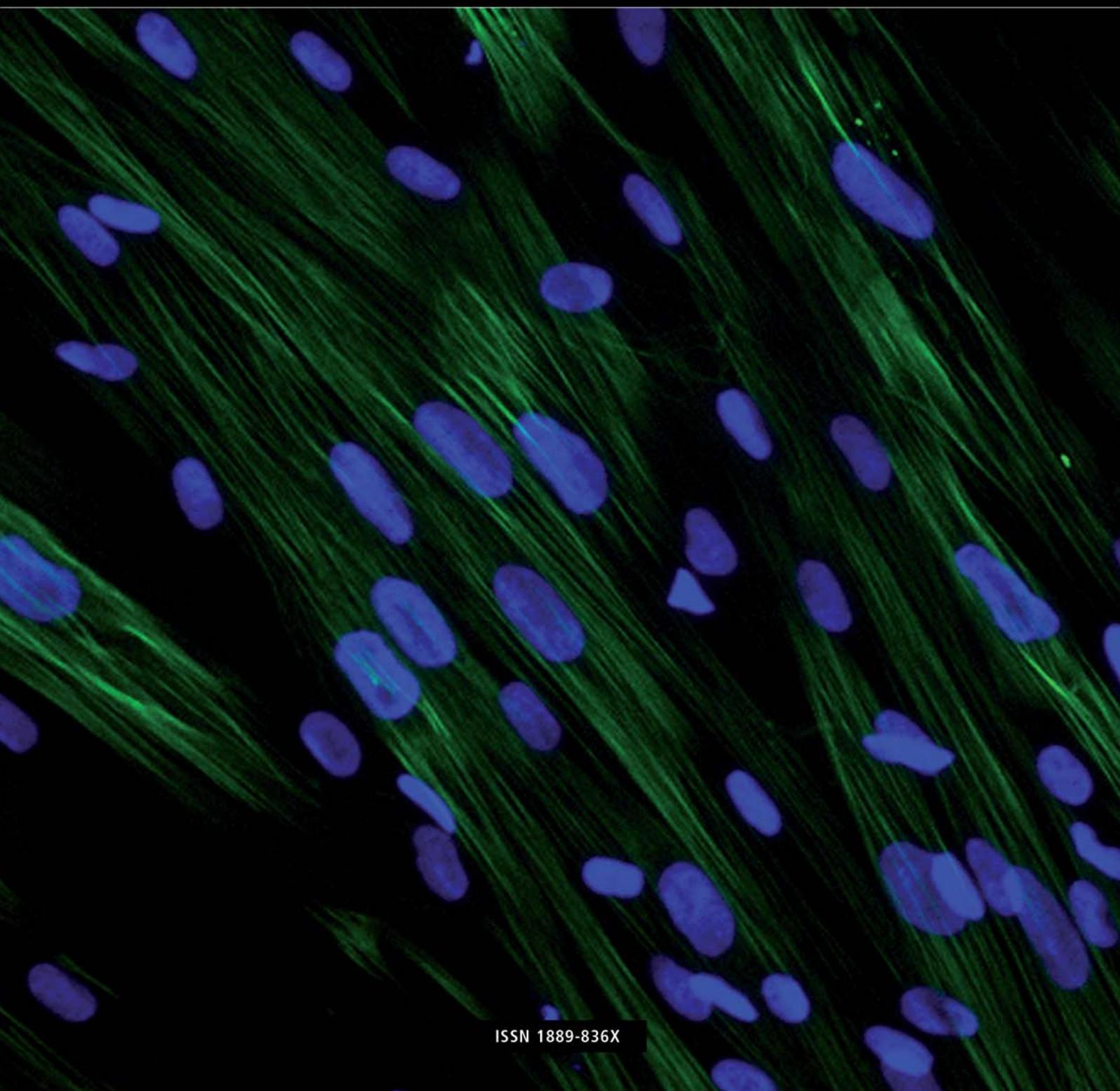
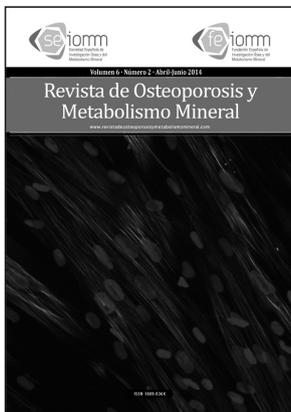


Volumen 6 · Número 2 · Abril-Junio 2014

# Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

[www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com](http://www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com)





Volume 6 - Número 2 - Abril-Junio 2014  
Revista de Osteoporosis y  
Metabolismo Mineral

### Nuestra portada

Inmunolocalización por fluorescencia de la alfa actina en cultivos fibroblastos diferenciados a miofibroblastos.

#### Autores:

Antonio Casado Díaz,  
Raquel Santiago Mora y  
José Manuel Quesada  
Gómez

#### Director

**Manuel Sosa Henríquez**

#### Redactora Jefe

**M<sup>a</sup> Jesús Gómez de Tejada Romero**

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

#### Presidente

**Francesc Xavier Nogués Solán**

#### Vicepresidente

**José Manuel Olmos Martínez**

#### Secretaria

**Carmen Gómez Vaquero**

#### Tesorera

**Arancha Rodríguez de Cortazar**

#### Vocal 1

**Cristina Carbonell Abella**

#### Vocal 2

**Antonio Cano Sánchez**

Paseo de la Castellana, 135 (7<sup>a</sup> planta)  
28046 Madrid

Tel: +34-917906834

Fax: +34-917906869

e-mail: [seiommm@seiommm.org](mailto:seiommm@seiommm.org)

<http://www.seiommm.org>

#### Edición



Avda. Reina Victoria, 47 (6<sup>o</sup> D)  
28003 Madrid

Tel: +34-915 538 297

e-mail: [correo@ibanezyplaza.com](mailto:correo@ibanezyplaza.com)

<http://www.ibanezyplaza.com>

#### Maquetación

**Concha García García**

#### Traducción inglés

**Andrew Stephens**

#### Impresión

**Gráficas 82, S.L.**

#### SopORTE Válido

**32/09-R-CM**

#### Depósito Legal

**M-3643-2013**

**ISSN 1889-836X**

## SUMARIO

Vol. 6 - Nº 2 - Abril-Junio 2014

### 33 EDITORIAL

**Análisis de las modificaciones epigenéticas en células óseas: ¿son los osteoblastos aislados de hueso un buen modelo para estudiar cambios en la metilación del ADN?**

Plotkin LI

### 35 ORIGINALES

**Análisis comparativo del epigenoma del tejido óseo y de osteoblastos primarios**

Delgado-Calle J, Alonso MA, Ortiz J, Montero A, Garcés C, Sañudo C, Pérez-Aguilar MD, Pérez Núñez MI, Riancho JA

**40 Riesgo de fractura osteoporótica mayor y de cadera en pacientes con accidente cerebrovascular en fase aguda. Estudio prospectivo multicéntrico**

Olmo JA, Román P, León ML, Mena P, Ignatowicz U, Fuentes M, Almagro MM, Martínez E, Torres J, Canteras M

**46 Comparación de las acciones osteogénicas de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) en modelos de ratón diabético y con déficit del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I)**

López-Herradón A, Lozano D, Portal-Núñez S, Ardura JA, Gutiérrez-Rojas I, Maycas M, Rodríguez L, Varela I, Esbrit P

### 57 REVISIÓN

**Regulación endocrina del metabolismo energético a través del hueso**

González-Rozas M, Pérez Castrillón JL

### 63 DOCUMENTO ESPECIAL

**Caso clínico a debate: vacaciones terapéuticas, ¿sí o no?**

Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ, Malouf Sierra J

### 71 NORMAS DE PUBLICACIÓN

Envío de originales:  
[revistadeosteoporosisymetabolismomineral@ibanezyplaza.com](mailto:revistadeosteoporosisymetabolismomineral@ibanezyplaza.com)

Versión on-line:

<http://www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com>

**Comité Editorial****Teresita Bellido. PhD**

Department of Medicine, Division of Endocrinology. Indiana University School of Medicine. Indianapolis, Indiana. Estados Unidos

**Ernesto Canalis. MD, PhD**

Director, Center for Skeletal Research. Professor of Orthopedic Surgery and Medicine New England Musculoskeletal Institute University of Connecticut Health Center. Farmington, CT. Estados Unidos

**Oswaldo Daniel Messina**

Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Hospital Cosme Argerich. Buenos Aires. Argentina

**Patricia Clark Peralta. MD, PhD**

Facultad de Medicina, UNAM. Unidad Clínica Epidemiológica. Hospital Infantil Federico Gómez. México DF. México

**Lilian I Plotkin. PhD**

Anatomy and Cell Biology. Indiana University School of Medicine. Indianapolis, Indiana. Estados Unidos

**Manuel Díaz Curiel**

Universidad Autónoma de Madrid. Unidad de Metabolismo Óseo. Hospital Fundación Jiménez Díaz. Instituto de Investigación FJD. Fundación Hispana de Osteoporosis y Metabolismo Mineral (FHOE-MO). Madrid. España

**Adolfo Díez Pérez**

Universidad de Barcelona. Servicio de Medicina Interna. Instituto Municipal de Investigación Médica. (IMIM). Hospital del Mar. Barcelona. España

**Francesc Xavier Nogués Solán**

Universidad Autónoma de Barcelona. Unidad de Investigación en Fisiopatología Ósea y Articular (URFOA). Departamento de Medicina Interna, Parc de Salut Mar – RETICEF. Barcelona. España

**Manuel Sosa Henríquez (Director)**

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral. Hospital Universitario Insular. Servicio de Medicina Interna. Unidad Metabólica Ósea. Las Palmas de Gran Canaria. España

**María Jesús Gómez de Tejada Romero (Redactora Jefe)**

Universidad de Sevilla. Departamento de Medicina. Sevilla. España

**Comité de Expertos**

Pilar Aguado Acín

María José Amérgo García

Abdón Arbelo Rodríguez

Miguel Arias Paciencia

Emilia Aznar Villacampa

Chesús Beltrán Audera

Pere Benito Ruiz

Santiago Benito Urbina

Miguel Bernard Pineda

Josep Blanch i Rubió

José Antonio Blázquez Cabrera

José Ramón Caeiro Rey

Javier Calvo Catalá

M<sup>a</sup> Jesús Cancelo Hidalgo

Jorge Cannata Andía

Antonio Cano Sánchez

Cristina Carbonell Abella

Jordi Carbonell Abelló

Pedro Carpintero Benítez

Enrique Casado Burgos

Santos Castañeda Sanz

Fidencio Cons Molina

Sonia Dapia Robleda

Jesús Delgado Calle

Bernardino Díaz López

Casimira Domínguez Cabrera

Fernando Escobar Jiménez

José Filgueira Rubio

Jordi Fiter Areste

Juan José García Borrás

Juan Alberto García Vadillo

Eduardo Girona Quesada

Carlos Gómez Alonso

Milagros González Béjar

Jesús González Macías

Emilio González Reimers

Jenaro Graña Gil

Silvana di Gregorio

Daniel Grinberg Vaisman

Nuria Gunañabens Gay

Roberto Güerri Fernández

Federico Hawkins Carranza

Diego Hernández Hernández

José Luis Hernández Hernández

Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Esteban Jódar Gimeno

Pau Lluç Mezquida

José Andrés López-Herce Cid

M<sup>a</sup> Luisa Mariñoso Barba

Guillermo Martínez Díaz-Guerra

María Elena Martínez Rodríguez

Leonardo Mellivobsky Saldier

Manuel Mesa Ramos

Pedro Mezquita Raya

Ana Monegal Brancos

Josefa Montoya García

María Jesús Moro Álvarez

Manuel Muñoz Torres

Laura Navarro Casado

Manuel Naves García

Xavier Nogués Solán

Joan Miquel Nolla Solé

José Antonio Olmos Martínez

Norberto Ortego Centeno

Santiago Palacios Gil-Antuñano

Esteban Pérez Alonso

Ramón Pérez Cano

José Luis Pérez Castrillón

Pilar Peris Bernal

Concepción de la Piedra Gordo

José Manuel Quesada Gómez

Enrique Raya Álvarez

Rebeca Reyes García

José Antonio Riancho Moral

Luis de Río Barquero

Luis Rodríguez Arboleya

Minerva Rodríguez García

Antonia Rodríguez Hernández

Manuel Rodríguez Pérez

Inmaculada Ros Villamajó

Rafael Sánchez Borrego

Armando Torres Ramirez

Antonio Torrijos Eslava

Carmen Valdés y Llorca

Carmen Valero Díaz de Lamadrid

Ana Weruaga Rey

**METODOLOGÍA Y DISEÑO DE DATOS**

Pedro Saavedra Santana

José María Limiñana Cañal

**SUMMARY**

Vol. 6 - Nº 2 - April-June 2014

**33 EDITORIAL**

**Analysis of epigenetic modifications in bone cells: osteoblasts are osteoblasts isolated from bone a good model to study changes in DNA methylation?**

Plotkin LI

**35 ORIGINAL ARTICLES**

**Comparative epigenomic analysis of bone tissue and primary osteoblasts**

Delgado-Calle J, Alonso MA, Ortiz J, Montero A, Garcés C, Sañudo C, Pérez-Aguilar MD, Pérez Núñez MI, Riancho JA

**40 Risk of major osteoporotic or hip fracture in patients with cerebrovascular accident in the acute phase. Multicentre prospective study**

Olmo JA, Román P, León ML, Mena P, Ignatowitz U, Fuentes M, Almagro MM, Martínez E, Torres J, Canteras M

**46 Comparison of the osteogenic actions of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in diabetic and insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficient mouse models**

López-Herradón A, Lozano D, Portal-Núñez S, Arduza JA, Gutiérrez-Rojas I, Maycas M, Rodríguez L, Varela I, Esbrit P

**57 REVIEW**

**Endocrine regulation of energy metabolism by bone**

González-Rozas M, Pérez Castrillón JL

**63 SPECIAL DOCUMENT**

**Clinical case discussion: therapeutic holiday, yes or not?**

Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ, Malouf Sierra J

# Análisis de las modificaciones epigenéticas en células óseas: ¿son los osteoblastos aislados de hueso un buen modelo para estudiar cambios en la metilación del ADN?

**Plotkin LI**

Departamento de Anatomía y Biología Celular - Facultad de Medicina de la Universidad de Indiana - Centro Médico de la Administración de Veteranos Roubush - Indianápolis (Indiana, EE.UU.)

Correspondencia: Lilian I. Plotkin, Ph.D. - Department of Anatomy and Cell Biology - Indiana University School of Medicine - 635 Barnhill Drive, MS-5035 - Indianapolis, IN, USA  
Correo electrónico: lplotkin@iupui.edu

**L**a epigenética es el estudio de los mecanismos que regulan la expresión génica de forma estable y hereditaria, pero sin alterar la secuencia de ADN<sup>1</sup>. Este campo de investigación ha cobrado importancia en los últimos años y se postula que puede explicar el proceso de diferenciación de las células óseas, la aparición de enfermedades del metabolismo óseo, así como también la heredabilidad de ciertas patologías (para revisiones recientes, ver<sup>1-3</sup>). Los mecanismos epigenéticos incluyen modificaciones post-transcripcionales en histonas, regulación de la síntesis de proteínas a través de microARNs y la metilación del ADN.

Recientemente se ha propuesto que cambios en los niveles de metilación de genes pueden alterar la diferenciación de osteoblastos y precursores de osteoclastos en el tejido óseo. Por ejemplo, los factores de transcripción *osterix* y *DLX5*, el receptor de estrógenos  $\alpha$ , así como la *osteopontina*, son co-regulados a través de la metilación del ADN<sup>4,6</sup>. Más aún, los niveles de metilación del ADN pueden ser regulados por estímulos mecánicos, como es el caso del promotor de la *osteopontina*<sup>6</sup>, sugiriendo que parte de los efectos de la estimulación mecánica ocurren debido a la regulación de la expresión génica mediante mecanismos epigenéticos. Es importante mencionar que la metilación de regiones promotoras del ADN de ciertos genes puede regular su expresión en distintas etapas de la diferenciación celular. Tal es el caso de la fosfatasa alcalina y la *esclerostina*<sup>7-9</sup>. Mientras el grado de metilación en la región promotora de la fosfatasa alcalina aumenta a medida que las células del

linaje osteoblástico se diferencian, llegando a silenciar su expresión en los osteocitos, lo opuesto ocurre con la *esclerostina*, cuyo promotor está metilado en los osteoblastos y se encuentra desmetilado en los osteocitos.

De forma similar a la diferenciación osteoblástica, los genes que codifican para *RANKL* y *OPG* son también regulados por sus niveles de metilación<sup>10</sup>, afectando de esta manera la generación de osteoclastos, proceso que depende de la expresión relativa de *RANKL* y *OPG*<sup>11</sup>. Como ocurre en las células del linaje osteoblástico, cambios en los niveles de metilación del ADN también acompañan la diferenciación de los precursores de osteoclastos. Esto lleva a diferencias en los niveles de expresión de genes fundamentales para la función de los osteoclastos como la *catepsina K* y la *fosfatasa ácida resistente al tartrato*<sup>12</sup>.

También se ha propuesto que patrones aberrantes de metilación de ADN pueden causar patologías en las que existen alteraciones en el metabolismo óseo. Por ejemplo, la reducción de los niveles de la metiltransferasa *DNMT1*, una enzima involucrada en el mantenimiento de la metilación genómica, lleva a la pérdida de la masa ósea<sup>13</sup>. De manera similar, cambios en la expresión génica en condrocitos están asociados con cambios en la metilación del ADN (por ejemplo, en el gen del colágeno tipo X o de diversas metaloproteinasas de la matriz<sup>14,15</sup>) pudiendo contribuir a la generación de osteoartritis.

El presente trabajo es la continuación de estudios previos del mismo grupo en los que demostraron el papel de la metilación de ADN en la regulación de la expresión de la proteína de osteocitos escler-

rostina<sup>9</sup>, del marcador de formación ósea fosfatasa alcalina<sup>7</sup>, y de las citoquinas involucradas en la generación de osteoclastos RANKL/OPG<sup>10</sup>. En el manuscrito de Delgado-Calle y cols.<sup>16</sup> exploran y comparan la presencia de *loci* CpG metilados en el ADN purificado de huesos humanos y de cultivos primarios de osteoblastos obtenidos también de fracturas osteoporóticas u osteoartritis. Los autores analizaron los niveles de metilación del hueso y de los osteoblastos cultivados, y encontraron un patrón similar en cuanto al promedio de metilación, tanto si se analizaron todos los *loci* o sólo aquéllos relacionados con el hueso. De forma consistente, una fracción de los genes analizados se desvió de la relación general. En particular, el listado de genes relacionados con el metabolismo óseo y que se encuentran metilados en forma diferencial en preparaciones de hueso y células cultivadas incluye el receptor para la hormona paratiroidea, miembros de la cadena de estimulación de la vía Wnt y TGF $\beta$  e interleuquinas y quimioquinas. Modificaciones en la expresión de estos genes pueden tener efectos profundos en la maduración, proliferación y supervivencia de las células óseas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la composición de las células presentes en el hueso y el hecho de que las células hayan sido cultivadas por 1 ó 2 pases. En particular, la mayoría de las células en los huesos son osteocitos y no osteoblastos. Además, la presencia de células de médula ósea en los fragmentos de hueso puede también confundir los resultados. Otro factor que puede explicar las diferencias encontradas es el hecho de que las células osteoblásticas estuvieron expuestas a un medio artificial y en un incubador. Aunque prometedores, los resultados encontrados en este trabajo necesitan ser complementados por estudios más detallados, separando osteoblastos de osteocitos para evaluar la contribución de cada población celular en los *loci* metilados. En resumen, el trabajo de Delgado-Calle y cols. demuestra que la población de genes metilados en células óseas varía dependiendo de la fuente de material. Las conclusiones del estudio deben ser tomadas con precaución debido a la diferencia en el tipo de células presentes en los huesos, comparado con los cultivos primarios, y el bajo número de réplicas. Sin embargo, revela la importancia de corroborar los resultados obtenidos en cultivos celulares con estudios en animales o en muestras humanas.

**Agradecimiento:** Este trabajo fue financiado por el *National Institutes of Health* R01-AR053643.

## Bibliografía

1. Vrtacnik P, Marc J, Ostanek B. Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:589-608.
2. Delgado-Calle J, Garmilla P, Riancho JA. Do epigenetic marks govern bone mass and homeostasis? *Curr Genomics* 2012;13:252-63.
3. Delgado-Calle J, Riancho JA. The role of DNA methylation in common skeletal disorders. *Biology (Basel)* 2012;1:698-713.
4. Lee JY, Lee YM, Kim MJ, Choi JY, Park EK, Kim SY, et al. Methylation of the mouse *Dlx5* and *Osx* gene promoters regulates cell type-specific gene expression. *Mol Cells* 2006;22:182-8.
5. Penolazzi L, Lambertini E, Giordano S, Sollazzo V, Traina G, del Senno L, et al. Methylation analysis of the promoter F of estrogen receptor alpha gene: effects on the level of transcription on human osteoblastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;91:1-9.
6. Arnsdorf EJ, Tummala P, Castillo AB, Zhang F, Jacobs CR. The epigenetic mechanism of mechanically induced osteogenic differentiation. *J Biomech* 2010;43:2881-6.
7. Delgado-Calle J, Sañudo C, Sanchez-Verde L, Garcia-Renedo RJ, Arozamena J, Riancho JA. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone* 2011;49:830-8.
8. Delgado-Calle J, Arozamena J, Pérez-López J, Bolado-Carrancio A, Sañudo C, Agudo G, et al. Role of BMPs in the regulation of sclerostin as revealed by an epigenetic modifier of human bone cells. *Mol Cell Endocrinol* 2013;369:27-34.
9. Delgado-Calle J, Sañudo C, Bolado A, Fernández AF, Arozamena J, Pascual-Carra MA, et al. DNA methylation contributes to the regulation of sclerostin expression in human osteocytes. *J Bone Miner Res* 2012;27:926-37.
10. Delgado-Calle J, Sañudo C, Fernández AF, García-Renedo R, Fraga MF, Riancho JA. Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone. *Epigenetics* 2012;7:83-91.
11. Bellido T, Plotkin LI, Bruzzaniti A. Bone cells. In: Burr D, Allen M, editors. *Basic and Applied Bone Biology*: Elsevier; 2014; p. 27-45.
12. De la Rica L, Rodríguez-Ubrea J, García M, Islam AB, Urquiza JM, Hernando H, et al. PU.1 target genes undergo Tet2-coupled demethylation and DNMT3b-mediated methylation in monocyte-to-osteoclast differentiation. *Genome Biol* 2013;14:R99.
13. Liu L, van GT, Kadish I, Li Y, Wang D, James SR, et al. Insufficient DNA methylation affects healthy aging and promotes age-related health problems. *Clin Epigenetics* 2011;2:349-60.
14. Zimmermann P, Boeuf S, Dickhut A, Boehmer S, Olek S, Richter W. Correlation of COL10A1 induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the COL10A1 promoter. *Arthritis Rheum* 2008;58:2743-53.
15. Barter MJ, Bui C, Young DA. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:339-49.
16. Delgado-Calle J, Alonso MA, Ortiz J, Montero A, Garcés C, Sañudo C, et al. Análisis comparativo del epigenoma del tejido óseo y de osteoblastos primarios. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2014;6:35-39.

**Delgado-Calle J<sup>1</sup>, Alonso MA<sup>2</sup>, Ortiz J<sup>2</sup>, Montero A<sup>2</sup>, Garcés C<sup>2</sup>, Sañudo C<sup>1</sup>, Pérez-Aguilar MD<sup>2</sup>, Pérez Núñez MI<sup>2</sup>, Riancho JA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Interna - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Universidad de Cantabria - IDIVAL - RETICEF - Santander

<sup>2</sup> Servicio de Traumatología y Ortopedia - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Universidad de Cantabria - IDIVAL - Santander

## Análisis comparativo del epigenoma del tejido óseo y de osteoblastos primarios

Correspondencia: José A. Riancho - Departamento de Medicina Interna - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Avda. Valdecilla, s/n - 39008 Santander (España)

Correo electrónico: rianchoj@unican.es

Fecha de recepción: 25/04/2014

Fecha de aceptación: 17/06/2014

### Resumen

**Objetivos:** Los mecanismos epigenéticos, y en particular la metilación de las citosinas en las regiones promotoras, modulan la expresión de muchos genes. Sin embargo, su papel en la homeostasis esquelética apenas ha sido estudiado. En particular, se desconoce si los patrones de metilación de las células óseas en cultivo son un buen reflejo de lo que ocurre en el tejido óseo. El objetivo de este trabajo fue explorar las posibles diferencias en la metilación de citosinas en muestras de hueso humano y en osteoblastos.

**Material y métodos:** Para ello efectuamos un estudio de todo el genoma analizando el grado de metilación de 23.667 *loci* y comparamos los resultados en muestras de tejido óseo y en cultivos de osteoblastos primarios.

**Resultados:** Globalmente observamos una buena correlación entre ambos tipos de muestras, tanto en el conjunto de *loci* ( $r^2=0,87$ ;  $p<10^{-50}$ ), como en los localizados en genes involucrados en el metabolismo óseo. Sin embargo, una fracción de *loci* (7-8%) se desviaron de esa tendencia general y mostraron diferencias en la metilación superiores al 20%.

**Conclusiones:** Estos resultados indican que los datos de metilación obtenidos en cultivo no necesariamente son un fiel reflejo de lo que ocurre en los tejidos, por lo que se debe tener precaución antes de extrapolarlos a la situación en vivo.

**Palabras clave:** metilación de ADN, epigenética, osteoblastos.

# Comparative epigenomic analysis of bone tissue and primary osteoblasts

## Summary

**Objectives:** Epigenetic mechanisms, and in particular cytosine methylation in the promoter regions, modulate the expression of many genes. However, their role in skeletal homeostasis has scarcely been studied. In particular, it is not known if the patterns of methylation of bone cells in culture are a good reflection of that which occurs in bone tissues. The aim of this work was to explore the possible differences in cytosine methylation in human bone and in osteoblasts.

**Material and methods:** To achieve this we carried out a genome-wide study, analysing the degree of methylation of 23,667 *loci* and comparing the results in samples of bone tissue and in cultures of primary osteoblasts.

**Results:** Overall, we observed a good correlation between the two sample types, both in the whole group of *loci* ( $r^2=0,87$ ;  $p<10^{-50}$ ), and in those located in genes involved in bone metabolism. However, some of the *loci* (7-8%) deviated from this general tendency and showed differences in methylation greater than 20%.

**Conclusions:** These results indicate that the methylation data obtained in cultures are not necessarily a true reflection of that which occurs in tissues, which means that care should be taken when extrapolating such results to an *in vivo* situation.

