. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria - Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias - Grupo de investigación en osteoporosis y metabolismo mineral - Las Palmas de Gran Canaria (España)

2. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria - Departamento de Matemáticas - Las Palmas de Gran Canaria (España)

3. Departamento de Medicina - Universidad de Sevilla - Sevilla (España)

4. Hospital Universitario Insular - Servicio de Cirugía Máxilofacial - Las Palmas de Gran Canaria (España)

5. Hospital Universitario Insular - Unidad Metabólica Ósea - Las Palmas de Gran Canaria (España)

Fecha de recepción: 15/09/2019 - Fecha de aceptación: 30/09/2019

Resumen

Objetivo: La osteonecrosis de maxilares (ONM) es una enfermedad recientemente descrita cuya etiopatogenia es desconocida, aunque se ha atribuido, entre otras causas, al tratamiento prolongado con bifosfonatos. Sin embargo, mientras que la ONM es una patología localizada, la acción de los bifosfonatos es generalizada, es decir, afecta a todos los huesos. No hay estudios que muestren el estado óseo general de los pacientes con ONM. Con este trabajo hemos querido estudiar en pacientes afectados de ONM dicho estado general mediante medidas cuantitativas y estimaciones cualitativas del hueso por medio de la densidad mineral ósea (DMO) y el *trabecular bone score* (TBS) y los parámetros ultrasonográficos en el calcáneo (QUS), además de la presencia de otras enfermedades y la toma de fármacos (especialmente los bifosfonatos) en los pacientes con ONM que pudieran participar en su etiopatogenia.

Material y método: Estudio observacional y transversal de casos y controles, realizado en 304 pacientes de ambos sexos, en los que el grupo de casos (grupo I) estaba formado por 24 pacientes que habían sufrido una ONM, mientras que el grupo control (grupo II) estaba formado por 280 pacientes que no presentaban ONM y que recibían bifosfonatos desde un mínimo de 5 años por causas diversas. A todos ellos se les realizó una densitometría ósea (DXA, Hologic 4500 Discovery[®]) en la columna lumbar y en la extremidad proximal del fémur. Además, se les realizó mediciones del TBS en la columna lumbar, así como de los parámetros ultrasonográficos en el calcáneo (Hologic, Sahara[®]) en el pie dominante (QUS).

Resultados: Los pacientes afectados de ONM tenían una mayor comorbilidad que los controles, con una mayor prevalencia de las siguientes enfermedades: diabetes *mellitus*, cáncer, artritis reumatoide, hipertiroidismo, cardiopatía, arritmias, insuficiencia cardíaca e hipercolesterolemia. Por ello, el consumo de corticoides, (orales e inhalados), anticoagulantes, hipnóticos, bifosfonatos i.v. (zoledronato), y quimioterapia antineoplásica fue también mayor entre los pacientes afectados de ONM que los pacientes controles. Sin embargo, entre los pacientes con ONM el porcentaje que tomaba bifosfonatos orales fue menor. Los valores densitométricos (DMO medida en la columna lumbar L2-L4, cuello femoral y total de cadera) fueron más elevados en los pacientes con ONM en comparación con los de los controles. El TBS no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, y los ultrasonidos presentaron valores más elevados de QUI y SOS en los pacientes con ONM que en los controles. La prevalencia de fracturas por fragilidad fue similar en ambos grupos.

Conclusiones: Nuestros pacientes afectados de ONM mostraron una mayor comorbilidad y un mayor consumo de fármacos que los pacientes del grupo control, a excepción de bifosfonatos orales. Por otro lado, tanto la DMO como los parámetros ultrasonográficos mostraron valores más elevados en los pacientes con ONM que los controles. Si consideramos la DXA como una técnica medidora de la cantidad de masa ósea, y el TBS y la ultrasonografía de calcáneo técnicas estimadoras de aspectos cualitativos del hueso, podemos suponer que ni la cantidad ni la calidad óseas en general parecen estar afectadas en la ONM, siendo probablemente otro su mecanismo etiopatogénico. Los bifosfonatos orales no parecen estar entre los fármacos que participen en la etiología de la ONM, aunque sí los bifosfonatos más potentes que se administran por vía intravenosa, si bien no pueden considerarse independientemente de la patología subyacente para la cual se administran.

Palabras clave: osteonecrosis, maxilares, bifosfonatos, calidad, cantidad, densitometría, ultrasonidos.

INTRODUCCIÓN

La osteonecrosis de maxilares (ONM) es una enfermedad descrita hace relativamente poco tiempo. Después de la publicación inicial de Marx¹ se consideró que los bifosfonatos eran el agente etiológico responsable de la enfermedad, siendo incluso denominada durante un tiempo osteonecrosis por bifosfonatos²⁻⁵, lo cual es erróneo puesto que en la etiopatogenia de la ONM pueden participar muchos factores además de estos fármacos^{1,6,7}.

Una de las hipótesis sobre la etiopatogenia de la ONM sería la existencia de un exceso de supresión del remodelado óseo, que puede ser producido por los bifosfonatos o por otros potentes antirresortivos, como denosumab, fármaco también implicado en la ONM^{8,9}. Dado que estos fármacos actúan sobre todo el esqueleto, de existir tal exceso de supresión del remodelado óseo, cabría esperar la existencia de alteraciones tanto en la cantidad de la DMO como en la calidad del hueso en otras localizaciones. Pero aunque en la literatura existen muchas descripciones de casos aislados o series de esta enfermedad reseñando sus características clínicas y la posible asociación con diferentes patologías y factores de riesgo^{1,3-7,10}, no hemos encontrado publicaciones que analicen las posibles alteraciones cuantitativas y/o cualitativas del hueso en general en los pacientes con ONM.

La medición de la masa ósea mediante absorciometría radiológica dual (DXA) ha sido suficientemente validada y es aceptada como una técnica fiable de cuantificación ósea al medir la densidad mineral ósea (DMO)¹¹⁻¹⁴. Por otro lado, las técnicas no cruentas de medición de la calidad ósea no han tenido tanto éxito, debido a los múltiples aspectos que engloba el concepto de calidad ósea. A pesar de ello, en la actualidad existen dos técnicas que pueden estimar algunos aspectos de la calidad ósea; por un lado, el *trabecular bone score* (TBS), asociada a la DXA, que ofrece información sobre la microestructura ósea¹⁵⁻²¹; y por otro, la ultrasonografía cuantitativa (QUS), que si bien no es conocido exactamente qué propiedades del hueso refleja, sus mediciones han sido relacionadas también con la microarquitectura ósea y con algunos parámetros mecánicos²²⁻²⁴.

Por ello, el objetivo de nuestro trabajo ha sido estudiar las posibles alteraciones en la cantidad del tejido óseo en otras localizaciones distintas a los maxilares y que sirven de referencia, medida como DMO por densitometría ósea (absorciometría radiológica dual, DXA) en columna lumbar y fémur proximal; así como en la calidad ósea, estimada, por una parte, por medio del TBS y, por otra, utilizando los parámetros obtenidos por un ultrasonógrafo de calcáneo (QUS), en una población de pacientes afectados de ONM, y estimar la presencia de determinadas patologías y tratamiento que afectan al hueso, destacando los bifosfonatos como objetivo secundario, que pudieran participar de su etiopatogenia. Para ello tomamos como referencia un grupo control de pacientes que habían recibido bifosfonatos durante al menos 5 años consecutivos y que continuaban tomándolos en el momento de realizarse el estudio.

MATERIAL Y MÉTODO

Criterios de inclusión

Es un estudio de casos y controles en el que consideramos "caso" a pacientes que habían sufrido una ONM y "controles" a pacientes sin ONM y que habían recibido bifosfonatos durante un mínimo de 5 años y continuaban tomándolo en la actualidad.

Incluimos como casos 24 pacientes que fueron diagnosticados de ONM siguiendo los criterios de la "*International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw*"²⁵. Los controles fueron sujetos sin ONM que se reclutaron entre pacientes estudiados en la Unidad Metabólica Ósea del Hospital Universitario Insular y que por diversas patologías habían recibido bifosfonatos orales o intravenosos (i.v.) durante un mínimo de 5 años y continuaban recibiendo los.

Exploración física

A todos los pacientes que participaron en el estudio se les realizó una exploración física completa. La talla se obtuvo en un tallímetro y el peso en una báscula, llevando el paciente ropa ligera, sin zapatos. El índice de masa corporal (IMC) se calculó a partir de la fórmula = peso (kg)/talla (m)².

Absorciometría radiológica dual, o densitometría ósea (DXA)

La DMO se estimó por medio de un densitómetro Hologic® QDR 4500 Discovery (Hologic, España). Las determinaciones se realizaron en la columna lumbar (vértebras L2-L4) y en el fémur proximal (cuello femoral, trocánter, intertrocánter y fémur total). El programa informático facilitado por el fabricante permite separar las localizaciones anatómicas. Los resultados se expresaron en g/cm² y *T-score*. La precisión del equipo (coeficiente de variación) fue del 0,5% *in vitro* (medido con un *phantom* estándar) y del 0,9% *in vivo* (obtenido por mediciones dobles realizadas en 12 pacientes en el mismo día). Todas las determinaciones fueron realizadas por el mismo operador; por lo que no existían variaciones interobservador. Los valores de *T-score* se calcularon a partir de los valores de referencia que el aparato incluye obtenidos para la población española.

Trabecular bone score (TBS)

Todas las mediciones de TBS se realizaron utilizando el programa *TBS insight Software*, versión 2.0.0.1 (Med-Imaps, Pessac, Francia). El programa informático utiliza la imagen obtenida previamente por DXA en la misma región de interés (columna lumbar, L2-L4). Los valores de *T-score* se calcularon a partir de los valores de referencia obtenidos para la población española²⁶.

Ultrasonografía cuantitativa (QUS)

A todos los pacientes se les efectuó un estudio ultrasonográfico en el calcáneo del pie dominante. Para ello, utilizamos el aparato de ultrasonidos Sahara® Clinical Sonometer (Hologic Inc., Bedford, Massachusetts, EE.UU.). El sistema consiste en 2 transductores, uno de los cuales actúa como emisor y el otro como receptor de los ultrasonidos. Los parámetros obtenidos son la atenuación ultrasónica de banda ancha (BUA) y la velocidad del sonido (SOS). Los resultados obtenidos por ambos parámetros, BUA y SOS se combinan para obtener el denominado índice cuantitativo ultrasónico o QUI, al aplicar la fórmula:

$$\text{QUI} = 0,41 \times (\text{BUA} + \text{SOS}) - 571.$$

En todas las determinaciones ultrasonográficas se calcularon sus correspondientes *T-scores* con los datos obtenidos como valores de referencia para la población española²⁷.

Diagnóstico de las fracturas

A todos los pacientes se les realizó una Rx de columna dorsal y lumbar AP y lateral. La fracturas vertebrales prevalente fueron diagnosticadas aplicando los criterios semicuantitativos de fractura vertebral de Genant²⁸. La

presencia de fracturas no vertebrales se documentó por medio de la historia clínica obtenida a los pacientes confirmada por los registros médicos hospitalarios o por medio de las oportunas radiografías.

Análisis estadístico

Los datos continuos se expresaron como medias y desviaciones típicas cuando las variables seguían una distribución normal, o por medio de las medianas con sus rangos intercuartílicos cuando la distribución no era normal. Las variables categóricas se expresaron como frecuencias y porcentajes. Para los datos independientes, los porcentajes se compararon utilizando la prueba de la Chi-Cuadrado (χ^2) o la prueba exacta de Fisher. Las medias se compararon utilizando la prueba de la t de Student y las medianas aplicando la U de Mann Whitney. En todos los casos se consideró el nivel de significación estadística en el 5% (valor $p < 0,05$).

Aspectos éticos y legales

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética y Ensayos Clínicos del Hospital Universitario Insular. Se trata de un estudio observacional en el que no hubo interven-

ción farmacológica de ningún tipo. En todo momento observamos las recomendaciones de la Asociación Médica Mundial recogidos en la Declaración de Helsinki²⁹.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran las características basales y los estilos de vida de los pacientes incluidos en el estudio. Los pacientes tenían una edad similar y la proporción de varones y mujeres fue similar en ambos grupos.

Los pacientes afectados de ONM tenían menos talla, un mayor IMC y un menor consumo de tabaco y de alcohol que los controles. Tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas en el consumo de café o en la actividad física en el tiempo libre.

En la tabla 2 se recoge la comorbilidad de los pacientes afectados de ONM y de los controles. Globalmente, los pacientes que sufrieron una ONM tenían una mayor comorbilidad que los controles: en ellos se observó una mayor prevalencia de diabetes *mellitus*, cáncer, artritis reumatoide, hipertiroidismo, cardiopatía, arritmias, insuficiencia cardíaca e hipercolesterolemia. La prevalencia de fracturas por fragilidad fue similar en ambos grupos.

Tabla 1. Características basales y estilos de vida de los pacientes afectados de ONM y los controles

	Casos ONM (n=24)	Controles (n=280)	p valor
Edad (años)	69,3 ± 11,4	69,1 ± 10,4	0,900
Sexo			0,325
Varones	4 (16,7%)	30 (10,7%)	
Mujeres	20 (83,3%)	250 (89,3%)	
Peso (kg)	65,9 ± 16,4	68,8 ± 16,1	0,425
Talla (cm)	152 ± 11,3	157 ± 9,3	0,010
Envergadura (cm)	159,4 ± 15,9	160 ± 10,9	0,853
IMC (kg/m ²)	28,8 ± 7,3	25,9 ± 6,6	0,019
Ingesta actual de calcio (mg/día)	725 (390,5)	700 (250)	0,459
Tabaco			0,049
Sí	1 (4,2%)	49 (17,6%)	
No	16 (66,7%)	192 (68,8%)	
Ex-fumador	7 (29,2%)	38 (13,6%)	
Alcohol			0,022
Sí	4 (16,7%)	94 (33,7%)	
No	18 (75%)	181 (64,9%)	
Ex-bebedor	2 (8,3%)	4 (1,4%)	
Café			0,777
Sí	21 (87,5%)	231 (83,1%)	
No	3 (12,5%)	47 (16,9%)	
Actividad física en el tiempo libre			0,902
Baja	16 (66,7%)	173 (62%)	
Media	7 (29,2%)	92 (33%)	
Intensa	1 (4,2%)	14 (5%)	

Las variables continuas se resumen como media ± desviación típica o como medianas con sus intervalos intercuartílicos (IQR). Las variables categóricas son expresadas como frecuencia (%). IMC: índice de masa corporal: = (peso/talla²).

Tabla 2. Comorbilidad de los pacientes afectados de ONM y los controles

	ONM (n=24)	Controles (n=280)	p valor
Diabetes mellitus			
Sí	5 (23,8%)	21 (7,5%)	0,025
No	16 (76,2%)	259 (92,5%)	
Cáncer			
Sí	11 (45,8%)	31 (11,1%)	<0,001
No	13 (54,2%)	249 (88,9%)	
Artritis reumatoide			
Sí	9 (37,5%)	7 (2,5%)	<0,001
No	15 (62,5%)	273 (97,5%)	
Enfermedad tiroidea			
Hipertiroidismo	3 (12,5%)	7 (2,5%)	0,027
Hipotiroidismo	1 (4,2%)	24 (8,7%)	
Ninguna	20 (83,3%)	246 (88,8%)	
Cardiopatía			
Sí	11 (45,8%)	33 (11,8%)	<0,001
No	13 (54,2%)	247 (88,2%)	
Angina			
Sí	1 (4,2%)	14 (5%)	1
No	23 (95,8%)	266 (95%)	
Infarto de miocardio			
Sí	1 (4,2%)	4 (1,4%)	0,339
No	23 (95,8%)	276 (98,6%)	
Arritmias			
Sí	6 (25%)	17 (6,1%)	0,005
No	18 (75%)	263 (93,9%)	
Insuficiencia cardíaca			
Sí	5 (20,8%)	8 (2,9%)	0,002
No	19 (79,2%)	272 (97,1%)	
Fracturas por fragilidad			
Sí	11 (45,8%)	104 (37,1%)	0,511
No	13 (54,2%)	176 (62,9%)	
Hipercolesterolemia			
Sí	133 (47,5%)	3 (12,5%)	0,001
No	147 (52,5%)	21 (87,5%)	

Los resultados se expresan como frecuencias (%).

En la tabla 3 mostramos el consumo de fármacos que tenían ambos grupos de pacientes. En consonancia con la existencia de una mayor comorbilidad, los pacientes afectados de ONM presentaron un consumo significativamente mayor de corticoides orales, anticoagulantes orales e hipnóticos que los controles, y de manera igualmente significativa habían recibido quimioterapia un número mayor de ellos. El consumo de esteroides inhalados mostró asimismo una tendencia que estuvo muy cerca de alcanzar el nivel de significación (p=0,05).

En los pacientes afectados de ONM, el uso de bifosfonatos fue mayoritariamente por vía i.v. (75%) y mucho menor por vía oral (8,3%). Por otro lado, el 16,7% de estos pacientes no habían tomado o recibido nunca bifosfonatos. Obviamente, puesto que era un criterio de inclusión, en el grupo control el 100% habían recibido o tomado bifosfonatos, siendo mayoritariamente por vía oral (92,1%).

En la tabla 4 presentamos los parámetros densitométricos, ultrasonográficos y los valores de TBS. La DMO obtenida mostró valores mas elevados en los pacientes

Tabla 3. Fármacos utilizados por los pacientes con ONM y los controles

	ONM (n=24)	Controles (n= 279)	p valor
Corticoides orales			
En la actualidad	5 (20,8%)	17 (6,1%)	0,027
Alguna vez (>6 meses)	2 (8,3%)	22 (7,9%)	
Nunca	17 (70,8%)	240 (86,0%)	
Esteroides inhalados			
En la actualidad	3 (12,5%)	8 (2,9%)	0,050
Alguna vez (>6 meses)	1 (4,2%)	9 (3,2%)	
Nunca	20 (83,3%)	262 (93,9%)	
Quimioterapia			
Sí	11 (45,8%)	14 (5%)	<0,001
No	13 (54,2%)	266 (95%)	
Estatinas			
En la actualidad	4 (16,7%)	92 (33,0%)	0,255
Alguna vez (>6 meses)	2 (8,3%)	17 (6,1%)	
Nunca	18 (75,0%)	170 (60,9%)	
Anticoagulantes orales			
En la actualidad	4 (16,7%)	8 (2,9%)	0,003
Alguna vez (>6 meses)	0 (0,0%)	7 (2,5%)	
Nunca	20 (83,3%)	264 (94,6)	
Hipnóticos			
En la actualidad	18 (75,0%)	115 (41,2%)	0,006
Alguna vez (>6 meses)	2 (8,3%)	70 (25,1%)	
Nunca	4 (16,7%)	94 (33,7%)	
Bifosfonatos			
Orales	2 (8,3%)	259 (92,1%)	0,001
i.v. zoledronato	18 (75%)	22 (7,9%)	
Nunca	4 (16,7%)	0 (0%)	

Los resultados se expresan como frecuencias (%).

afectos de ONM en todas las localizaciones anatómicas en las que se determinó; tanto en columna lumbar como en la extremidad proximal del fémur la *T-score* fue también mayor en ellos. No obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en los valores de TBS y de BUA, mientras que los pacientes afectados de ONM mostraron valores más elevados de QUI y de SOS que los controles.

De acuerdo a los valores densitométricos ((DXA) observados en el momento del estudio, obtuvimos que el 28% de los pacientes con ONM tenían criterios de osteoporosis (*T-score* ≤ -2,5 en cualquiera de las siguientes localizaciones: L2-L4, cuello femoral o cadera total), mientras que dichos criterios se apreciaron en el 47,6% de los pacientes controles, sin llegar a ser significativa la diferencia (p=0,06) (Tabla 5).

DISCUSIÓN

La ONM es una patología relativamente reciente, habiéndose descrito las primeras series hace unos 15 años^{1,30-32}. Su mecanismo etiopatogénico es desconocido^{3,6,7,32-35} ha-

biéndose relacionado muchos posibles factores de riesgo, pero sin haberse podido establecer una causa-efecto inequívoca con ninguno de ellos^{2,3,5-7,36,37}, pudiendo considerarse multifactorial. Durante mucho tiempo se ha señalado al tratamiento con bifosfonatos como un agente etiológico primordial de la ONM, hasta el extremo de que durante algún tiempo a la ONM se le denominó osteonecrosis inducida por bifosfonatos^{1-4,31,32,35,38}, y aún lo consideran así muchos de los especialistas odontólogos, que indican su retirada ante una intervención quirúrgica orodental.

Una hipótesis etiopatogénica que fue aceptada durante mucho tiempo indicaba que los bifosfonatos, administrados por varios años y a dosis elevadas, producirían una supresión excesiva del remodelado, que implicaría el desarrollo de un hueso con menor cantidad de masa ósea y una alteración severa de la calidad, lo que se vino a llamar un hueso “congelado”³⁹. Como apoyo de esta hipótesis se ha observado que la inmensa mayoría de los pacientes afectados de ONM, más del 95% de ellos, son pacientes que han sufrido un cáncer y que además del tratamiento de

base del proceso (cirugía, radioterapia) han recibido poliquimioterapia y bifosfonatos intravenosos a dosis elevadas, habitualmente zoledronato^{1,6,7,30} a la dosis utilizadas en oncología, que es de 4 mg i.v. cada 28 días (52 mg al año), mientras que en el tratamiento de la osteoporosis, la dosis utilizada del mismo fármaco es de 5 mg i.v. una vez al año⁴⁰.

Sin embargo, existen también algunos desacuerdos. En primer lugar, un porcentaje considerable de pacientes con ONM, el 16,7%, no habían recibido nunca bifosfonatos.

Por otra parte, la mayor DMO medida por DXA en todas las localizaciones de estos pacientes respecto a los pacientes controles apunta a una mayor cantidad ósea general de los primeros frente a los segundos. No hemos encontrado en las bases de datos principales estudios similares al nuestro que hayan comparado la DMO en pacientes afectados de ONM con controles en tratamiento con bifosfonatos, por lo que no sabemos si este hallazgo ha sido o no corroborado por otros autores. Queremos destacar el hecho de que no había diferencia estadísticamente significativa en el diagnóstico densitométrico de osteoporosis entre ambos grupos; puede parecer lógico que debería haber más porcentaje de diagnóstico de osteoporosis entre el grupo control, ya que en él el tratamiento con bifosfonatos orales (fármaco de lección

para la osteoporosis) era mayoritario. Sin embargo, debemos recordar que el tratamiento a largo plazo con dicho fármaco aumenta la DMO, y por tanto la *T-score*, haciendo que sus valores se alejen de los criterios densitométricos de osteoporosis.

Otro aspecto que hemos querido considerar es la calidad del hueso. Es cierto que este aspecto es mucho más controvertido, pues no existe un único método definitivo y no creo que haya sido aceptado como el “patrón oro” para la estimación de la calidad ósea, a diferencia de lo que ocurre con la densitometría, que es la referencia universalmente aceptada para la cantidad¹¹⁻¹⁴. Uno de los métodos descritos recientemente para la estimación de la calidad ósea es el denominado *trabecular bone score* o TBS¹⁶, que básicamente efectúa una evaluación de la integridad de las trabéculas óseas vertebrales, reanalizando las imágenes obtenidas mediante DXA¹⁷⁻²¹. Los parámetros obtenidos con la ultrasonografía cuantitativa de calcáneo también se han propuesto como posibles indicadores de la calidad del hueso²²⁻²⁴. En nuestra serie, los pacientes con ONM mostraron valores similares de TBS y BUA a los de los pacientes controles, y los índices SOS y el QUI eran ligera pero significativamente mayores en los primeros, lo que nos hace pensar que los aspectos cualitativos óseos en ambos grupos eran parecidos, y, si acaso, nunca peores en los pacientes afectados de ONM que

Tabla 4. Parámetros óseos relacionados con aspectos cualitativos y cuantitativos: DMO medida en columna lumbar y extremidad proximal del fémur, TBS medida en la columna lumbar y parámetros ultrasonográficos obtenidos en el calcáneo

DXA	ONM (n=24)	Controles (n=280)	p valor
L2-L4 (g/cm ²)	0,95 (0,18)	0,82 (0,18)	0,001
<i>T-score</i> L2L4	-0,87 (1,57)	-2,22 (1,76)	0,001
Cuello femoral (g/cm ²)	0,68 (0,23)	0,64 (0,15)	0,025
<i>T-score</i> cuello femoral	-1,46 (2,15)	-1,89 (1,36)	0,006
Fémur total (g/cm ²)	0,86 (0,24)	0,78 (0,17)	0,006
<i>T-score</i> fémur total	-0,45 (-0,64)	-0,5 (1,33)	0,006
TBS L2L4 (g/cm ²)	1,18 (0,14)	1,25 (0,13)	0,174
<i>T-score</i> TBS L2L4	-3,32 (1,72)	-2,47 (1,69)	0,174
QUI	72,4 (18,7)	69,9 (26,4)	0,040
<i>T-score</i> QUI	-1,68 (0,52)	-1,83 (1,34)	0,040
BUA (dB/MHz)	60,8 (24,2)	57 (23,5)	0,119
<i>T-score</i> BUA	-1,07 (0,12)	-1,32 (1,56)	0,119
SOS (m/s)	1511,8 (33,5)	1508 (39,6)	0,033
<i>T-score</i> SOS	-1,96 (0,72)	-1,94 (1,2)	0,033

Los resultados se expresan como medianas e intervalos intercuartílicos (IQR).

Tabla 5. Porcentaje de diagnóstico densitométrico de osteoporosis en el momento del estudio en ambos grupos

	Grupo ONM	Grupo control	P valor (Chi-cuadrado)	OR (IC 95%)
Osteoporosis densitométrica	7 (28%)	130 (47,6%)	0,060	2,338; (0,946, 6,777)
No osteoporosis densitométrica	18 (72%)	143 (52,4%)		

en los que tomaban bifosfonatos. Algunos autores han descrito valores bajos de los parámetros ultrasonográficos en pacientes afectados de ONM⁴¹ pero al igual que ocurría con la densitometría en la ONM, existen muy pocos estudios similares al nuestro con el que poder efectuar comparaciones. Si tenemos en cuenta que los pacientes controles tomaban bifosfonatos durante largo plazo, y considerando que los bifosfonatos mejoran la cantidad y la calidad ósea^{42,43} los mayores valores de DMO, TBS, SOS y QUI en los pacientes con ONM podrían estar indicándonos que el estado de salud ósea general de estos pacientes es adecuado.

Por último, si unimos a los anteriores resultados el hecho de que la prevalencia de fracturas por fragilidad también fuera similar en ambos grupos (y considerando que los bifosfonatos disminuyen el riesgo de fractura), tenemos evidencias indirectas de que la estructura ósea general, tanto cuantitativa como cualitativamente, es cuanto menos similar (si no mejor) en pacientes con ONM y pacientes en tratamiento con bifosfonatos.

Estamos totalmente de acuerdo en que la etiopatogenia de la ONM es multifactorial, como se ha publicado en múltiples estudios y acordado por consenso^{1-3,10,36,44}. Los pacientes con esta enfermedad tienen una mayor comorbilidad, como hemos observado en nuestra serie. Por consiguiente, el consumo de fármacos es también significativamente mayor en este grupo de pacientes⁴⁵ que entre los estudiados aquí: corticoides orales, corticoides inhalados, anticoagulantes orales, hipnóticos y el haber recibido poliquimioterapia. Sin embargo, si nos centramos en los bifosfonatos, los pacientes con ONM tienen una mayor utilización de bifosfonatos potentes por vía i.v. (75%), lo cual estuvo muy relacionado con la mayor incidencia de cáncer, pero no de bifosfonatos orales.

Una de las limitaciones de este estudio lo constituye el tamaño muestral de los casos, con sólo 24 pacientes. Ello se debe a la escasa incidencia de esta enfermedad y a la dificultad de conseguir la participación en un estudio de estas características de algunos pacientes, por su delicada situación clínica. Por otra parte, podría discutirse la elección del grupo control. Hemos escogido a pacientes que llevaban al menos 5 años recibiendo bifosfonatos, dado que es precisamente este hecho lo que se consideran un factor de riesgo asociado a la aparición de ONM⁴⁶⁻⁴⁸, pero que tienen un efecto beneficioso en el hueso en general. Finalmente, somos conscientes de que circunstancias locales no valoradas, como la higiene bucal, o la presencia de patologías dentogingivales o de intervenciones dentales, tienen un peso específico relevante y determinante en la etiopatogenia de la ONM, si bien consideramos no incluirlas por tratarse de circunstancias locales que no afectan al hueso en general.

CONCLUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio indican que los pacientes que han sufrido una ONM no parecen tener una peor salud ósea (en conceptos de cantidad y calidad) en general en comparación con pacientes que llevan recibiendo bifosfonatos de manera ininterrumpida durante al menos 5 años. Además, los bifosfonatos orales no fueron los fármacos que más fueron utilizados en estos pacientes, por lo que hay que prestar más atención a otros que sí estuvieron presentes con mayor prevalencia, como los corticoides, los bifosfonatos intravenosos, la quimioterapia, los hipnóticos y los anticoagulantes orales; sin dejar de tener en cuenta a comorbilidades, como el cáncer, la diabetes, la artritis reumatoide, la hipercolesterolemia, las cardiopatías y las patologías tiroideas.



Conflicto de intereses: Lo autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

- Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: Risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(11):1567-75.
- Otto S, Hafner S, Mast G, Tischer T, Volkmer E, Schieker M, et al. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: Is pH the Missing Part in the Pathogenesis Puzzle? *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(5):1158-61.
- Allen MR, Burr DB. The Pathogenesis of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: So Many Hypotheses, So Few Data. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(Suppl 5):61-70.
- Lehrer S, Montazem A, Ramanathan L, Pessin-Minsley M, Pfail J, Stock RG, et al. Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws, Bone Markers, and a Hypothesized Candidate Gene. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(1):159-61.
- Rasmusson L, Abtahi J. Bisphosphonate Associated Osteonecrosis of the Jaw: An Update on Pathophysiology, Risk Factors, and Treatment. *Int J Dent.* 2014;2014:1-9.
- Sosa Henríquez M, Vicente Barrero M, Bocanegra Pérez S. Osteonecrosis de los maxilares: nuevas evidencias sobre su etiopatogenia. *Rev Osteoporos y Metab Miner.* 2011;3(1)5-6.
- Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ, Bagán Sebastián JV, Curiel MD, Jódar Gimeno E, et al. Osteonecrosis de los maxilares: Documento de consenso. *Rev Osteoporos y Metab Miner.* 2009;1(1)4-51.
- Selvi Sabater P, Rizo Cerdá AM, Titos Arcos JC, Espuny Miró A. Posible osteonecrosis mandibular inducida por denosumab en el tratamiento de la osteoporosis. A propósito de un caso. *Farm Hosp.* 2014;38(3):248-9.
- Troeltzsch M, Woodlock T, Krieglstein S, Steiner T, Messlinger K, Troeltzsch M. Physiology and pharmacology of non-bisphosphonate drugs implicated in osteonecrosis of the jaw. *J Can Dent Assoc (Tor).* 2012;78(1).
- Leizaola-Cardesa IO, Aguilar-Salvatierra A, Gonzalez-Jaranay M, Moreu G, Sala-Romero MJ, Gómez-Moreno G. Bisphosphonates, vitamin D, parathyroid hormone, and osteonecrosis of the jaw. Could there be a missing link? *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal.* 2016;21(2):e236-40.
- National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *JAMA* 2001;285(6):785-95.
- Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ. ¿Hay vida más allá de la densitometría ósea? *Med Clin (Barc).* 2011;136(14):607-52.
- Gómez de Tejada Romero MJ, Sosa Henríquez M. Los ultrasonidos, la densitometría, el T-score y los criterios de la organización mundial de la salud para el diagnóstico de la osteoporosis. *Rev Esp Enf Metab Oseas.* 2002;11(5):165-87.
- Gómez de Tejada Romero MJ, Sosa Henríquez M. Los ultrasonidos, la densitometría y la osteoporosis. *An Med Interna.* 2007;24(2):55-6.
- Martineau P, Leslie WD. Trabecular bone score (TBS): Method and applications. *Bone.* 2017;104:66-72.
- Silva BC, Boutroy S, Zhang C, McMahon DJ, Zhou B, Wang J, et al. Trabecular bone score (TBS) - A novel method to evaluate bone microarchitectural texture in patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):1963-70.
- Pothuaud L, Barthe N, Krieg MA, Mehnen N, Carceller P, Hans D. Evaluation of the Potential Use of Trabecular Bone Score to Complement Bone Mineral Density in the Diagnosis of Osteoporosis: A Preliminary Spine BMD-Matched, Case-Control Study. *J Clin Densitom.* 2009;12(2):170-6.
- Bousson V, Bergot C, Sutter B, Levitz P, Cortet B. Trabecular bone score (TBS): Available knowledge, clinical relevance, and future prospects. *Osteoporos Int.* 2012;23(5):1489-501.
- Warzecha M, Czerwiński E, Amarowicz J, Berwecka M. Trabecular Bone Score (TBS) in Clinical Practice - Review. *Ortop Traumatol Rehabil.* 2018;20(5):347-359.
- Harvey NC, Glüer CC, Binkley N, McCloskey E V, Brandi ML, Cooper C, et al. Trabecular bone score (TBS) as a new complementary approach for osteoporosis evaluation in clinical practice. *Bone.* 2015;78:216-24.
- Leslie WD, Krieg MA, Hans D. Clinical factors associated with trabecular bone score. *J Clin Densitom [Internet].* 2013;16(3):374-9.
- Raum K, Grimal Q, Varga P, Barkmann R, Glüer CC, Laugier P. Ultrasound to assess bone quality. *Curr Osteoporos Rep.* 2014;12(2):154-62.
- Wallach S, Feinblatt JD, Carstens JH, Avioli L V. The bone "quality" problem. *Calcif Tissue Int.* 1992;51(3):169-72.
- Glüer CC. Quantitative Ultrasound-It is time to focus research efforts. *Bone.* 2007;40(1):9-13.
- Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: A systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res.* 2015;30:3-23.
- Del Rio LM, Winzenrieth R, Cormier C, Di Gregorio S. Is bone microarchitecture status of the lumbar spine assessed by TBS related to femoral neck fracture? A Spanish case-control study. *Osteoporos Int.* 2013;24(3):991-8.
- Sosa M, Saavedra P, Muñoz-Torres M, Alegre J, Gómez C, González-Macías J, et al. Quantitative ultrasound calcaneus measurements: Normative data and precision in the Spanish population. *Osteoporos Int.* 2002;13(6):487-92.
- Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res.* 1993;8(9):1137-48.
- World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA.* 2013;310(20):2013-6.
- Raje N, Woo S Bin, Hande K, Yap JT, Richardson PG, Vallet S, et al. Clinical, radiographic, and biochemical characterization of multiple myeloma patients with osteonecrosis of the jaw. *Clin Cancer Res.* 2008;14(8):2387-95.
- Lehrer S, Montazem A, Ramanathan L, Pessin-Minsley M, Pfail J, Stock RG, et al. Normal serum bone markers in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2008;106(3):389-91.
- Assael LA. Oral Bisphosphonates as a Cause of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: Clinical Findings, Assessment of Risks, and Preventive Strategies. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(Suppl 5):35-43.
- Aspenberg P. Osteonecrosis of the jaw: what do bisphosphonates do? *Expert Opin Drug Saf.* 2006;5(6):743-5.
- Bedogni A, Saia G, Bettini G, Tronchet A, Totola A, Bedogni G. Osteomieloma: the missing link in the pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws? *Oncologist.* 2012;17:1114-9.
- Kwon YD, Ohe JY, Kim DY, Chung DJ, Park YD. Retrospective study of two biochemical markers for the risk assessment of oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Can they be utilized as risk markers? *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(1):100-5.
- Ruggiero S, Gralow J, Marx RE, Hoff AO, Schubert MM, Huryn JM, et al. Practical Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Osteonecrosis of the Jaw in Patients With Cancer. *J Oncol Pract.* 2017;21(1):7-14.
- Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: A systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res.* 2015;30(1):3-23.
- Huang YF, Chang CT, Muo CH, Tsai CH, Shen YF, Wu CZ. Impact of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw on osteoporotic patients after dental extraction: A population-based cohort study. *PLoS One.* 2015;10(4):1-13.
- Aspenberg P, Schilcher J, Fahlgren A. Histology of an undisplaced femoral fatigue fracture in association with bisphosphonate treatment: Frozen bone with remodelling at the crack. *Acta Orthop.* 2010;81(4):460-2.
- Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley J. Once-Yearly Zoledronic Acid for Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007;356(18):1809-22.
- Motta ACF, Macedo LD, Santos GG, Guerreiro CT, Ferrari T, Oliveira TFL, et al. Quantitative ultrasound at the hand phalanges in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Braz Oral Res.* 2015;29(1):1-9.