**Key words:** DNA methylation, epigenetics, osteoblasts.

## Introducción

Algunas enfermedades esqueléticas frecuentes, como la osteoporosis o la artrosis, tienen una clara tendencia a la agregación familiar, lo que sugiere que su componente hereditario es importante<sup>1</sup>. De hecho, en varios estudios se ha estimado que la herencia explica hasta el 50-80% de la variabilidad de la masa ósea<sup>2,3</sup>. Sin embargo, las variantes alélicas identificadas en los estudios de genes candidatos y los barridos de todo el genoma (“*genome-wide association studies*”, GWAS) apenas explican una pequeña proporción de ese componente hereditario<sup>4,6</sup>. Los mecanismos epigenéticos pueden contribuir a explicar ese fenómeno. Estos permiten adaptar la expresión de los genes a las condiciones ambientales. Incluyen la metilación del ADN, las modificaciones postraslacionales de las histonas, los ARN no codificantes y la estructura general de la cromatina<sup>7-9</sup>.

En el ADN humano, la mayor parte de las citosinas que van seguidas de una guanina se encuentran metiladas. Se cree que ello da estabilidad al ADN. Sin embargo, en las regiones promotoras de muchos genes hay zonas ricas en citosinas seguidas de guanina (llamadas islas CpG) que pueden estar metiladas o no<sup>10</sup>. El grado de metilación de esas islas se correlaciona con la actividad transcripcional: en general, a mayor metilación, menor expresión del gen<sup>11,12</sup>.

Apenas hay estudios sobre la metilación de islas CpG en el hueso o en osteoblastos, en especial en humanos. Tampoco se conoce si los patrones de metilación en islas CpG en osteoblastos son equiparables a los observados en hueso o no. Por eso,

el objetivo de este trabajo fue explorar la metilación de citosinas a lo largo de todo el ADN en muestras de hueso humano, y comparar los resultados con los patrones de metilación en osteoblastos primarios en cultivo.

## Material y métodos

### Hueso y cultivos de osteoblastos

Se tomaron muestras de hueso trabecular de la cabeza femoral de mujeres sometidas a artroplastia de cadera (fracturas, artrosis), mediante un trócar dentado. Los cilindros se obtuvieron de la región central de la cabeza, evitando el hueso subcondral y las zonas de fractura y osteotomía, según se ha descrito previamente<sup>13</sup>. Tras lavarlas extensamente en PBS, se congelaron en nitrógeno líquido o se sembraron en frascos de plástico en medio Dulbecco suplementado con 10% de suero bovino y antibióticos para obtener osteoblastos a partir de esos explantes<sup>14</sup>.

### Análisis de la metilación

Tras pulverizar los fragmentos óseos, se aisló el ADN por el procedimiento previamente publicado<sup>12</sup>. Se utilizó un procedimiento similar para extraer el ADN de los cultivos confluentes de osteoblastos, de pases primero o segundo<sup>15</sup>. Para analizar la metilación se utilizaron *arrays* de metilación (Infinium Human Methylation 27 DNA análisis bead-chip, Illumina) que exploran unos 27.000 *loci* CpG localizados en las regiones promotoras de unos 14.500 genes. El grado de metilación de cada *locus* se expresa como un valor  $\beta$ , que oscila entre 0 y 1 y es proporcional a la metilación (0-100%). Los detalles del método han sido publicados previamente<sup>16</sup>.

**Análisis de los resultados**

Los valores  $\beta$  se multiplicaron por 100 para estimar el porcentaje de metilación. Se calcularon los valores promedio de metilación observados en 15 huesos de pacientes con fractura y en 15 huesos de pacientes con artrosis y que fueron incluidos en un estudio previo<sup>16</sup>. La media de la edad era de 77 años. Los resultados se compararon con el promedio de la metilación observada en dos cultivos de osteoblastos (uno procedente de un hueso con fractura y otro de un hueso con artrosis), que, para reducir las fuentes de variabilidad, fueron analizados conjuntamente en los mismos *arrays* que las muestras de hueso. Para comparar la metilación en ambos tipos de muestras se utilizaron pruebas de correlación y regresión lineal. Para identificar los genes relacionados con el hueso se exploraron las bases de datos bioinformáticos y los trabajos de la literatura.

**Resultados**

Se exploraron un total de 23.667 *loci*. Como se muestra en la figura 1, cuando se analizaron conjuntamente todos los *loci* CpG explorados, se encontró una correlación directa entre el nivel de metilación en hueso y en osteoblastos ( $r^2=0,88$ ;  $p<10^{-50}$ ). Asimismo, en términos generales el promedio de metilación en ambos tipos de muestras era similar (pendiente de la recta de regresión,  $b=1,009$ ; ordenada en el origen  $-4$ ). Sin embargo, había un número relevante de *loci* que se desviaban de esa relación (Figura 1). Para analizar si esas desviaciones dependían de genes no relacionados con el hueso, se hizo un subanálisis limitado a 658 *loci* localizados en 319 genes que están claramente relacionados con la homeostasis esquelética. El resultado fue similar al del análisis global (Figura 2). Existía una correlación general en el nivel de metilación de ambas muestras ( $r^2=0,87$ ;  $p<10^{-50}$ ), pero una fracción significativa de genes se desviaba de la relación general.

Restringiendo el análisis a los 319 genes óseos (de los que se exploraron 658 *loci*), la metilación en hueso era levemente mayor que en cultivo (diferencia promedio 3,8%;  $p=2,4 \times 10^{-15}$ ; figura 3). En concreto, de los 658 *loci*, 117 (17,8%) mostraban diferencias superiores al 10%. De ellos, el 61% estaban más metilados en el tejido óseo que en los cultivos, mientras que en el 39% de los *loci* la metilación era mayor en los cultivos. En 45 *loci* la diferencia del porcentaje de metilación era superior a 20 puntos, distribuyéndose en este caso por igual el exceso de metilación entre el tejido óseo y los cultivos. Los genes en los que se situaban esos *loci* se exponen en la tabla 1.

**Discusión**

El análisis del epigenoma, y en particular del patrón de metilación del ADN, está siendo objeto de un interés creciente, dado el papel que desempeña en determinar el patrón de expresión génica a lo largo de los diferentes estadios de diferenciación de las estirpes celulares, así como en su adaptación a las condiciones cambiantes del medio. Su

Figura 1. Porcentajes de metilación en tejido óseo y en cultivos de osteoblastos en el conjunto de *loci* analizados

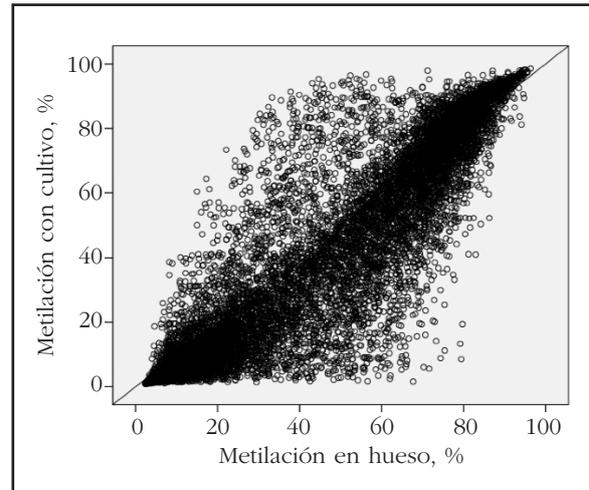


Figura 2. Porcentajes de metilación en tejido óseo y en cultivos de osteoblastos en *loci* correspondientes a genes relacionados con el metabolismo óseo

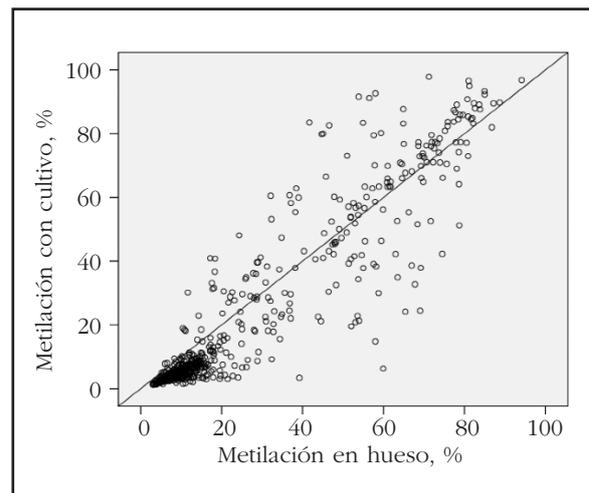


Figura 3. Distribución de frecuencias de las diferencias de metilación entre tejido óseo y osteoblastos en cultivo. Sólo se representan los datos correspondientes a los genes relacionados con el metabolismo óseo

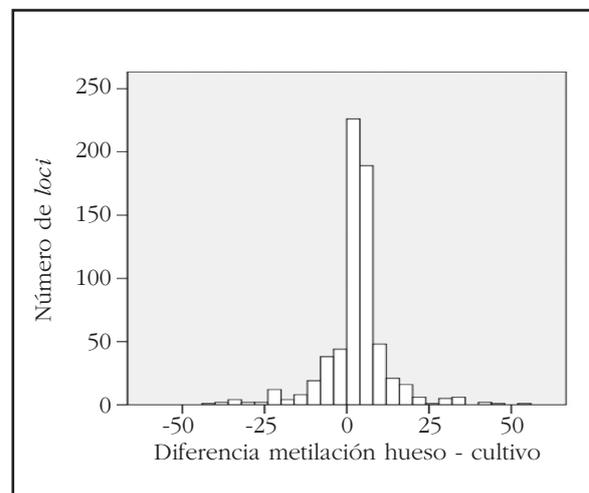


Tabla 1. Genes relacionados con el metabolismo óseo en los que se observaron diferencias de metilación superiores a 20 puntos porcentuales entre el tejido óseo y los cultivos de osteoblastos primarios. Se indica el número de *loci* CpG con diferencias de metilación

Gen	Nº <i>loci</i>
ACVRL1	1
AMH	1
APC	1
AR	2
ATP6V0D2	1
BGN	1
CDKN2B	4
CHRD	1
COL3A1	1
CXCL12	1
DLX5	1
ENG	1
FGF1	1
FGFR1	2
FKBP1B	1
GDF5	1
IL1B	1
IL1RN	1
ITGAM	1
LGALS1	1
MAP4K1	1
MAPK1	1
MAPK10	1
MSX1	7
NR3C1	1
PTH1H	1
PTHR1	1
SFRP1	1
SMAD2	1
TGFB3	1
TNF	1
TRAF1	1
WISP1	1
WNT6	1

papel en algunas enfermedades también parece importante, especialmente en los procesos neoplásicos<sup>17</sup>. De hecho, diferentes estudios han relacionado los cambios en la metilación de los promotores con las alteraciones en la expresión de genes facilitadores o inhibidores del desarrollo de tumores<sup>18-20</sup>. Sin embargo, el papel de los patrones de metilación en las enfermedades esqueléticas no tumorales apenas es conocido.

Uno de los factores que dificultan el análisis del epigenoma es que, a diferencia del genoma, el epigenoma es específico de cada tejido. Esto resulta lógico, puesto que los patrones de expresión génica deben estar alineados con las funciones específicas de ese tejido (de hecho, con las de cada tipo celular). De ahí que, dada la dificultad que plantea la obtención de muestras del esqueleto, exista poca información sobre el epigenoma del hueso.

Nuestro grupo ha publicado recientemente un análisis del patrón de metilación del tejido óseo en pacientes con osteoporosis y con artrosis<sup>16</sup>. En el presente estudio, aprovechamos esos datos para compararlos con el patrón de metilación de los osteoblastos primarios en cultivo, a fin de determinar hasta qué punto son similares. Este análisis es importante a fin de explorar si las células en cultivo son o no un buen reflejo del patrón tisular y, en consecuencia, si los cambios inducidos por diversas manipulaciones de los cultivos pueden ser relevantes para el tejido.

En este estudio de genoma completo, en el que hemos analizado unos 23.000 *loci*, hemos comprobado que, en general, existe una buena correlación en los patrones de metilación en el hueso y los osteoblastos primarios en cultivo. Sin embargo, algunos genes se desvían claramente de ese patrón. La desviación no sigue un patrón sistemático, y afecta tanto a genes que se han relacionado con el metabolismo óseo como a otros. Globalmente, un 17-18% de los *loci* (situados en genes relacionados con vías metabólicas del hueso o no) presentan desviaciones en el grado de metilación superiores al 10%. La proporción de genes con diferencias superiores al 20%, ciertamente relevante desde el punto de vista biológico, fue del 7-8%, similar en el total de *loci* y en aquellos localizados en el subgrupo de genes relacionados con el hueso. Hay varias razones que pueden justificar esas diferencias. Por un lado, el propio cultivo puede inducir cambios fenotípicos en las células, incluyendo cambios en los patrones de expresión y metilación génica. Por otro, en el tejido óseo hay una variedad de estirpes celulares, no sólo osteoblastos, que no se encuentran representadas en los cultivos. Lamentablemente, no es posible cultivar osteocitos, una especie muy abundante en el hueso, para hacer un estudio comparativo similar al efectuado con los osteoblastos.

En conclusión, los resultados de nuestro estudio indican que existe una buena correlación global en los patrones de metilación entre el tejido óseo y los osteoblastos. Sin embargo, algunos genes presentan patrones claramente divergentes,

con frecuencia similar en el subgrupo de genes relacionados con el metabolismo óseo y en el global de genes analizados. Por tanto, los datos de metilación observados en cultivo pueden no ser representativos de la situación en vivo.

Estudio financiado en parte por una beca del Instituto de Salud Carlos III (PI 12/635).

### Bibliografía

1. Riancho JA, González-Macías J. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Madrid: Jarpyo, 2004.
2. Ralston SH. Osteoporosis as an hereditary disease. *Clin Rev Bone Miner Metab* 2010;8:68-76.
3. Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 2010;31:629-62.
4. Riancho JA, Zarrabeitia MT, Gonzalez-Macias J. Genetics of osteoporosis. *Aging Health* 2008;4:365-76.
5. Riancho JA. Genome-wide association studies (GWAS) in complex diseases: advantages and limitations. *Reumatol Clin* 2012;8:56-7.
6. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet* 2012;44:491-501.
7. Delgado-Calle J, Garmilla P, Riancho JA. Do epigenetic marks govern bone mass and homeostasis? *Curr Genomics* 2012;13:252-63.
8. Calvanese V, Lara E, Kahn A, Fraga MF. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2009;8:268-76.
9. Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta* 2014 Feb 19. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.02.007. [Epub ahead of print].
10. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007;128:669-81.
11. Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 2007;23:413-8.
12. Delgado-Calle J, Sanudo C, Fernandez AF, Garcia-Renedo R, Fraga MF, Riancho JA. Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone. *Epigenetics* 2012;7:83-91.
13. Hernandez JL, Garces CM, Sumillera M, Fernandez-Aldasoro EV, Garcia-Ibarbia C, Ortiz JA, et al. Aromatase expression in osteoarthritic and osteoporotic bone. *Arthritis Rheum* 2008;58:1696-700.
14. Velasco J, Zarrabeitia MT, Prieto JR, Perez-Castrillon JL, Perez-Aguilar MD, Perez-Nuñez MI, et al. Wnt pathway genes in osteoporosis and osteoarthritis: differential expression and genetic association study. *Osteoporos Int* 2010;21:109-18.
15. Delgado-Calle J, Sanudo C, Sanchez-Verde L, Garcia-Renedo RJ, Arozamena J, Riancho JA. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone* 2011;49:830-8.
16. Delgado-Calle J, Fernandez AF, Sainz J, Zarrabeitia MT, Sanudo C, Garcia-Renedo R, et al. Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65:197-205.
17. Choi JD, Lee JS. Interplay between epigenetics and genetics in cancer. *Genomics Inform* 2013;11:164-73.
18. Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:87-95.
19. Tost J, Hamzaoui H, Busato F, Neyret A, Mourah S, Dupont JM, et al. Methylation of specific CpG sites in the P2 promoter of parathyroid hormone-related protein determines the invasive potential of breast cancer cell lines. *Epigenetics* 2011;6:1035-46.
20. Jose-Eneriz E, Agirre X, Rodriguez-Otero P, Prosper F. Epigenetic regulation of cell signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics* 2013;5:525-38.

**Olmo JA<sup>1</sup>, Román P<sup>2</sup>, León ML<sup>2</sup>, Mena P<sup>1</sup>, Ignatowitz U<sup>1</sup>, Fuentes M<sup>3</sup>, Almagro MM<sup>3</sup>, Martínez E<sup>4</sup>, Torres J<sup>5</sup>, Canteras M<sup>6</sup>**

1 Servicio de Rehabilitación - Hospital de Torreveja (Alicante)

2 Servicio de Rehabilitación - Hospital General de Ciudad Real

3 Servicio de Rehabilitación - Hospital Virgen de las Nieves - Granada

4 Servicio de Rehabilitación - Hospital Ramón y Cajal - Madrid

5 Servicio de Rehabilitación - Hospital del Vinalopó - Elche (Alicante)

6 Catedrático de Bioestadística - Facultad de Medicina de Murcia

## Riesgo de fractura osteoporótica mayor y de cadera en pacientes con accidente cerebrovascular en fase aguda. Estudio prospectivo multicéntrico

Correspondencia: Juan A. Olmo Fernández-Delgado - Avda. Río Segura, 8 - 30002 Murcia (España)

Correo electrónico: juanolmofernandez@hotmail.com

Fecha de recepción: 08/12/2013

Fecha de aceptación: 26/05/2014

*Trabajo becado con la beca de investigación clínica FEIOMM 2010.*

### Resumen

**Objetivos:** Los pacientes hemipléjicos son considerados una población de riesgo para padecer fracturas osteoporóticas. El objetivo de este trabajo es conocer el riesgo absoluto de fractura por fragilidad en pacientes con accidente cerebrovascular (ACV) y el estado osteometabólico en pacientes con ictus en fase aguda, así como comprobar si existen diferencias basales con un grupo control de pacientes sin patología cerebrovascular.

**Pacientes y método:** Estudio prospectivo multicéntrico realizado en cinco hospitales españoles. Se establecieron dos grupos: a) pacientes con ictus de menos de tres meses de evolución, y b) un grupo control de una población sin enfermedad cerebrovascular. Se analizaron antecedentes de fracturas por fragilidad, número de caídas en el año anterior, densidad mineral ósea (DMO) de cadera, índice FRAX®, determinaciones bioquímicas y marcadores óseos: calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, vitamina D, parathormona (PTH), y telopéptido carboxiterminal del colágeno I (CTX).

**Resultados:** Se han estudiado un total de 82 pacientes: 50 pacientes con ACV y 32 controles. El 12% de los pacientes con ACV presentaron riesgo elevado de sufrir una fractura de cadera y el 8% riesgo elevado de una fractura mayor osteoporótica. En el grupo control el riesgo fue mayor. Los pacientes hemipléjicos presentaron una DMO en cadera menor que el grupo control, aunque las diferencias de ambas variables no fueron estadísticamente significativas.

Los niveles de CTX estaban elevados en pacientes con ACV, siendo la única determinación con diferencias significativas entre ambos grupos estudiados.

**Conclusiones:** Los pacientes con ACV presentaron valores de marcadores de reabsorción ósea (CTX) significativamente elevados y una DMO de cadera menor que el grupo control.

**Palabras clave:** *accidente cerebrovascular, DMO, fractura por fragilidad.*

## Risk of major osteoporotic or hip fracture in patients with cerebrovascular accident in the acute phase. Multicentre prospective study

### Summary

**Objetives:** Hemiplegic patients are considered to be a population at risk of suffering osteoporotic fractures. The aim of this work is to understand the absolute risk of fragility fracture in patients with cerebrovascular accident (CVA) and the osteometabolic state of patients with ictus in the acute phase, as well as confirming if there are baseline differences compared to a control group without cerebrovascular pathology.

**Patients and method:** Multicentre prospective study carried out in five Spanish hospitals. Two groups were established: a) patients with ictus of less than three months development, and b) a control group from a population without cerebrovascular disease. History of fragility fractures, number of falls in the previous year, bone mineral density (BMD) in the hip, FRAX® index, determinations of biochemistry and bone markers - calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, vitamin D, parathormone (PTH), and carboxy-terminal telopeptide of collagen type I (CTX) - were analysed.

**Results:** A total of 82 patients were studied: 50 patients with CVA and 32 controls. 12% of those patients with CVA had an increased risk of suffering a hip fracture, and 8% an increased risk of a major osteoporotic fracture. In the control group the risk was greater. The hemiplegic patients had BMD in the hip lower than those in the control group, although the differences in both variables were not statistically significant.

The levels of CTX were higher in patients with CVA, this being the sole determination which showed a statistical difference between the two groups studied.

**Conclusions:** The patients with CVA had values of markers for bone resorption (CTX) significantly higher and a BMD in the hip lower than those in the control group.

**Key words:** cerebrovascular accident, BMD, fragility fracture.

### Introducción

Como es universalmente aceptado, la importancia de la osteoporosis radica en el riesgo de provocar fracturas. Concretamente son las fracturas de cadera las que tienen mayor trascendencia debido a las repercusiones funcionales, económicas y a la tasa de mortalidad. La fractura de cadera se considera un acontecimiento multifactorial, otorgándosele al estudio y jerarquización de los diversos factores una gran relevancia.

La importancia del ictus en el riesgo de fractura de cadera se empezó a plantear en 1997, tras el estudio realizado en la población japonesa por Suzuki y cols.<sup>1</sup> Estudios posteriores<sup>2-5</sup> han reforzado esos hallazgos dirigidos a considerar a los pacientes hemipléjicos una población de riesgo, y a recomendar la determinación sistemática de la densidad mineral ósea (DMO) y el uso de bifosfonatos durante el periodo de rehabilitación<sup>6</sup>.

Las teorías etiopatogénicas que han intentado explicar este desenlace son diversas, y van desde un incremento de las caídas, consecuencia de la alteración de la marcha<sup>1</sup>, a una disminución acelerada de la masa ósea provocada por la inmovilidad<sup>7</sup>; este planteamiento se ve reforzado por algunos estudios que encuentran diferencias significativas de la masa ósea entre el lado parético y el sano, así como relaciones de los niveles de DMO con la actividad funcional residual<sup>7-9</sup>.

Algunos autores han planteado que el incremento del riesgo de fractura radica en el déficit de vitamina D<sup>10</sup> que suelen padecer los pacientes

aquejados de hemiplejia, déficit atribuible a carencias alimentarias y baja exposición solar. El impacto sobre la calidad ósea y un mayor riesgo de caídas por debilidad muscular podría explicar el aumento de las fracturas<sup>11</sup>.

También se han apuntado alteraciones genéticas, ya que puede haber mayor presencia en los pacientes con ictus de un polimorfismo en el gen OPG-1181c/C, que controla la síntesis de osteoprotegerina; aunque esta alteración sólo se ha relacionado con ictus de etiología hemorrágica<sup>12</sup>.

Teorías más recientes señalan la alteración del remodelado óseo, muy incrementado durante el primer al año post-ictus, como causa del deterioro de la calidad ósea<sup>13-15</sup>.

Pero también es posible que los pacientes que sufren un accidente cerebrovascular (ACV) lleguen a este desenlace con niveles más bajos de DMO y por tanto mayor riesgo de sufrir fracturas osteoporóticas<sup>16</sup>.

La explicación de esta situación podría encontrarse en la relación, todavía no suficientemente aclarada, entre dislipemias, arteriosclerosis y osteoporosis, con posibles mecanismos etiopatogénicos comunes<sup>17</sup>.

El objetivo del presente estudio fue conocer el riesgo absoluto de fractura mayor osteoporótica y de cadera utilizando la herramienta FRAX® en pacientes con ACV; como objetivos secundarios, intentamos evaluar la existencia de diferencias basales en los parámetros osteometabólicos y de DMO entre pacientes con ictus y un grupo control sin patología cerebrovascular.

## Pacientes y método

Se ha realizado un estudio prospectivo multicéntrico comparativo, por emparejamiento no 1:1 de 50 pacientes con ACV frente a 32 controles, en el que han participado los servicios de Rehabilitación de cinco hospitales españoles. La inclusión de pacientes se inició en marzo de 2011, finalizando en junio de 2013.

El estudio fue autorizado por el Comité Ético de Investigación Científica de los hospitales participantes. Por limitaciones presupuestarias para realizar densitometrías óseas, en un centro no se pudo realizar el estudio del grupo control.

Todos los pacientes, tanto del grupo de estudio como del control, firmaron un consentimiento informado.

### Criterios de inclusión y exclusión

a) Grupo de pacientes con ACV: los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes remitidos a la consulta de rehabilitación con el diagnóstico de ACV de menos de 3 meses de evolución, ya sea de etiología isquémica o hemorrágica.

- Edad comprendida entre 60-80 años.

Como criterios de exclusión se establecieron:

- Pacientes que antes de sufrir el ictus estuvieran encamados, por cualquier patología, durante más de 24 semanas.

- Pacientes sin capacidad de deambulación antes del ictus.

- ACV previos con secuelas funcionales.

- Pacientes diagnosticados de osteoporosis secundaria a: hiper o hipoparatiroidismo, hiper o hipotiroidismo, hipogonadismo en el varón, tratamiento con corticoides orales de más de 3 meses, alcoholismo crónico con presencia de alteraciones hepáticas.

b) Grupo control:

Se estableció con pacientes que acudieron a la consulta de Rehabilitación por cualquier patología y no sufriesen una enfermedad vascular (ACV, patología cardíaca isquémica, isquemia arterial de miembros inferiores).

La selección se hizo siguiendo un sistema pareado de edad y sexo.

El resto de criterios de exclusión fueron coincidentes a los del grupo ACV: encamamiento, incapacidad para la deambulación, osteoporosis secundaria.

### Variables estudiadas del grupo de ACV

- Edad y sexo.

- Etiología del ACV isquémico o hemorrágico.

- Capacidad para la deambulación siguiendo la Clasificación Funcional de la Marcha del Hospital de Sagunto (CFMHS), que estratifica de la siguiente forma esta actividad:

Nivel 0: Deambulación imposible o nula.

Nivel 1: Deambulación no funcional.

Nivel 2: Deambulación solo en el interior de locales y del domicilio.

Nivel 3: Deambulación alrededor de la casa con perímetros inferiores a 600 metros.

Nivel 4: Deambulación independiente por la comunidad, pero con marcha anormal (cojera de cualquier tipo).

Nivel 5: Deambulación normal sin claudicación ni limitaciones.

- Antecedentes de fracturas por fragilidad en los 10 años previos al ACV y localización.

- Número de caídas en el año anterior al ictus.

- DMO de cadera.

- T-score: considerándose osteopenia entre -1 a -2,5 y osteoporosis cuando  $T < -2,5$ .

- Índice de FRAX®: se consideró riesgo de fractura cuando los valores del porcentaje de fractura mayor osteoporótica era  $\geq 10$  y el de fractura de cadera  $\geq 3$ .

- Determinaciones analíticas:

- \* Bioquímica: glucosa, colesterol y triglicéridos.