42. Delmas PD, Li Z, Cooper C. Relationship between changes in bone mineral density and fracture risk reduction with antiresorptive drugs: some issues with meta-analyses. *J Bone Miner Res.* 2004;19(2):330-7.
43. Gallacher SJ, Dixon T. Impact of treatments for postmenopausal osteoporosis (bisphosphonates, parathyroid hormone, strontium ranelate, and denosumab) on bone quality: a systematic review. *Calcif Tissue Int.* 2010;87:469-84.
44. Sosa-Henriquez M. Osteonecrosis de los maxilares: Documento de consenso. *Rev Osteoporos y Metab Miner.* 2009;1(1):41-51.
45. Ramírez L, López-Pintor RM, Casañas E, Arriba L de, Hernández G. New Non-Bisphosphonate Drugs that Produce Osteonecrosis of the Jaws. *Oral Health Prev Dent.* 2015;13(5):385-93.
46. Adler RA, Fuleihan GE, Bauer DC, Camacho PM, Bart L, Clines GA, et al. Managing Osteoporosis in Patients on Long-Term Bisphosphonate Treatment: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2016;31(1):16-35.
47. Anagnostis P, Paschou SA, Mintzioti G, Ceausu I, Depypere H, Lambrinoukaki I, et al. Drug holidays from bisphosphonates and denosumab in postmenopausal osteoporosis: EMAS position statement [Internet]. Vol. 101, *Maturitas.* 2017;101:23-30.
48. Black DM, Bauer DC, Schwartz A V, Cummings SR, Rosen CJ. Continuing Bisphosphonate Treatment for Osteoporosis - For Whom and for How Long? *N Engl J Med.* 2012;366(22):2051-3.

Células osteogénicas afectadas por los factores solubles tumorales contribuyen a la formación del nicho pre-metastásico óseo

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000300005>

Álvarez Carrión L¹, Gutiérrez Rojas I¹, Ardura JA^{1,2}, Alonso V^{1,2}

¹ Laboratorio de Fisiopatología Ósea - Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA) - Universidad San Pablo-CEU - Alcorcón - Madrid (España)

² Departamento de Ciencias Médicas Básicas - Facultad de Medicina - Universidad San Pablo-CEU - Alcorcón - Madrid (España)

Fecha de recepción: 12/07/2019 - Fecha de aceptación: 07/10/2019

Trabajo premiado con una beca FEIOMM de Investigación Básica 2017

Resumen

Objetivo: Analizar el efecto de los secretomas de tumores sólidos organotrópicos hacia el hueso en células de linaje osteogénico, de tipo osteoblástico y osteocítico, en la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo.

Material y método: Caracterizamos los cambios en expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real del eje OPG/RANKL, así como de otros genes relacionados con la diferenciación osteoblástica como son Runx2 y osteocalcina, inducidos por los medios condicionados de células tumorales prostáticas, mama y melanoma en pre-osteoblastos MC3T3-E1 y osteocitos MLO-Y4 murinos o en osteoblastos humanos, según correspondiese por especie.

Resultados: La estimulación de las células osteocíticas con medios condicionados de células de melanoma o adenocarcinoma prostático indujo un incremento en la expresión génica de OPG y también de RANKL, viéndose incrementado la *ratio* OPG/RANKL. Únicamente el secretoma de las células de adenocarcinoma prostático alteró la expresión de Runx2 en osteocitos. Los medios condicionados de células de cáncer de mama modificaron únicamente la expresión de RANKL en células osteoblásticas, viéndose disminuido la *ratio* OPG/RANKL.

Conclusión: Los factores solubles tumorales tienen como diana celular a las células osteocíticas, favoreciendo la inducción de un nicho pre-metastásico óseo por modificación de la *ratio* OPG/RANKL en el entorno óseo, y, con ello, la progresión de tumores organotrópicos óseos como son el melanoma y adenocarcinomas prostático.

Palabras clave: tumores organotrópicos óseos, factores solubles tumorales, nicho pre-metastásico óseo, metástasis óseas, osteocitos y osteoblastos.

INTRODUCCIÓN

La aparición de la enfermedad metastásica constituye una grave amenaza en la tasa de supervivencia de pacientes que desarrollan un tumor. Se ha observado, que ciertos tipos de tumores presentan una elevada tendencia a colonizar órganos específicos. Desde la hipótesis formulada por Paget ("seed-and-soil")¹, pocos estudios han descifrado los mecanismos reguladores del organotropismo metastásico. Estudios iniciales, se centraron en la función de las propiedades intrínsecas de la célula tumoral, como la expresión de genes y vías de regulación de la colonización, en dirección al organotropismo²⁻⁴.

El hueso es un órgano frecuentemente infiltrado por la diseminación metastásica de tumores sólidos^{5,6}, siendo la aparición de la enfermedad metastásica una grave amenaza en la tasa de supervivencia de pacientes que desarrollan un tumor. El 65-80% con cáncer de próstata o mama metastásico presenta complicaciones esqueléticas⁵. El estudio de las metástasis óseas se ha centrado principalmente en la interacción de la célula tumoral con el hueso, una vez ha sido establecida la metástasis, ignorando los

estadios subclínicos del proceso que ocurre previamente. El establecimiento de células tumorales en el microambiente óseo altera el balance del proceso de remodelado óseo entre la formación ósea, inducida por osteoblastos, y la resorción, mediada por osteoclastos. Como consecuencia, las vías de supervivencia y proliferación de células tumorales están favorecidas, induciéndose la formación de "un ciclo vicioso de las metástasis óseas"⁷.

Los tumores provocan dos tipos diferentes (aunque no excluyentes) de lesiones esqueléticas. La forma más común, representada por el cáncer de mama es la lesión osteolítica asociada a una alteración del remodelado óseo con incremento en la actividad osteoclastica y la consiguiente osteolisis⁸⁻¹¹. Por otro lado, existe un segundo tipo de lesiones denominadas osteoblásticas caracterizadas por un elevado remodelado óseo con un incremento en la actividad de los osteoblastos con aumento del osteoide y de la tasa de mineralización. Estas áreas de hueso formado de *novo* en las zonas de metástasis se denominan lesiones osteoescleróticas, que suelen ser débiles e inestables, con tendencia a la rotura. Este tipo de lesiones es característico del cáncer



Correspondencia: Verónica Alonso Rodríguez (veronica.alonsoalonsorodriguez@ceu.es)

de próstata. No obstante, actualmente se reconoce la existencia de un componente resortivo mediado por los osteoclastos como paso previo para el establecimiento de lesiones osteoblásticas^{12,13}.

Recientes estudios han descrito cambios pro-metastásicos en órganos donde más tarde aparecerán metástasis. Tales cambios inducen la formación de nichos pre-metastásicos que favorecen la implantación de células tumorales en órganos diana^{14,15}.

La complejidad celular del hueso (osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de recubrimiento óseo, células endoteliales y tejido hematopoyético), así como las funciones que realizan en el mismo regulando el metabolismo y remodelado óseo, plantea la posibilidad de que la formación del nicho pre-metastásico óseo sea consecuencia de una red compleja de modificaciones y alteraciones combinadas o secuenciales de todas estas células¹⁶.

A pesar de la existencia de algunas observaciones analizando el efecto de los factores secretados por células tumorales que afectan a la viabilidad de células óseas¹⁷, se desconoce la existencia de mecanismos comunes o cambios acontecidos en las células óseas inducidos por los tumores sólidos con un alto organotropismo hacia el hueso como órgano diana metastásico.

En este estudio, hemos analizado los cambios en el perfil transcripcional de citoquinas relacionadas con el metabolismo óseo en células osteoblásticas y osteocíticas, inducidos por factores solubles tumorales de células de tumor de mama, próstata y melanoma. Nuestras observaciones muestran que estos factores modifican significativamente el perfil transcripcional de los osteocitos. Estos resultados sugieren un papel relevante de los osteocitos como la célula inductora inicial en la formación del nicho pre-metastásico óseo.

MATERIAL Y MÉTODO

Cultivos celulares

Las líneas celulares pre-osteoblástica murina MC3T3-E1 (ATCC: CRL-2593) y osteocítica murina MLO-Y4 (generosamente donada por Lynda Bonewald) se cultivaron en DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) o α -MEM con 2,5% de suero fetal de carnero (SCF) y 2,5% SFB, respectivamente. Todas las células fueron cultivadas en medios que contenían penicilina (100 unidades/mL) y estreptomycin (100 μ g/mL) en el incubador humidificado a 37°C y 5% CO₂ atmosférico.

La línea continua osteoblástica humana hFOB 1.19 (ATCC® CRL-11372TM) se cultivó en una mezcla 1:1 de Ham's F12 y DMEM con 2,5 mM de L-glutamina, 0,3 mg/mL de G418 y 10% SFB en el incubador humidificado a 34°C y 5% CO₂ atmosférico.

Utilizamos las líneas de adenocarcinoma prostática de ratón TRAMP-1 (ATCC® CRL-2730 TM), melanoma murina B16 (ATCC® CRL-6323) y cáncer de mama humana (ATCC® MDA-MB-231 HTB-26) para la obtención del secretoma tumoral. Estas células se cultivaron en medio de cultivo DMEM suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 μ g/ml), glutamina al 1% y SFB al 10%. Cuando el cultivo alcanzó confluencia se lavaron con una solución fosfatada (PBS). A continuación, se obtuvieron los secretomas tumorales y medios condicionados óseos utilizados para la estimulación de células tumorales previamente activadas con factores solubles óseos.

Para la obtención de los medios condicionados tanto de células tumorales como células óseas, las líneas celulares se cultivaron hasta confluencia con medio de cultivo

α -MEM suplementado con penicilina y estreptomycin al 0% de SFB, tras 24 horas de incubación, se recogieron los medios y se eliminaron los restos celulares y células muertas por centrifugación (5.000 rpm, 10 minutos).

Con el fin de evitar cualquier tipo de reactividad biológica cruzada de las citocinas de una especie en células de otra especie¹⁸ y reproducir de la manera más fiel posible la comunicación de células tumorales con células óseas, nuestros modelos experimentales *in vitro* se diseñaron atendiendo principalmente al criterio de especie. De esta forma, se evaluaron los efectos del secretoma tumoral de la línea humana de cáncer de mama sobre la línea osteoblástica humana. Actualmente no existe una línea continua osteocítica bien caracterizada. Los efectos de los secretomas de líneas tumorales de próstata y melanoma de ratón se estudiaron sobre las líneas murinas óseas (osteoblástica, MC3T3, y osteocíticas, MLOY4). En la figura 1 se encuentra representado el protocolo empleado en la obtención de medios condicionados y su estimulación en las distintas estirpes celulares al 25%.

Ensayo de viabilidad celular

El número de células viables óseas MC3T3, MLOY4 y hFOBs estimuladas o no con secretoma tumoral al 25% fue evaluado por el ensayo de exclusión por azul de trypan como previamente ha sido descrito¹⁹.

Estudios de expresión génica por PCR a tiempo real

El ARN total se extrajo de cultivos celulares por el método de Trizol. La síntesis de cADN se realizó utilizando la transcriptasa reversa del virus de mieloblastosis aviar (Promega) y cebadores aleatorios hexaméricos (*random hexamer primers*). La PCR en tiempo real se llevó a cabo en el sistema ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) utilizando Sybr premix ex Taq (Takara, Otsu, Japan) y cebadores específicos de cada gen (Tabla 1). Todos los resultados fueron expresados en número de copias de ARNm calculadas para cada muestra utilizando el valor del ciclo umbral (*cycle threshold*, Ct). La expresión génica relativa se representa como: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{gen\ diana} - \Delta Ct_{18S/GAPDH}$. El cambio del número de veces con respecto al tratamiento se define como la expresión comparada con el control, calculándose como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tratamiento} - \Delta Ct_{control}$. La especificidad del amplicon fue confirmada como la presencia de una única amplificación tras el análisis de la curva de fusión (*melting curve*). Los resultados mostrados corresponden a la media realizada de al menos 3 experimentos independientes por triplicado.

Análisis estadísticos

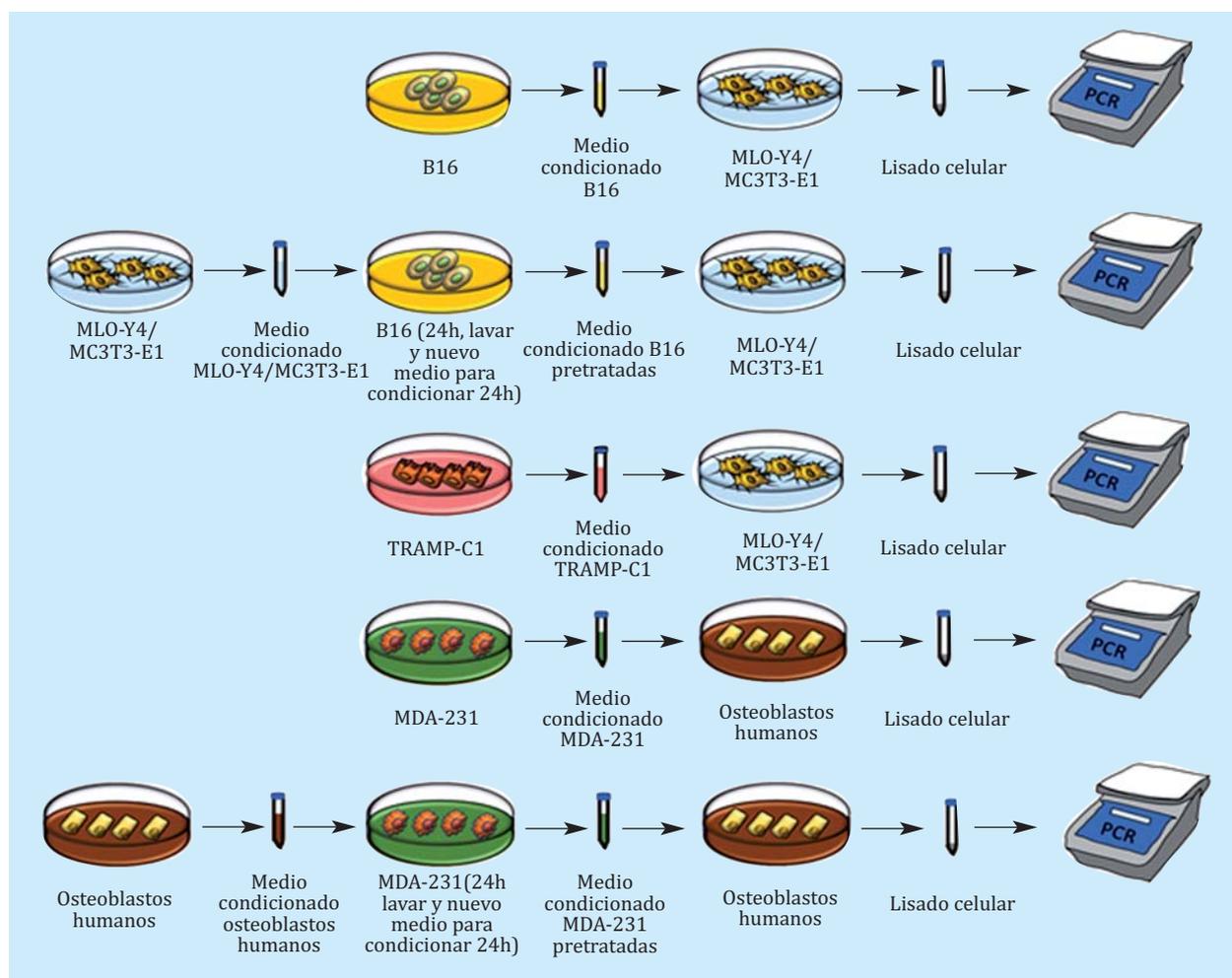
Los datos se expresaron como media \pm error estándar. Las diferencias entre las condiciones experimentales y los controles fueron analizadas utilizando el test estadístico U Mann Whitney donde los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

La comunicación mediante factores solubles entre melanocitos tumorogénicos y células óseas regula la expresión de genes de remodelado óseo en osteocitos

Con objeto de estudiar la comunicación existente entre las células tumorales y las células óseas en la formación de nichos pre-metastásicos óseos, se estimularon células óseas de ratón o humano con los secretomas de distintas células tumorales con organotropismo a tejido óseo, que habían sido previamente estimuladas o no con secretomas de osteocitos u osteoblastos (Figura 1).

Figura 1. Representación gráfica del protocolo de trabajo empleado para la obtención de medios condicionados (MC) pre-tratados o no. Los MC no pre-tratados de MLO-Y4, MC3T3-E1, osteoblastos humanos, B16, TRAMP-C1 o MDA-231 se obtuvieron tras 24 h de cultivo en α -MEM al 0% de SFB y se usaron para estimular las diferentes líneas celulares. Los MC pre-tratados se obtuvieron tras cultivar 24 h las B16 o MDA-231 con MC de MLO-Y4, MC3T3-E1 u osteoblastos humanos seguido de un lavado con PBS y 24 h de cultivo con α -MEM al 0% de SFB. Finalmente, se obtuvo un lisado celular que se analizó por PCR



En primer lugar, corroboramos que los medios condicionados tumorales de las TRAMP-C1 o B16, es decir secretoma tumoral, no afectan a la viabilidad de las células ósteoblásticas, MC3T3, y osteocítica, MLOY4 tras 24 h de estimulación (Figura 2). Sin embargo, la estimulación de osteocitos MLO-Y4 con secretomas obtenidos de medios condicionados de células de melanoma B16 indujo sobreexpresión del gen OPG con un aumento neto en la relación OPG/RANK-L, sin afectar significativamente a la expresión génica de RANK-L, ni al factor de transcripción Runx2 (Figura 3A-D). Por el contrario, los secretomas de células de melanoma B16, que previamente habían sido expuestas a medios condicionados de células MLO-Y4, ocasionaron un aumento en la expresión de RANK-L y un descenso en la relación OPG/RANK-L. No se observaron modificaciones en la expresión de OPG o de Runx2 respecto a los medios condicionados sin pre-estimulación (Figura 3A-D). Estos datos sugieren que las células tumorogénicas de melanoma, que han sido expuestas a secretoma de osteocitos, secretan factores solubles que ocasionan una respuesta de aumento de genes de remodelado óseo, particularmente incrementando la expresión del factor osteoclastogénico RANK-L en osteocitos.

Curiosamente, estos efectos no se reprodujeron en células osteoblásticas MC3T3-E1, en las que los medios condicionados de células B16 no ocasionaron sobrestimulaciones génicas (Figura 3E-H).

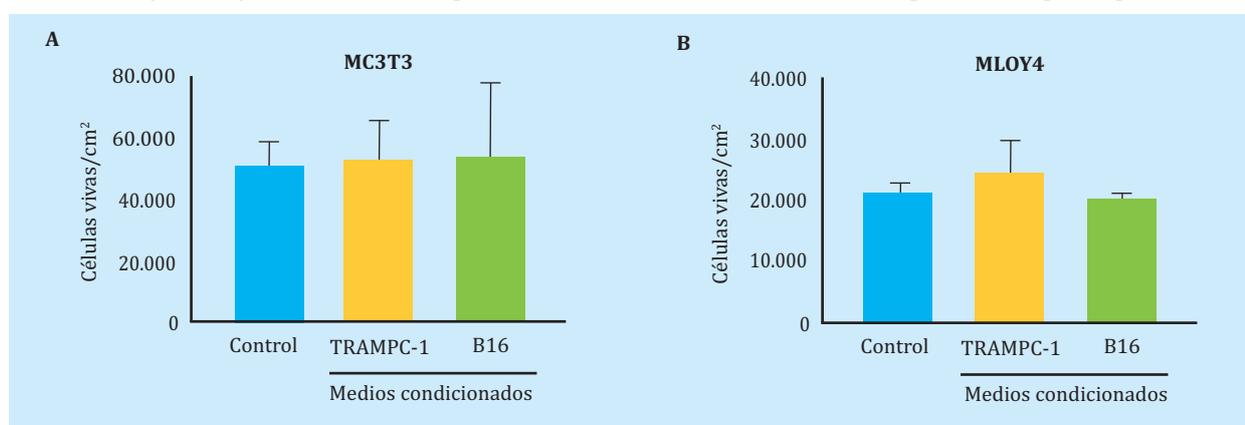
La comunicación mediante factores solubles entre células tumorogénicas de mama y células óseas regula la expresión de genes de remodelado en osteoblastos

A continuación, analizamos los efectos de células de otro tipo de tumor que metastatiza a hueso, como es el de mama⁵, sobre la expresión génica de células óseas. En este caso, analizamos los efectos del secretoma de la línea tumoral humana de cáncer de mama MDA-MB-231 sobre osteoblastos humanos (Figura 1). Observamos que los medios condicionados de células MDA-MB-231 causaron un incremento en la expresión de RANK-L y una disminución de la relación OPG/RANK-L, sin afectar a la expresión de OPG o de Runx2 en osteoblastos humanos (Figura 3A-D). Los efectos sobre la expresión génica de osteoblastos fueron similares utilizando los secretomas de MDA-MB-231, tanto pre-tratados como no pre-tratados con medios condicionados de osteoblastos humanos (Figura 4A-C).

Tabla 1. Primers utilizados en los análisis de PCR a tiempo real

Gene	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
RANK-L	TGTACTTTCGAGCGCAGATG	AGGCTTGTTCATCCTCCTG
OPG	CAGAGCGAAACACAGTTTG	CACACAGGGTGACATCTATTC
Osteocalcin	GCAATAAGGTAGTGAACAGACTCC	CCATAGATGCGTTTGTAGGCGG
Runx2	CCTGAACCTCTGCACCAAGTCCT	TCATCTGGCTCAGATAGGAGGG

Figura 2. Los factores solubles secretados por melanocitos tumorogénicos de ratón (B16) o células tumorales prostáticas de ratón (TRAMPC-1) no afectan a la viabilidad de células óseas murinas pre-osteoblásticas (MC3T3-E1) u osteocíticas (MLO-Y4) Los datos están representados como la media ± SEM de 2 experimentos por triplicado



La comunicación mediante factores solubles entre células tumorogénicas de próstata y células óseas regula la expresión de genes de remodelado y osteogénicos en osteocitos
 Seguidamente, quisimos comprobar si las células de tumor de próstata, potencialmente capacitadas para metastatizar a hueso^{20,21}, también establecían comunicación con células óseas mediante factores solubles (Figura 1). En este caso, observamos que los secretomas de células de adenocarcinoma de próstata de ratón TRAMP-C1 indujeron sobreexpresión de los genes OPG y RANK-L, causando un aumento en la relación OPG/RANK-L, además de sobreexpresar el factor de transcripción osteogénico Runx2 en osteocitos MLO-Y4 (Figura 5A-D). Dada la sobreexpresión génica de Runx2 en estas células, quisimos comprobar si la proteína osteocalcina, una proteína asociada a formación ósea y regulada por Runx2²², también sufría cambios en estas condiciones. De modo similar a Runx2, la expresión de osteocalcina aumentó tras estimulación con el secretoma de las células TRAMP-C1 en osteocitos MLO-Y4 (Figura 5E).

De manera similar a los datos observados con los secretomas de células de melanoma B16, los medios condicionados de células TRAMP-C1 no afectaron a la expresión génica de los marcadores previamente mencionados en osteoblastos MC3T3-E1 (Figura 5F-J).

DISCUSIÓN

La formación de un microambiente que favorezca la implantación de células tumorales circulantes fue descrita por Kaplan. Sus resultados demostraron la formación de un nicho pre-metastásico, en el cual se observaron una serie de cambios moleculares y celulares en el pulmón previo al establecimiento del melanoma metastásico^{15,23}.

Posteriormente, otros investigadores describieron una serie de eventos secuenciales que podría implicar la formación de un nicho pre-metastásico en el hígado, sugiriendo la implicación de exosomas derivados de lesiones pancreáticas malignas como desencadenantes del proceso¹⁴. En este sentido, poco ha sido descrito sobre la formación del nicho pre-metastásico óseo y se desconoce las respuestas de las distintas subpoblaciones óseas a la estimulación por secretomas de distintos tumores con alta frecuencia metastásica a hueso. En el presente artículo, mostramos por primera vez como el secretoma de tumores sólidos, con alto potencial organotrópico en la formación de metástasis óseas, modifica la expresión génica de genes relacionados con el metabolismo óseo en células de linaje osteogénico, pudiendo ser el proceso desencadenante en la inducción de un microambiente favorable para el asentamiento de células tumorales.

Recientemente, se ha sugerido que las células del tumor primario producen factores solubles tumorales que disparan la formación del nicho pre-metastásico inmaduro²⁴. Nuestros resultados confirman que los secretomas tumorales de las células de tumor primario (como melanoma y de próstata), o las células tumorales de mama derivadas de procesos metastásicos no óseos, modifican principalmente el equilibrio entre los niveles de expresión de OPG y RANKL. Este desequilibrio desacoplaría la relación entre formación ósea osteoblástica y la resorción ósea osteoclástica, generando la liberación de factores de crecimiento y citoquinas e iniciándose de este modo un "ciclo vicioso previo" de retroalimentación que fomente la formación de las futuras zonas metastásicas en hueso¹⁰. En este sentido, nuestros resultados sugieren al osteocito como la célula más susceptible a los factores solubles tumorales. En nuestro modelo

Figura 3. Los factores solubles secretados por melanocitos tumorigénicos (B16) modifican la expresión de genes de remodelado óseo en osteocitos (MLO-Y4) pero no en pre-osteoblastos (MC3T3-E1). La expresión de OPG (A,E), RANK-L (B,F), *ratio* OPG/RANK-L (C,G) y Runx2 (D,H) se evaluó mediante PCR a tiempo real tras estimular 24 h MLO-Y4 y MC3T3-E1 con medio condicionado de B16 pre-tratadas o no. Los datos están representados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes por triplicado. * $p < 0,05$ vs. control, ** $p < 0,01$ vs. control

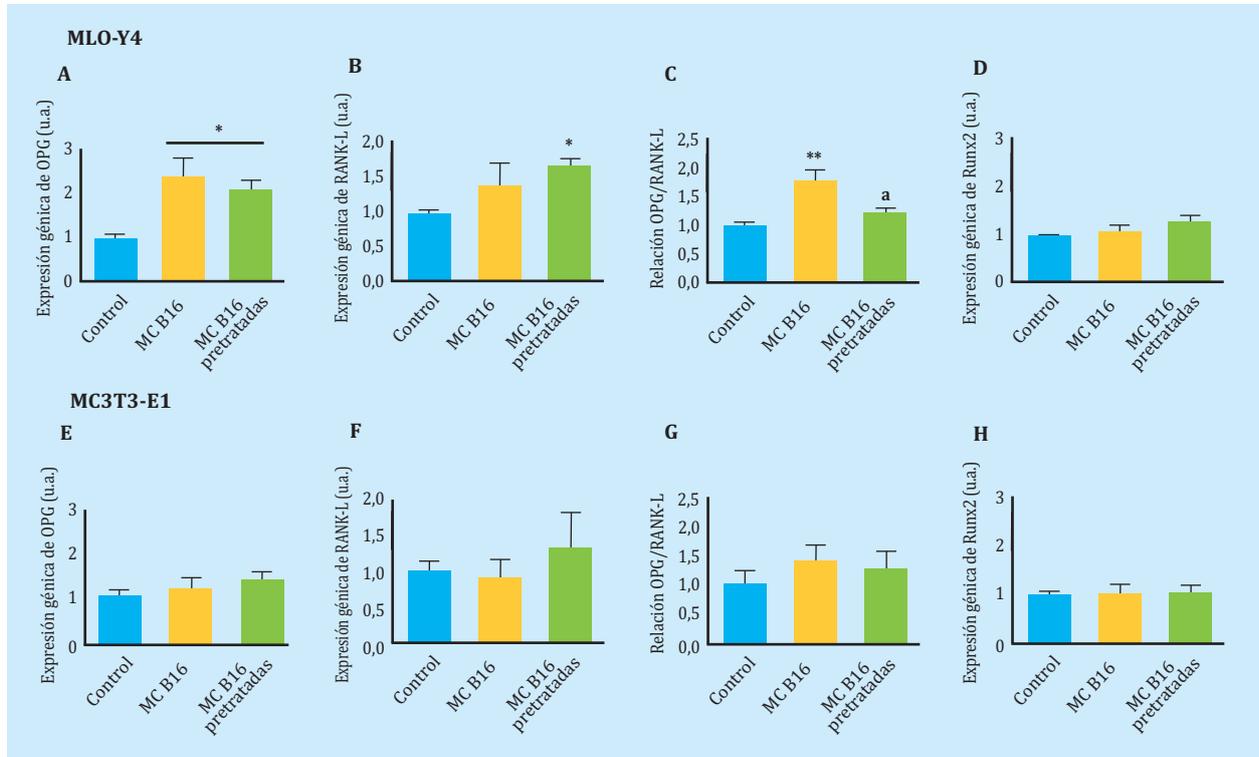


Figura 4. Los factores solubles secretados por células tumorales de cáncer de mama (MDA-MB-231) modifican la expresión de genes de remodelado óseo en osteoblastos humanos (hFOB 1.19). La expresión de OPG (A), RANK-L (B), *ratio* OPG/RANK-L (C) y Runx2 (D) se evaluó mediante PCR a tiempo real tras estimular 24 h los osteoblastos humanos con medio condicionado de MDA pre-tratadas o no. Los datos están representados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes por triplicado. * $p < 0,05$ vs. control