- \* Marcadores óseos: fosfatasa alcalina total, 25-hidroxivitamina D, PTH, calcio, fósforo y telopeptido carboxiterminal del colágeno I (CTX) en sangre.

En el grupo control se recogieron los mismos datos, a excepción de los relacionados con la hemicipleja y la situación funcional.

### Análisis estadístico:

Se realizó un análisis estadístico inicial calculando las frecuencias y porcentajes de las variables categóricas. El estudio estadístico comparativo se ha realizado utilizando tablas de contingencia con análisis de residuos.

Para las variables cuantitativas se han calculado la medias y desviación estándar, utilizándose el test de la t-Student para realizar el análisis comparativo. El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0,05$  para todas las variables analizadas.

## Resultados

Se han estudiado un total de 82 pacientes: 50 pacientes con ACV y 32 que constituyeron el grupo control.

Respecto al sexo, en el grupo ACV hubo 24 varones (48%) y 26 mujeres (52%), no existiendo diferencias significativas con el grupo control, que estuvo formado por 14 varones (43,75%) y 18 mujeres (56,25%).

Tampoco se encontraron diferencias significativas en la edad media de ambos grupos, ACV: 70,32 años ( $DE \pm 5,8$ ); y grupo control: 72,44 años ( $DE \pm 6,6$ ).

Los procesos isquémicos determinaron la etiología en 39 pacientes (91%) y se diagnosticó hemorragia cerebral en 4 (9%); no se comunicó la causa en 7 pacientes.

La mayoría de los pacientes del estudio presentaron una capacidad de deambulación en estadio 3 o 4 de la CFMHS (Tabla 1).

Los pacientes con ACV sufrieron mayor número de caídas en el año anterior al estudio; por el contrario los del grupo control tenían un mayor historial de fracturas por fragilidad (Tabla 2).

T-score en cadera: El 66% de los pacientes con ACV y el 50,15% del grupo control presentaban una T-score en niveles de osteopenia o de osteoporosis, no existiendo diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 2).

DMO de cadera: Los pacientes hemipléjicos presentaron un nivel medio de masa ósea en cadera menor que el grupo control, pero las diferencias no fueron significativas (Tabla 4).

Tabla 1. Capacidad de deambulaci3n siguiendo la CFMHS

	Frecuencia	Porcentaje
Nivel 0: Deambulaci3n nula	7	15,21%
Nivel 1: Deambulaci3n no funcional	3	6,50%
Nivel 2: Solo en el hogar	7	15,21%
Nivel 3: Independiente per3metro menos de 600 metros	13	28,26%
Nivel 4: Independiente con marcha ANORMAL	12	26,08%
Nivel 5: Deambulaci3n normal	4	8,69%
No se recogió	4	8,6%

**Índice FRAX®:** En el grupo control fue mayor el número de pacientes con riesgo elevado de sufrir una fractura por fragilidad que el grupo ACV, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 2).

**Determinaciones bioquímicas:** Los niveles de colesterol fueron más altos en el grupo control, no así la glucemia y triglicéridos, las diferencias no fueron en ningún caso significativas (Tabla 3).

**Marcadores analíticos de metabolismo óseo:** Niveles de vitamina D: En el grupo ACV 32 pacientes (68%) presentaban niveles por debajo de 30 ng/ml, catalogándose de insuficiencia o deficiencia de vitamina D. En el grupo control 22 pacientes (71%) eran insuficientes o deficientes en esta vitamina. Las diferencias entre los grupos no eran significativas.

Tampoco se han encontrado diferencias significativas en los valores de calcio, f3sforo y PTH.

Los niveles de CTX estaban significativamente elevados en pacientes con ACV (Tabla 4).

## Discusi3n

En el presente estudio se pretendió mostrar la situaci3n basal en relaci3n al riesgo de fractura osteopor3tica de pacientes que han sufrido un ACV reciente, asumiendo que la mayor3a de hallazgos van a estar más relacionados con sus antecedentes patol3gicos y estilo de vida, que con el impacto que sobre el sistema óseo puede provocar, con el paso del tiempo, un ictus con repercusiones motoras.

Como cabía esperar, en la mayor3a de pacientes el ictus fue de etiología isquémica, siendo la tasa obtenida del 91% la más alta de lo encontrado en los servicios de Neurología<sup>18</sup>, aunque es posible que la superior mortalidad del ictus hemorrágico provoque una mayor proporci3n de ACV isquémicos en los servicios de rehabilitaci3n.

Para la valoraci3n de la situaci3n funcional hemos utilizado la CFMHS, que es una escala validada<sup>19</sup> y de amplia difusi3n en los servicios de Rehabilitaci3n; la hemos preferido a otras más conocidas, como la de Barthel, por centrarse en la

capacidad de deambulaci3n del paciente, actividad de la vida diaria más relevante en la evoluci3n de la salud ósea.

En relaci3n a los resultados obtenidos con esta escala de deambulaci3n, nos parece importante remarcar que el 62% de los pacientes con ictus presentaban una marcha autónoma, aunque fuese con limitaciones, situaci3n que puede sorprender en ACV en fase aguda; tal vez pueda existir un sesgo de selecci3n por las dificultades que para el estudio (traslados, pruebas, etc.) pudieran tener los pacientes con afectaciones motoras más graves.

Hemos seleccionado el índice FRAX® por ser una herramienta de creciente difusi3n, a pesar de reconocérsele algunas limitaciones. Se estableció la línea de corte en 10 para la fractura mayor osteopor3tica, y de 3 para establecer el riesgo elevado de fractura de cadera, por ser los valores mínimo de corte que, cuando se inició el estudio, era aconsejado y utilizado por otros autores españoles<sup>20,21</sup>; aunque cada vez es mayor la evidencia de que el FRAX® infravalora en la poblaci3n española el riesgo de fracturas, en especial la fractura mayor osteopor3tica, siendo más sensible la predicción de fractura de cadera<sup>22</sup>, pero debemos destacar que ésta es la más relevante para nuestro estudio.

Utilizando esta cifras corte, encontramos que el 12% de los pacientes tenían riesgo elevado de padecer una fractura de cadera, y el 8% de sufrir una fractura mayor osteopor3tica en los próximos diez años; no hemos encontrado trabajos semejantes en pacientes con ictus que nos permita comparar nuestros resultados.

En cuanto a los valores de DMO del cuello femoral, el 58% de los pacientes con ictus presentaban osteopenia y el 8% osteoporosis, en el estudio publicado por Hye Won<sup>16</sup>, realizado en pacientes de las mismas características que los nuestros (ACV en fase aguda), encontraron cifras de osteopenia y osteoporosis de columna del 39% y 43% respectivamente, aunque hemos de recordar que, según los estudios realizados por Díez Curiel, la disminuci3n de la DMO es más frecuente en columna que en cadera<sup>23</sup>.

Tabla 2. Frecuencia y porcentaje de caídas durante un año, fracturas en los diez años previos, de pacientes con osteopenia y osteoporosis de cadera (T-score) y pacientes con riesgo elevado de Fracturas Mayor Osteoporóticas (MO) y de Fractura de Cadera (HF) en ambos grupos estudiados

		Caídas	Fracturas	T-score: -1 a -2,5	T-score: ≥-2,5	FRAX® MO ≥10	FRAX® HF ≥3
ACV	Frecuencia Porcentaje	4 8%	3 6%	29 58%	4 8%	4 8%	6 12,5%
Control	Frecuencia Porcentaje	0	8 25%	13 34%	5 15%	4 13%	8 25,8%

Tabla 3. Determinaciones bioquímicas. Valores medios

	ACV	Control	Valor de p
Glucemia (mg/dl)	108,97	99,68	NS
Colesterol (mg/dl)	144,97	199,48	NS
Triglicéridos (mg/dl)	129,7	114,33	NS

Tabla 4. Densidad mineral ósea (DMO) en cadera y parámetros bioquímicos óseos

	ACV media±DE	Control media±DE	Valor de p
DMO cadera (g/cm <sup>2</sup> )	0,7216±0,185	0,7609±0,16	NS
Calcio (mg/dl)	9,37±0,46	9,42±0,58	NS
Fósforo (mg/dl)	3,54±0,70	3,37±0,56	NS
Fosfatasa alcalina total (UI/l)	125,32±67	111,97±52	NS
Vitamina D (ng/l)	25,31±11	24,69±11	NS
PTH (pg/ml)	48,73±35	59,99±36	NS
CTX (ng/ml)	0,4362±0,27	0,2907±0,11	0,011

Puede sorprender que el grupo control, pese a ser homogéneo en edad y sexo con los pacientes con ACV, presente un riesgo más elevado de sufrir fractura mayor osteoporótica o de cadera, situación que se puede correlacionar con un mayor número de fracturas por fragilidad en los 10 años previos al estudio, este hallazgo puede hacer sospechar un sesgo de selección y por tanto una limitación de nuestros resultados, que ha favorecido la inclusión de pacientes con osteoporosis en el grupo control. Aunque no podemos olvidar que la prevalencia de osteoporosis en una consulta general de rehabilitación es muy alta, como describe Serralta<sup>24</sup> que encuentra esta patología en el 53% de sus pacientes.

La relación entre dislipemias y metabolismo óseo ha sido comunicada por diversos autores, aunque sin hallazgos concluyentes<sup>17</sup>; en nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas con el grupo control en ninguno de los parámetros bioquímicos. En términos absolutos, las cifras de coles-

terol son más bajas en los pacientes con ACV. Estos resultados tienen que ser tomados con precaución, ya que no hemos recogido los posibles tratamientos hipolipemiantes, lo que es una limitación del estudio, en especial por la importancia que parecen tener las estatinas en el metabolismo óseo y en la disminución del riesgo de fracturas<sup>17</sup>.

Es de destacar el importante número de pacientes con insuficiencia o deficiencia de vitamina D en ambos grupos, hallazgo que apunta una vez más a la prevalencia del déficit de este sistema hormonal en España, que se presenta en el 30% de la población general, llegando a afectar al 87% de los ancianos institucionalizados<sup>25,26</sup>.

Lo más relevante de los hallazgos analíticos es el incremento de los marcadores de resorción ósea CTX en el grupo con ictus. Este hallazgo ha sido recogido en otros estudios que, como el nuestro, se han realizado en pacientes con ictus en fase aguda<sup>15</sup> y se correlacionan con mayores pérdidas de masa ósea en cadera<sup>13</sup>.

Para estos autores existe una correlación entre los niveles elevados de CTX y el grado de afectación motora; en este caso sería el factor mecanostato el más influyente en el aumento de la reabsorción ósea de estos pacientes; pero el metabolismo óseo es un proceso complejo donde intervienen factores locales y endocrino-metabólico con un posible efecto final en el RANK-RANKL-OPG, que sería el agente final del proceso de remodelado óseo<sup>27</sup>.

Es posible que, de la misma forma que se han comunicado alteraciones de este sistema en la enfermedad de Paget, cáncer de próstata o artritis reumatoide, entre otras<sup>27</sup>, encuentren alguna alteración específica de estas citocinas en los pacientes con ACV.

En conclusión, si queremos disminuir el riesgo de los pacientes con ACV para padecer una fractura de cadera en los años siguientes al ictus, se deberá planificar un programa de terapia física con carga y deambulacion, para favorecer el factor mecanostato, sin olvidar la necesidad de un tratamiento antirresortivo, al menos en pacientes donde se detecte riesgo de fractura.

**Conflicto de interés:** Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

### Bibliografía

- Suzuki T, Yoshida H, Hashimoto T, Yoshimura N, Fujiwara S, Fukunaga M, et al. Case control study of risk factors for hip fractures in the Japanese elderly by a Mediterranean Osteoporosis study (MEDOS) questionnaire. *Bone* 1997;21:461-7.
- Kang H, Chung SD, Xirasgar S, Jaw FS, Herng-Ching L. Increased risk of stroke in the year after a hip fracture a population-based follow-up study. *Stroke* 2011;42:336-41.
- Trimpou P, Landin-Wilhelmse K, Oden A, Rosengren A, Wilhelmsen L. Male risk factors for hip fracture-a 30-years follow-up study in 7.495 men. *Osteoporos Int* 2010;21:409-16.
- Huang PJ, Lee SH. Case control study of risk factors for hip fracture in the elderly. *Hu Li Za Zhi* 2012;59:45-54.
- Fisher A, Srikusalanukul W, Davis M, Smith P. Poststroke hip fracture: prevalence, clinical characteristics, mineral-bone metabolism, outcomes, and gaps in prevention. *Stroke Res Treat* 2013; doi: 10.1155/2013/641943. Epub 2013 Sep 25.
- Powels S, Lalmohamed A, Leufken B, de Boer A, Cooper C, Van Staa T, et al. Risk of hip/femur fracture after stroke: a population-based case control study. *Stroke* 2009;40:3281-5.
- Dermirag D, Ozdemi F, Kokino S, Berkarda S. The relations between mineral density and immobilization duration in hemiplegic limbs. *Ann Nucl Med* 2005;19:695-9.
- Takaoto S, Masuyama T, Nakajima M, Sekiya K, Kosaka H, Morimoto T, et al. Alterations of bone mineral density of the femurs in hemiplegia. *Calcif Tissue Int* 1995;56:259-62.
- Beaupre GS, Lew HL. Bone density changes after stroke. *Am J Phys Rehabil* 2006;85:464-72.
- Yoshiro S. Abnormal bone and calcium metabolism in patients after stroke. *Arch Phys Med Rehabil* 2000;81:117-21.
- Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Willett WC, Staehelin HB, Bazemore MG, Zee RY, et al. Effects of vitamin D on falls: a meta-analysis. *JAMA* 2004;291:1999-6.
- Strand M, Söderström I, Wiklund PG, Hallmans G, Weinehall L, Söderberg S, et al. Polymorphism at the osteoprotegerin and interleukin-6 genes in relations to first-ever stroke. *Cerebrovascular Dis* 2007;24:418-25.
- Paker N, Bugdayci D, Tekdos D, Caglayan D, Kaya B. Relationship between bone turnover and bone density at the proximal femur stroke patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2009;18:139-43.
- Ryan DJ, Browne JG, Healy M, Casey Habirson JA. Biochemical indices of bone turnover in stroke patients are comparable to that of hip fracture patients. *Bone* 2009;44(Sup 2):S253-S338.
- Haddaway MJ, Bainbridge NJ, Powell DE, Davie MW. Bone resorption in stroke and institutionalized subjects. *Calcif Tissue Int* 2009;84:118-25.
- Kim HW, Kang E, Im S, Ko YJ, Im SA, Lee JI. Prevalence of pre-stroke low bone mineral density and vertebral fracture I first stroke patients. *Bone* 2008;43:183-6.
- Yezerka I, Hernández JL, Olmos JM, González J. Dislipemias y metabolismo óseo. ¿Un vínculo común de la osteoporosis y aterosclerosis? *Rev Osteoporos Metab Miner* 2011;1:41-50.
- Ustrell-Roiga X, Serena-Lealb J. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cerebrovasculares. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:753-69.
- Viosca E, Lafuente R, Martínez JL, Almagro P, Gracia A, González C. Walking recovery after an acute stroke: Assessment with a new functional classification and the Barthel index. *Arch Phys Med Rehabil* 2005;86:1239-44.
- Mesa Ramos M. Métodos Diagnósticos en Osteoporosis. En: *ARC en Osteoporosis 2011. Revisión de Abstractas*. Madrid Ed Luzan 5 SA; 2011; p.38.
- Olmo Fernández-Delgado JA. ¿Podría el índice de FRAX® modificar el tratamiento de la osteoporosis? *Rev Osteoporos Metab Miner* 2012;4:23-6.
- Kanterewicz E, Sierra G, Puigoriol E, Tebé C, Peris P. Riesgo de fractura en la cohorte FRODOS. Estudio comparativo de la aplicación del modelo FRAX® español, francés, inglés y sueco. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2014;6:14-9.
- Diaz Curiel M, Carrasco de la Peña JL, Honorato Perez J, Perez Cano R, Rapado A, Ruiz-Martínez I. Study of bone mineral density in lumbar spine and femoral neck in a Spanish population. *Osteoporosis Int* 1997;7:59-64.
- Serralta-Dávila I, Girbes-Borras I. Motivos de consulta e rehabilitación con factores de riesgo clínico de osteoporosis. *Rehabilitación* 2008;42:73-9.
- Quesada Gómez JM, Sosa Henríquez M. Nutrición y osteoporosis. Calcio y vitamina D. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2011;4:165-82.
- Groba Marco MV, Mirallave Pescador A, González Rodríguez E, García Santana E, González Padilla E, Saavedra Santana P, et al. Factores relacionados con la insuficiencia de de vitamina D en estudiantes de Medicina de Gran Canaria. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2010;2:11-8.
- Neyro Bilbao JL, Cano Sánchez A, Palacios Gil-Antuñano S. Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2011;3:105-12.

López-Herradón A<sup>1,2</sup>, Lozano D<sup>1,2,3</sup>, Portal-Núñez S<sup>1,2</sup>, Ardura JA<sup>1,2</sup>, Gutiérrez-Rojas I<sup>4</sup>, Maycas M<sup>1,2</sup>, Rodríguez L<sup>3,5,6</sup>, Varela I<sup>3,5,6</sup>, Esbrit P<sup>1,2</sup>

1 Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo - Instituto de Investigación Sanitaria (IIS)-Fundación Jiménez Díaz - Universidad Autónoma de Madrid

2 Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) - Instituto de Salud Carlos III - Madrid

3 Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ) de Madrid

4 Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) - Instituto de Salud Carlos III - Madrid

5 Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" - CSIC-Universidad Autónoma de Madrid

6 Unidad 761 - Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) - Instituto de Salud Carlos III - Madrid

## Comparación de las acciones osteogénicas de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) en modelos de ratón diabético y con déficit del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I)

Correspondencia: Pedro Esbrit - Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo - IIS-Fundación Jiménez Díaz - Avda. Reyes Católicos, 2 - 28040 Madrid (España)  
Correo electrónico: pesbrit@fjd.es

Fecha de recepción: 01/05/2014

Fecha de aceptación: 15/07/2014

*Trabajo becado con una Beca de Investigación en Biología Molecular FEIOMM 2011.*

### Resumen

La diabetes *mellitus* (DM) es una patología metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica debida al déficit de producción y/o acción de la insulina. La DM, sobre todo la tipo 1, se asocia comúnmente a osteopenia/osteoporosis y al aumento de riesgo de fracturas. El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), un factor abundante en la matriz ósea que ejerce un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la masa ósea, disminuye en la DM. La proteína relacionada con la parathormona (PTHrP), un modulador del crecimiento y la función osteoblástica, actúa sobre los osteoprogenitores promoviendo la diferenciación osteoblástica y la regeneración ósea. Su expresión disminuye en situación diabética. En este trabajo, hemos evaluado y comparado las acciones osteogénicas de la PTHrP en modelos murinos de DM tipo 1 y deficiente en IGF-I. Los ratones diabéticos por inyección de estreptozotocina presentan una disminución de la masa ósea en los huesos largos, asociada al incremento de proteínas oxidadas y a la disminución de expresión de genes relacionados con la vía Wnt y de la proteína  $\beta$ -catenina, además de mostrar alteraciones en el hueso trabecular vertebral. En el modelo de ratón con déficit de IGF-I, nuestros resultados indican una situación de osteopenia tanto en el fémur (asociado a una inhibición de la vía Wnt) como en la columna (L1-L5). Nuestros hallazgos demuestran que la administración de PTHrP, predominantemente a través de su dominio N-terminal, modula la vía de Wnt canónica en relación a sus acciones osteogénicas en situación diabética y, también en parte, en ausencia de IGF-I.

**Palabras clave:** *PTHrP, diabetes mellitus, IGF-I, osteopenia, vía Wnt.*

# Comparison of the osteogenic actions of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in diabetic and insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficient mouse models

## Summary

Diabetes *mellitus* (DM) is a metabolic pathology characterised by chronic hyperglycemia due to a deficit in the production and/or action of insulin. DM, above all type I, is commonly associated with osteopenia/osteoporosis and with an increased risk of fractures. Insulin-like growth factor-I (IGF-I), a factor abundant in the bone matrix which plays a significant role in the development and maintenance of bone mass, diminishes with DM. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP), a modulator of growth and osteoblast function, acts on osteoprogenitors, promoting osteoblast differentiation and bone regeneration. Its expression is reduced in the presence of DM. In this work we have evaluated and compared the osteogenic actions of PTHrP in mouse models with type 1 DM and IGF-I deficiency. Diabetic mice by injection of streptozotocin had a reduction in bone mass in the long bones associated with an increase in oxidised proteins and a reduction in the expression of genes related to the Wnt pathway and of  $\beta$ -catenin protein, as well as alterations in vertebral trabecular bone. In the mouse model with IGF-I deficit our results indicate the presence of osteopenia both in the femur (associated with an inhibition of the Wnt pathway) and the spine (L1-L5). Our findings demonstrate that the administration of PTHrP, predominantly through its N-terminal domain, modulates the canonical Wnt pathway in relation to its osteogenic actions in a diabetic situation and also, in part, in the absence of IGF-I.

**Key words:** *PTHrP, diabetes mellitus, IGF-I, osteopenia, Wnt pathway.*

## Introducción

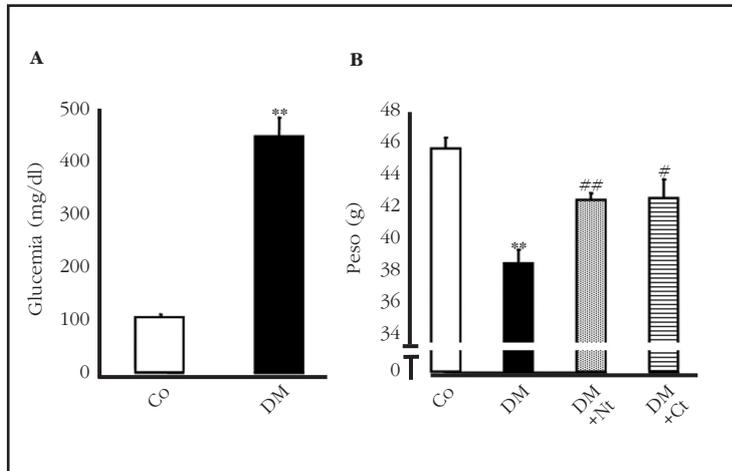
La diabetes *mellitus* (DM) es una patología metabólica caracterizada por una hiperglucemia crónica debida al déficit de producción y/o acción de la insulina, responsable de la disfunción de órganos tales como la retina, el riñón, el sistema nervioso y el sistema cardiovascular<sup>1</sup>. Además, la DM se asocia comúnmente a osteopenia/osteoporosis y al aumento de riesgo de fracturas, por mecanismos solo parcialmente caracterizados<sup>2</sup>. La DM tipo 1 (DM1), o insulino-dependiente, se caracteriza por niveles bajos de insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) circulantes y se suele manifestar antes de alcanzar el pico de masa ósea, mientras que la tipo 2 (DM2) -asociada a resistencia insulínica- es común en adultos<sup>3</sup>. Las alteraciones esqueléticas en la DM1 incluyen: 1) una disminución del crecimiento óseo longitudinal durante la pubertad en adolescentes; 2) una disminución de masa ósea en cadera, cabeza del fémur y columna vertebral en adultos; 3) un incremento del riesgo de fractura; y 4) una disminución de la capacidad regenerativa ósea. Las características de la DM son compatibles con un bajo nivel de remodelado óseo<sup>4,7</sup>. La hiperglucemia induce una menor proliferación y función osteoblástica. Además, los productos de glicosilación avanzada (AGEs) contribuyen a la generación de estrés oxidativo, incrementando la fragilidad ósea y el riesgo de fracturas<sup>8,9</sup>.

Entre los factores endocrinos y locales con acción ósea demostrada, la insulina, producida y secretada por las células pancreáticas, y el IGF-I mayoritariamente producido en el hígado pero

también en el hueso donde se acumula en la matriz ósea, merecen una especial consideración en la osteopatía asociada a la DM<sup>10,11</sup>. Estudios en ratas diabéticas tipo 1 indican el papel del déficit de insulina en la disminución de la integridad y resistencia ósea<sup>12,13</sup>. Además, los pacientes con DM1 poseen niveles séricos de IGF-I significativamente disminuidos en relación a los encontrados en individuos normales o en pacientes con DM2<sup>14</sup>. Se sabe que el IGF-I sistémico juega un importante papel en el desarrollo y mantenimiento de la masa ósea. De hecho, ratones con una deficiencia global en IGF-I presentan al nacer un tamaño de aproximadamente el 60% del correspondiente a sus controles, que disminuye al 30% a las 8 semanas, y presentan una menor mineralización ósea y un bajo remodelado óseo<sup>15-17</sup>.

Por otra parte, la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) juega un papel fundamental en el desarrollo del hueso endocondral retrasando la diferenciación de los condrocitos en la placa de crecimiento, y actúa como un importante regulador local del remodelado óseo en adultos<sup>18</sup>. Ratones homocigotos *Pthrp*<sup>-/-</sup> presentan una condrodisplasia letal perinatal; mientras que los heterocigotos *Pthrp*<sup>+/-</sup> son viables pero exhiben una reducción significativa de la masa ósea<sup>19</sup>. La PTHrP posee similitud estructural con la PTH en su extremo N-terminal, pero difiere completamente de esta hormona en el resto de su estructura. La región media y C-terminal de la PTHrP contiene distintos epítomos singulares, asociados a efectos auto/paracrinos e intracrinos en distintos tipos celulares<sup>20</sup>. Como consecuencia de su pro-

Figura 1. Caracterización del modelo de ratón diabético por STZ. Se muestra la glucemia basal en los ratones control (Co) y diabéticos (DM), así como los cambios en el peso en cada uno de los grupos experimentales. Nt, PTHrP (1-36); Ct, PTHrP (107-139). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de 5 ratones/grupo. \*\* $p < 0,01$  vs. Co; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs. DM



cesamiento post-trasduccional<sup>21</sup>, la PTHrP puede generar distintos fragmentos bioactivos: 1) un fragmento N-terminal 1-36; 2) uno o varios fragmentos en la región media, cuyos aminoácidos 88-91 y 102-106 son dominios de localización nuclear/nucleolar (NLS); y 3) un fragmento C-terminal que contiene la secuencia 107-111 conocida como osteostatina. Aunque aún no se ha logrado aislar un receptor para esta región C-terminal de la PTHrP, se ha demostrado que señala en parte a través de la transactivación del receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) asociada a sus acciones en los osteoblastos<sup>22-24</sup>. Estudios previos han demostrado que la PTHrP revierte los efectos deletéreos de la DM1 sobre el número de células osteoformadoras y la función osteoblástica en la tibia de ratón en regeneración<sup>25</sup>. Además, la PTHrP es capaz de compensar la disminución de diferenciación osteoblástica y la inhibición de la señalización a través de Wnt/ $\beta$ -catenina –una vía clave estimuladora de la formación ósea– inducidas por la alta glucosa en células osteoblásticas *in vitro*<sup>24,26,27</sup>.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en el presente trabajo hemos evaluado y comparado las consecuencias del déficit de insulina (DM1) y de IGF-I en la eficacia de la PTHrP para inducir acciones osteogénicas en el ratón.