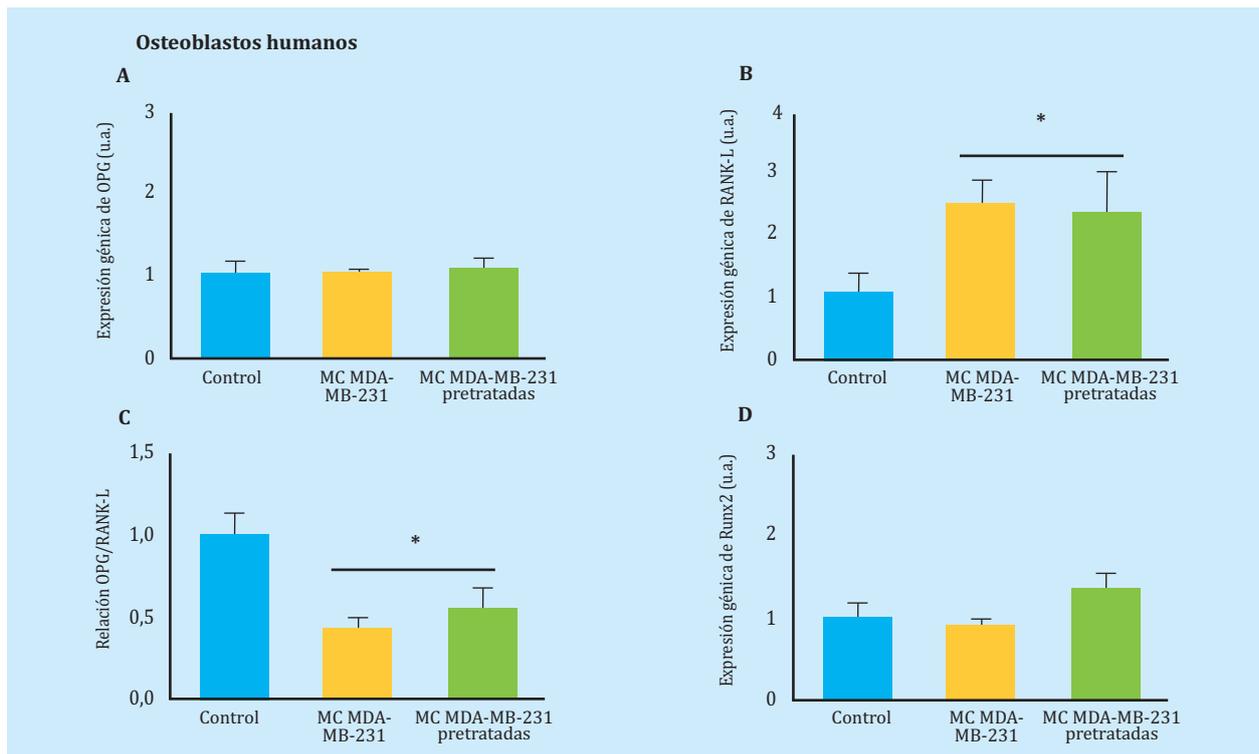
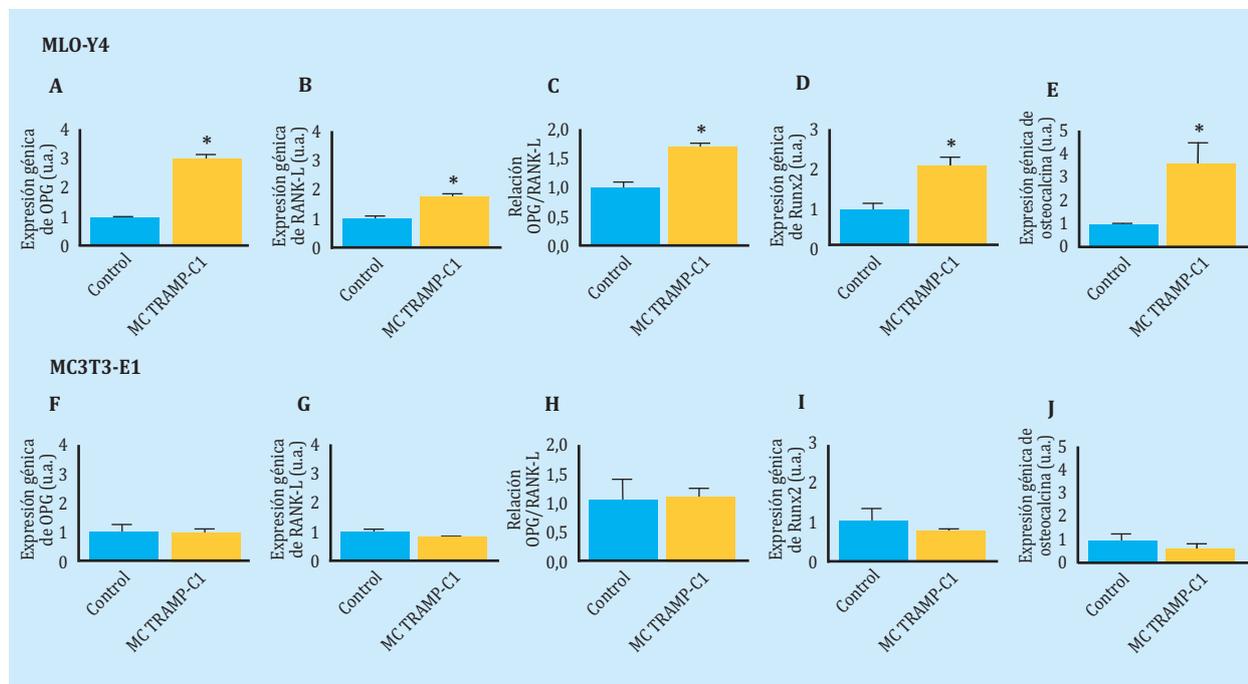


Figura 5. Los factores solubles secretados por células tumorales prostáticas (TRAMP-C1) modifican la expresión de genes de remodelado óseo en osteocitos (MLO-Y4) pero no en pre-osteoblastos (MC3T3-E1). La expresión de OPG (A,F), RANK-L (B,G), *ratio* OPG/RANK-L (C,H), Runx2 (D,I) y osteocalcina (E,J) se evaluó mediante PCR a tiempo real tras estimular 24 h MLO-Y4 y MC3T3-E1 con medio condicionado de TRAMP-C1. Los datos están representados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes por triplicado. * $p < 0,05$ vs. control

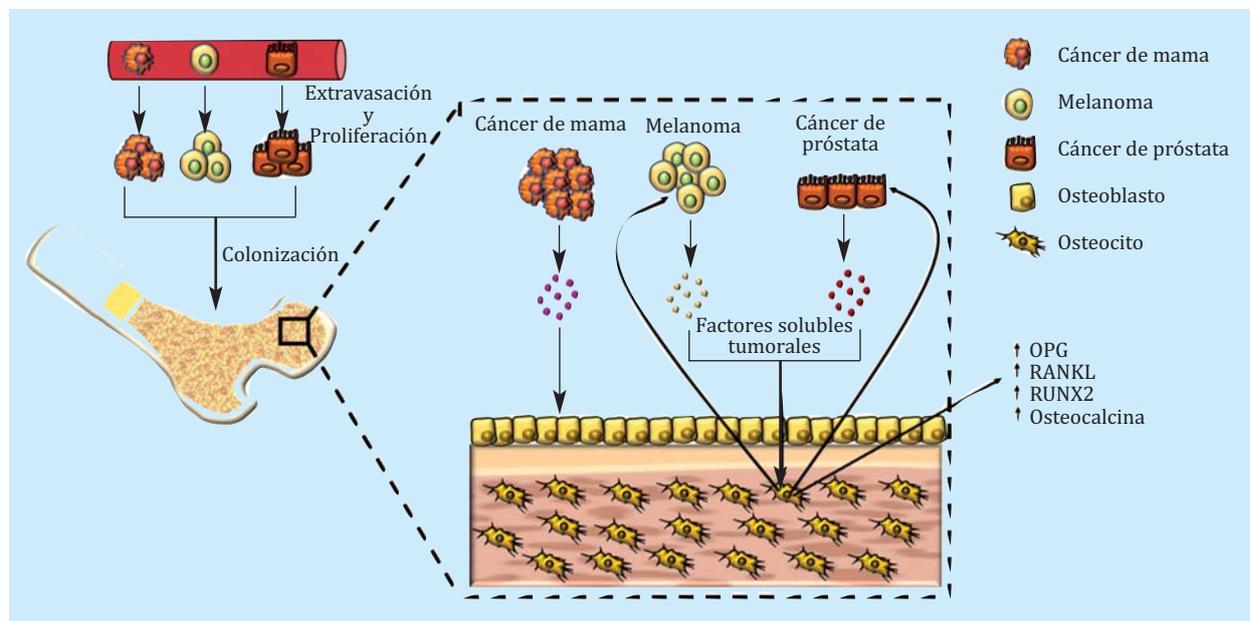


experimental *in vitro*, en el que tratamos tanto células osteocíticas como células osteoblásticas de ratón con medios condicionados de células murinas de tumor primario de melanoma y de próstata, observamos cambios significativos en la expresión génica de la línea osteocítica sin observar cambios significativos en la línea osteoblástica. Estas observaciones nos hacen concluir que, aunque ambos tipos de tumor generarán en un futuro distintos tipos de metástasis, siendo las derivadas de melanoma con un carácter más osteolítico²⁵ y las de adenocarcinoma prostático preferentemente osteoblástico, las etapas iniciales, en las cuales se producen alteraciones en la fisiología de las células óseas, son comunes. Estas observaciones sugieren que las modificaciones que se originen en el nicho pre-metastásico no predisponen al tipo concreto de lesiones esqueléticas que se desarrollarán en la enfermedad metastásica.

De manera destacada, sugerimos al osteocito como principal célula diana de los factores solubles tumorales. Dado que no existe ningún modelo de célula osteocítica humana de linaje continuo, no pudimos corroborar los resultados obtenidos por el secretoma de melanoma y cáncer de próstata en comparación con el secretoma de cáncer de mama en estas células. El estudio de los cambios inducidos por el secretoma de células de cáncer de mama sobre células óseas se limitó a los efectos en la línea continua osteoblástica humana hFOBs. Los resultados obtenidos sugieren que las células del cáncer de mama son capaces de afectar a los osteoblastos mediante factores solubles y que modulan principalmente la expresión génica de RANK-L sin necesidad de mantener comunicación cruzada con estas células, confirmando la alteración del eje OPG/RANKL, al igual que los cambios inducidos por los otros secretomas tumorales estudiados. Dado que los osteocitos son las células mayoritarias en hueso, con una vida media de 25 años, con carácter multifuncional y papel de director-coordinador del entorno

óseo^{26,27}, su modulación, ya sea farmacológica o como diana terapéutica, podría ser clave para evitar la formación del nicho pre-metastásico y con ello la metástasis ósea. Se ha propuesto que son los osteocitos, y no el resto de células del linaje osteogénico, la principal fuente que requieren los osteoclastos para su formación y activación en el remodelado del hueso trabecular^{28,29}, pudiendo ser también las únicas responsables de iniciar el ciclo vicioso del proceso metastásico óseo. Pocos estudios han establecido un papel claro del osteocito y su relación con el cáncer. En este sentido, Delgado-Calle y cols. demostraron que los osteocitos podrían ser reguladores de la proliferación de las células de cáncer de tipo mieloma por interacción directa con ellas a través de sus prolongaciones citoplasmáticas, las cuales son capaces de alcanzar las superficies periósticas y endocorticales, así como la superficie de médula ósea³⁰. Esta interacción directa resultaría en la activación de la vía de señalización de Notch en las células de mieloma. Esta vía media la comunicación célula a célula, y participa en el control y activación de programas de proliferación celular y muerte. Su inhibición farmacológica, utilizando un inhibidor de dicha vía, evitó la proliferación del mieloma inducida por osteocitos³⁰. Además de regular y coordinar al resto de estirpes celulares en el entorno óseo, los osteocitos podrían secretar factores que alcancen a células lejanas, como, por ejemplo, células de tumor primario, y las modifiquen. Esta comunicación se ha sugerido en el caso del adenocarcinoma prostático, donde células osteocíticas y osteoblásticas regulaban sus propiedades osteomiméticas²¹. Además, esta comunicación podría modular vías de señalización claves en las células prostáticas tumorales, como los mediadores intracelulares calcio, AMP cíclico y ERK $\frac{1}{2}$ ³¹, pudiendo potenciar la progresión tumoral del cáncer de próstata al hueso. Todos estos resultados, junto con los resultados mostrados en el presente artículo, sugieren que en la comunicación cruzada

Figura 6. Los secretomas tumorales modifican el entorno óseo, siendo los osteocitos las células más sensibles a estos cambios. Los factores solubles secretados por los tumores de próstata y melanoma son los que afectan principalmente al osteocito, incrementando la expresión génica de diferentes factores relacionados con el remodelado óseo. A su vez, los osteocitos secretan factores que modifican e inducen un mayor fenotipo osteomimético en las propias células tumorales



entre el tumor primario y células óseas la composición de los factores implicados en el secretoma puede ir variando. Durante la evolución del tumor, los factores solubles tumorales podrían alcanzar el entorno óseo e inducir cambios en sus células. Estas células también podrían enviar factores solubles al tumor primario, que generarán cambios en las células tumorales induciéndolas un mayor fenotipo osteomimético. El secretoma de estas células tumorales osteomiméticas (en las figuras presentadas como medios condicionados pre-tratados), al alcanzar de nuevo el entorno óseo, podría afectar en el mismo sentido o inducir distintas variaciones del microambiente cambiante hacia la formación del nicho. En este sentido, en el análisis proteómico del secretoma de dos líneas continuas tumorales prostáticas con origen distinto, DU145 (procedentes de metástasis cerebrales) y PC-3 (procedentes de metástasis óseas) se encontraron 211 proteínas de secreción diferencialmente expresadas, lo que supuso un 37,6% del total de proteínas analizadas, indicando que las proteínas de secreción fueron considerablemente diferentes entre ambas líneas celulares³². En base a estas investigaciones y a nuestros resultados proponemos que los secretomas tumorales modifican el entorno óseo, siendo más sensible la línea osteocítica (Figura 6). Los resultados mostrados abren un amplio campo de estudio en el conocimiento de la comunicación entre las células tumorales primarias y las células del futuro órgano metastásico, en este caso, el microambiente óseo. No obstante, se debería profundizar en su conocimiento, debido a las limitaciones del presente estudio. Como se ha comentado previamente se han evitado efectos inespecíficos como resultado de emplear cultivos celulares de especies distintas, y se ha empleado un modelo celular *in vitro* basado en líneas celulares ampliamente uti-

lizadas como referente para el estudio del metabolismo y la fisiología ósea, en el caso de las MC3T3, MLOY-4 y hFOBs; así como en el estudio del cáncer, en el caso de las células tumorales prostáticas, de melanoma o mama. Con respecto a la línea tumoral de mama (MDA-MB-231 HTB-26), una de las limitaciones que tiene su uso en modelos *in vitro* es su origen metastásico³³ pudiéndose ver alterado su comportamiento como tumor primario y con ello la comunicación organotrófica metastásica. Por este motivo, se han estudiado las otras dos líneas tumorales con organotropismo metastásico óseo cuyo origen proviene de tumores primarios. Sin embargo, sería recomendable confirmar los resultados obtenidos en el presente trabajo en un modelo de experimentación *in vivo* donde se pueda estudiar y confirmar los cambios acontecidos en el microambiente óseo previo al establecimiento de la metástasis, cuantificando en el suero/plasma las citoquinas óseas alteradas y determinando la temporalidad de la comunicación del hueso y el tumor primario así como el nivel de cambio en el tejido óseo. El conocimiento más detallado de los cambios moleculares que implican la formación del nicho pre-metastásico óseo, así como de los factores del secretoma que lo inducen, podría aportar nuevas dianas terapéuticas o protocolos de actuación, mejorando así su pronóstico. Estas actuaciones disminuirían los eventos esqueléticos metastásicos que desarrollan los pacientes con tumores sólidos como el de próstata o el de mama, incrementando así su calidad de vida.

Financiación: Este trabajo se realizó gracias a proyectos del CEU San Pablo-Santander (USP-BS-PPC 11/2012, USPB-BS-APP-2/2016 y MERMERG-2), y a la BECA 2017 FEIOMM Básica.



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

Bibliografía

1. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev.* 1989;8:98-101.
2. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001;410:50-6.
3. Zhou, W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell.* 2014; 25:501-15.
4. Lu X, Kang Y. Organotropism of breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2007;12:153-62.
5. Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. Cancer to bone: A fatal attraction. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:411-25.
6. Ell B, Kang Y. Snapshot: bone metastasis. *Cell.* 2012;151:690-690.e1
7. Guise TA. The vicious cycle of bone metastases. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002;2:570-2.
8. Bagi CM. Targeting of therapeutic agents to bone to treat metastatic cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:995-1010.
9. Guise TA. Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Cancer.* 2000;88:2892-8.
10. Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA. Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther.* 2007;6:2609-17.
11. Käkönen SM, Mundy GR. Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. *Cancer.* 2003;97:834-9.
12. Yoneda T. Cellular and molecular mechanisms of breast and prostate cancer metastasis to bone. *Eur J Cancer.* 1998;34:240-5.
13. Urwin GH, Percival RC, Harris S, Beneton MN, Williams JL, Kanis JA. Generalised increase in bone resorption in carcinoma of the prostate. *Br J Urol.* 1985;57:721-3.
14. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol.* 2015;17:816-26.
15. Kaplan R, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR-1 positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* 2005; 438:820-7.
16. Kan C, Vargas G, Pape FL, Clézardin P. Cancer cell colonisation in the bone microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10):E1674.
17. Yu KJ, Li JK, Lee YC, Yu G, Lin SC, Pan T, et al. Cabozantinib-induced osteoblast secretome promotes survival and migration of metastatic prostate cancer cells in bone. *Oncotarget.* 2017;8(43): 74987-5006.
18. Scheerlinck JP. Functional and structural comparison of cytokines in different species. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;72:39-44.
19. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2001 May; Appendix 3: Appendix 3B.
20. Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, Finegold MJ, et al. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res.* 1996; 56:4096-102.
21. Ardura JA, Gutiérrez-Rojas I, Álvarez-Carrión L, Rodríguez-Ramos MR, Pozuelo JM, Alonso V. The secreted matrix protein mindin increases prostate tumor progression and tumor-bone crosstalk via ERK 1/2 regulation. *Carcinogenesis.* 2019;40(7):828-39.
22. Alonso V, de Gortázar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol.* 2008;217:717-27.
23. Kaplan RN, Psaila B, Lyden D. Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;25:521-9.
24. Liu Y, Cao X. Characteristics and significance of the pre-metastatic niche. *Cancer Cell.* 2016;30(5):668-81.
25. Mohammad KS, Javelaud D, Fournier PG, Niewolna M, McKenna CR, Peng XH, et al. TGF- β -RI kinase Inhibitor SD-208 reduces the development and progression of melanoma bone metastases. *Cancer Res.* 2011;71(1):175-84.
26. Atkinson EG, Delgado-Calle J. The emerging role of osteocytes in cancer in bone. *JBM Plus.* 2019;3(3):e10186.
27. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229-38.
28. Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, et al. Osteocytes, not osteoblasts or lining cells, are the main source of the RANKL required for osteoclast formation in remodeling bone. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138189.
29. Compto, JT, Lee FY. A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. *J Bone Joint Surg Am.* 2014;96(19):1659-68.
30. Delgado-Calle J, Anderson J, Gregor MD, Hiasa M, Chirgwin JM, Carlesso N, et al. Bidirectional Notch signaling and osteocyte-derived factors in the bone marrow microenvironment promote tumor cell proliferation and bone destruction in multiple myeloma. *Cancer Res.* 2016;76:1089-100.
31. Ardura JA, Gutiérrez-Rojas I, Álvarez-Carrión L, Friedman PA, Alonso V. Factors secreted by bone cells induce intracellular calcium accumulation and cyclic AMP and activation of ERK 1/2 in prostate cancer cells; evaluation by fluorescence techniques in living cells. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2018;10 (4):131-8.
32. Kwon OK, Jeon JM, Sung E, Na AY, Kim SJ, Lee S. Comparative secretome profiling and mutant protein identification in metastatic prostate cancer cells by quantitative mass spectrometry-based proteomics. *Cancer Genomics Proteomics.* 2018;15(4):279-90.
33. Ali R, Samman N, Al Zahrani H, Nehdi A, Rahman S, Khan AL, et al. Isolation and characterization of a new naturally immortalized human breast carcinoma cell line, KAIMRC1. *BMC Cancer.* 2017; 17(1):803.

Fractura vertebral transversal metastásica por cáncer de pulmón

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000300006>

Molina Almela C¹, Sánchez Pardo M², Rueda Cid A¹, Campos Fernández C¹, Calvo Català J¹

1 Servicio de Reumatología

2 Servicio de Neurocirugía

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia - Valencia (España)

Fecha de recepción: 25/04/2019 - Fecha de aceptación: 31/05/2019

Paciente de 58 años con artritis reumatoide en remisión con metotrexate a dosis de 10 mg/semanales. Acude a Urgencias hospitalarias en varias ocasiones por episodio de lumbalgia aguda de un mes de evolución. En la radiografía lumbar hay una fractura transversal L4 con retroimpulsión de muro posterior (Figura 1) que pasa desapercibida. La lumbalgia se hace incapacitante con pérdida de función de la pierna izquierda. Se realiza resonancia magnética lumbar en T2 y STIR (Figuras 2a y 2b), que muestra fractura aguda-subaguda de soma vertebral L4 con edema de pedículos y moderado desplazamiento intracanal de la mitad inferior del muro posterior que comprime la raíz nerviosa eferente izquierda y ocupa parcialmente el receso lateral. Con la sospecha de etiología tumoral, ingresa para estudio. En el TAC torácico aparece una gran tumoración cavitada en lóbulo superior derecho que comunica con bronquio principal ipsilateral asociado a neumonitis y bronquiectasias perilesionales (Figura 3). El estudio histológico de la lesión pulmonar fue de carcinoma de pulmón de célula grande PD-L1 positivo 80%. Se realizó vertebroplastia. Inició tratamiento con pembrolizumab con buena respuesta hasta el momento. La artritis reumatoide se mantiene en remisión a pesar del tratamiento con anti PDL1.

Presentamos un caso de fractura vertebral transversal secundaria a metástasis por cáncer de pulmón. Estas fracturas son muy infrecuentes y a menudo pasan desapercibidas. Pueden aparecer en pacientes con una espondilitis anquilosante y fusión vertebral¹, pero fuera de este contexto son altamente sugestivas de neoplasia subyacente. Los principales tumores a considerar son mieloma o metástasis de próstata, mama o pulmón. Otros tumores primarios menos frecuentes son riñón, colon, piel o tiroides^{2,3}.

Figura 1. Radiografía lumbar lateral. Se observa una fractura transversal L4 con retroimpulsión de muro posterior



Correspondencia: Clara Molina Almela (molina_claalm@gva.es)

Figuras 2a y 2b. RMN lumbar en T2 y STIR que muestra fractura aguda-subaguda de soma vertebral L4 con edema de pedículos y moderado desplazamiento intracanal de la mitad inferior del muro posterior que comprime la raíz nerviosa eferente izquierda y ocupa parcialmente el receso lateral

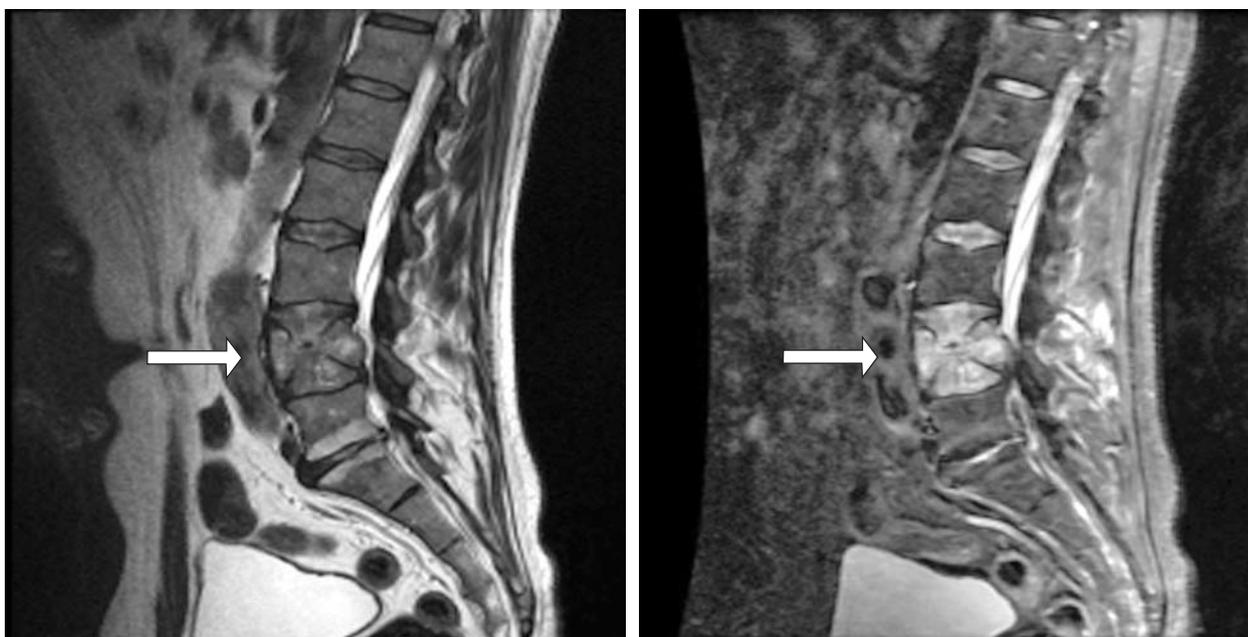
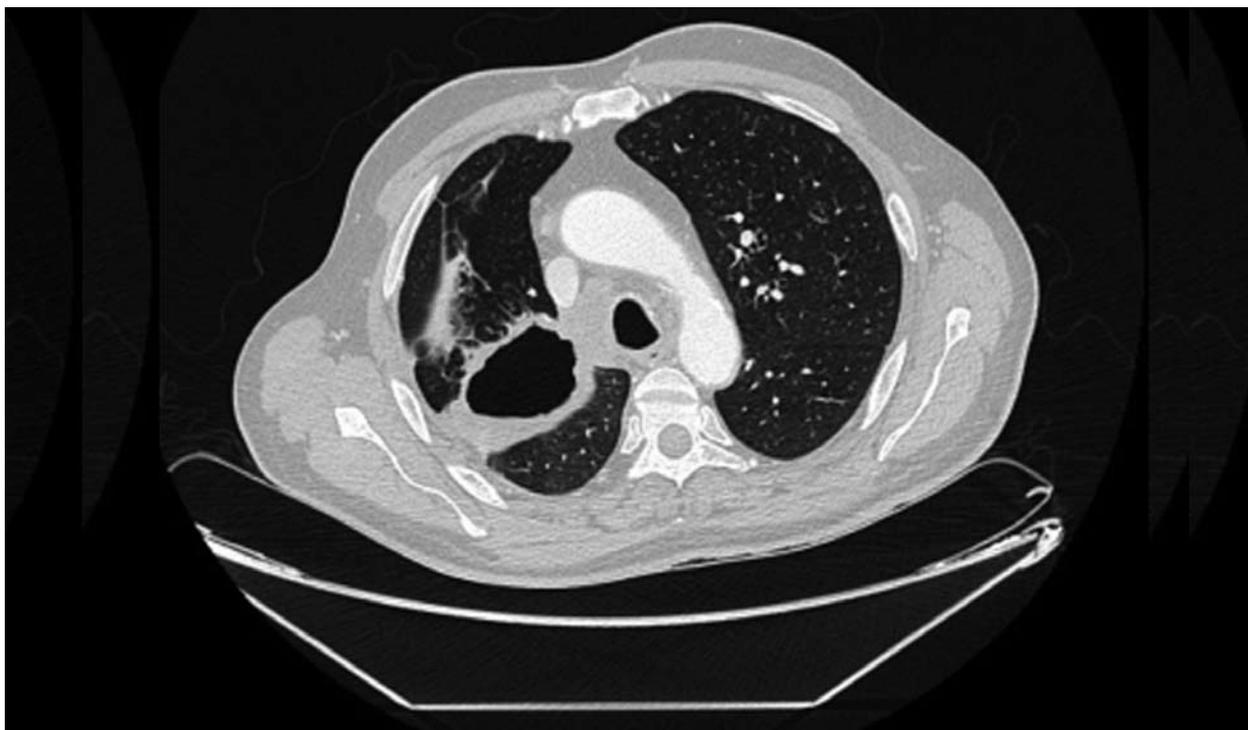


Figura 3. TAC torácico que muestra una gran tumoración cavitada en lóbulo superior derecho



►► Conflicto de intereses: Lo autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Glace B, Dubost JJ, Ristori JM, Irthum B, Chazal J, Soubrier M. Transversal fractures in spinal ankylosis: a case series of 17 patients. *Rev Med Interne*. 2011;32(5):283-6.
2. Resnick D, Kransdorf M. Skeletal metastases (Chapter 72). En: Resnick D, Kransdorf M, Eds. *Bone and Joint imaging*. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2004. p.1249-1267.
3. Civantos Modino S, Navea Aguilera C, Pavón de Paz I, Almodovar Ruiz F, Elviro Peña MR. Metástasis óseas y compresión medular como debut de carcinoma folicular de tiroides. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2012;4(4):141-4.

Vitamina D e insuficiencia cardíaca. Fisiopatología, prevalencia, y asociación pronóstica

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000300007>

Groba Marco MV¹, García Quintana A¹, Galván Ruíz M¹, Rúa-Figueroa Erausquín D¹, Sosa Henríquez M²

¹ Servicio de Cardiología - Hospital Universitario Dr. Negrín - Las Palmas de Gran Canaria (España)

² Departamento de Ciencias Médico-Quirúrgicas - Universidad de Las Palmas de Gran Canaria - Unidad Metabólica Ósea - Hospital Insular - Las Palmas de Gran Canaria (España)

INTRODUCCIÓN

La insuficiencia cardíaca (IC) es un problema de primer orden de salud pública caracterizado por una elevada mortalidad, hospitalizaciones frecuentes y deterioro de la calidad de vida, con una prevalencia e incidencia que está aumentando en todo el mundo^{1,2}. Aunque el pronóstico ha mejorado en las últimas décadas gracias a la mejoría diagnóstica y terapéutica de las enfermedades cardiovasculares, la morbimortalidad de estos pacientes sigue siendo elevada³. Todo ello conlleva que se sigan necesitando nuevos objetivos y opciones de tratamiento.

Tradicionalmente, la vitamina D se había asociado únicamente con la salud ósea, aceptándose que la deficiencia de vitamina D provocaba osteomalacia y osteoporosis en adultos y raquitismo en los niños^{4,5}. Sin embargo, datos obtenidos en los últimos años indican que la vitamina D es un importante micronutriente para una función óptima de muchos órganos y tejidos en todo el cuerpo, incluidos el sistema cardiovascular^{6,7}. Se ha sugerido que la deficiencia de vitamina D puede ser un factor importante tanto en la génesis de factores de riesgo y enfermedad cardiovascular⁷ como marcador pronóstico en la IC. Datos fisiopatológicos indican que el déficit de vitamina D puede ser muy perjudicial para los pacientes afectados de IC, y que el abordaje terapéutico con suplementación de vitamina D puede ser potencialmente beneficioso, aunque todo ello no está exento de controversia⁸.

En este artículo revisamos la evidencia que hasta el momento respalda el vínculo entre la vitamina D y la IC, analizamos los potenciales mecanismos a través de los cuales la vitamina D podría ejercer sus efectos cardioprotectores y los potenciales efectos deletéreos de su déficit, y desglosamos los principales estudios sobre suplementación con vitamina D en pacientes con IC.

FISIOPATOLOGÍA DE LA VITAMINA D E INSUFICIENCIA CARDÍACA

No existe una única vía establecida ni una hipótesis única que explique la relación entre vitamina D e IC. El receptor de la vitamina D (RVD) es un receptor hormonal nuclear que media la acción del calcitriol a través de vías genómicas y no genómicas⁹. Los cardiomiocitos tienen RVD, y se conoce que el calcitriol mediante el RVD también modula importantes genes relacionados con la salud cardiovascular, por lo que pueden estar influenciados por la vitamina D¹⁰.

Los RVD funcionales se expresan en el núcleo celular o adyacente a los túbulos T de los cardiomiocitos, y también de fibroblastos cardíacos. La hipertrofia cardíaca se ha asociado con un aumento de la expresión de estos receptores en estas células. También se ha atribuido a la vitamina D una propiedad antiproliferativa mediada por la supresión de proto-oncogenes como el c-myc, así como del péptido natriurético, actuando directamente sobre el crecimiento y la diferenciación de los cardiomiocitos. Ratones sin RVD (*knock-out* del gen VDR) muestran una mayor deposición de colágeno en sus estructuras cardíacas¹⁰.

Asimismo, existen mecanismos moleculares de mayor complejidad que pueden explicar la relación entre la vitamina D y la IC. La vitamina D actúa sobre los canales del calcio de los cardiomiocitos induciendo una rápida entrada de calcio intracelular¹¹. Esta concentración intracelular de calcio controla respuestas a largo plazo de crecimiento, proliferación y muerte celular. Además, mediante la activación de la proteína C-kinasa, promueve la relajación del cardiomiocito y, por tanto, participa en la función diastólica cardíaca¹² y en la sístole cardíaca mediante la activación de la adenil-ciclase o la adenosin-monofosfato cíclica. La disfunción de cualquiera de estas vías puede producir disfunción ventricular sistólica y/o diastólica, y, en consecuencia, IC.

En la fisiopatología de la vitamina D e IC participan de manera clave varios sistemas neuroendocrinos y las citoquinas inflamatorias. Estos se activan para mantener la homeostasis circulatoria, pero a largo plazo contribuyen al aumento de las resistencias sistémicas y remodelado ventricular, desarrollando y empeorando la IC. Si bien el sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) y el sistema nervioso simpático (SNS) han sido hasta el momento los más importantes en la IC, recientemente, tanto a nivel diagnóstico como terapéutico, sistemas contrarreguladores como los péptidos natriuréticos también están siendo claves en el abordaje diagnóstico-terapéutico de este síndrome^{13,14}.

Se ha demostrado que la vitamina D tiene una íntima relación con el SRAA. Distintos estudios han demostrado que existe una correlación inversa entre los niveles de vitamina D y la actividad del SRAA¹⁵⁻¹⁷. Entre las principales acciones del SRAA se incluye la regulación del tono vascular, de la volemia, la remodelación ventricular y vascular y la activación del SNS; estando bien definido el papel clave del SRAA en la fisiopatología de la IC y de la hipertensión arterial.