## Materiales y métodos

Todos los estudios realizados en animales fueron desarrollados con la aprobación del Comité de Experimentación y Bienestar Animal del IIS-Fundación Jiménez Díaz. El dolor y el sufrimiento de los animales fueron paliados de acuerdo a la normativa europea vigente (Directiva 2010/63/UE). Igualmente, el diseño experimental se adaptó al criterio conocido como las 3R (del inglés, *replace, reduce, refine*) para minimizar el número de animales que permitan obtener resultados significativos<sup>28</sup>.

## Modelo de ratón con DM1

Se utilizaron ratones CD-1 macho de 4 meses de edad (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona), estabilizados durante dos semanas en el bioterio del IIS-Fundación Jiménez Díaz. Los animales tuvieron acceso libre a agua y a una dieta estándar (8,8 g/kg de calcio y 5,9 g/kg de fósforo; Panlab, Reus), a 22°C con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para inducir la DM, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.), una citotoxina pancreática, durante 5 días consecutivos a una dosis de 45 mg/kg de peso corporal en tampón citrato sódico 50 mM, pH 4,5, o con el vehículo salino (controles)<sup>25</sup>. Una semana después de la última inyección se midió la glucosa en sangre, extraída de la cola del ratón, mediante un glucómetro (Glucocard G+meter, Menarini Diagnostics,

Florenzia, Italia), considerándose diabéticos aquellos con glucemia  $\geq 250$  mg/dl (Figura 1A). Dos semanas tras la confirmación de la DM, los ratones se trataron con PTHrP (1-36) (Nt) o PTHrP (107-139) (Ct) (Bachem, Bubendorf, Suiza), 100  $\mu$ g/kg en cada caso, o con tampón salino fosfatado, pH 7,4 (TSF) (vehículo de los péptidos) cada dos días por inyección subcutánea, durante un total de 14 días (Figura 1A). Se utilizaron 5 ratones/grupo en cada uno de estos 4 grupos experimentales.

Dos horas después de la última inyección de cada tratamiento, los animales se pesaron y posteriormente fueron sacrificados con una mezcla de ketamina (Pfizer, Madrid, España) 20 mg/kg y xilacina (Bayer, Kiel, Alemania) 5 mg/kg (2:1, v/v). Posteriormente, se extrajeron los fémures, las tibias (descartando el peroné) y las vértebras L1-L5, eliminando los restos de músculo adyacentes. Los huesos largos se destinaron a la obtención de cultivos de células mesenquimales de médula ósea (CMMOs) o fueron almacenados para la posterior extracción de ARN (en N<sub>2</sub> líquido) o el análisis de proteínas carboniladas (a -80°C). Las vértebras se almacenaron a -20°C hasta su inclusión en metacrilato para análisis de histomorfometría ósea.

## Modelo de ratón deficiente en IGF-I

Los ratones con deficiencia homocigótica de IGF-I (*Igf1*-nulos), de 3 meses de edad y un fondo genético mixto MF1/129sv, se generaron tras el cruce de ratones heterocigotos con una delección en el exón 4 del gen *Igf1*<sup>15</sup>. Los ratones fueron genotipados mediante *Southern Blot* tras la extracción de ADN genómico proveniente de la cola con REExtract-N-Amp<sup>TM</sup>Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich) y se caracterizaron por criterios funcionales<sup>29,30</sup>.

Se establecieron 4 grupos experimentales con 6 ratones/grupo, control e *Igf1*-nulos, tratados con PTHrP (1-36), PTHrP (107-111) o con TSF. Se admi-

nistraron los péptidos de la PTHrP (80 µg/kg en cada caso) o el vehículo salino por inyección subcutánea cada 48 horas durante dos semanas. Se eligió esta dosis debido a que dosis similares de estos péptidos inducen efectos anabólicos o anti-resortivos, respectivamente, en roedores<sup>25,29-31</sup>. A las 2 h. de la última inyección, los ratones se sacrificaron como se ha descrito anteriormente. Los huesos largos se destinaron a la obtención de CMMOs. Los fémures sobrantes se almacenaron en N<sub>2</sub> líquido para posterior extracción de ARN total, y las vértebras L1-L5 para histomorfometría.

### Cultivo de CMMOs *ex vivo*

Para la obtención de las CMMOs de los fémures y tibias obtenidos en ambos modelos animales, se perforaron las epífisis de manera paralela a la diáfisis con una aguja quirúrgica de tipo 20G de grosor. La cavidad medular se perfundió con medio de cultivo α-MEM suplementado con suero fetal bovino al 15%, penicilina-estreptomina al 1% y fungizona 2,5 µg/ml, obteniéndose la médula ósea. Tras varios lavados se obtuvo una suspensión homogénea que se centrifugó a 1.500xg durante 5 minutos en frío. El precipitado celular se resuspendió en el medio mencionado anteriormente (sin fungizona), contando el número de células viables (por exclusión de azul de tripán) en un contador de células automático (Countess™, Life Technologies, Paisley, Reino Unido). Posteriormente, las células se sembraron a una densidad de 1-2,5x10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup> en placas de 6 pocillos en una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C<sup>25,32</sup>. Se añadió medio de diferenciación osteogénica (el medio anterior suplementado con ácido L-ascórbico 50 µg/ml y β-glicerolfosfato 10 nM) al cultivo el tercer día de la siembra. Las células se mantuvieron bajo estas condiciones durante 14-16 días siendo la mitad del volumen del medio condicionado reemplazado cada dos días. Durante este periodo, las CMMOs procedentes de ratones diabéticos o *Igf1*-nulos se trataron *in vitro* con los péptidos de la PTHrP (añadidos en el momento del cambio de medio).

### Densitometría ósea

Mediante absorciometría dual de rayos X (DXA) se midieron la densidad mineral ósea (DMO; g/cm<sup>2</sup>), el contenido mineral óseo (CMO; g) y el % de grasa periósea en el cuerpo total, el fémur, la tibia y la columna lumbar (vértebras L1-L5) (regiones de interés) de los ratones anestesiados. La DXA se llevó a cabo utilizando un equipo PIXIMus I (GE Lunar Corp., Madison, Wisconsin, EE.UU.). El programa de este equipo calcula los parámetros citados en diferentes regiones del esqueleto (excluyendo la cabeza) con un coeficiente de variación de ±2%.

### Histomorfometría ósea

Las muestras de vértebras L1-L5 se fijaron durante 24 horas en etanol al 70% y, posteriormente, se deshidrataron en etanol 96% durante dos días y etanol absoluto otros dos días. A continuación, las muestras se incluyeron en metil-metacrilato polimerizado (Merck, Whitehouse Station, Nueva Jersey, EE.UU.), siguiendo un protocolo estándar<sup>34</sup>. A continuación,

se realizaron cortes seriados de 7 µm lo más cercanos al eje sagital de la columna con un microtomo Leica RM 2255, que fueron depositados en portas pre-tratados con gelatina de Haupt, se cubrieron con una lámina de polietileno y se prensaron durante 20-24 horas a 60°C. Antes de teñir las muestras, éstas se desplastificaron en metil-acetato (Merck) durante 15-30 minutos, seguido de rehidratación con etanol a concentraciones decrecientes (absoluto, 70% y 50%) y lavado con agua destilada. La tinción de Von Kossa permite visualizar el hueso mineralizado de color negro. La tinción con tricrómico de Goldner tiñe en azul, los núcleos celulares; en rojo, los ribetes de osteoide; y en verde, el hueso mineralizado. Tras las tinciones, las muestras se deshidrataron y se montaron con resina DPX (VWR, Lovaina, Bélgica).

Para determinar los parámetros histomorfométricos, se utilizó un micrómetro acoplado a una redícula rectangular en el ocular del microscopio (*Olympus BX41*, Olympus, Melville, Nueva Jersey, EE.UU.)<sup>32</sup>. Se determinó: el volumen trabecular frente al volumen óseo total (BV/TV); el grosor medio trabecular (Tb.Th); el número de trabéculas (Tb.N); y la separación trabecular (Tb.S), según los criterios de la *American Society for Bone and Mineral Research*<sup>35</sup>. Estos parámetros fueron evaluados por 2 observadores de manera independiente.

### Análisis de expresión proteica por transferencia *western*

Para extraer la proteína total del fémur se procedió a su homogenización mecánica en un mortero. Las proteínas se extrajeron con tampón RIPA [50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, Tritón X-100 al 1%, deoxicolato sódico al 1% y dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1%], suplementado con inhibidores de proteasas (*Protease inhibitor cocktail* P8340, Sigma-Aldrich) y de fosfatasa (*Phosphatase inhibitor cocktail Set II*, Calbiochem, La Jolla, California, EE.UU.). Tras incubación durante 30 minutos a 4°C, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos, recogiendo los sobrenadantes. La medida de la concentración de proteína se realizó por el método del ácido bicinónico (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, EE.UU.), utilizando una curva patrón de seroalbúmina bovina. En los extractos proteicos se cuantificaron las proteínas carboniladas, mediante derivatización de los grupos carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP-hidrazina) utilizando el ensayo comercial *OxyBlot protein oxidation detection kit* (Millipore, Billerica, Massachusetts, EE.UU.). La proteína DNP-hidrazona estable obtenida se detecta por inmunotransferencia. Para ello, las proteínas derivatizadas (20 µg) se separaron por electroforesis en geles de poliácridamida-SDS al 12,5%, y posteriormente se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinidileno (Schelider & Schuel, Keene, Nueva Hampshire, EE.UU.), seguido de incubación con un anticuerpo primario policlonal anti-DNP y con un secundario conjugado con peroxidasa de rábano. Las bandas resultantes se visualizaron por quimioluminiscencia (*ECL Western Blotting Detection Reagents*; GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

Tabla 1. Secuencias de los cebadores específicos empleados para la amplificación génica por PCR a tiempo real

Cebador	Secuencia Sentido 5'-3'	Secuencia Anti-sentido 5'-3'
<i>Wnt3a</i>	GCACCACCGTCAGCAACAG	GGGTGGCTTTGTCCAGAACA
<i>Fz2</i>	CCGTCTCTGGATCCTCACAT	AGAAGCGCTCATTGCATAACC
<i>Lrp5</i>	CAACGTGGACGTGTTTTATTCTTC	CAGCGACTGGTGCTGTAGTCA
<i>Lrp6</i>	AGATCCATCAAGTGGGTTTCATGTA	GAAGCGACTTGAGCCATCCA
<i>18s</i>	ATGCTCTTAGCTGAGGTGCCCG	ATTCCTAGCTGCGGTATCCAGG

Para el análisis de las proteínas procedentes de los CMMOs, los extractos proteicos (20 µg) fueron separados en gel de poliacrilamida-SDS al 8% con β-mercaptoetanol al 5%. A continuación, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot® SD *semi-dry transfer cell*, Bio-Rad, California, EE.UU.). Seguidamente, las membranas se bloquearon con leche desnatada al 2,5% en un tampón Tris-salino (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1%). Posteriormente, estas membranas fueron incubadas en presencia del anticuerpo primario policlonal correspondiente a β-catenina (dilución 1:10000; Abcam, Cambridge, Reino Unido) y de IgG de cabra anti-conejo combinado con peroxidasa de rábano [(dilución 1:10000); Santa Cruz, California, EE.UU.]. Como control de carga se analizó la expresión de β-actina [(dilución 1:500); Santa Cruz].

#### Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)

El ARN total se extrajo de los homogeneizados de fémur (como se ha indicado anteriormente) con Trizol (Invitrogen, Groningen, Holanda) a 4°C. La retrotranscripción del ARN obtenido a ADNc se llevó a cabo a partir de 0,5 -1,5 µg de ARN con el *cDNA High capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) en un termociclador Techgene (Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, Reino Unido), siguiendo el siguiente protocolo secuencial: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C. La PCR a tiempo real se realizó con: 1) cebadores específicos de ratón para los siguientes genes de la vía canónica de Wnt<sup>34</sup>: *Wnt3a*, *frizzled 2 (Fz2)* y proteínas relacionadas con los receptores de lipoproteínas de baja densidad 5 y 6 (*Lrp5* y *Lrp6*, respectivamente) (Tabla 1), y la mezcla de reacción *SYBR Premix Ex-Taq green* polimerasa (Takara, Otsu, Japón); 2) sondas *TaqMan MGB* (Assay-by-Design™ System, Applied Biosystems) para ciclina D1 (*Ccnd1*) y conexina 43 (*Cx43*), y una mezcla de reacción con *Premix Ex-Taq* polimerasa (Takara) en un termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). En paralelo, se amplificó el ARN *18s* ribosomal como gen normalizador<sup>25,31</sup>.

Las curvas de disociación verificaron la obtención de un único producto de amplificación en el caso del uso de cebadores específicos. Los niveles de expresión en cada condición experimental

relativos al control basal se calcularon como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratamiento}} - \Delta Ct_{\text{basal}}$ ) como se ha descrito anteriormente<sup>27</sup>. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

#### Estadística

Los resultados se expresaron como media ± error estándar de la media (EEM). La comparación entre varios grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. La comparación paramétrica entre dos grupos se realizó mediante la prueba t de Student; mientras que en aquellas comparaciones no paramétricas se realizó la prueba de Mann Whitney. Las diferencias con una  $p < 0,05$  fueron consideradas significativas. Los análisis se llevaron a cabo con el programa informático Graphpad InStat (San Diego, California, EE.UU.).

#### Resultados

##### Acciones osteogénicas de la PTHrP en un modelo de osteopenia asociada a DM1 en ratón

Los ratones diabéticos por inyección de STZ mostraron una disminución significativa del peso corporal respecto a los controles, que en parte se recuperó por el tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP (Figura 1). En estos animales, la DM indujo una disminución de la DMO y CMO, así como del porcentaje de grasa periósea, predominantemente en los huesos largos; alteraciones que fueron en parte por ambos fragmentos de la PTHrP (Tabla 2).

Mediante histomorfometría realizada en las vértebras (L1-L5), observamos que los ratones diabéticos mostraban una disminución del volumen trabecular total (BV/TV), del grosor medio (Tb.Th) y del número de trabéculas (Tb.N.) y un incremento de separación trabecular (Tb.S); parámetros que se normalizaron tras el tratamiento con los péptidos de la PTHrP (Tabla 3). La tinción de Von Kossa permitió visualizar claramente estas alteraciones en el hueso trabecular de las vértebras en cada uno de los grupos experimentales estudiados (Figura 2).

En el fémur de los ratones diabéticos, analizamos la expresión de genes implicados en la activación de la vía Wnt/β-catenina; observamos que los niveles de ARNm del ligando *Wnt3a*, del receptor *Fz2* y de los co-receptores *Lrp5* y *Lrp6*, así como los de *Ccnd1* (un gen diana final de esta vía) estaban disminuidos en estos ratones (Figura

Tabla 2. Valores de masa ósea y grasa periósea en los huesos largos, columna vertebral y cuerpo total de ratones controles y diabéticos, con y sin tratamiento PTHrP (1-36) o PTHrP (107-139)

		Control	Diabético (DM)	DM+PTHrP (1-36)	DM+PTHrP (107-139)
<b>Fémur</b>	DMO	0,123±0,001	0,103±0,0009**	0,106±0,001	0,119±0,001##
	CMO	0,046±0,001	0,041±0,0005**	0,042±0,0007	0,047±0,001#
	%Grasa	19,45±2,376	11,56±0,409**	17,76±0,248##	13,34±0,441#
<b>Tibia</b>	DMO	0,084±0,002	0,076±0,0004**	0,086±0,002#	0,086±0,002##
	CMO	0,046±0,001	0,042±0,0007*	0,045±0,001#	0,046±0,0004##
	%Grasa	18,94±0,909	14,98±0,485**	16,78±0,171##	18,64±0,930##
<b>Columna</b>	DMO	0,077±0,003	0,074±0,001	0,074±0,0009	0,076±0,0007
	CMO	0,092±0,006	0,057±0,011*	0,089±0,001#	0,094±0,003#
	%Grasa	18,78±1,084	11,06±0,175	10,4±0,175#	11,21±0,606
<b>Cuerpo total</b>	DMO	0,064±0,001	0,056±0,001**	0,067±0,001##	0,067±0,002##
	CMO	0,901±0,029	0,864±0,017	0,892±0,019	0,892±0,001
	%Grasa	18,78±1,084	12,82±0,582**	13,56±0,597	12,92±2,143

DMO (g/cm<sup>2</sup>); CMO (g). Los valores son la media ± EEM de 5 ratones/grupo. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05; ##p<0,01 vs. DM.

3A). Además, en los osteoprogenitores de la médula ósea (CMMOs) de los huesos largos encontramos una menor expresión proteica de β-catenina (Figura 3B). Estos efectos deletéreos de la situación diabética sobre efectores de la vía Wnt/β-catenina fueron compensados por la administración de PTHrP *in vivo* (sobre todo por el fragmento N-terminal) e *in vitro* (Figuras 3A y 3B).

Dado que la DM se asocia a un incremento de estrés oxidativo, analizamos la producción de proteínas oxidadas en el fémur de los ratones diabéticos<sup>35</sup>. Estos animales presentaban un aumento de proteínas oxidadas respecto a los controles, que mostró una tendencia a la normalización tras el tratamiento con PTHrP (1-36), pero no con PTHrP (107-139) (Figura 3C).

**Alteraciones de la masa y la estructura óseas asociadas al déficit de IGF-I en ratón y su modulación por la PTHrP**

Los ratones *Igf1*-nulos mostraron una disminución significativa de la DMO y CMO respecto a los ratones control en el cuerpo total, fémur y columna (L1-L5) (Figura 4A). Al final del período de estudio (día 14), los ratones *Igf1*-nulos mostraron menos ganancia de masa ósea en el cuerpo total, pero mayor en fémur y en columna, respecto a la de los controles (Figura 4B). El tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP produjo un aumento significativo de masa ósea en el cuerpo total y en

el fémur de los ratones *Igf1*-nulos (Figura 4B). Mediante análisis histomorfométrico, se observó una alteración general en los parámetros estructurales evaluados en las vértebras L1-L5 de los ratones *Igf1*-nulos respecto a los controles. El tratamiento con los péptidos de la PTHrP normalizó el BV/TV y el Tb.Th. en estos animales (Tabla 4).

En los ratones *Igf1*-nulos, encontramos en el fémur una disminución de un gen inicial y otro final, claves en la actividad de la vía canónica de Wnt, *Wnt3a*, y *Cx43*, que resultó parcialmente compensada por el tratamiento con los péptidos de la PTHrP (Figura 5A).

Además, quisimos comprobar si la PTHrP podría ejercer acciones osteogénicas autónomas a nivel celular en ausencia de IGF-I. Para ello, utilizamos cultivos de CMMOs provenientes de ratones controles e *Igf1*-nulos, tratados *in vitro* con ambos péptidos de la PTHrP. Estos cultivos a partir de ratones *Igf1*-nulos mostraron una menor capacidad de mineralización en comparación con la de los ratones control, que no se afectó por el tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP (Figura 5B).

**Discusión**

**Efectos osteogénicos de la PTHrP en un modelo murino de DM1 inducido por STZ**

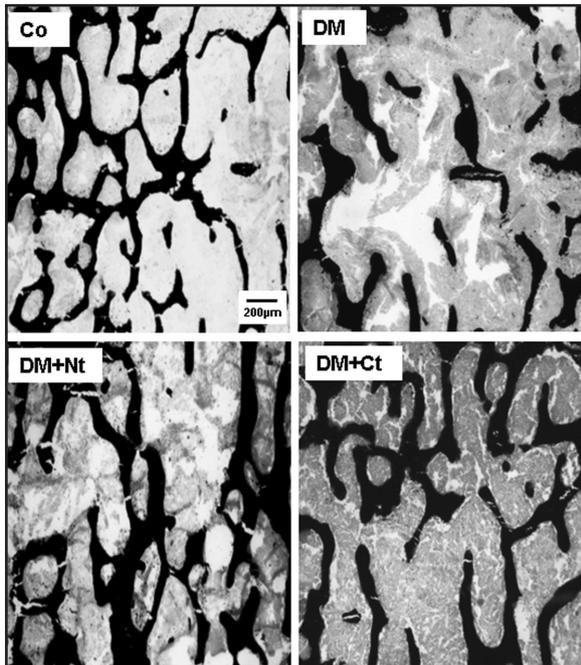
En el presente estudio observamos una pérdida de peso en los ratones diabéticos, debida posiblemente a la acción lipolítica y a la pérdida muscu-

Tabla 3. Alteraciones de parámetros histomorfométricos en el hueso trabecular (vértebras L1-L5) de ratones diabéticos, tratados o no con PTHrP

Parámetro	Control	Diabético (DM)	DM + PTHrP (1-36)	DM + PTHrP (107-139)
BV/TV (%)	36,93±1,64	22,21±1,6**	37,19±2,76##	37,43±3,7##
Tb.Th. (µm)	85,49±4,53	59,91±2,24**	83,93±4,81##	88,24±2,91##
Tb. N. (mm <sup>-1</sup> )	2,26±0,09	1,77±0,09*	2,32±0,07##	2,30±0,15#
Tb. S. (µm)	146,93±9,71	225,97±12,07**	130,12±1,45##	130,52±12,49#

BV/TV: volumen trabecular total; Tb.Th.: grosor medio de las trabéculas; Tb.N.: número de trabéculas; Tb.S.: separación trabecular. Los valores corresponden a la media ± EEM de 5 ratones/grupo \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05, ##p<0,01 vs. DM.

Figura 2. Alteraciones del hueso trabecular en las vértebras (L1-L5) en ratones diabéticos, con o sin tratamiento con los péptidos de la PTHrP. Se muestran imágenes representativas obtenidas mediante microscopía óptica (4x) de cortes histológicos de vértebras de ratones control (Co) o diabéticos (DM), tratados o no con PTHrP Nt (Nt) o C-terminal (Ct), tras su inclusión en metacrilato y tinción de Von Kossa, mostrando la estructura trabecular



lar inducida por la droga STZ<sup>36,37</sup>. Utilizando DXA, corroboramos este hallazgo con el descenso observado en el porcentaje de grasa periósea en el cuerpo total y los huesos largos de los ratones diabéticos. En dichas localizaciones observamos, además, una disminución de masa ósea a las 4 semanas de la instauración de la DM. El tratamiento con los péptidos de la PTHrP compensó esta osteopenia, de acuerdo a observaciones previas en este modelo de DM1 tras la administración de análogos de PTH y PTHrP<sup>25,26,38,39</sup>.

El análisis histomorfométrico de las vértebras L1-L5 mostró una disminución del BV/TV y de otros parámetros trabeculares (Tb.Th., Tb.N y Tb.S) en los ratones diabéticos, en consonancia con observaciones en otro modelo de DM1 inducida por STZ en ratón<sup>40</sup>. Por otra parte, datos recientes de un análisis histomorfométrico en biopsias procedentes de cresta iliaca de pacientes con DM1 no registraron alteraciones significativas en la estructura trabecular respecto al grupo control sano, aunque sí una tendencia coherente con los resultados obtenidos en las vértebras de los ratones diabéticos en nuestro estudio<sup>41</sup>. Sin embargo, es interesante señalar que en estos pacientes diabéticos, las muestras fueron obtenidas antes de la aparición de complicaciones asociadas a la DM. Nuestros resultados demuestran la capacidad de los péptidos de la PTHrP para atenuar las alteraciones de la estructura trabecular vertebral producidas por la DM en el ratón, confirmando hallazgos previos<sup>25,26,44</sup>.

Datos recientes de nuestro grupo han mostrado alteraciones de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en el hueso de ratones con DM1 inducida por STZ, asociadas a una disminución de esclerostina correspondiente a una mayor tasa de apoptosis osteocítica en la tibia de estos ratones<sup>42</sup>. Por otra parte, se ha encontrado una sobreexpresión de Sost y Dkk1 (inhibidores de la vía Wnt canónica) en la tibia de ratas diabéticas<sup>43</sup>. En humanos, se han encontrado altos niveles de esclerostina y una disminución de  $\beta$ -catenina en el suero de pacientes con DM2<sup>44</sup>. Los resultados del presente trabajo demuestran una alteración en la expresión de genes canónicos de las etapas iniciales de la vía Wnt en el hueso murino diabético, en contraste con lo observado en la rata diabética<sup>43</sup>. Así pues, las alteraciones en los componentes de la vía Wnt en situación diabética parece compleja y dependiente de la especie.

El estado hiperglucémico asociado a la DM1 condiciona un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS), que producen aumento de la carbonilación proteica<sup>35,45</sup>. El aumento observado de proteínas carboniladas en el fémur de los ratones diabéticos se redujo en los tratados con el fragmento N-terminal de la PTHrP. En este sentido, se ha descrito la capacidad

Tabla 4. Alteraciones de parámetros histomorfométricos en las vértebras L1-L5 de ratones *Igf1*-nulos, tratados o no con PTHrP

Parámetro	Control	<i>Igf1</i> -nulo	<i>Igf1</i> -nulo+Nt	<i>Igf1</i> -nulo+Ost
BV/TV (%)	26,1±1,5	16,5±0,9**	22,6±3,3#	22,85±0,2#
Tb. Th (µm)	54,5±2	45,9±1,8**	65,4±3**,##	52,5±2,5#
Tb. Sp (µm)	156±6,8	214,7±19,3**	230,6±27,9**	213,2±9,24**
Tb. N (1/mm)	4,7±0,1	3,7±0,2**	3,4±0,3**	3,6±0,23**

BV/TV: volumen trabecular óseo/volumen total; Tb. Th: espesor trabecular; Tb.N: número de trabéculas; Tb. Sp: separación trabecular. Nt, PTHrP (1-36); Ost, osteostatina. Los valores son la media ± EEM de 6 ratones/grupo. \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05; ##p<0,01 vs. *Igf1*-nulo.

de la PTH para disminuir la producción de ROS en CMMOs del fémur de ratones viejos<sup>46</sup>. El exceso de ROS en el hueso diabético afecta a la osteoblastogénesis -derivando la diferenciación de las CMMOs a adipogénesis<sup>47,48</sup> y a la función osteoblástica -disminuyendo la expresión de Runx2, FA y Col1α<sup>49</sup> y también activando la transcripción de FoxO, el cual antagoniza la señalización de Wnt canónica<sup>50</sup>. Así, encontramos una disminución de β-catenina en los cultivos de CMMOs provenientes de los huesos largos de los ratones diabéticos. A este respecto, en un modelo de ratón diabético no obeso (similar al modelo de DM1 por STZ) se ha observado una supresión de la vía PI3K/AKT en células osteoprogenitoras que podría contribuir a la desestabilización de la β-catenina en estas células<sup>51</sup>. En humanos, se ha caracterizado una mutación en el gen *Sirt1* directamente relacionada con el desarrollo de DM1<sup>52</sup>, que resulta de interés, ya que la proteína SIRT1 promueve la translocación al núcleo de la β-catenina en células osteoprogenitoras<sup>53</sup>.

Nuestros hallazgos demuestran que la PTHrP (predominantemente su fragmento N-terminal) es capaz de contrarrestar, al menos en parte, el estrés oxidativo y las alteraciones de distintos componentes activadores de la vía Wnt como parte de sus acciones osteogénicas en el hueso diabético.

**Efectos osteogénicos de la PTHrP (1-36) y la osteostatina en un modelo murino deficiente en IGF-I**

El sistema IGF juega un papel determinante en la regulación del crecimiento somático. Se ha sugerido que una disminución en la producción y/o en la actividad de IGF-I podría contribuir a la pérdida de masa ósea

Figura 3. Efecto de la PTHrP sobre la vía Wnt/β-catenina en los huesos largos de ratones diabéticos. (A) Cambios en la expresión de genes relacionados con la vía Wnt canónica (analizada por PCR a tiempo real) en el fémur de los ratones control (Co) y diabéticos (DM), tratados o no con el fragmento N-terminal (Nt) o C-terminal (Ct) de la PTHrP. (B) Autorradiografía representativa de los cambios en la expresión de β-catenina en CMMOs extraídas del fémur y la tibia de estos ratones, cultivadas durante 14 días en medio osteogénico, en presencia o no de cada uno de los péptidos de la PTHrP (100 nM). Se muestran las intensidades medias relativas de la señal de β-catenina normalizadas a la de β-actina para cada condición experimental referidas al control en un experimento representativo. (C) Efecto de la PTHrP sobre la oxidación de proteínas en ratones diabéticos. Medida de las proteínas carboniladas en el fémur de ratones control y diabéticos, tratados o no con los péptidos de la PTHrP. Los resultados en A y C corresponden a la media ± EEM de los valores obtenidos en 5 ratones de cada condición experimental. \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. Co; #p<0,05, ##p<0,01 vs. DM

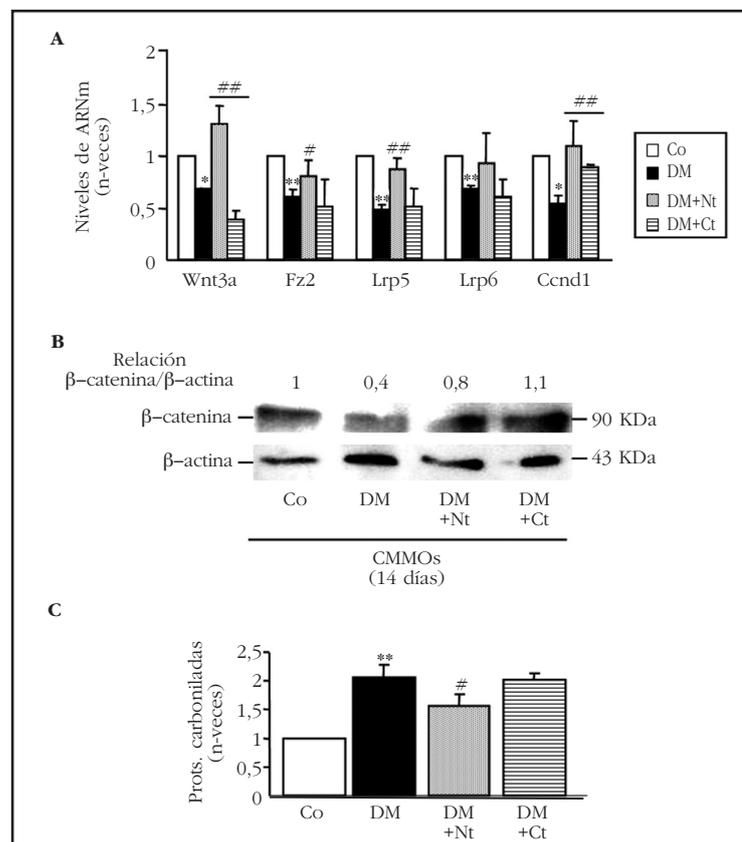
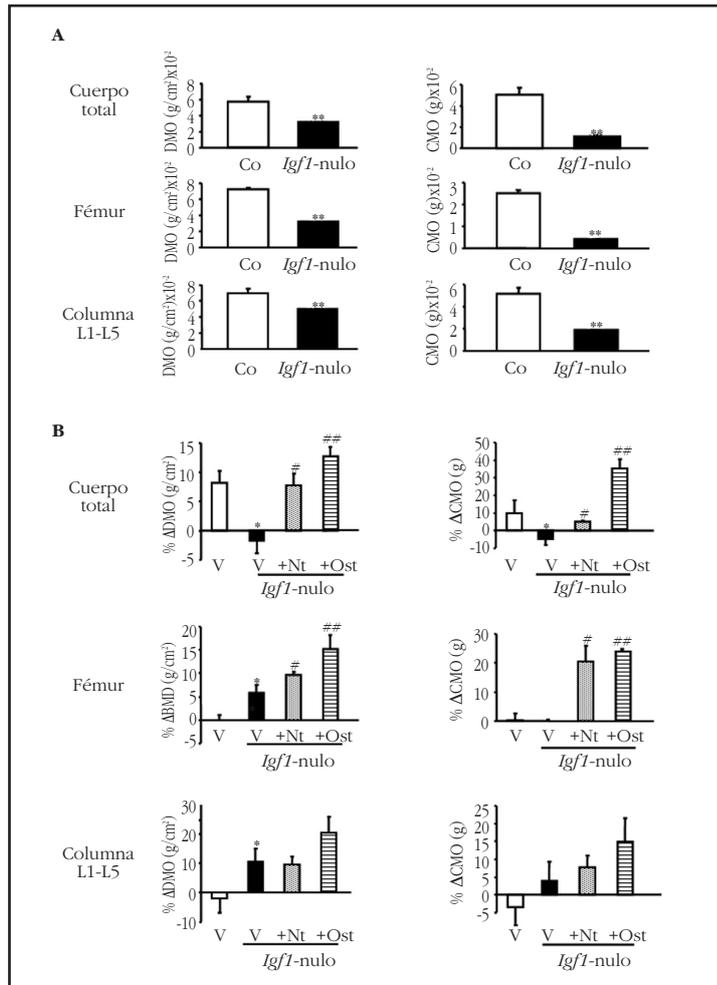


Figura 4. Caracterización de los cambios en la masa ósea de ratones *Igf1*-nulos, tratados o no con PTHrP. (A) Valores de DMO y CMO de ratones control (Co) e *Igf1*-nulos al comienzo del estudio (día 0) en cuerpo total, fémur y columna. (B) Incrementos ( $\Delta$ ) en % de los valores de DMO y CMO desde el comienzo (día 0) hasta la finalización del estudio (día 14) para cada uno de los genotipos, y efecto del tratamiento con la PTHrP N-terminal (Nt) o con osteostatina (Ost) (o vehículo, V). Los valores corresponden a las medias  $\pm$  EEM de 6 ratones para cada condición experimental. \*\* $p < 0,01$  vs. Co (A); \* $p < 0,05$  vs. V-control; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs. V-*Igf1*-nulo (B)



asociada a la edad<sup>54</sup>. Sin embargo, también se ha especulado que esta disminución determinaría un menor remodelado óseo y así preservar la solidez de los huesos largos en esta situación<sup>55</sup>. El IGF-I aumenta la formación ósea periosteal, pero sus efectos en el hueso trabecular son variables<sup>16,56,57</sup>. Las diferencias observadas en el esqueleto de los ratones deficientes en IGF-I podrían ser consecuencia del efecto dual de este factor en la osteoblastogénesis y la osteoclastogénesis y su impacto relativo según la localización ósea<sup>16</sup>.

En el presente trabajo, hemos utilizado un modelo de ratón con deficiencia en la expresión de *Igf1* que muestra alteraciones significativas en la masa y la estructura ósea trabecular de las vértebras, compensadas en parte por ambos péptidos de la PTHrP. Resulta de interés mencionar los efectos anabólicos de la PTH observados en el hueso trabecular de rato-

nes con deficiencia del IGF-I proveniente de la síntesis hepática<sup>58</sup>. La baja actividad resorptiva asociada a la deficiencia del IGF-I podría facilitar la manifestación de una acción anabólica de la PTHrP a nivel trabecular<sup>16,59</sup>. De hecho, se han descrito efectos anabólicos de ambos fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP en el hueso trabecular del fémur en el modelo de ratón diabético por STZ, con bajo remodelado óseo<sup>25,26</sup>.

Observamos cambios significativos en varios componentes de la vía Wnt canónica compatibles con las alteraciones en el remodelado óseo en los ratones deficientes en IGF-I. Datos previos en ratones con déficit de IGF-I en osteocitos muestran una marcada deficiencia en el desarrollo óseo y en la respuesta a la estimulación mecánica, asociadas a una activación deficitaria de la vía Wnt<sup>60,61</sup>. En nuestro estudio, encontramos que la administración de PTHrP (1-36) u osteostatina corrige en parte las alteraciones observadas en la vía Wnt canónica en los ratones deficientes en IGF-I. En este sentido, como demuestran nuestros datos, tanto la PTHrP (1-36) como el fragmento C-terminal nativo PTHrP (107-139) actúan sobre esta vía metabólica en ratones diabéticos por STZ<sup>25,26,42</sup>.

Por otra parte, encontramos que las CMMOs de los ratones con déficit de IGF-I mostraron una menor capacidad osteogénica que los ratones control. Un resultado similar se obtuvo en ratones con déficit de *Igf1r* en osteoblastos maduros<sup>62,63</sup>. Además, estas CMMOs mostraron una falta de respuesta a la PTHrP *in vitro*, indicando que el IGF-I es esencial para la acción de la PTHrP sobre estas células osteoprogenitoras.

Estos hallazgos, en conjunto, demuestran que la PTHrP, predominantemente a través de su dominio N-terminal, es capaz de modular la vía de Wnt canónica en relación a sus acciones osteogénicas en situación diabética. Además, un sistema funcional de IGF es necesario para al menos parte de las acciones osteogénicas de la PTHrP (1-36) y de la osteostatina en el esqueleto murino.

**Agradecimientos:** La PTHrP (1-36) humana fue donada generosamente por los Dres. A. F. Stewart y A. García Ocaña (Facultad de Medicina de la Universidad de Pittsburg, Pensilvania, EE.UU.).

**Otras financiaciones:** Este trabajo ha sido también financiado con Ayudas del Ministerio de Educación y Cultura (SAF2005-05254), del Instituto de Salud Carlos III (PI050117, PI080922, PI11/00449, RD06/0013/1002 y RD12/0043/0008) y del Ministerio

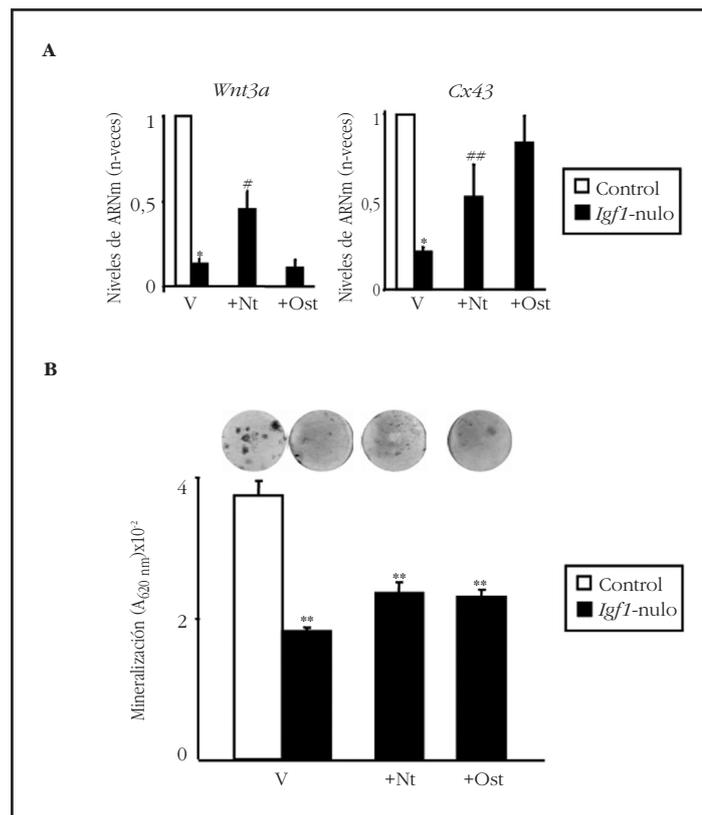
de Ciencia e Innovación (SAF2011-24391). AL-H y MM fueron agraciadas con becas de la Fundación Conchita Rábago, así como del Ministerio de Educación-programa FPU (AP2009-1871) (AL-H) y del Ministerio de Economía y Competitividad (FI12/00458) (MM). LR-de la R posee un contrato CIBERER. SP-N y DL poseen contratos post-doctorales de RETICEF (RD06/0013/1002 y RD12/0043/0008) y la Comunidad Autónoma de Madrid (S-2009/Mat-1472), respectivamente.

**Declaración de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

### Bibliografía

- Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009;37 (Suppl1):S81-90.
- Wongdee K, Charoenphandhu N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes* 2011;2:41-8.
- Adami S. Bone health in diabetes: considerations for clinical management. *Curr Med Res Opin* 2009;25:1057-72.
- McCabe LR. Understanding the pathology and mechanisms of type 1 diabetic bone loss. *J Cell Biochem* 2007;102:1343-57.
- Rakel A, Sheehy O, Rahme E, Le Lorier J. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2008;34:193-205.
- Botolin S, Faugere MC, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type 1 diabetic mice. *Endocrinology* 2005;146:3622-31.
- Starup-Linde J. Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:21.
- Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes. *Curr Drug Targets* 2011;12:2096-102.
- Saito M, Marumo K. Bone quality in diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:72.
- Carney EF. Bone: modulation of IGF-1 might prevent osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:440.
- Thraillkill KM, Lumpkin CK, Jr., Bunn RC, Kemp SF, Fowlkes JL. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289:E735-45.
- Einhorn TA, Boskey AL, Gundberg CM, Vigorita VJ, Devlin VJ, Beyer MM. The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes. *J Orthop Res* 1988;6:317-23.
- Hou JC, Zernicke RF, Barnard RJ. Effects of severe diabetes and insulin on the femoral neck of the immature rat. *J Orthop Res* 1993;11:263-71.
- Jehle PM, Jehle DR, Mohan S, Bohm BO. Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus patients. *J Endocrinol* 1998;159:297-306.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 1993;75:59-72.
- Bikle DD, Majumdar S, Laib A, Powell-Braxton L, Rosen C, Beamer W, et al. The skeletal structure of insulin-like growth factor I-deficient mice. *J Bone Miner Res* 2001;16:2320-9.
- Wang Y, Nishida S, Sakata T, Elalieh HZ, Chang W, Halloran BP, et al. Insulin-like growth factor-I is essential for embryonic bone development. *Endocrinology* 2006;147:4753-61.

Figura 5. (A) Cambios de factores relacionados con la vía Wnt canónica en ratones *Igf1*-nulos, tratados o no con PTHrP. Expresión génica (evaluada por PCR a tiempo real) de *Wnt3a* y *Cx43* en el fémur de estos ratones, y efecto del tratamiento con PTHrP (1-36) (Nt) u osteostatina (Ost) (o vehículo, V). Los valores representan las medias  $\pm$  EEM de 6 ratones/grupo. \* $p < 0,05$  vs. V; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs. V-*Igf1*-nulo. (B) Alteración en la capacidad mineralizante de CMMOs de ratones *Igf1*-nulos. Las CMMOs de 2 ratones Co ó 5 ratones *Igf1*-nulos fueron cultivadas durante 16 días, con o sin (vehículo salino, V) PTHrP (1-36) (Nt) u osteostatina (Ost) (100 nM). La mineralización se evaluó mediante tinción con rojo alizarina S (se muestran imágenes representativas). Los valores representan las medias  $\pm$  EEM de 7 pocillos de cultivo por condición experimental. \*\* $p < 0,01$  vs. V-control



- Kartsogiannis V, Moseley J, McKelvie B, Chou ST, Hards DK, Ng KW, et al. Temporal expression of PTHrP during endochondral bone formation in mouse and intramembranous bone formation in an in vivo rabbit model. *Bone* 1997;21:385-92.
- Amizuka N, Karaplis AC, Henderson JE, Warshawsky H, Lipman ML, Matsuki Y, et al. Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development. *Dev Biol* 1996;175:166-76.
- McCauley LK, Martin TJ. Twenty-five years of PTHrP progress: from cancer hormone to multifunctional cytokine. *J Bone Miner Res* 2013;27:1231-9.
- Orloff JJ, Reddy D, de Papp AE, Yang KH, Soifer NE, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein as a pro-hormone: posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr Rev* 1994;15:40-60.
- de Gortazar AR, Alonso V, Álvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Transient exposure to PTHrP (107-139) exerts anabolic effects through vascular endothelial growth factor receptor 2 in human osteoblastic cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 2006;79:360-9.
- Alonso V, de Gortazar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Álvarez-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.

24. García-Martín A, Acitores A, Maycas M, Villanueva-Peñacarrillo ML, Esbrit P. Src kinases mediate VEGFR2 transactivation by the osteostatin domain of PTHrP to modulate osteoblastic function. *J Cell Biochem* 2013;114:1404-13.
25. Lozano D, de Castro LF, Dapia S, Andrade-Zapata I, Manzarbeitia F, Álvarez-Arroyo MV, et al. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. *Endocrinology* 2009;150:2027-35.
26. Lozano D, Fernández-de-Castro L, Portal-Núñez S, López-Herradón A, Dapia S, Gómez-Barrena E, et al. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopaenia. *Br J Pharmacol* 2011;162:1424-38.
27. López-Herradón A, Portal-Núñez S, García-Martín A, Lozano D, Pérez-Martínez FC, Ceña V, et al. Inhibition of the canonical Wnt pathway by high glucose can be reversed by parathyroid hormone-related protein in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 2013;114:1908-16.
28. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. 1959, London: Methuen and Co. Ltd.
29. Rihani-Basharat S, Lewinson D. PTHrP(107-111) inhibits *in vivo* resorption that was stimulated by PTHrP(1-34) when applied intermittently to neonatal mice. *Calcif Tissue Int* 1997;61:426-8.
30. de Castro LF, Lozano D, Dapia S, Portal-Núñez S, Caeiro JR, Gómez-Barrena E, et al. Role of the N- and C-terminal fragments of parathyroid-hormone-related protein as putative therapies to improve bone regeneration under high glucocorticoid treatment. *Tissue Eng Part A* 2010;16:1157-68.
31. de Castro LF, Lozano D, Portal-Núñez S, Maycas M, De la Fuente M, Caeiro JR, et al. Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *J Cell Physiol* 2012;227:1752-60.
32. Serrano S, Aubia J, Mariñoso M. Patología ósea metabólica. 1990, Barcelona: Sandoz S.A.E.
33. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013;28:2-17.
34. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
35. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;329:23-38.
36. Szkudelski T, Szkudelska K. Streptozotocin induces lipolysis in rat adipocytes *in vitro*. *Physiol Res* 2002;51:255-9.
37. Kelleher AR, Fairchild TJ, Keslacy S. STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF-kappaB canonical cascade activation. *Acta Diabetol* 2010;47:315-23.
38. Suzuki K, Miyakoshi N, Tsuchida T, Kasukawa Y, Sato K, Itoi E. Effects of combined treatment of insulin and human parathyroid hormone(1-34) on cancellous bone mass and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bone* 2003;33:108-14.
39. Motyl KJ, McCauley LK, McCabe LR. Amelioration of type I diabetes-induced osteoporosis by parathyroid hormone is associated with improved osteoblast survival. *J Cell Physiol* 2012;227:1326-34.
40. Illien-Junger S, Grosjean F, Laudier DM, Vlassara H, Striker GE, Iatridis JC. Combined anti-inflammatory and anti-AGE drug treatments have a protective effect on intervertebral discs in mice with diabetes. *PLoS One* 2013;8:e64302.
41. Armas LA, Akhter MP, Drincic A, Recker RR. Trabecular bone histomorphometry in humans with Type 1 Diabetes Mellitus. *Bone* 2012;50:91-6.
42. Portal-Núñez S, Lozano D, de Castro LF, de Gortazar AR, Nogués X, Esbrit P. Alterations of the Wnt/beta-catenin pathway and its target genes for the N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in bone from diabetic mice. *FEBS Lett* 2010;584:3095-100.
43. Hie M, Iitsuka N, Otsuka T, Tsukamoto I. Insulin-dependent diabetes mellitus decreases osteoblastogenesis associated with the inhibition of Wnt signaling through increased expression of Sost and Dkk1 and inhibition of Akt activation. *Int J Mol Med* 2011;28:455-62.
44. Gaudio A, Privitera F, Battaglia K, Torrisi V, Sidoti MH, Pulvirenti I, et al. Sclerostin levels associated with inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling and reduced bone turnover in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:3744-50.
45. Wong CM, Marcocci L, Liu L, Suzuki YJ. Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:393-404.
46. Jilka RL, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Roberson PK, Weinstein RS, et al. Decreased oxidative stress and greater bone anabolism in the aged, when compared to the young, murine skeleton with parathyroid hormone administration. *Aging Cell* 2010;9:851-67.
47. Yamaguchi M. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Differentiation: Involvement in Osteoporosis with Obesity and Diabetes. *J Bone Marrow Res* 2013;1:e107.
48. Li W, Hu W, Ho F. High glucose induced bone loss via attenuating the proliferation and osteoblastogenesis and enhancing adipogenesis of bone marrow mesenchymal-stem cells. *Biomed Eng Appl Basis Commun* 2013;25:1-15.
49. Graves D, Alblow J, Paglia D, O'Connor J, Lin S. Impact of diabetes on fracture healing. *J Exp Clin Med* 2011;3:3-8.
50. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem* 2007;282:27298-305.
51. Li L, Xia Y, Wang Z, Cao X, Da Z, Guo G, et al. Suppression of the PI3K-Akt pathway is involved in the decreased adhesion and migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from non-obese diabetic mice. *Cell Biol Int* 2011;35:961-6.
52. Hughes JW, Herold KC. Novel SIRT1 mutation linked to autoimmune diabetes in humans. *Cell Metab* 2013;17:311-2.
53. Simic P, Zainabadi K, Bell E, Sykes DB, Saez B, Lotinun S, et al. SIRT1 regulates differentiation of mesenchymal stem cells by deacetylating beta-catenin. *EMBO Mol Med* 2013;5:430-40.
54. Cao JJ, Kurimoto P, Boudignon B, Rosen C, Lima F, Halloran BP. Aging impairs IGF-I receptor activation and induces skeletal resistance to IGF-I. *J Bone Miner Res* 2007;22:1271-9.
55. Courtland HW, Kennedy OD, Wu Y, Gao Y, Sun H, Schaffler MB, et al. Low levels of plasma IGF-1 inhibit intracortical bone remodeling during aging. *Age (Dordr)* 2012;35:1691-703.
56. Yakar S, Courtland HW, Clemmons D. IGF-1 and bone: New discoveries from mouse models. *J Bone Miner Res* 2010;25:2543-52.
57. Sakata T, Wang Y, Halloran BP, Elalieh HZ, Cao J, Bikle DD. Skeletal unloading induces resistance to insulin-like growth factor-I (IGF-I) by inhibiting activation of the IGF-I signaling pathways. *J Bone Miner Res* 2004;19:436-46.
58. Yakar S, Bouxsein ML, Canalis E, Sun H, Glatt V, Gundberg C, et al. The ternary IGF complex influences postnatal bone acquisition and the skeletal response to intermittent parathyroid hormone. *J Endocrinol* 2006;189:289-99.
59. Bikle DD, Sakata T, Leary C, Elalieh H, Ginzinger D, Rosen CJ, et al. Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res* 2002;17:1570-8.
60. Sheng MH, Zhou XD, Bonewald LF, Baylink DJ, Lau KH. Disruption of the insulin-like growth factor-1 gene in osteocytes impairs developmental bone growth in mice. *Bone* 2013;52:133-44.
61. Lau KH, Baylink DJ, Zhou XD, Rodriguez D, Bonewald LF, Li Z, et al. Osteocyte-derived insulin-like growth factor I is essential for determining bone mechanosensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E271-81.
62. Wang Y, Nishida S, Boudignon BM, Burghardt A, Elalieh HZ, Hamilton MM, et al. IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res* 2007;22:1329-37.
63. Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, et al. Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem* 2002;277:44005-12.

**González-Rozas M<sup>1</sup>, Pérez Castrillón JL<sup>2</sup>**

1 Servicio de Medicina Interna - Hospital General de Segovia

2 Servicio de Medicina Interna - Hospital Universitario Río Hortega (Valladolid) - Departamento de Medicina de la Universidad de Valladolid

## Regulación endocrina del metabolismo energético a través del hueso

Correspondencia: Marta González-Rozas - c/Miguel Servet s/n - 40020 Segovia (España)

Correo electrónico: martaglezrozas@yahoo.es

Fecha de recepción: 23/04/2014

Fecha de aceptación: 04/07/2014

### Resumen

Las funciones clásicas del hueso son el mantenimiento de la homeostasis fosfo-cálcica, la reparación de los daños así como un efecto estructural que permite la locomoción y protege los órganos vitales. Los recientes descubrimientos de las nuevas funciones del hueso en la regulación del metabolismo energético sugieren que el hueso puede ser un órgano endocrino.

En la última década, en diferentes estudios genéticos y moleculares realizados en ratones, han determinado que la osteocalcina aumenta la secreción de insulina y la sensibilidad a ésta, a través de la elevación de la secreción de adiponectina, estimula la proliferación y el mejor funcionamiento de las células beta, promueve la reducción de masa grasa y el incremento del consumo de energía.

Estos hallazgos demuestran la existencia de una regulación recíproca entre el hueso y el metabolismo energético, mediada por la osteocalcina. El reconocimiento del papel metabólico de la osteocalcina, supone un descubrimiento importante en el campo de la Osteología y la Endocrinología posibilitando nuevas terapias en la prevención y tratamiento de enfermedades metabólicas como la diabetes *mellitus*, la sarcopenia, la obesidad y la osteoporosis.

**Palabras clave:** *osteocalcina, hueso, órgano endocrino, metabolismo energético, insulina, diabetes mellitus, obesidad.*

## Endocrine regulation of energy metabolism by bone

### Summary

The classical functions of bone are the maintenance of phosphorus-calcium homeostasis, damage repair, as well its structural function which allows locomotion and protects the vital organs. The recent discovery of new functions for bone in the regulation of energy metabolism suggest that bone may be an endocrine organ.

In the last decade, different genetic and molecular studies carried out in mice have determined that osteocalcin increases the secretion of insulin, and sensitivity to it, by increasing the secretion of adiponectin, stimulates the proliferation and the better functioning of the beta cells, promotes the reduction of fatty mass and an increase in the consumption of energy.