La cascada de acción y fisiopatología del SRAA es la siguiente: la renina es una proteína que actúa sobre el angiotensinógeno, produciendo angiotensina I, que se transforma en angiotensina II por la acción de la enzima convertidora de la angiotensina a nivel pulmonar y vascular. La angiotensina II es una hormona potente vasoconstrictora de las arteriolas renales aferentes y eferentes, y también promueve la activación del sistema nervioso simpático (así mismo clave en la fisiopatología de la IC). La sobreactivación del SNS y del SRAA contribuye al progresivo remodelado cardíaco que puede llevar a IC. Esta hormona a su vez favorece también la liberación de aldosterona de la corteza suprarrenal, importante en el equilibrio electrolítico y volémico al retener sodio y agua y liberar potasio y magnesio a nivel renal¹⁸.

Aunque uno de los principales factores que estimulan la liberación de renina y por tanto el SRAA es la disminución de la perfusión renal, estudios experimentales han demostrado que tras modificar la función del RVD en animales experimentales con ratones RVD *knock-out* se objetiva un aumento de la concentración de la expresión de renina con aumento del RNAm y de su proteína en el riñón, y de la angiotensina II plasmática, en comparación con ratones *wil-type*¹⁵. En consecuencia, estos ratones *knock-out* desarrollaban más hipertensión arterial, hipertrofia ventricular izquierda y un aumento de retención de líquido. La inyección de 1,25(OH)₂D lograba una supresión marcada de la renina, que también se lograba con el uso del inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, captopril, o el antagonista del receptor de la angiotensina II, losartán; lo cual mostraba el papel fisiopatológico clave del SRAA^{15,19}, demostrando que la causa probable de ello es la sobreestimulación del SRAA²⁰. El papel de la angiotensina II en el aumento de la fibrosis e hipertrofia cardíaca, aumento del tono vascular y por tanto tensión arterial, así como aumento del tono simpático, y relación directa con los síntomas y progresión de la insuficiencia cardíaca en humanos, está también claramente establecido.

La deficiencia de vitamina D se ha relacionado con un incremento de producción y liberación de citoquinas inflamatorias, que conlleva un efecto negativo indirecto y directo sobre el corazón y otros órganos. Las citoquinas inflamatorias inducen la apoptosis de cardiomiocitos, hipertrofia, fibrosis, remodelado cardíaco y alteraciones iónicas negativas como una retención del sodio y, por tanto, retención de líquidos²¹. También aumenta la actividad catabólica e induce caquexia, lo que contribuye a la progresión del síndrome de IC²². Estudios *in vitro* han sugerido que la vitamina D inhibe citoquinas inflamatorias como la TNF- α y la IL-6, mientras que estimula citoquinas antiinflamatorias como la IL-10²³.

Los RVD también están presentes en la glándula paratiroides, y el calcitriol suprime la producción de hormona paratiroidea (PTH) e impide la proliferación de glándulas paratiroides²⁴. Cuando existe una deficiencia de vitamina D se produce un hiperparatiroidismo secundario, que también conlleva efectos deletéreos cardiovasculares y tróficos en los cardiomiocitos. Este aumento de niveles de PTH conlleva también un aumento de la presión arterial por aumento de la rigidez arterial y contribuye, por tanto y una vez más, al remodelado cardíaco en la IC secundario a la hipertrofia, apoptosis y fibrosis del ventrículo^{10,25}.

Otro mecanismo fisiopatológico es la influencia de la vitamina D en la regeneración de la matriz extracelular

del miocárdico, otra vía por la que puede resultar dañina para la estructura y función cardíaca. Estudios experimentales con ratones RVD *knock-out*, han demostrado que la ausencia de vitamina D se asocia a un incremento de la expresión y actividad de las metaloproteinasas de la matriz miocárdica (MMP), que resulta en remodelado miocárdico, incremento del depósito de colágeno y mayor fibrosis^{26,27}. La vitamina D modula la regeneración de la matriz extracelular del miocardio actuando sobre la expresión de ambas metaloproteinasas (MMP) de matriz que hidrolizan proteínas de la matriz extracelular (ECM) e inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP). En ratones RVD *knock-out*, la expresión desequilibrada de MMP/TIMP se caracterizó por la regulación positiva de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 negativa de TIMP-1 y TIMP-3. El desequilibrio entre MMP y TIMP promovió la destrucción de tejido miocárdico y remodelado ventricular; todo ello íntimamente relacionado con los procesos complejos de iniciación y progresión IC diastólica y sistólica²⁸. También cabe señalar que se ha objetivado que determinadas citoquinas inflamatorias como la TNF-alfa también son un importante regulador de la actividad de las MMP, y pueden contribuir a esta vía fisiopatológica²⁹.

La enfermedad arterial coronaria es un importante factor para el desarrollo de IC, y el déficit de vitamina D se ha relacionado con un aumento de la arteriosclerosis y calcificación de las arterias coronarias^{1,9,27,30}. Esta observación es consistente con la relación inversa objetivada entre los niveles de vitamina D y la calcificación de las arterias coronarias^{6,30,31}. Está documentado que las células endoteliales también expresan RVD, y que la vitamina D aumenta la actividad de óxido nítrico *in vitro*³², mejora la producción del factor de crecimiento endotelial vascular³³ y reduce la agregación plaquetaria endotelial³⁴. Finalmente, existe evidencia de que la deficiencia de vitamina D puede ser un factor importante regulador del sistema cardiorrenal. Como hemos destacado previamente, el sistema cardiovascular y el renal están íntimamente relacionados, de tal manera que alteraciones en el funcionamiento de uno puede deteriorar progresivamente al otro³⁴.

Cuando existe una progresión del síndrome cardiorrenal esto también implica la activación neurohormonal, principalmente del sistema renina-angiotensina y del sistema nervioso simpático, y de mecanismos sistémicos inflamatorios como hemos descrito con anterioridad. Esto influye una vez más en la fibrosis y el remodelado ventricular, alteraciones hidroelectrolíticas, y disfunción cardíaca y renal; desencadenando un circuito vicioso negativo en respuesta al deterioro del sistema cardiorrenal, con mayor activación neurohormonal y de citoquinas inflamatorias, lo que resulta en una mayor disfunción sistémica.

En la población con enfermedad renal crónica (ERC), al igual que en la población con IC, la prevalencia de hipovitaminosis D es elevada, y también se ha asociado con un incremento de riesgo de eventos cardiovasculares³⁴. Una reducción de actividad de la enzima 1-alfa-hidroxilasa y la depleción de proteínas de unión de la vitamina D al RVD secundaria a proteinuria son las responsables de que los pacientes con ERC tengan una deficiencia de vitamina D. Por tanto, la correlación estrecha de la IC y enfermedad renal crónica resalta la importancia de la vitamina D en ambas patologías y en la fisiopatología del síndrome cardiorrenal.

Tabla 1. Prevalencia del déficit de vitamina D en insuficiencia cardíaca (IC)

Primer autor Año Tipo de estudio	Pacientes (n)	Criterio de inclusión	Definición de hipovitaminosis	Edad media (años) /mujeres (%)	Prevalencia
Gostman I <i>et al.</i> 2012 Prospectivo	3.009/46.825	Pacientes ≥ 45 años con IC vs. población control con 25-HCC medida	25-HCC <10 ng/ml	75,9 \pm 10,7/ 64,7/11,3	14,8 ng/ml/16,3ng/ml (28% frente 22%, $p < 0,00001$). En grupo IC, sólo el 8,8% tenían 25-HCC >30 ng/ml
Liu L <i>et al.</i> 2011 Prospectivo	548	IC NYHA II-IV	25-HCC <20 ng/ml	74/61	75% cohorte
Kim DH <i>et al.</i> 2008 Transversal	8.351	Adultos con niveles de 25-HCC medidos	25-HCC <30 ng/ml		74% de la población general. 89% de hipovitaminosis D en pacientes con IC y EAC
Zittermann <i>et al.</i> 2003 Transversal	24/34/34	Pacientes IC NYHA II-IV <50 años vs. ≥ 50 años vs. control sin IC ≥ 50 años		38,9/64,1/68,9	Ambos grupos con IC presentaron niveles disminuidos de 25-HCC y calcitriol ($p < 0,001$). Correlación inversa de niveles de vitamina D con severidad de IC (valorada por niveles de Nt-proBNP)
Shane E <i>et al.</i> 1997 Transversal	101	IC NYHA III-IV; consideración para trasplante	25-HCC ≤ 9 ng/ml	NE/22	17% de hipovitaminosis D en pacientes con 25-HCC ≤ 9 ng/ml y 26% con $1,25(\text{OH})_2\text{D} \leq 15$ pg/ml. Correlación inversa entre severidad de IC y niveles de vitamina D

NYHA: escala *New York Heart Association*; EAC: enfermedad aguda coronaria; Nt-proBNP: propéptido natriurético cerebral N-terminal; NE: no especificado.

PREVALENCIA DE HIPOVITAMINOSIS D E INSUFICIENCIA CARDÍACA

Aunque no existe consenso sobre los niveles óptimos de vitamina D, la deficiencia de esta hormona es definida por la mayoría de los expertos como un nivel de 25-hidroxicolecalciferol (25-HCC) inferior a 20 ng/ml^{4,38-42}. Para ser más específicos, de acuerdo al consenso uniformemente aceptado por las sociedades científicas dedicadas al metabolismo mineral óseo, se considera que los pacientes tienen unos niveles óptimos de vitamina D cuando los valores séricos de 25-HCC estén por encima de 30 ng/ml; entre 29 y 20 ng/ml se considera que existe una insuficiencia; y por debajo de 20 ng/ml se establece la existencia de una deficiencia, que sería severa con cifras de 25-HCC inferiores a 10 ng/ml^{38,41}. Asimismo, ha emergido la teoría de la relación en forma de U entre los niveles de vitamina D y cualquier causa de mortalidad, enfermedad cardiovascular, determinados tipos de cáncer, caídas y fracturas, y que la intoxicación por vitamina D se observa con unos niveles séricos de 25-HCC >150 ng/ml⁴³. Las guías de práctica clínica recomiendan que los niveles de vitamina D en plasma no deben medirse rutinariamente

en la población general y solo debería ser medido en pacientes de poblaciones consideradas en riesgo para la deficiencia de esta hormona⁴⁴⁻⁴⁷.

En los últimos años se ha evidenciado que probablemente el déficit de vitamina D ha sido infraestimado y es mucho más prevalente de lo que se había reconocido. Se estima una prevalencia mundial de un billón de individuos con niveles de vitamina D deficitarios e insuficientes⁴² y se ha descrito que el 40-80% de la población adulta presenta déficit de vitamina D^{48,49} siendo de especial importancia en mujeres de países del Medio Este. Se han descrito numerosos factores de riesgo para la deficiencia de la vitamina D, como son la edad, hiperpigmentación cutánea, internamiento en instituciones, latitud distanciada del Ecuador, obesidad, tabaquismo, nefropatía, hepatopatía o determinados fármacos como los corticoides, fenitoína o el fenobarbital⁴⁹. De especial relevancia es la epidemia global de obesidad en países desarrollados, que influye de manera significativa en el déficit de vitamina D, dado el secuestro que tiene lugar de dicha hormona en el tejido adiposo⁴⁸.

Tabla 2. Niveles de vitamina D y riesgo de insuficiencia cardíaca (IC)

Primer autor Año Tipo de estudio	Pacientes (n)	Criterio de inclusión	Edad media (años) Sexo F (%)	Seguimiento	Resultados
Bansal N <i>et al.</i> 2014 Prospectivo	6.469	Población general libre de ECV establecida (<i>Multi Ethnic Study of Atherosclerosis</i>)	62 53	8,4 años	- Comparación entre pacientes con PTH <65 y ≥65 pg/ml; estos últimos presentaban un 50% (CI 95%: 3-20%) mayor riesgo de incidencia de IC y 5,3 g (CI 95%: 2,6-7,9 g) más masa ventricular izquierda por RNM - Sin asociación entre IC y 25-HCC
Wannamethee SG <i>et al.</i> 2014 Prospectivo	3.713	Población general edad 60-79 años con y sin ECV establecida	68 0	13 años	- En pacientes con PTH >55,6 pg/ml, riesgo de IC de <i>novo</i> del 1,66 HR (CI 95%: 1,30-2,1) - Sin asociación entre los niveles de 25-HCC, calcio o fósforo con riesgo de IC (HR=1,07; CI 95%: 0,67-1,71)
Kestenbaum B <i>et al.</i> 2011 Prospectivo	2.312	Sujetos sanos ≥65 años	75 NI	14 años	- En pacientes con 25-HCC <15 ng/ml, riesgo mayor del 29% (CI 95%: 5-55% mayor) de mortalidad por cualquier causa. Cada 10 ng/ml menos de 25-HCC se asoció a un 9% más de riesgo relativo de mortalidad (CI 95%: 2-17% mayor) - En pacientes con PTH ≥ 65 pg/ml, un riesgo mayor del 30% (CI 95%: 6- 61%) de incidencia de IC
Pilz S <i>et al.</i> 2008 Prospectivo	3.299	Pacientes caucásicos sometidos a un cateterismo cardíaco	63 NI	7,7 años	2,84 HR (IC 95%: 1,20-6,74) para muerte por IC y 5,05 HR (IC 95%: 2,13-11,97) para muerte súbita cuando se compara pacientes con hipovitaminosis D severa (25-HCC <10 ng/ml frente a pacientes con niveles óptimos de vitamina D (25-HCC >30 ng/ml). Correlación inversa con niveles de niveles de 25-HCC y 1,25(OH) ₂ D, y Nt-proBNP (r=-0,190 y -0,255, respectivamente; p<0,001) y con FEVI (p<0,001)

ECV: enfermedad cardiovascular; RMN: resonancia magnético nuclear; NI: no indicado; HR: *hazard ratio*; CI: intervalo de confianza; Nt-proBNP: propéptido natriurético cerebral N-terminal; FEVI: fracción de eyección ventricular izquierda.

También es cierto que se ha objetivado un déficit de vitamina D tanto en población joven y aparentemente sana⁵⁰, describiéndose hasta en aproximadamente el 50% de los adultos jóvenes; incluso en estudios llevados a cabo en áreas con elevada exposición a luz solar como las Islas Canarias, Israel, Australia, Turquía, India o el Líbano, donde un 30-50% de los niños y adultos tienen unos niveles de 25-HCC <20 ng/ml⁵¹⁻⁵³.

Asimismo, datos obtenidos del *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) objetivaron una prevalencia de hipovitaminosis D del 74% en la población general, aumentando significativamente la prevalencia hasta el 89% cuando se tenía en cuenta únicamente a pacientes con IC y enfermedad coronaria ar-

terial (*odds ratio* [OR]=3,52; intervalo de confianza [CI] 95%: 1,58-7,84)⁵⁴. Otro estudio, de similares características en el que se incluyeron 4.105 sujetos de una población general con al menos una determinación de vitamina D, objetivó que únicamente el 36% de esta cohorte tenían unos niveles de vitamina D dentro de la normalidad. Una mayor prevalencia de insuficiencia cardíaca (90% relativa y 9% absoluta) se objetivó en sujetos con niveles de vitamina D ≤15 ng/ml, y en un seguimiento de 1,3±1,2 años de una población mayor de 50 años se objetivó una incidencia de nuevos casos de IC en el 2,5% de esta cohorte. En este estudio se concluyó que los niveles de vitamina D en plasma tienen una correlación inversa con el riesgo de desarrollar IC, y los

Tabla 3. Impacto pronóstico del déficit de vitamina D en pacientes con insuficiencia cardíaca (IC)

Primero autor Año Tipo de estudio	Pacientes (n)	Criterios de inclusión	Seguimiento	Niveles de vitamina D	Resultados
Gruson D <i>et al.</i> 2015 Prospectivo	170	IC NYHA II-IV con FEVI \leq 35%	4,1 años	NE	- Correlación inversa de los niveles de 1,25(OH) ₂ D con la severidad de IC (valores medios: NYHA II: 33,3 pg/ml, NYHA III: 23,4 pg/ml, NYHA IV: 14,0 pg/ml; p<0,001) - 1,25(OH) ₂ D y su <i>ratio</i> a PTH (1-84) predictor independiente de mortalidad cardiovascular en IC
Gostman I <i>et al.</i> 2012 Prospectivo	3.009 con IC/46.825 control	Pacientes \geq 45 años con IC vs. población control con 25-HCC medida	518 días	25-HCC <10 ng/ml	- Mayor mortalidad en pacientes con IC (HR=1,52; CI 95%: 1,21-1,92; p<0,001) - Reducción de mortalidad en pacientes que recibieron suplementación con vitamina D (HR 0,68; CI 95%: 0,54-0,85; p<0,0001)
Liu L <i>et al.</i> 2011 Prospectivo	548	IC NYHA II-IV hospitalizados	18 meses	NE	- Por cada 4 ng/ml de descenso de 25-HCC, mayor riesgo de muerte por objetivo final combinado de muerte por cualquier causa o insuficiencia cardíaca y rehospitalización (HR=1,09; CI 95%:1,00- 1,16) y mayor mortalidad por cualquier causa (HR=1,10; CI 95%: 1,00-1,22) - Sin efecto significativo en rehospitalización por IC

NYHA: escala *New York Heart Association*; FEVI: fracción de eyección ventricular izquierda; HR: *hazard ratio*; CI: intervalo de confianza; NE: no especificado.

valores de riesgo ajustados para IC fueron de 2,01 y 1,3 para valores ente 16-30 ng/ml y \leq 15 ng/ml, respectivamente⁷.

También se ha demostrado elevada prevalencia de déficit de vitamina D en pacientes con IC evaluados para trasplante cardíaco, así como su correlación inversa entre los niveles séricos de vitamina D y la severidad de la IC⁵⁵. Esta relación también se ha objetivado por otros grupos usando controles sin insuficiencia cardíaca⁵⁶ incluso en pacientes más jóvenes, lo cual sugiere que existe una asociación entre IC y déficit de vitamina D que es independiente de la edad.

Por lo tanto, aunque existe una elevada prevalencia de hipovitaminosis D en la población general aparentemente sana, este déficit parece ser más marcado en la población con IC (Tablas 1,2 y3).

RELACIÓN ENTRE LA VITAMINA D Y LA INSUFICIENCIA CARDÍACA

La IC es una enfermedad con elevada repercusión socio-sanitaria, por eso se ha intentado hacer un esfuerzo especial a la hora de predecir el riesgo de desarrollar IC e identificar aquella población en riesgo en la que se debe enfatizar una prevención primaria más activa. Por ello, y dada la elevada morbimortalidad de la IC, resulta interesante encontrar marcadores pronósticos en esta patología que puedan predecir mortalidad. En este sentido también se ha intentado confirmar mediante estudios longitudi-

nales la asociación entre los niveles de vitamina D y el riesgo de IC y de eventos adversos.

La vitamina D se ha asociado con el desarrollo de IC y como factor pronóstico independiente de mortalidad por IC y muerte súbita en un estudio prospectivo de 3.299 pacientes caucásicos sometidos a cateterismo cardíaco, con un seguimiento de 7,7 años de media. Cuando se compararon pacientes con hipovitaminosis D severa (25HCC <10 ng/ml) frente a pacientes con niveles óptimos de vitamina D (25-HCC >30 ng/ml), se obtuvo un *hazard ratio* (HR) de 2,84 (CI 95%: 1,20-6,74) para muerte por IC y 5,05 (CI 95%: 2,13-11,97) para muerte súbita. También se objetivó una correlación inversa entre los niveles de propéptido natriurético cerebral N-terminal (Nt-proBNP) y los niveles séricos de vitamina D, y una asociación inversa con la clase funcional de la NYHA (*New York Heart Association*)⁵⁷. Estos hallazgos también han sido corroborados posteriormente en un estudio de 2.312 sujetos sanos mayores de 65 años, donde se objetivó que pacientes con 25-HCC <15 ng/ml tenían un riesgo mayor del 29% (CI 95%: 5-55% mayor) de mortalidad por cualquier causa, y que por cada 10 ng/ml que disminuía el 25-HCC aumentaba un 9% el riesgo relativo de mortalidad (CI 95%: 2-17%)²⁰.

Los datos hasta el momento que relacionan los niveles de vitamina D con el riesgo de desarrollar IC son discrepantes. Por una parte, no se ha objetivado una asociación

inequívoca de los niveles de vitamina D con la incidencia de IC, pero por otra, sí que se ha objetivado su asociación con los niveles de PTH^{20,58,59}. Así, en un estudio de 6.469 personas de una población general libre de enfermedad cardiovascular establecida, con un seguimiento medio de 8,4 años, tras realizar una comparación de pacientes con niveles de PTH <65 pg/ml y PTH ≥65 pg/ml, estos últimos presentaban un 50% (CI 95%: 3-20%) de mayor riesgo de incidencia de IC y 5,3 g (CI 95%: 2,6- 7,9 g) más de masa ventricular izquierda determinada por RNM⁵⁸. Asimismo, en una cohorte de 3.713 varones de entre 60-79 años con y sin enfermedad cardiovascular, se objetivó que en pacientes con niveles de PTH >55,6 pg/ml, existía un mayor riesgo de IC de *novo* (HR=1,66; CI 95%: 1,30-2,1)⁵⁹. Estos hallazgos fueron demostrados previamente por Kestenbaum *et al.* en un estudio de 2.312 sujetos sanos ≥65 años de edad, en los que, tras un seguimiento de 14 años, objetivaron que los pacientes con PTH ≥65 pg/ml presentaban un mayor riesgo de un 30% (CI 95%: 6-61%) de incidencia de IC²⁰.

Esto es interesante dado que niveles elevados de PTH generalmente identifican a pacientes con niveles bajos de vitamina D, pudiéndose confundir la relación existente entre la hipovitaminosis D y los niveles de PTH con la IC. De hecho, el progresivo deterioro de la función renal, la inactividad física, así como la reducción de la absorción de calcio, son tanto causas como consecuencias de la hipovitaminosis D, que se asocian a su vez con un aumento de los niveles de PTH. Por tanto, a la luz de los estudios expuestos previamente, se puede extrapolar que se ha evidenciado que existe una asociación independiente de riesgo de insuficiencia cardíaca en pacientes con niveles bajos de vitamina D o niveles elevados de PTH. Esto es interesante, pues algunos autores consideran que son los niveles de PTH los que predicen la enfermedad cardiovascular⁶⁰.

En los últimos años se han publicado numerosos estudios en los que no solo se ha objetivado una elevada prevalencia de déficit de vitamina D en pacientes con IC, sino que también se ha relacionado a la vitamina D como marcador de enfermedad más severa y de mayor tasa de eventos adversos en pacientes con insuficiencia cardíaca. Se ha objetivado una relación inversa entre niveles de 25-HCC y niveles de péptido natriurético B (BNP) en pacientes con IC^{20,54}, así

como de función ventricular⁶¹, reportándose como marcador independiente de hospitalización por IC y mortalidad²⁰.

Sin embargo, también existe la teoría de que el déficit de vitamina D en pacientes con IC se produce porque estos pacientes tienen una peor clase funcional, están más débiles y, por lo tanto, tienen un estilo de vida más sedentario, por lo que tienen una menor exposición a la luz solar, lo que condiciona una menor producción de vitamina D en la piel y que tengan concentraciones más bajas de vitamina D⁶². Esto se pone en duda en distintos estudios en los que, tras un análisis multivariante con la cuantificación de la actividad física, se objetiva una asociación entre los niveles de vitamina D y la disfunción ventricular y la mortalidad por IC que sigue siendo significativa⁵⁶.

Finalmente, es interesante también comentar la fuerte asociación que se ha encontrado entre pacientes con fibrilación auricular e IC (dado que la fibrilación auricular es un desencadenante importante para la exacerbación de IC y fracaso terapéutico) en un estudio observacional en el que se incluyeron 180 pacientes separados en dos grupos, en base a si estaban en ritmo sinusal o fibrilación auricular permanente⁵⁶. En el grupo de fibrilación auricular se objetivó que los niveles plasmáticos de vitamina D eran significativamente menores (11,05 ng/ml frente a 20 ng/ml; p<0,001), los niveles de PTH eran significativamente mayores (76,7 frente a 55 pg/ml; p<0,001), y el tamaño auricular era significativamente mayor (45,03 mm/m² frente a 42,05 mm/m²; p<0,01) que en el grupo en ritmo sinusal. Resultaron ser predictores independientes de fibrilación auricular los niveles de vitamina D (OR=0,854; CI 95%: 0,805-0,907; p<0,001) y el tamaño auricular/superficie corporal (OR=1,077; CI 95%: 1,003-1,156; p<0,05). En este estudio se estableció el nivel de vitamina D como punto de corte predictivo de fibrilación auricular en 16,50 ng/ml (76,0% de sensibilidad y 65,5% de especificidad, área bajo la curva -AUC- =0,75; CI 95%: 0,67-0,82).

En conclusión, existe evidencia experimental y clínica que demuestra mecanismos fisiopatológicos plausibles y una asociación directa e indirecta entre la vitamina D con la IC y el sistema cardiovascular. El déficit de vitamina D es muy elevado en pacientes con IC y se podría asociar al pronóstico de estos pacientes^{4,6,8,10,17,19,20,24,30,31,35-37}.



Conflicto de intereses: Lo autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

- Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 2007; 93(9):1137-46.
- Sayago-Silva I, García-López F, Segovia-Cubero J. Epidemiology of heart failure in Spain over the last 20 years. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2013;66(8):649-56.
- Ponikowski P, Anker SD, AlHabib KF, Cowie MR, Force TL, Hu S, et al. Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Hear Fail*. 2014;1(1):4-25.
- Pettifor JM. Nutritional rickets: deficiency of vitamin D, calcium, or both? *Am J Clin Nutr*. 2004;80:1725S-9.
- Holick MF. Resurrection of vitamin D and rickets. *J Clin Invest*. 2006;116(8):2062-72.
- Judd SE, Tangpricha V. Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. *Am J Med Sci*. 2009;338(1):40-4.
- Anderson JL, May HT, Horne BD, Bair TL, Hall NL, Carlquist JF, et al. Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, disease status, and incident events in a general healthcare population. *Am J Cardiol*. 2010;106(7):963-8.
- D'Amore C, Marsico F, Parente A, Paolillo S, De Martino F, Gargiulo P, et al. Vitamin D deficiency and clinical outcome in patients with chronic heart failure: A review. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017;27(10):837-49.
- Norman AW. From vitamin D to hormone D: Fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):491s-9s.
- Camici M, Galetta F, Franzoni F, Carpi A, Zangeneh F. Vitamin D and heart. *Intern Emerg Med*. 2013;8(Suppl 1):5-9.
- Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;103(3-5):521-4.
- Green JJ, Robinson DA, Wilson GE, Simpson RU, Westfall MV. Calcitriol modulation of cardiac contractile performance via protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41(2):350-9.
- McMurray JJ, Packer M, Desay A, Gong J, Lefkowitz M. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*. 2016;291:3.
- Bayes-Genis A, Morant-Talamante N, Lupón J. Neprilysin and natriuretic peptide regulation in heart failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2016;13(4):151-7.
- Li YC, Kong J, Wei M, Chen Z, Liu SQ, Cao L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 2002;110(2):229-38.
- Tomaschitz A, Pilz S, Ritz E, Grammer T, Drechsler C, Boehm BO, et al. Independent association between 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and the renin-angiotensin system. The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin Chim Acta*. 2010;411(17-18):1354-60.
- Forman JP, Williams JS, Fisher ND. Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension*. 2010;55(5):1283-8.
- Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 2017;57(2):313-70.
- Li YC. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem*. 2003;88(2):327-31.
- Kestenbaum B, Katz R, De Boer I, Hofnagle A, Sarnak MJ, Shlipak MG, et al. Vitamin D, parathyroid hormone, and cardiovascular events among older adults. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(14):1433-41.
- Hedayat M, Mahmoudi MJ, Rose NR, Rezaei N. Proinflammatory cytokines in heart failure: Double-edged swords. *Heart Fail Rev*. 2010;15(6):543-62.
- Nozaki N, Yamaguchi S, Shirakabe M, Nakamura H, Tomoike H. Soluble tumor necrosis factor receptors are elevated in relation to severity of congestive heart failure. *Jpn Circ J*. 1997; 61:657-64.
- Mora JR, Iwata M, Von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: Vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):685-98.
- DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.
- Saleh FN, Schirmer H, Sundsfjord J, Jorde R. Parathyroid hormone and left ventricular hypertrophy. *Eur Heart J*. 2003;2054-60.
- Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R, Woessner JF. Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol*. 1996;148(5):1639-48.
- Li YY, Feng YQ, Kadokami T, McTiernan CF, Draviam R, Watkins SC, et al. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;97(23):12746-51.
- Weber KT, Weglicki WB, Simpson RU. Macro- and micronutrient dyshomeostasis in the adverse structural remodeling of myocardium. *Cardiovasc Res*. 2009;81(3):500-8.
- Li YY, Kadokami T, Wang P, McTiernan CF, Feldman AM. MMP inhibition modulates TNF- α transgenic mouse phenotype early in the development of heart failure. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2015;282(3):H983-9.
- Akin F, Ayça B, Köse N, Duran M, Sarı M, Uysal OK, et al. Serum vitamin D levels are independently associated with severity of coronary artery disease. *J Investig Med*. 2016;60(6):869-73.
- de Boer IH, Kestenbaum B, Shoben AB, Michos ED, Sarnak MJ, Siscovick DS. 25-hydroxyvitamin D levels inversely associate with risk for developing coronary artery calcification. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(8):1805-12.
- Molinari C, Uberti F, Grossini E, Carda S, Invernizzi M, Cisari C. 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol induces nitric oxide production in cultured endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*. 2011; 27(6):661-8.
- Grundmann M, Haidar M, Placzko S, Niendorf R, Darashchonak N, Hubel CA, et al. Vitamin D improves the angiogenic properties of endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Physiol*. 2012;303(9):954-62.
- Stach K, Kälsch AI, Nguyen XD, Elmas E, Kravlev S, Lang S, et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D 3 attenuates platelet activation and the expression of VCAM-1 and MT1-MMP in human endothelial cells. *Cardiology*. 2011;118(2):107-15.
- Al Mheid I, Quyyumi AA. Vitamin D and cardiovascular disease: controversy unresolved. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(1):89-100.
- Rostand SG, Drüeke TB. Parathyroid hormone, vitamin D, and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Kidney Int*. 1999;56(2):383-92.
- Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: Results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int*. 2007;71(1):31-8.
- Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(1):18-28.
- Giustina A, Adler RA, Binkley N, Bouillon R, Ebeling PR, Lazaretto-Castro M, et al. Controversies in vitamin D: summary statement from an international conference. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(2):234-40.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911-30.
- Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int*. 2005;16(7):713-6.
- Holick MF. High Prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(3):353-73.
- Ross AC, Manson JAE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: What clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):53-8.
- Glendenning P, Inderjeeth CA, Holick M. Measuring vitamin D. *Clin Biochem*. 2012;38(12):901-6.
- Glendenning P, Inderjeeth CA. Vitamin D: Methods of 25 hydroxyvitamin D analysis, targeting at risk populations and selecting thresholds of treatment. *Clin Biochem*. 2012;45(12):901-6.
- Kennel K, Drake MT, Hurley DL. Vitamin D deficiency in adults: when to

- test and how to treat. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(8):752-8.
47. Holick MF. NIH public vitamin D status: measurement, interpretation and clinical application. *Ann Epidemiol.* 2009;19(2):73-8.
48. Palacios C, Gonzalez L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;144:138-45.
49. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide health problem. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:1080-6.
50. Groba Marco M, Mirallave Pescador A, González Rodríguez E, García Santana S, González Padilla E, Santana P S, et al. Factores relacionados con insuficiencia de vitamina D en estudiantes de Medicina de Gran Canaria. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2010;2:11-8.
51. Marwaha RK, Tandon N, Reddy DRHK, Aggarwal R, Singh R, Sawhney RC, et al. Vitamin D and bone mineral density status of healthy schoolchildren in northern India. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(2):477-82.
52. Fuleihan GE-H, Nabulsi M, Choucair M, Salamoun M, Shahine CH, Kizirian A, et al. Hypovitaminosis D in healthy schoolchildren. *Pediatrics.* 2004;107(4):e53-e53.
53. McGrath J, Kimlin M, Saha S, Eyles D, Parisi A. Vitamin D insufficiency in south-east Queensland. *Med J Austr.* 2001;174: 150-151.
54. Kim DH, Sabour S, Sagar UN, Adams S, Whellan DJ. Prevalence of hypovitaminosis D in cardiovascular diseases (from the National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2004). *Am J Cardiol.* 2008;102(11):1540-4.
55. Shane E, Mancini D, Aaronson K, Silverberg SJ, Seibel MJ, Adesso V, et al. Bone mass, vitamin D deficiency, and hyperparathyroidism in congestive heart failure. *Am J Med.* 1997;103(3):197-207.
56. Zittermann A, Schulze Schleithoff S, Tenderich G, Berthold HK, Körfer R, Stehle P. Low vitamin D status: A contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure? *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(1):105-12.
57. Pilz S, März W, Wellnitz B, Seelhorst U, Fahrleitner-Pammer A, Dimai HP, et al. Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(10):3927-35.
58. Bansal N, Zelnick L, Robinson-Cohen C, Hoofnagle AN, Ix JH, Lima JA, et al. Serum parathyroid hormone and 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk of incident heart failure: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(6):1-15.
59. Wannamethee GS, Welsh PW, Papacosta OP, Lennon L, Whincup PH, Sattar N. Elevated parathyroid hormone, but not vitamin D deficiency, is associated with increased risk of heart failure in older men with and without cardiovascular disease. *Circ Hear Fail.* 2014;7(5):732-9.
60. Kamycheva E, Sundsfjord J, Jorde R. Serum parathyroid hormone levels predict coronary heart disease: The Tromso Study. *Eur J Prev Cardiol.* 2004;11(1):69-74.
61. Zittermann A, Ernst JB. Calcitropic and phosphaturic hormones in heart failure. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016;26(11):971-9.
62. Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Vitamin D insufficiency in congestive heart failure: Why and what to do about it? *Heart Fail Rev.* 2006;11(1):25-33.