These findings demonstrate the existence of a reciprocal regulation between bone and energy metabolism, mediated by osteocalcin. The recognition of the metabolic role of osteocalcin is a significant discovery in the field of osteology and endocrinology, bringing the possibility of new therapies in the treatment and prevention of metabolic diseases such as diabetes *mellitus*, sarcopenia, obesity and osteoporosis.

**Key words:** *osteocalcin, bone, endocrine organ, energy metabolism, insulin, diabetes mellitus, obesity.*

### Introducción

Las funciones clásicas del hueso son el mantenimiento de la homeostasis fosfocálcica, la reparación de los daños acaecidos, así como un efecto estructural que permite la locomoción y protege los órganos vitales<sup>1</sup>. El hueso es un tejido dinámico que está en constante cambio a través del remodelado óseo, y que requiere de una gran cantidad de energía para la realización de dicho proceso<sup>1,3</sup>.

La osteoporosis es la enfermedad por alteración del remodelado óseo más frecuente, y se relaciona con un aumento de la resorción ósea o un descenso de su formación. La observación clínica de que la osteoporosis se produce como consecuencia de un fallo gonadal y que el sobrepeso protege frente al desarrollo de la osteoporosis, sugiere la hipótesis de que el apetito o la masa corporal, la reproducción y la masa ósea pueden tener un mecanismo de regulación hormonal común. Esta conjetura y los recientes descubrimientos de las nuevas funciones del hueso en la regulación del metabolismo energético, proponen que el hueso puede ser un órgano endocrino<sup>2</sup>.

En las últimas décadas, numerosos ensayos clínicos han demostrado que la leptina, hormona derivada del adipocito, regula el apetito y ejerce un efecto antagónico bimodal sobre el remodelado óseo. Para ello utiliza dos vías hipotalámicas diferentes, el sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART), que actúan directamente sobre los osteoblastos<sup>2</sup>.

Lee y cols., en diferentes estudios genéticos y moleculares realizados en ratones, han determinado que la osteocalcina aumenta la secreción de insulina y su sensibilidad al elevar la secreción de adiponectina; y que también estimula la proliferación y el funcionamiento de las células beta, a la vez que promueve la reducción de masa grasa y el incremento del consumo de energía<sup>4,5</sup>. Estos hallazgos demuestran la existencia de una regulación entre el hueso y el metabolismo energético, mediada por la osteocalcina (OC).

En algunos estudios anteriores realizados en humanos se habían detectado diferentes marcadores de masa ósea baja en pacientes diabéticos, entre los que se encontraba la OC, pero hasta hace muy poco, no se habían realizado en éstos investigaciones para determinar sus funciones metabólicas. Recientemente, se ha encontrado en adultos una asociación entre la concentración de OC con marcadores de síndrome metabólico y obesidad, confirmando la existencia de una relación inversa entre la OC y la masa grasa y los niveles de glucosa<sup>6</sup>.

Esta relación recíproca entre el hueso y el metabolismo energético, a través del reciente reconocimiento del papel metabólico de la OC, supone un descubrimiento importante en el campo de la Osteología y la Endocrinología, posibilitando nuevas terapias en la prevención y tratamiento de enfermedades metabólicas como la diabetes *mellitus*, la sarcopenia, la obesidad y la osteoporosis.

### El hueso es un órgano endocrino

El órgano endocrino se puede definir como aquel capaz de regular el desarrollo, integrar la función de diversos órganos y tejidos y coordinar los procesos metabólicos del organismo mediante la síntesis y liberación de hormonas secretadas a la circulación. Estas funciones reguladoras se realizan mediante mecanismos de *feedback* o retroalimentación, donde la propia concentración de la hormona indica la necesidad de aumentar o disminuir su producción. Esta regulación es una característica fundamental de los órganos endocrinos.

El remodelado óseo es un proceso bifásico que se realiza de forma secuencial y de manera equilibrada. Consiste en la destrucción o resorción seguido de la formación de matriz ósea nueva<sup>7,8</sup>. Este proceso permite mantener la masa ósea de forma constante durante la edad adulta, y es esencial para el mantenimiento de la arquitectura ósea según las necesidades mecánicas, la reparación de daños producidos en el ejercicio diario y el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo fosfocálcico, de manera que el remodelado se constituye como una verdadera fun-

ción homeostática<sup>7,9</sup>. Gran parte de las funciones homeostáticas son controladas por el hipotálamo, como el apetito o la reproducción. No es de extrañar que el remodelado pudiera estar, al menos parcialmente, controlado por un mecanismo central<sup>9</sup>.

El remodelado óseo requiere de un gran y continuo suplemento de energía para las células óseas<sup>4</sup>. Para cubrir este gran coste energético, debe existir una corregulación entre el metabolismo energético y el hueso. En otras palabras, el remodelado óseo puede jugar un papel importante en cómo la glucosa y la energía son manejadas por el cuerpo<sup>7</sup>.

Estos dos aspectos biológicos (el establecimiento del remodelado óseo como función homeostática y su regulación central) junto con su participación en la regulación de la energía y la glucosa, sugieren la hipótesis de que existe una coordinación regulada entre el remodelado óseo y el metabolismo energético, probablemente a través de un mecanismo central<sup>8,9</sup>.

En la identificación de hormonas que pudieran regular la formación del hueso, partimos de dos hechos clínicos fundamentales. Primero, la osteoporosis se origina por un fallo gonadal<sup>10</sup>; y, segundo, el sobrepeso parece que protege frente a la osteoporosis<sup>11-13</sup>. Estas dos observaciones sugieren la existencia de un mecanismo de regulación común entre el apetito, la reproducción y la masa ósea. Al intentar determinar la hormona u hormonas reguladoras, se observó que la leptina es la única que influye de forma significativa en ambas funciones.

Se han establecido diferentes fases en la regulación central del remodelado óseo. El proceso comienza con la emisión de señales aferentes desde los adipocitos al hipotálamo, donde la leptina tiene un papel importante. Continúa con una fase neural compleja hipotalámica en la que participan numerosos neuropéptidos, y desde donde parten señales eferentes hacia los receptores  $\beta 2$  adrenérgicos en los osteoblastos. Como consecuencia se producen cambios en factores de transcripción y genes *clock* que afectan a la osteoblastogénesis. La última fase representa la regulación ósea de los adipocitos, probablemente a través de la liberación de OC. Los adipocitos podrían regular, a su vez, la proliferación y diferenciación de los osteoblastos<sup>14</sup> (Figura 1).

### Osteocalcina (OC)

El hueso y el metabolismo energético parecen tener una regulación cruzada por un componente central que es la grasa. Para validar esta hipótesis, se necesita un mediador que, originado en el hueso, pueda regular el metabolismo energético. Este mediador es la OC.

La estrategia para demostrar esta teoría requiere identificar genes específicos de los osteoblastos, para generar ratones con deleciones y estudiar los fenotipos metabólicos<sup>15</sup>. Lee y cols., en diferentes experimentos *in vitro*, confirmaron que los osteoblastos secretaban alguna sustancia que afectaba a las células pancreáticas y a los adipocitos, y parecía regular el metabolismo de la glucosa<sup>4</sup>. El co-

cultivo de osteoblastos de ratones salvajes con islotes pancreáticos aumentaba hasta el 500% la expresión del gen de insulina y de los marcadores de progresión del ciclo celular en los islotes. Karsenty y cols. fueron los primeros en proponer, en 2006, que existía una regulación endocrina del metabolismo energético, a través del esqueleto<sup>1</sup>.

La observación de que el ratón deficiente en una proteína específica del linaje osteoblástico, la OC, (OC<sup>-/-</sup>), exhibía una cantidad anormal de grasa visceral, llevó a la hipótesis de que esa era la hormona secretada por los osteoblastos que afectaba al metabolismo de la glucosa<sup>4</sup>.

La OC es una de las pocas proteínas específicas osteoblásticas que tiene numerosos rasgos de hormona. Es una molécula de bajo peso molecular (5.700 Da), producida por los osteoblastos<sup>4</sup>. Está presente en todos los vertebrados, y se considera un marcador de diferenciación para osteoblastos maduros. Es secretada a la circulación y desde su identificación, hace 30 años, se ha considerado el mayor constituyente de la matriz extracelular, donde se une a la hidroxiapatita, a través de tres residuos gamma-carboxilados, denominados residuos Gla. Esta carboxilación ofrece una oportunidad de regulación<sup>16</sup>. Sorprendentemente, aunque es la proteína no colágena más abundante (15% en el hueso), no está involucrada en la formación ósea<sup>17</sup>.

Los ratones sin OC tenían niveles altos de glucosa, niveles bajos de insulina y una disminución en la secreción de insulina estimulada por la glucosa, en comparación con los de genotipo salvaje<sup>4,20,21</sup> (Figura 2). En el páncreas, el tamaño de los islotes, la masa de las células beta y el contenido de insulina estaba descendido. Además, estaba aumentada la masa grasa, el número de adipocitos y los niveles de triglicéridos. La expresión de adiponectina y de sus dianas moleculares estaban reducidas, y la infusión subcutánea de OC recombinante en los ratones salvajes producía un aumento de la insulina y su sensibilidad, y mejoraba la expresión de los genes de insulina<sup>4</sup>.

Posteriormente, se obtuvieron ratones que presentaban una ausencia de genes que se expresan preferentemente en los osteoblastos. El primer gen fue Esp, que codifica el receptor de proteína tirosina fosfatasa (OST-PTP) presente en células madre, células de Sertoli y osteoblastos, y que no se expresan en las células beta del páncreas o el tejido adiposo<sup>2,4,18</sup>. Los ratones sin Esp (Esp<sup>-/-</sup>) tenían las células pancreáticas más grandes y numerosas que los ratones salvajes, proliferando entre un 60% y un 300% en ratones desde 5 días hasta un mes de edad. El aumento de los niveles de insulina y de la sensibilidad insulínica eran debidos a la captación de glucosa en el músculo, grasa marrón, grasa blanca e hígado, y al aumento de la adiponectina (la única adipocina afectada que estaba elevada el doble en estos ratones), así como al incremento en la expresión de otros genes diana de la adiponectina, que estaban aumentados tres veces, como el gen de Acyl-CoA oxidasa, el gen del receptor activador de la proliferación del peroxisoma alfa (PPAR alfa) y el de la proteína desacoplante 2 (UCP 2). Por el con-

Figura 1. Esquema de regulación central del remodelado óseo. Adaptado de Rosen<sup>14</sup>

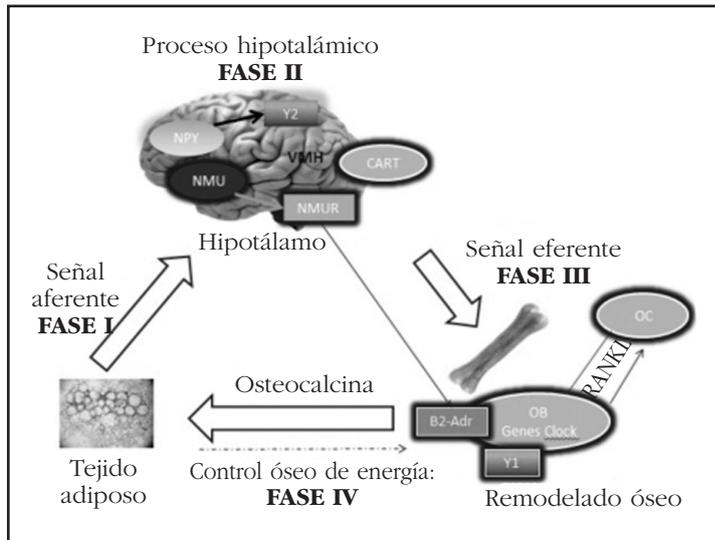
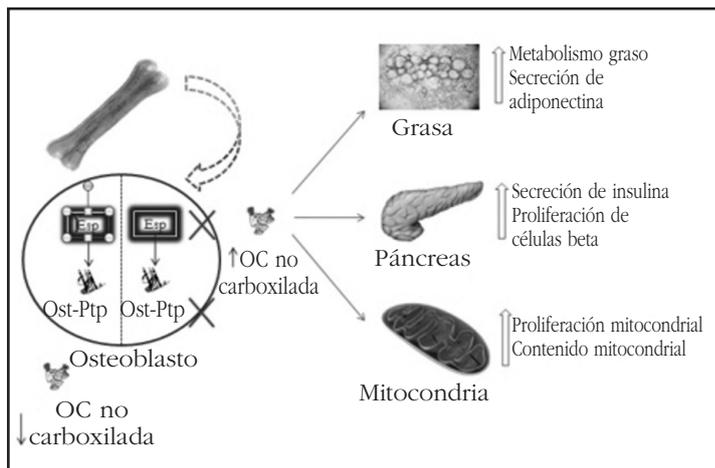


Figura 2. Fisiología integradora: vía metabólica novel de la osteocalcina. Adaptado de Kim y cols.<sup>19</sup>



trario, estos genes que codifican enzimas insulino-sensibilizantes, así como la adiponectina y la insulina, estaban disminuidos en los ratones sin OC<sup>19</sup>. En el ratón sin Esp se observó un aumento de hasta tres veces del área mitocondrial y de proteínas asociadas con la biogénesis. A pesar de que la insulina es una hormona lipogénica, estos ratones eran más delgados por un aumento en el gasto energético, que se evidenció por una elevación en la expresión de PGC1- alfa y de la proteína desacoplante 1 (UCP 1) sin que se afectase el apetito. El descenso de la masa grasa se restringió a la grasa visceral, y los niveles de triglicéridos eran menores.

Para confirmar que la delección de Esp protegía frente al desarrollo de síntomas diabéticos, se hicieron estudios en ratones a los que se les produjo hiperfagia por lesiones estructurales hipotalámicas, se destruyeron células beta pancreáticas o se les alimentó con dieta grasa. En los ratones sin Esp, se comprobó una menor ganancia de peso y no desarrollaron intolerancia a la glucosa o insulino-resistencia<sup>20</sup>.

El hecho de que los ratones sin OC tenga un fenotipo contrario a los ratones sin Esp, sugiere que los dos genes están en la misma vía, aunque no interactúan físicamente (Tabla 1). Lee reportó que el 90% de la OC estaba unida a la hidroxapatita, mientras que en los ratones sin Esp sólo lo estaba el 74%. Este hecho hizo que se planteara la posibilidad de que la OST-PTP, regulada por el gen Esp, estuviera de algún modo envuelta en la gamma-carboxilación de la OC<sup>21</sup>.

La OC es secretada por los osteoblastos siguiendo numerosas modificaciones postraslacionales. Estas modificaciones incluyen la escisión de un pre-peptido y la gamma-carboxilación, dependiente de vitamina K, de los tres residuos glutámicos en residuos Gla<sup>22</sup>. Esta gamma-carboxilación es esencial para que la proteína tenga alta afinidad por los minerales y permita a la OC atraer iones de calcio e incorporarlos a los cristales de hidroxapatita, que forman el 70% de los huesos<sup>22</sup>.

Hay una alta proporción de OC no carboxilada en la circulación, mientras que la mayor proporción de OC carboxilada se encuentra en la matriz ósea; sin embargo, no todos los residuos de los tres ácidos glutámicos son completamente carboxilados e incorporados a los cristales, y el grado de carboxilación varía<sup>23</sup>. La vitamina K es un cofactor para la enzima glutamato carboxilasa que se requiere para la carboxilación de las proteínas que contienen Gla en la cascada de la coagulación y para la carboxilación de la OC. La carboxilación o la ausencia de ésta hace a la OC susceptible de liberarse de los osteoblastos a la circulación. En experimentos *in vitro*

realizados en islotes aislados y en adipocitos primarios, se reveló que la forma carboxilada es inactiva y la no carboxilada es la forma activa<sup>4,24</sup>.

Tal y como hemos comentado previamente, los ratones (Esp<sup>-/-</sup>) y los ratones tratados con OC no carboxilada resultaban en un fenotipo protector, opuesto al modelo (OC<sup>-/-</sup>). Alternativamente, la sobreexpresión de OST-PTP originaba un fenotipo idéntico a los ratones (OC<sup>-/-</sup>)<sup>4,25</sup>.

Los cambios metabólicos en ratones con delección del receptor de insulina en los osteoblastos proporcionan la evidencia del vínculo de acción de la insulina en el remodelado óseo y la homeostasis de la glucosa.

La señalización de insulina en los osteoblastos inhibe la carboxilación, por lo que es un regulador positivo de la actividad metabólica. OST-PTP inhibe la señalización de insulina, de manera que el fenotipo metabólico de ratones sin Esp es secundario a un aumento en la señalización de insulina en los osteoblastos y al aumento secundario de OC no carboxilada<sup>25</sup>.

Tabla 1. Características de los ratones (Esp<sup>-/-</sup>) y (OC<sup>-/-</sup>). Adaptada de Wah<sup>21</sup>

Esp <sup>-/-</sup>	OC <sup>-/-</sup>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muerte neonatal por hipoglucemia e hiperinsulinemia</li> <li>• Aumento de la sensibilidad insulínica</li> <li>• Aumento de la secreción de insulina</li> <li>• Aumento de las células beta y área pancreática</li> <li>• Aumento de adiponectina</li> <li>• Aumento del gasto energético</li> <li>• Reducción del peso corporal y del acúmulo de grasa</li> <li>• Niveles bajos de triglicéridos y ácidos grasos libres</li> <li>• Aumento significativo de OC no carboxilada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiperglucemia</li> <li>• Descenso de la sensibilidad insulínica</li> <li>• Descenso de la secreción de insulina</li> <li>• Descenso de las células beta y área pancreática</li> <li>• Descenso de adiponectina</li> <li>• Descenso del gasto energético</li> <li>• Anormalmente gordo</li> <li>• Aumento de triglicéridos</li> <li>• OC no se expresa</li> </ul>

La insulina promueve la habilidad de los osteoblastos de mejorar la resorción ósea. Desciende, a través de FoxO1, la expresión de OPG y esto promueve la resorción ósea y, en particular, la expresión de Tcigr 1 que codifica una bomba de subunidad de protón que contribuye a la acidificación de la matriz ósea extracelular<sup>21</sup>. El pH ácido en torno a 4,5 generado durante la resorción ósea es suficiente para decarboxilar y activar las moléculas de OC (Gla-OCN) almacenadas en la matriz ósea extracelular. Se llega a producir la suficiente cantidad de OC no carboxilada como para inducir la expresión de células beta y estimular la expresión de insulina en ellas, al igual que con el tratamiento con OC recombinante<sup>25</sup>. Esto revela un mecanismo pH-dependiente de activación para esta hormona, e identifica la señalización de insulina en los osteoblastos como un vínculo crítico entre el remodelado óseo y el metabolismo energético<sup>25,26</sup>.

Son muy importantes los datos obtenidos en numerosos estudios en humanos acerca de la relación de la OC con la homeostasis de la glucosa y el metabolismo energético y, por otro lado, con el metabolismo óseo. En el primer campo, los hallazgos son muy interesantes. Los modelos de ratones muestran a la OC como una hormona reguladora positiva de la producción de insulina y de la sensibilidad insulínica. Niveles bajos de OC se asocian a diabetes *mellitus*, intolerancia a glucosa e insulino-resistencia. Estudios adicionales han determinado que niveles bajos de OC empeoran la hemoglobina glicosilada (HbA1c), la insulina en ayunas y la insulino-resistencia mediante el modelo homeostático de evaluación (HOMA), independientemente de la presencia de diabetes *mellitus*<sup>6,27-29</sup>. Estos datos sugieren que el aumento de los niveles de OC podría ser una terapia futura para tratar la diabetes.

También se han encontrado que los niveles circulantes de OC están inversamente correlacionados con parámetros de adiposidad, como el índice de masa corporal (IMC) o la masa grasa, y con niveles de glucosa plasmática en hombres y mujeres adultos de diferentes etnias<sup>6,20,30</sup>.

Los niveles de OC circulante se han asociado asimismo con un número de anomalías lipídicas, y se correlacionan positivamente con niveles de adiponectina en mujeres postmenopáusicas<sup>20</sup>. De forma más general, los obesos tienen menos OC que los no obesos, y los sujetos con diabetes *mellitus* tipo 2 tienen menos OC que los no diabéticos<sup>20,30</sup>.

Se ha empezado a testar la producción dinámica de OC como marcador de energía y del metabolismo de glucosa. Por ejemplo, se ha visto que la pérdida de peso significativa causa un descenso en el modelo homeostático de evaluación de la resistencia en insulina (HOMA-IR), así como un aumento de los niveles de OC en niños obesos<sup>31</sup>. En no diabéticos, la pérdida de peso con dieta y ejercicio aumenta los niveles de OC en paralelo con el descenso de grasa visceral, y aumenta la sensibilidad a la insulina<sup>32,33</sup>. Los niveles descendidos de OC también se han correlacionado con el infarto agudo de miocardio.

En cuanto al segundo campo, se ha descrito ampliamente que las alteraciones en el metabolismo de la glucosa pueden ser un factor de riesgo de pérdida de masa ósea y fracturas en humanos<sup>34</sup>. En un estudio transversal, se encontró que mujeres osteoporóticas tras 6 meses o más de tratamiento con alendronato, tenían niveles más bajos de OC no carboxilada que aquellas que no habían sido tratadas. Apenas hay estudios que establezcan los efectos de los bifosfonatos en la homeostasis de la glucosa o la sensibilidad insulínica<sup>35</sup>. El tratamiento con alendronato y raloxifeno (modulador selectivo de los receptores de estrógenos) durante 12 meses redujo los marcadores bioquímicos de remodelación ósea, incluido la OC<sup>36</sup>.

Sería importante comprobar si los fármacos anti-resortivos, que son el principal tratamiento de osteoporosis, pueden en algunos casos tener efecto negativo en la tolerancia a la glucosa, así como el efecto de los anticoagulantes que afectan a la vitamina K<sup>25</sup>.

Por último, destacar también la posible relación que parece existir entre la OC y la regulación endocrina de la reproducción masculina a través de la regulación de la producción de andrógenos<sup>37,38</sup>.

## Conclusiones

Los modelos recientes de ratones sugieren un nuevo papel del hueso en el que es la fuente de una hormona, la OC no carboxilada, que afecta al metabolismo energético, la insulino-resistencia, la obesidad y el desarrollo de diabetes. De manera que un órgano con función endocrina, como es la grasa, es mediado por la función endocrina de otro órgano, el esqueleto.

Los estudios que se deben realizar en un futuro, basados en esta integración fisiológica, deben revisar otras ramas noveles que aún no han sido estudiadas. Cada vez hay más estudios que están estableciendo que múltiples aspectos de la biología de la OC son similares en ratones y humanos, intentado determinar si el sistema endocrino puede ser o no diferente al existente en humanos.

Queda por aclarar el posible papel de la adiponectina, la leptina, la OC y la insulina, que parecen integrar las funciones del tejido adiposo, hueso y páncreas para regular el metabolismo de la glucosa, el remodelado óseo, la energía y el metabolismo lipídico.

Podemos considerar que el esqueleto, como órgano endocrino, está envuelto en la coordinación global del uso de energía, a través de la interacción con otros tejidos.

La identificación de la OC y su regulación y diferentes efectos ha proporcionado la base para el desarrollo de potenciales aplicaciones terapéuticas de enfermedades metabólicas como la diabetes *mellitus*, la sarcopenia o la obesidad.

Ambos autores declaran que no existen conflictos de intereses.

## Bibliografía

- Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab* 2006;4:341-8.
- Rappaport R. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Growth Genetics Hormones* 2009;25:24-5.
- Harada SI, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003;423:349-55.
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007;130:456-69.
- Wolf G. Energy regulation by the skeleton. *Nutr Rev* 2008;66:229-33.
- Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:827-32.
- Karsenty G, Oury F. The central regulation of bone mass, the first link between bone remodeling and energy metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4795-801.
- Ducy P. The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. *Diabetología* 2011;54:1291-7.
- Wei J, Ducy P. Co-dependence of bone and energy metabolism. *Arch Biochem Biophys* 2010;503:35-40.
- Riggs BL, Melton LJ 3rd. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 1986;314:1676-86.
- Zhao IJ, Liu YJ, Yuan Liu P, Hamilton J, Recker RR, Den HW. Relationship of obesity with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1640-6.
- Grinspoon S, Thomas E, Pitts S, Gross E, Mickley D, Miller K, et al. Prevalence and predictive factors for regional osteopenia in women with anorexia nervosa. *Ann Intern Med* 2000;133:790-4.
- Tremolieres FA, Pouilles JM, Ribot C. Vertebral postmenopausal bone loss is reduced in overweight women: a longitudinal study in 155 early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:683-6.
- Rosen CJ. Bone remodeling, energy metabolism, and the molecular clock. *Cell Metab* 2008;7:7-10.
- Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2000;100:197-207.
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 1989;69:990-1047.
- Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* 2004;165:625-30.
- Dacquin R, Mee PJ, Kawaguchi J, Olmsted-Davis EA, Gallagher JA, Nichols J, et al. Knock-in of nuclear localised beta-galactosidase reveals that the tyrosine collar. *Dev Dyn* 2004;229:826-34.
- Kim HY, Choe JW, Kim HK, Bae SJ, Kim BJ, Lee SH, et al. Negative association between metabolic syndrome and bone mineral density in Koreans, especially in men. *Calcif Tissue Int* 2010;86:350-8.
- Lee NK. An evolving integrative physiology: skeleton and energy metabolism. *BMB Rep* 2010;43:579-83.
- Wah NG. Regulation of glucose metabolism and the skeleton. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;75:147-55.
- Bügel S. Vitamin K and bone health in adult humans. *Vitam Horm* 2008;78:393-416.
- Motyl KJ, McCabe LR, Schwartz AV. Bone and glucose metabolism: a two-way street. *Arch Biochem Biophys* 2010;503:2-10.
- Lee NK, Karsenty G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:161-6.
- Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 2010;142:296-308.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211-25.
- Hwang YC, Jee JH, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY, Lee MK. Circulating osteocalcin level is not associated with incident type 2 diabetes in middle-aged male subjects: mean 8.4-year retrospective follow-up study. *Diabetes Care* 2012;35:1919-24.
- Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Kurioka S, Yano S, et al. Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:45-9.
- Bao YQ, Zhou M, Zhou J, Lu W, Gao YC, Pan XP, et al. Relationship between serum osteocalcin and glycaemic variability in Type 2 diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011;38:50-4.
- Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, et al. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res* 2009;24:785-91.
- Reinehr T, Roth CL. A new link between skeleton, obesity and insulin resistance: relationships between osteocalcin, leptin and insulin resistance in obese children before and after weight loss. *Int J Obes (Lond)* 2010;34:852-8.
- Fernández-Real JM, Izquierdo M, Ortega F, Gorostiaga E, Gómez-Ambrosi J, Moreno-Navarrete JM, et al. The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity, and disposal with hypocaloric diet and resistance training. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:237-45.
- Levinger I, Zebaze R, Jerums G, Hare DL, Selig S, Seeman E. The effect of acute exercise on undercarboxylated osteocalcin in obese men. *Osteoporos Int* 2011;22:1621-6.
- Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JA, Smals AG. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest* 2000;23:295-303.
- Aonuma H, Miyakoshi N, Hongo M, Kasukawa Y, Shimada Y. Low serum levels of undercarboxylated osteocalcin in postmenopausal osteoporotic women receiving an inhibitor of bone resorption. *Tohoku J Exp Med* 2009;218:201-5.
- Johnell O, Scheele WH, Lu Y, Reginster JY, Need AG, Seeman E. Additive effects of raloxifene and alendronate on bone density and biochemical markers of bone remodeling in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:985-92.
- Patti A, Gennari L, Merlotti D, Dotta F, Nuti R. Endocrine actions of osteocalcin. *Int J Endocrinol* 2013;2013:846480. doi: 10.1155/2013/846480. Epub 2013 Apr 30.
- Schuh-Huerta SM, Pera RA. Reproductive biology: bone returns the favour. *Nature* 2011;472(7341):46-7.

**Sosa Henríquez M<sup>1,2</sup>, Gómez de Tejada Romero MJ<sup>3</sup>, Malouf Sierra J<sup>4</sup>**

1 Universidad de Las Palmas de Gran Canaria - Grupo de investigación en osteoporosis y metabolismo mineral - Las Palmas de Gran Canaria

2 Hospital Universitario Insular - Unidad Metabólica Ósea - Las Palmas de Gran Canaria

3 Departamento de Medicina - Universidad de Sevilla (Sevilla)

4 Unidad de Metabolismo Mineral - Departamento de Medicina Interna - Hospital de la Santa Creu i Sant Pau - Universidad Autónoma de Barcelona - Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau (Barcelona)

## Caso clínico a debate: vacaciones terapéuticas, ¿sí o no?

La correspondencia sobre este documento especial debe remitirse a la redacción de la revista: [secretaria@revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com](mailto:secretaria@revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com)

### Presentación

Introducimos un nuevo tipo de documento especial, en el que, desde la propia Revista, debatiremos un tema de actual controversia que permita a los lectores reflexionar y, sobre todo, participar con sus opiniones como Cartas al Director.

En esta ocasión tratamos el tema de las vacaciones terapéuticas utilizando un caso clínico. Dos opiniones razonadas, a favor y en contra, se expondrán a continuación, con el único objetivo de suscitar la polémica y estimular la intervención de los lectores en el debate.

### Caso clínico

Paciente mujer de 63 años en la actualidad, que acude a consulta por primera vez en julio de 2004 con 53 años. Fue remitida por su médico de cabecera por presentar un cuadro de dolor de espalda de varios meses de evolución. En esta primera visita, se le solicitó una radiografía lateral de columna dorso-lumbar (Figura 1) que mostró la existencia de una fractura vertebral lumbar.

Como antecedentes personales, la paciente tuvo una menopausia precoz a los 35 años, sin que existiera ninguna enfermedad que lo justificase, para la que se le indicó tratamiento hormonal sustitutivo durante 5 años. Asimismo fue diagnosticada de hipercolesterolemia, para la cual seguía dieta y tomaba simvastatina de forma irregular. No refiere consumo de tabaco, ni de alcohol, es sedentaria y no tiene otros antecedentes de inte-

rés. No toma ninguna otra medicación, además de la estatina antes mencionada.

La analítica realizada en la primera visita fue completamente normal. Los datos relacionados con el metabolismo mineral óseo se muestran en la tabla 1. Los niveles de vitamina D, medidos como 25-hidroxicolecalciferol (25-HCC), fueron de 22 ng/mL. La valoración del riesgo a 10 años tanto por la escala FRAX<sup>®</sup> como la Qfracture<sup>®</sup> se muestra en la tabla 2.

Los valores de la densitometría se muestran en la tabla 3 y la evolución de la misma en las figuras 2 y 3.

A la paciente se le indicó como tratamiento medidas generales que incluían caminar a diario una hora, aumentar la ingesta de productos lácteos desnatados, un suplemento de calcio y vitamina D, y alendronato con vitamina D semanal. Fue valorada por el Servicio de Rehabilitación, donde le indicaron tratamiento fisioterapéutico durante 2 meses, mejorando del dolor de espalda. Ha continuado con el tratamiento indicado durante 10 años, que tolera bien, sin efectos secundarios, reconociendo algún olvido puntual del suplemento de calcio y vitamina D. No ha tenido caídas ni fracturas desde entonces.

En la última visita, que se produjo en febrero de 2014, tras 10 años de tratamiento, trae informe de su médico de cabecera que nos solicita nuestra opinión sobre la posibilidad de suspender el tratamiento y dar a la paciente vacaciones terapéuticas.

## Opiniones razonadas

### A) Razones para mantener el tratamiento en esta paciente (NO a las vacaciones terapéuticas)

**Manuel Sosa Henríquez y M<sup>a</sup> Jesús Gómez de Tejada Romero**

Nuestro principal objetivo al instaurar un tratamiento para la osteoporosis es evitar la aparición de la fractura por fragilidad<sup>1</sup>, que es la complicación clínica de esta enfermedad, ya sea la primera fractura cuando aún no se ha presentado o, si ya existiera, las sucesivas.

Igualmente importante son las consecuencias de las fracturas, es decir, la aparición de dolor y el empeoramiento de la calidad de vida, de manera que, con el tratamiento, también pretendemos evitar o disminuir ese dolor o y mejorar la calidad de vida de los pacientes<sup>2</sup>.

Las razones puramente clínicas (esto es, dejando a un lado las económicas o personales del paciente) para suspender un determinado tratamiento, para la osteoporosis o para cualquier otra enfermedad, son en nuestra opinión:

1. Por curación de la enfermedad. Así, suspendemos un antibiótico al resolver la infección, o un antiinflamatorio al producirse la curación del proceso inflamatorio. Este no es el caso de la osteoporosis, al tratarse de una enfermedad crónica, con alteraciones microestructurales profundas que no se curan.

2. Por pérdida de efectividad del fármaco utilizado. Volviendo al ejemplo anterior, algunos microorganismos pueden desarrollar resistencia a un antibiótico, el cual, siendo inicialmente útil, deja de serlo. Esto en el campo de la osteoporosis es bastante más complicado de definir, pues las fracturas, por una parte, tienen una etiopatogenia multifactorial y, por otra, los fármacos de que disponemos reducen el riesgo de fractura, pero no lo eliminan por completo. Para simplificar la respuesta, podemos asumir los criterios de "fracaso terapéutico" tal y como Díez Pérez y cols. indicaron<sup>3</sup>.

3. En algunos casos, se establece una limitación *a priori* al uso de un fármaco. Así, teriparatida puede utilizarse durante un máximo de 2 años, según la indicación recogida en su ficha técnica; o zoledronato, que, según se ha publicado recientemente, a partir de 5 años de su uso la reducción del riesgo de fractura es igual tanto si se administra como si se suspende<sup>4</sup>.

4. Otro motivo para suspender un fármaco es la aparición de efectos secundarios que superen los efectos beneficiosos de su uso contra la enfermedad para la que se prescribió. Así, en el tratamiento de la osteoporosis con SERMs, la aparición de fenómenos tromboembólicos obliga a su suspensión y sustitución por otro tipo de fármaco antiosteoporótico.

Siguiendo estas razones, y en el caso que nos ocupa, ¿hay algún motivo para suspender el tratamiento a esta paciente? Ésta ha mantenido el tratamiento durante 10 años, y aún siendo una paciente de alto riesgo, con una fractura vertebral previa, en todo ese tiempo no ha sufrido nuevas fracturas; por lo que el tratamiento hasta el

Figura 1. Radiografías lateral y anteroposterior de columna lumbar de la paciente. Las flechas señalan la fractura vertebral (L2)



momento ha sido un éxito y ha cumplido exactamente lo que esperábamos de él. Por otro lado, la paciente está asintomática, los marcadores bioquímicos de remodelado óseo son normales, y su densidad mineral ósea no ha dejado de aumentar desde que se inició la terapia.

En los últimos años, no obstante, y a partir de la descripción en la literatura de casos de osteonecrosis de maxilares (ONM) y fracturas atípicas femorales en pacientes en tratamiento con bifosfonatos<sup>5,6</sup>, está tomando fuerza una corriente de opinión tendente a la suspensión del tratamiento sólo por el hecho de "llevar mucho tiempo con él", "porque no existen datos sobre seguridad a partir de un determinado número de años" o "por el riesgo de que aparezca una complicación del tipo de una osteonecrosis de maxilares o una fractura femoral atípica". A nuestro parecer, se trata de justificaciones sin mucho peso real. En cuanto al tiempo de tratamiento, ¿caso nos planteamos esta cuestión en el tratamiento de otras enfermedades crónicas, como la HTA o la diabetes? Una patología, mientras exista, debe ser tratada, y *a priori*, y sin presencia de complicaciones o efectos secundarios, el tratamiento será mantenido con el fármaco de elección si está siendo efectivo.

Por otro lado, los bifosfonatos son unos fármacos bastante seguros, cuyo único efecto adverso demostrado es la lesión en la mucosa esofágica, que se evita con las medidas posturales después de la administración oral. Es cierto que no existen datos fiables de seguridad durante un período de tiempo tan largo de tratamiento con bifosfonatos. Sin embargo, es difícil que los haya (no al menos en los términos de ensayo clínico con un número elevado de pacientes, aleatorizado, controlado y a

Tabla 1. Datos bioquímicos relacionados con el metabolismo mineral óseo. 25-HCC: 25-hidroxicolecalciferol. FATR: fosfatasa ácida tartrato-resistente. P1NP: Propéptido amino-terminal del procolágeno 1. CTX: Telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo 1. ND: no disponible

Parámetro	Rango de referencia	2004	2014	Cambio porcentual con respecto al valor basal
25-HCC (ng/mL)	30,0 - 80,0	22	51,8	57,5%
PTH (pg/mL)	15 - 88	54,2	29,9	-81,2%
Calcio (mg/dL)	8,5 - 10,5	8,9	9,3	4,3%
Fósforo (mg/dL)	2,5 - 4,9	3,2	3,2	0%
Osteocalcina (ng/mL)	11 - 43	8,6	13,45	55,8%
FATR (UI/L)	0,0 - 3,3	2,4	2,9	17,2%
P1NP (ng/mL)	Premenopáusicas: <30,1 Postmenopáusicas: <37,1 Hombres: <36,4	ND	22,54	ND
CTX (ng/mL)	0 - 0,5	0,4	0,15	-166,6%
Calcio corregido (mg/dL)	8,5 - 10,5	9	9,4	3,1%

doble ciego que asegure su fiabilidad), porque los ensayos clínicos en el campo de la osteoporosis se terminan a los 3 ó 5 años. Una vez conseguida la aprobación para su uso, el estudio concluye. Existen muy pocos estudios sobre seguimiento a largo plazo, y en éstos la pérdida del número de pacientes es tan elevada, que de entrada hace dudar acerca de que la población que permanece sea representativa del total que inició el estudio. Por tanto, una vez que el fármaco sale al mercado, es la experiencia clínica la que habla. Y, hasta el momento, si no existen efectos adversos y el fármaco sigue siendo efectivo, la experiencia clínica no dice nada en contra de continuar el tratamiento.

Los temidos efectos secundarios asociados al tratamiento a largo plazo con los bifosfonatos, y atribuidos a su potente efecto antirresortivo, como la osteonecrosis de los maxilares o las fracturas atípicas, no constituyen un problema real. La osteonecrosis de los maxilares asociada a los bifosfonatos es una complicación que aparece mayoritariamente en pacientes oncológicos tratados con dichos fármacos para sus metástasis óseas, quienes, además, han recibido otros tratamientos potentes (citostáticos), y en los que los bifosfonatos se han empleado a unas dosis muy superiores a las utilizadas en el tratamiento de la osteoporosis<sup>5</sup>. Por otro lado, desconocemos cuál es la etiopatogenia exacta de la ONM, pero ya hoy en día se perfila una etiopatogenia multifactorial, donde entrarían factores rela-

Tabla 2. Estimación del riesgo de fractura a 10 años en la 1ª visita

Riesgo absoluto estimado	FRAX®	QFRACTURE®
Cualquier fractura ( <i>Major</i> )	15	6
Fractura de cadera ( <i>bip</i> )	2,7	2

cionados no sólo con el tratamiento recibido por el paciente (los bifosfonatos, sí, pero también los glucocorticoides), sino también la presencia de enfermedades concomitantes (como la diabetes *mellitus* o la artritis reumatoide), así como la concurrencia de una intervención dental (extracción, implantes, etc.), acompañado de un componente infeccioso<sup>7</sup>. Y aún así, si esto sólo no fuera bastante para no considerar la ONM como un problema real en el tratamiento de la OP con bifosfonatos, se sabe que hasta el 25% de los casos descritos de ONM no recibían bifosfonatos<sup>5,8</sup>. En relación a los casos descritos en pacientes osteoporóticos tratados con bifosfonatos, los estudios de incidencia barajan cifras en torno al 1/100.000 pacientes/año e incluso menor de 1/100.000 pacientes/año<sup>9</sup>. En el estudio de referencia de zoledronato (HORIZON), que consideró la ONM como efecto adverso, sólo se constató la aparición de 2 casos, uno de los cuales ocurrió en el grupo placebo<sup>10</sup>. En una revisión sistemática en la que se evaluaba si los pacientes en tratamiento con bifosfonatos, tanto I.V. como orales, tenían más

Tabla 3. Valores densitométricos a lo largo de los 10 años de evolución. DMO: densidad mineral ósea

Año	DMO L2-L4	T-score L2-L4	DMO cuello femoral	T-score cuello femoral	DMO cadera total	T-score cadera total
2004	0,655	-3,7	0,607	-2,1	0,778	-1,3
2005	0,717	-3,1	0,639	-1,8	0,845	-0,8
2006	0,734	-2,9	0,648	-1,8	0,850	-0,8
2007	0,765	-2,6	0,638	-1,8	0,843	-0,8
2008	0,744	-2,8	0,671	-1,5	0,852	-0,7
2010	0,744	-2,8	0,638	-1,8	0,825	-1,0
2011	0,757	-2,7	0,647	-1,8	0,844	-0,8
2012	0,777	-2,5	0,646	-1,8	0,870	-0,6
2014	0,776	-2,5	0,673	-1,5	0,884	-0,5

riesgo de sufrir ONM ante la realización de un implante dental que aquéllos que no estaban tratados con ellos, se concluyó que el tratamiento con bifosfonatos no era una contraindicación para realizar la intervención<sup>11</sup>. Y cada vez más investigadores concluyen que la ONM es una complicación tan poco frecuente en los pacientes tratados con bifosfonatos para la osteoporosis, que su riesgo no justifica el cese del tratamiento a largo plazo, y más cuando se trata de un tratamiento que reduce eficazmente el riesgo de fractura, complicación cuya incidencia es incomparablemente superior a la de ONM, así como su morbilidad, mortalidad y coste socioeconómico.

Por otro lado, las fracturas atípicas femorales constituyen en la actualidad el principal argumento a favor de la supresión del tratamiento con bifosfonatos, ya que en varios estudios epidemiológicos se ha establecido una cierta asociación entre el riesgo de desarrollar una fractura atípica y el tiempo de utilización de los bifosfonatos<sup>12</sup>. Sin embargo, también es cierto que igualmente se han descrito casos de este tipo de fracturas en pacientes que no tomaban bifosfonatos, y con otros fármacos antirresortivos como denosumab<sup>13</sup>, incluso otros no usados para la osteoporosis, como los inhibidores de la bomba de protones y los glucocorticoides. También se ha asociado a otras circunstancias patológicas, como la hipofosfatasa, el déficit de vitamina D y la artritis reumatoide<sup>14</sup>. En su conjunto, el riesgo de fractura atípica femoral es muy bajo. Un estudio realizado por Black y cols. en el que analizaban las fracturas de fémur ocurridas durante el desarrollo de 3 ensayos clínicos (FIT, FLEX y HORIZON, realizados con alendronato y zoledronato), obtuvieron que, en un total de 14.194 mujeres incluidas en el estudio, tuvieron lugar 283 fracturas de fémur, de las cuales sólo 12 eran atípicas<sup>15</sup>. Se ha estimado su inci-

dencia en 32 casos/millón de pacientes/año<sup>12</sup> o 1,78/100.000 pacientes/año<sup>16</sup>, y si bien estos mismos estudios encuentran un aumento de la incidencia con los años del tratamiento –un 10%/año<sup>15</sup> y 113,1/100.000 pacientes/año<sup>16</sup>–, aún no es incidencia suficiente para que afecte a la relación riesgo/beneficio de estos fármacos. Con la evidencia de que disponemos en la actualidad, no se puede establecer una relación causal entre el tratamiento prolongado con bifosfonatos y la aparición de fracturas atípicas, siendo probable que estos fármacos jueguen un papel en el desarrollo de las mismas, pero no posible que ésta sea única condición para el desarrollo de estas fracturas<sup>17</sup>.

La última razón que justificaría la suspensión del tratamiento, es el hecho observado de que los bifosfonatos tienen un cierto efecto residual y que una vez suspendido se prolonga la reducción del riesgo de fractura sin el concurso del fármaco. El estudio de referencia sobre el alendronato, denominado estudio FIT, constató que al cabo de un seguimiento medio de 4,3 años, las pacientes que tomaban alendronato tenían un reducción del riesgo de fracturas vertebrales morfométricas del 47%, de las fracturas vertebrales clínicas del 55% y de cadera del 51%<sup>18</sup>.

Los investigadores de este estudio hicieron una prolongación del mismo durante otros 5 años, denominado estudio FLEX comparando la reducción del riesgo de fractura entre aquéllas que continuaron tomando alendronato y aquéllas que lo suspendieron. Se observó que cuando se suspendía el tratamiento existía un efecto residual en la reducción del riesgo de fractura no vertebral, pero en cambio aumentaba el riesgo de fractura vertebral, en comparación con aquéllas pacientes que continuaron tomando el fármaco, en las que la reducción del riesgo de fracturas vertebrales clínicas fue del 55%<sup>19</sup>.

Ni siquiera tomando el fármaco correctamente la paciente está protegida al 100%. O dicho de otro modo, el riesgo nunca se reduce al 0%; pero, además, existe un factor de riesgo muy importante e ineludible, que es la edad. En nuestra paciente, solo considerando el factor edad, ha aumentado su riesgo de fractura, porque tiene 10 años más. Si ahora le indicáramos unas "vacaciones terapéuticas" (un eufemismo de suspender el tratamiento) estaremos obviando este riesgo aumentado debido solamente al hecho de que es 10 años mayor. ¿Cuál es entonces el objetivo al iniciar un tratamiento para la osteoporosis? ¿Evitar que se produzca una fractura si es posible a lo largo de su vida, o retrasar su aparición a 10 años después?

En esta paciente el tratamiento para la osteoporosis ha sido efectivo hasta el momento; no ha habido efectos secundarios ni complicaciones de ningún tipo. Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo están normales, no existe "sobresupresión" del remodelado óseo. La DMO va en aumento. Y tiene 10 años más. Solo por eso, el riesgo de nuevas fracturas es ahora incluso mayor. Si suspendemos el tratamiento (esto es, le damos vacaciones terapéuticas), por el simple hecho de que lleva ya 10 años con él, es posible que la protección conseguida descienda hasta tal punto de no contrarrestar el incremento del riesgo de fractura que se ha producido por ese mismo hecho, es decir, tener 10 años más.

Nuestra opinión es que, por tanto, que es esta paciente no es necesario ni considerable suspender el tratamiento.

### B) Razones para realizar vacaciones terapéuticas en esta paciente (SÍ a las vacaciones terapéuticas)

#### Jorge Malouf Sierra

Como se ha expuesto con anterioridad, el objetivo de cualquier tratamiento en la osteoporosis es el de reducir el riesgo de fractura por fragilidad. Este tipo de fracturas aparecen cuando la resistencia del hueso no es capaz de mantener la integridad del tejido óseo y las fuerzas biomecánicas más inocuas provocan que la estructura ósea de derrumbe.

Las guías de valoración y tratamiento de las fracturas por fragilidad de la NICE<sup>20</sup> sugieren que la valoración del riesgo de fractura debe hacerse en mujeres por debajo de los 65 años, únicamente si presenta más factores de riesgo asociado, entre los que podemos encontrar:

- Fractura por fragilidad previa.
- Uso actual de glucocorticoides.
- Historia de fracturas.
- Historia familiar de fractura de fémur.
- Causas de osteoporosis secundarias.
- Bajo índice de masa corporal (menor de 18,5 kg/m<sup>2</sup>).
- Hábito tabáquico.
- Consumo de más de 14 unidades de alcohol por semana.

En el caso de nuestra paciente, podría considerarse adecuado la valoración del riesgo de fractu-

Figura 2. Evolución de la densidad mineral ósea en la columna lumbar

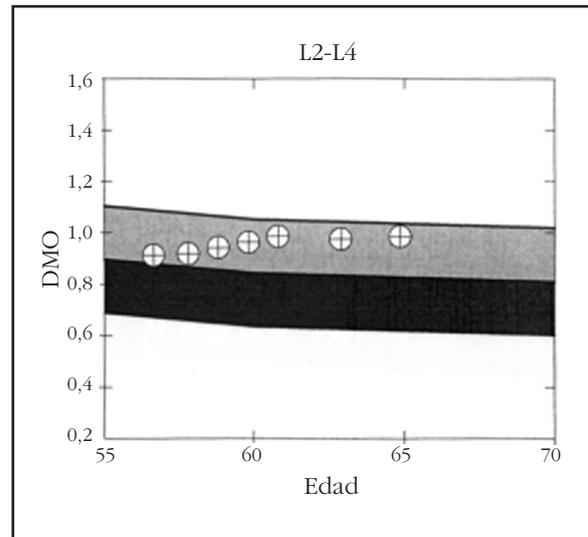
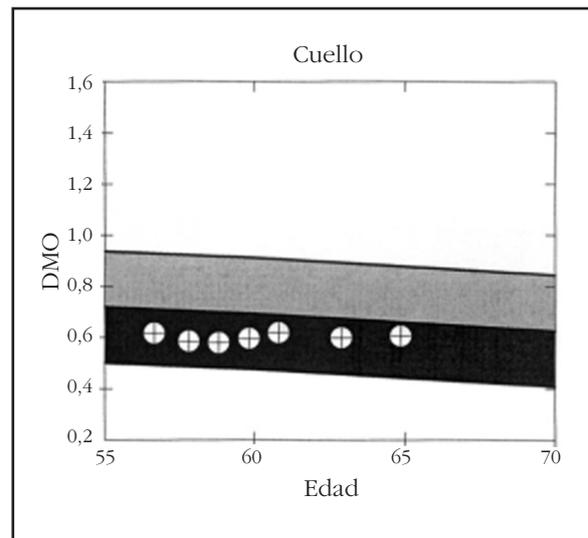


Figura 3. Evolución de la densidad mineral ósea en el cuello femoral



ra por medio de DXA dado que presentaba una fractura vertebral. Sin embargo, la paciente presenta solamente una fractura vertebral. Ismail et al., describieron en 2001 que las fracturas vertebrales eran un factor predictor de fracturas vertebrales subsecuentes, así como de fracturas de cadera y de fracturas no vertebrales. No obstante, el aumento de riesgo era importante a partir de 2 ó más fracturas vertebrales<sup>21</sup>.

Asimismo, en la Historia Clínica no consta si esta fractura tuvo alguna relación con algún trauma y el grado de fractura que presenta. Está descrito que el número y la severidad de la fractura(s) aumenta el riesgo de fractura<sup>22</sup>, independientemente de la DMO de la paciente. Aún así, la BMD que mayor predice el riesgo de fractura es la DMO del cuello del fémur.

Volviendo al caso clínico, la paciente durante los 10 años de seguimientos y densitometrías periódicas, nunca ha tenido una DMO del cuello del fémur compatible con osteoporosis, siendo la T-score más baja del cuello del fémur de -2,1 al inicio de su trayectoria por esta patología.

Como también se menciona anteriormente, uno de los factores de riesgo más importantes para las fracturas es la edad. Al inicio del tratamiento, cuando la paciente tenía 53 años, el riesgo de fractura era demasiado bajo y aunque la DMO de la columna lumbar fuera baja, no existía un riesgo demasiado alto de fractura, tanto vertebral como de cadera.

Los bifosfonatos son antirresortivos que tienen una gran afinidad por el tejido óseo. Los pacientes que reciben un bifosfonato por largos períodos de tiempo, mantendrán el bifosfonato unido al hueso durante mucho tiempo. Esto ha hecho que, en los últimos años, hayan aparecido efectos adversos que se observan usualmente después de un tiempo de tratamiento. Estos efectos adversos son la fractura atípica de la cadera y la osteonecrosis de la mandíbula asociada a bifosfonatos (ONM). Este último efecto adverso, fue descrito por primera vez por Marx en 2003<sup>23</sup> y, hasta ahora, aunque se sabe que existe una relación entre el uso prolongado de bifosfonatos y la patología, no está clara la fuerza de esta relación. Se sabe que existen varios factores de riesgo que aumentan la probabilidad de padecer una ONM como la duración del tratamiento, factores genéticos y factores demográficos como la edad, entre otros<sup>24</sup>.

La paciente del caso clínico es una paciente mayor de 60 años de edad que ha estado recibiendo bifosfonatos orales durante 10 años, lo cual aumenta el riesgo de aparición de una ONM. Por el contrario, el largo período de tratamiento de la paciente con bifosfonatos también ofrece algunas ventajas, como que los bifosfonatos seguirán liberándose del hueso por un largo período de tiempo, disminuyendo el riesgo de fractura a pesar de que la paciente no continúe con el tratamiento. A esta estrategia se le conoce como vacaciones terapéuticas<sup>25</sup>.

El estudio controlado con placebo más largo que existe fue con risedronato, y sus resultados de efectividad y seguridad son a 5 años de tratamiento. Este ensayo valoraba la disminución del riesgo de fractura y demostró un efecto adicional durante los últimos años de tratamiento. Durante los siguientes uno o dos años, los marcadores de remodelado óseo cambiaron poco. Aunque no existe un ensayo clínico que demuestre que el riesgo de fractura se mantiene bajo durante este período de tiempo de "vacaciones terapéuticas", sí se puede asumir que, si los marcadores de remodelado óseo no cambian, la paciente con un bajo riesgo de fractura podría estar protegida durante este tiempo y no necesitaría continuar tomando el bifosfonato<sup>26</sup>. Igualmente, Black et al., demostraron que continuar con el tratamiento de ácido zoledrónico de 6 a 9 años, no aporta ningún beneficio en lo que respecta a la disminución del riesgo de fractura<sup>4</sup>.

Finalmente, la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM) ha publicado un documento en el cual recomienda que después de 5 años de tratamiento con bifosfonatos orales, todos los pacientes sean evaluados con el fin de valorar el riesgo de fractura de ese paciente en particular, y así decidir si continuar con el bifosfonato (en caso de que el riesgo sea elevado) o suspender el tratamiento. Además, recomiendan que en aquellos pacientes con una T-score por encima de -2,5 en el cuello del fémur se considere suspender el tratamiento temporalmente (vacaciones terapéuticas)<sup>27</sup>.

De esta manera, en el caso de esta paciente, los únicos factores de riesgo de fractura que persisten son la edad y el antecedente de fractura vertebral. Durante los 10 años de tratamiento la DMO de la paciente ha evolucionado satisfactoriamente, siendo actualmente límite en la columna vertebral (T-score: -2,5) y de osteopenia (T-score: -1,5) en el cuello femoral. Estos datos sugieren que la paciente no debería continuar con el tratamiento con bifosfonatos orales y debería realizar unas vacaciones terapéuticas. Posteriormente, se le debería valorar el riesgo de fractura anualmente, investigando específicamente la DMO, los cambios de los marcadores de remodelado óseo y prestando principal atención a la progresión de la fractura vertebral preexistente o la producción de nuevas fracturas vertebrales, en cuyo caso debería volver a valorarse iniciar un tratamiento, ya sea antirresortivo u osteoformador.

## Bibliografía

1. National Osteoporosis Foundation (NOF). Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. Washington, DC: National Osteoporosis Foundation, 2014.
2. Sosa M, Gómez-Díaz J. La osteoporosis. Definición. Importancia. Fisiopatología y Clínica. Rev Osteoporosis Metab Miner 2010;2:3-7.
3. Díez-Pérez A, González-Macías J. Inadequate responders to osteoporosis treatment: proposal for an operational definition. Osteoporosis Int 2008;19:1511-6.
4. Black DM, Reid I, Cauley J, Boonen S, Cosman F, Leung P. The effect of 6 versus 9 years of zoledronic acid treatment in osteoporosis: a randomized extension to the HORIZON-Pivotal Fracture Trial (PFT). J Bone Miner Res 2013;28(Suppl1):disponible en: <http://www.asbmr.org/education/AbstractDetail?aid=683518f683518-681743-683494b-b683218-624360a683507d683568>.
5. Sosa-Henríquez M, Gómez de Tejada-Romero MJ, Bagán-Sebastián JV, Díaz-Curiel M, Díez-Pérez A, Jódar-Gimeno E, et al. Osteonecrosis de los maxilares. Documento de consenso. Rev Osteoporosis Metab Miner 2009;1:41-52.
6. Abrahamsen B, Einhorn TA. Beyond a reasonable doubt? Bisphosphonates and atypical femur fractures. Bone 2012;50:1196-200.
7. Sosa Henríquez M, Vicente Barrero M, Bocanegra Pérez S. Osteonecrosis de los maxilares: nuevas evidencias sobre su etiopatogenia. Rev Osteoporosis Metab Miner 2011;3:5-6.
8. Reid IR. Osteonecrosis of the jaw: who gets it, and why? Bone 2009;44:4-10.
9. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society of Bone and Mineral Research. J

- Bone Miner Res 2007;22:1479-91.
10. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2007;356:1809-22.
  11. Chadha GK, Ahmadieh A, Kumar SK, Sedghizadeh PP. Osseointegration of dental implants and osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate therapy: A systematic review. *J Oral Implantol* 2012 Apr 16. [Epub ahead of print].
  12. Meier RP, Perneger TV, Stern R, Rizzoli R, Peter RE. Increasing occurrence of atypical femoral fractures associated with bisphosphonate use. *Arch Intern Med* 2012;172:930-6.
  13. Khaw KS, Yong TY. Atypical femoral fracture in a patient treated with denosumab. *J Bone Miner Metab* 2014 Jul 5. [Epub ahead of print].
  14. Shane E, Burr D, Ebeling PR, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD, et al. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 2010;25:2267-94.
  15. Black DM, Kelly MP, Genant HK, Palermo L, Eastell R, Bucci-Rechtweg C, et al. Bisphosphonates and fractures of subtrochanteric or diaphyseal femur. *N Engl J Med* 2010;362:1761-71.
  16. Dell RM, Adams AL, Greene DF, Funahashi TT, Silverman SL, Eisemon EO, et al. Incidence of atypical nontraumatic diaphyseal fractures of the femur. *J Bone Miner Res* 2012;27:2544-50.
  17. Caeiro-Rey JR, Etxebarria-Foronda I, Mesa-Ramos M. Fracturas atípicas relacionadas con el uso prolongado de bifosfonatos. Estado de la situación. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol* 2011;55:392-404.
  18. Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC, et al. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Lancet* 1996;348:1535-41.
  19. Black DM, Schwartz AV, Ensrud KE, Cauley JA, Levis S, Quandt SA, et al. Effects of continuing or stopping alendronate after 5 years of treatment: the Fracture Intervention Trial Long-term Extension (FLEX): a randomized trial. *JAMA* 2006;296:2927-38.
  20. National Clinical Guideline Centre (UK). Osteoporosis: Fragility Fracture Risk: Osteoporosis: Assessing the Risk of Fragility Fracture. London: Royal College of Physicians (UK); 2012 Aug.
  21. Ismail AA, Cockerill W, Cooper C, Finn JD, Abendroth K, Parisi G, et al. Prevalent vertebral deformity predicts incident hip though not distal forearm fracture: results from the European Prospective Osteoporosis Study. *Osteoporos Int* 2001;12:85-90.
  22. Löfman O, Hallberg I, Berglund K, Wahlström O, Kartous L, Rosenqvist AM, et al. Women with low-energy fracture should be investigated for osteoporosis. *Acta Orthop* 2007;78:813-21.
  23. Popovic KS, Kocar M. Imaging findings in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Radiol Oncol* 2010;44:215-9.
  24. Kumar V, Shahi AK. Nitrogen containing bisphosphonates associated osteonecrosis of the jaws: A review for past 10 year literature. *Dent Res J (Isfahan)* 2014r;11:147-53.
  25. Compston JE, Bilezikian JP. Bisphosphonate therapy for osteoporosis: The long and short of it. *J Bone Miner Res* 2012;27:240-2.
  26. Miller PD. Efficacy and safety of long-term bisphosphonates in postmenopausal osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 2003;4:2253-8.
  27. González Macías J, Del Pino Montes J, Jódar Gimeno E, Díez Pérez A. Recomendaciones sobre la duración del tratamiento de la osteoporosis con bisfosfonatos. SEIOMM. Madrid, 2013. Disponible en: [www.seiommm.org](http://www.seiommm.org).

## Normas de publicación: Información para los autores

### 1) INFORMACIÓN GENERAL. POLÍTICA EDITORIAL

La Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral (Rev Osteoporos Metab Miner; [www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.es](http://www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.es)) es el órgano oficial de expresión científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM). Su periodicidad es trimestral (4 números al año: invierno, primavera, verano y otoño), con un número variable de monografías extraordinarias. El tercer número del año, verano, está destinado a la publicación de las comunicaciones del Congreso anual de la SEIOMM.

La Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral publica trabajos en español, que serán traducidos al inglés en su formato electrónico, y se ofrece libre y gratuitamente por medio de su página Web. El acceso es completo a todos los artículos, en ambos idiomas, sin período de carencia o embargo y sin necesidad de registro. La versión en papel se publica exclusivamente en español, y se distribuye por correo a los socios de la SEIOMM y a los suscriptores de la revista.

Los manuscritos serán considerados por el Comité de Dirección de la Revista. Todos los originales serán evaluados por al menos dos revisores, expertos en esta materia, que realizarán su valoración de forma ciega.

El Comité de Expertos lo constituye un grupo de colaboradores especializados en diferentes campos del metabolismo mineral óseo y que realizan la valoración de los manuscritos a solicitud del Comité de Dirección de la Revista. En la página Web de la Revista y en todos los números de la Revista se publica la relación de colaboradores que forman el Comité de Expertos. Asimismo, en el primer número de cada año se publican los nombres de los revisores que han colaborado activamente con la Revista en el año finalizado.

Los autores, si lo desean, podrán proponer al menos 3 posibles revisores externos, de quienes, además del nombre y apellidos, se deberá incluir su correo electrónico y las razones por la que consideran que pueden evaluar objetivamente el artículo. También podrán indicar aquellos revisores que no desean que evalúen el manuscrito, debiendo justificar también este dato, si bien su manejo será absolutamente confidencial por parte del equipo directivo de la Revista. Los juicios y opiniones expresados en los artículos publicados en la Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral son del autor o autores, y no necesariamente del Comité de Dirección. Tanto el Comité de Dirección como la SEIOMM declinan cualquier responsabilidad al respecto. Ni el Comité de Dirección ni la SEIOMM garantizan o apoyan ningún producto que se anuncie en la Revista, ni garantizan las afirmaciones realizadas por el fabricante sobre dicho producto o servicio.

### 2) ELABORACIÓN Y ENVÍO DE LOS MANUSCRITOS

Los manuscritos deben elaborarse siguiendo las recomendaciones del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas, disponibles en: <http://www.icmje.org>, y enviarse por correo electrónico a la dirección [revistadeosteoporosisymetabolismomineral@iba.nezypalaza.com](mailto:revistadeosteoporosisymetabolismomineral@iba.nezypalaza.com).

La Editorial de la Revista dará acuse de recibo inmediatamente, también por correo electrónico, y la Redacción iniciará el proceso de revisión, que habitualmente se completa en menos de 3 meses.

#### 2.1. Carta de presentación

Todos los manuscritos deben ir acompañados necesariamente de una carta de presentación que indique: 1) la sección de la revista en la que se desea publicar; 2) una breve explicación de cuál es la aportación original y la relevancia del trabajo en el campo de la patología metabólica ósea; 3) la declaración de que el manuscrito es original y no se ha remitido simultáneamente para evaluación a ninguna otra revista; y 4) que se han observado las presentes "instrucciones para los autores".

#### 2.2. Manuscritos

El texto completo del manuscrito, desde la página del título hasta las referencias, debe incluirse en un archivo escrito en Word, con letra tipo Arial de tamaño 12, interlineado a 1,5 líneas y justificado a la izquierda. Se numerarán las páginas correlativamente en el margen superior derecha y se deberá dejar un margen de 3 cm en los 4 bordes de la página (que será tamaño A4).

Se deben utilizar únicamente abreviaturas comunes en el campo de la Medicina y evitarse el uso de abreviaturas en el título y en el resumen del trabajo. La primera vez que aparezca una abreviatura deberá estar precedida por el término completo al que se refiere, excepto en el caso de unidades de medidas comunes, que se expresarán en Unidades del Sistema Internacional.

Los trabajos deberán incluir la información requerida a continuación, ordenándose las secciones de la siguiente manera: página del título y autores, página del resumen y palabras clave, texto principal (introducción, material y método, resultados, discusión y bibliografía), tablas y figuras. Si es necesario, se podrán incluir las tablas y figuras en otro archivo adjunto, con sus respectivos títulos y numeración.

#### 2.3. Apartados de los manuscritos

##### 2.3.1. Página del título y autores

Constará de la siguiente información:

- El título, que debe describir adecuadamente el contenido del trabajo. Debe ser breve, claro e informativo. Se debe incluir el nombre completo y el primer apellido de los autores, o los dos apellidos separados o unidos mediante guión, dependiendo de cómo prefieran los autores que aparezcan en las publicaciones.

- El nombre del (los) departamento(s) o servicio(s) y la(s) institución(es) a los que el trabajo debe ser atribuido. No es necesario incluir el cargo académico o profesional de los autores. Constará el reconocimiento de cualquier beca o ayuda económica, así como la declaración de la existencia o no de conflictos de intereses de cada uno de los autores.

Aparte se incluirá el nombre completo, el correo electrónico (si se dispone) y la dirección postal completa del autor al que se dirija la correspondencia, que será el responsable de la corrección de las pruebas.

##### 2.3.2. Resumen y palabras clave

El resumen estructurado deberá aparecer en la segunda página del manuscrito y tendrá un máximo de 250 palabras en el caso de los originales y de 150 en las notas clínicas.

Constará con los siguientes encabezamientos: Objetivos, señalando el propósito fundamental del trabajo; Material y métodos, explicando el diseño del estudio, los criterios de valoración de las pruebas diagnósticas y la dirección temporal (retrospectivo o prospectivo). Se mencionará el procedimiento de selección de los pacientes, los criterios de inclusión y/o exclusión, y el número de los pacientes que comienzan y terminan el estudio. Si es un trabajo experimental, se indicará el número y tipo de animales utilizados; Resultados, donde se hará constar los resultados más relevantes y significativos del estudio, así como su valoración estadística; y Conclusiones, donde se mencionarán las que sustentan directamente en los datos, junto con su aplicabilidad clínica. Habrá que otorgar el mismo énfasis a los hallazgos positivos y a los negativos con similar interés científico.

A continuación del resumen se incluirán las palabras clave, de 3 a 10 en total, con el objetivo de complementar la información contenida en el título y ayudar a identificar el trabajo en las bases de datos bibliográficas. Para las palabras clave se deben emplear términos equivalentes a los obtenidos de la lista de descriptores en Ciencias de la Salud (Medical Subjects Headings, MeSH) del Index Medicus (disponibles en: [www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html](http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html)).

Importante: No es necesario enviar el resumen ni las palabras clave en inglés. Esto será realizado por el traductor de la Revista.

##### 2.3.3. Introducción

Deben mencionarse claramente los objetivos del trabajo y resumir el fundamento del mismo, sin revisar extensamente el tema y eliminando recuerdos históricos. Citar sólo aquellas referencias estrictamente necesarias.

##### 2.3.4. Material y métodos

En este apartado se ha de especificar el lugar, el tiempo y la población del estudio. Los autores deben incluir información sobre cómo se realizó el diseño, cómo fueron los sujetos seleccionados; sobre todas las técnicas, determinaciones analíticas y otras pruebas o mediciones realizadas. Todo ello con suficiente detalle como para que otros investigadores puedan reproducir el estudio sin dificultades.

Al final de este apartado, se debe indicar cuál ha sido el tipo de análisis estadístico utilizado, precisando el intervalo de confianza. Los estudios contarán con los correspondientes experimentos o grupos control; en caso contrario, se explicarán las medidas utilizadas para evitar los sesgos y se comentará su posible efecto sobre las conclusiones del estudio. Si se trata de una metodología original, se explicarán las razones que han conducido a su empleo y se describirán sus posibles limitaciones.

No deben mostrarse los nombres de los pacientes ni incluir ningún dato que pueda conducir a su identificación. Con respecto a los fármacos, se utilizará el nombre genérico de los fármacos utilizados en el estudio evitando sus nombres comerciales, y detallando al máximo la dosis prescrita, la vía de administración y el tiempo de administración.

Asimismo, se indicarán las normas éticas seguidas por los investigadores, tanto en estudios en seres humanos como en animales. Los estudios en seres humanos deben contar con la aprobación expresa del Comité Local de Ética y de Ensayos Clínicos. Los autores deben mencionar que los procedimientos utilizados en los pacientes y controles han sido realizados tras obtención de un consentimiento informado.

##### 2.3.5. Resultados

Se deben presentar los resultados siguiendo una secuencia lógica y concordante en el texto y en las tablas y figuras. Los datos se pueden mostrar en tablas o figuras, pero no simultáneamente en ambas. En el texto se deben destacar las observaciones importantes, sin repetir todos los datos que se presenten en las tablas o figuras. No se debe mezclar la presentación de los resultados con su discusión.

##### 2.3.6. Discusión

Se trata de una discusión de los resultados obtenidos en este trabajo y no de una revisión del tema en general. Los autores deben destacar los aspectos nuevos e importantes que aporta su trabajo y las conclusiones que se propone a partir de ellos. No se debe repetir detalladamente datos que aparecen en el apartado de resultados. En la discusión, los autores deben incidir en las concordancias o discordancias de sus hallazgos y sus limitaciones, comparándolas con otros estudios relevantes, identificados mediante las referencias bibliográficas respectivas. Al final, se debe relacionar las conclusiones obtenidas con el o los objetivos del estudio, tal y como se recogió en la introducción. Se debe evitar formular conclusiones que no estén respaldadas por los hallazgos, así como apoyar estas conclusiones en otros trabajos aún no terminados. Si es necesario, los autores pueden plantear nuevas hipótesis, pero éstas deben ser claramente identificadas como tales. Cuando sea apropiado, los autores pueden proponer sus recomendaciones.

##### 2.3.7. Bibliografía

Se incluirán únicamente aquellas citas que se consideren importantes y hayan sido leídas por los autores. Todas las referencias deben estar citadas en el texto

de forma consecutiva según el orden de aparición, e identificadas mediante llamada en números arábigos en superíndice. Las referencias que se citan solamente en las tablas o leyendas deben ser numeradas de acuerdo con la secuencia establecida por la primera identificación en el texto de las tablas o figuras.

Al indicar las páginas inicial y final de una cita se deben mostrar en la página final sólo los dígitos que difieran de la página inicial (ejemplos: 23-9, y no 23-29; 247-51, y no 247-251). En todo momento deben seguirse las normas de los "Requerimientos Uniformes para Manuscritos Remitidos a Revistas Biomédicas", que pueden obtenerse en el New England Journal of Medicine (N Engl J Med 1997;336:309-15) y que también están disponibles en <http://www.icmje.org/>.

Las abreviaturas de los títulos de revistas se obtendrán de los formatos empleados por la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos de Norteamérica, en el Index Medicus (disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>).

Pueden consultarse las abreviaturas de las revistas más utilizadas en el siguiente enlace de la Caltech Library: <http://library.caltech.edu/reference/abbreviations>. Deben evitarse las referencias del estilo: "observaciones no publicadas", "comunicación personal" o similares. Los originales aceptados y no publicados en el momento de ser citados pueden incluirse como citas "En prensa".

### 2.3.8. Tablas

Se numerarán con números arábigos de manera correlativa en el mismo orden de aparición en el texto, y se incluirán en el manuscrito, al final del mismo, después de la bibliografía. Se prepararán a espacio y medio, como el resto del manuscrito, y no debe cambiarse el tipo de letra. Se identificarán con la numeración correspondiente y un título breve pero suficientemente explicativo en su parte superior. La leyenda de la tabla debe permitir comprender su contenido, sin que el lector tenga que acudir al texto para su comprensión. Cada columna de la tabla ha de contener un breve encabezado. Se deben incluir las necesarias notas explicativas a pie de tabla y utilizar llamadas en forma de letras minúsculas en superíndice y en orden alfabético (a, b, c).

En las tablas se deben incluir las medidas estadísticas de variación, como la desviación estándar y el error estándar de la media. Solo se emplearán los decimales con significado clínico; por ejemplo, la glucemia de 89,67 deberá expresarse como 89,7.

### 2.3.9. Figuras

Todos los gráficos, fotografías y dibujos se considerarán figuras. Las figuras se identificarán con números arábigos que coincidan con su orden de aparición en el texto. Los pies de las figuras se prepararán a espacio y medio en páginas separadas. Las leyendas y los pies de las figuras deberán contener información suficiente para poder interpretar los datos presentados sin necesidad de recurrir al texto. Para las notas explicativas a pie de figura se utilizarán llamadas en forma de letras minúsculas en superíndice, tal y como se indicó anteriormente en las tablas. En las fotografías de preparaciones histológicas deberá figurar el tipo de tinción y el aumento. La resolución mínima de las imágenes deberá ser de 300 ppp (puntos por pulgada).

## 3) PROCESO DE REVISIÓN DE LOS MANUSCRITOS

### 3.1. Recepción de manuscritos

Una vez que los manuscritos sean recibidos (lo que se confirmará mediante acuse de recibo por la Editorial), se les asignará un número de referencia y serán registrados en la Redacción de la Revista, notificándose al autor responsable de la correspondencia el inicio del proceso de revisión.

### 3.2. Primera evaluación

El manuscrito será inicialmente evaluado por un miembro del Comité Editorial, quien valorará la adecuación del mismo al contenido de la Revista, y realizará una primera evaluación sobre el cumplimiento de las normas de publicación por parte de los autores. En el caso de importante incumplimiento de las mismas, el manuscrito se devolverá a los autores

antes de continuar con el proceso de revisión, solicitándoles que subsanen los errores detectados.

### 3.3. Revisión por pares

En el caso de que el manuscrito sea adecuado para revisión, o una vez subsanados los errores indicados en el punto anterior, el Comité Editorial solicitará la revisión del manuscrito a dos revisores externos, anónimos, y especialistas reconocidos en la materia sobre la que versa el trabajo. Los manuscritos serán remitidos a los revisores sin incluir los datos de los autores. Por lo tanto, la revisión se hará a doble ciego: ni los dos revisores externos conocerán la identidad de los autores ni éstos conocerán qué revisores han evaluado el manuscrito. La Revista garantizará el cumplimiento estricto del doble anonimato en este proceso.

### 3.4. Duración del proceso de revisión

La duración del proceso de revisión dependerá del tiempo que tarden los revisores en enviar sus informes. Se solicitará que sean remitidos en el período máximo de 3 semanas. Una vez recibidos los informes, el Comité Editorial valorará los informes de los revisores y los reenviará a los autores, solicitando que observen las sugerencias y que remitan de nuevo el trabajo, con un informe detallado del cumplimiento de las sugerencias en un folio aparte, en el plazo máximo de 15 días.

Una vez recibido el manuscrito con las correcciones efectuadas, se remitirá a los revisores de nuevo para que informen del cumplimiento o no de las sugerencias. Este último paso se solicitará que se realice en el plazo de 72 horas.

### 3.5. Avance on line

Con el VºBº de los revisores, el manuscrito pasará por una corrección de estilo por parte de la Redacción para proceder a la maquetación por parte de la Editorial, galerada que se enviará al autor de correspondencia para su VºBº final, previo a su publicación como "avance on line" en la web de la Revista. El plazo a los autores para esta última revisión se limitará a 48 horas.

De los manuscritos publicados como "avance on line" el Comité Editorial decidirá cuáles y en qué momento se publicarán en los distintos números de la Revista, según las necesidades. La Revista se encarga de la traducción al inglés de todos los manuscritos.

Por lo general, el proceso de revisión y publicación se completará en 3 meses, dependiendo, obviamente, del cumplimiento de los plazos marcados por parte tanto de los revisores como de los autores.

## 4) NORMAS ESPECÍFICAS DE CADA SECCIÓN

### 4.1. Originales

Se considerarán originales aquellos trabajos clínicos o experimentales de cualquier tipo relacionados con el metabolismo mineral óseo.

Deberán estructurarse en Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Bibliografía. Tendrán una extensión máxima de 16 páginas, y se admitirán hasta 5 tablas o figuras. No deberán sobrepasar las 40 citas bibliográficas. Incluirán un resumen estructurado de 250 palabras como máximo. Dicho resumen será organizado en los siguientes apartados: Fundamentos, Objetivos, Material y Método, Resultados y Conclusiones.

### 4.2. Notas clínicas

Descripción de uno o más casos clínicos de excepcional observación que supongan una aportación importante al conocimiento del metabolismo mineral óseo. Deberán acompañarse de un resumen y una introducción breves (máximo, 150 palabras cada uno) y previos a la descripción del caso. La extensión máxima del texto ser de 5 páginas (1.750 palabras, 10.650 caracteres con espacios). Se admitirán hasta dos figuras y dos tablas. Es aconsejable que el número de firmantes no sea superior a seis y que no se incluya más de 20 referencias bibliográficas.

### 4.3. Originales breves

Se considerarán originales breves a aquellos trabajos clínicos o experimentales que por sus características especiales (número reducido de observaciones, trabajos de investigación con objetivo y resultados muy concretos, estudios epidemiológicos descriptivos,

entre otros) no puedan ser publicados como originales propiamente dicho, pero sí en forma más abreviada. Estos trabajos deberán tener una extensión máxima de 5 páginas de texto, no debiendo sobrepasar las 10 referencias bibliográficas y sin aportar más de 3 ilustraciones (figuras, tablas o imágenes). El número máximo de firmantes no debe ser superior a seis. Su estructura será como la de los artículos originales, permitiéndose para el resumen un máximo de 150 palabras.

### 4.4. Imágenes de Osteología

En este apartado se admitirán imágenes (radiológicas, anatomopatológicas, clínicas, etc.), hasta un número máximo de 4, relacionadas con el campo de la Osteología, las cuales deben ser acompañadas de un texto explicativo cuya extensión máxima será de 2 páginas

### 4.5. Cartas al Editor

En esta sección se publicarán aquellas cartas que hagan referencia a trabajos publicados en la revista anteriormente y aquellas que aporten opiniones, observaciones o experiencias que por sus características puedan ser resumidas en un breve texto. La extensión máxima será de 60 líneas y se admitirán una figura o una tabla y diez referencias bibliográficas como máximo. El número de firmantes no debe exceder de cuatro.

### 4.6. Otras secciones

La Revista incluye otras secciones (Editoriales, Revisiones y Documentos o Artículos Especiales), las cuales serán encargadas por el Comité de Redacción. Los autores que espontáneamente deseen colaborar en alguna de estas secciones deberán consultar previamente al Director de la Revista.

#### 4.6.1. Revisiones

Se presentarán con una extensión de 12 páginas (4.200 palabras, 25.560 caracteres con espacios) y un máximo de 60 citas. Se admitirán un máximo de 4 figuras y 5 tablas que deberán contribuir de manera evidente a la mejor comprensión del texto. Las revisiones se acompañarán de un resumen en español y tendrán un último apartado de conclusiones de aproximadamente un folio de extensión.

#### 4.6.2. Editoriales

Tendrán una extensión máxima de 4 páginas (2.100 palabras, 12.780 caracteres con espacios), sin tablas ni figuras, y un máximo de 30 citas bibliográficas.

#### 4.6.3. Documentos especiales

Se incluirá en este apartado todos aquellos documentos y artículos que pudieran realizar alguna aportación científica al campo del metabolismo mineral óseo y que posea unas características que no permitan su inclusión en alguno de los apartados anteriores de la revista. El Comité Editorial decidirá la manera de publicar estos documentos, y se reserva el derecho de modificarlos para adecuarlos al formato de la Revista.

## 5) TRANSMISIÓN DE LOS DERECHOS DE AUTOR

### 5.1. Garantías del autor y responsabilidad

Al enviar el trabajo por correo electrónico, el autor garantiza que todo el material que remite a la Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral para su publicación es original, y que el mismo no ha sido publicado con anterioridad ni remitido simultáneamente a ninguna otra Revista para su publicación. Asimismo, el autor garantiza que el trabajo que remite cumple la Ley de Protección de Datos y que ha obtenido el consentimiento previo y escrito de los pacientes o sus familiares para su publicación.

### 5.2. Cesión de derechos de explotación

El autor cede en exclusiva a la SEIOMM, con facultad de cesión a terceros, todos los derechos de explotación que deriven de los manuscritos que sean seleccionados para su publicación en la Revista, y en particular los de reproducción, distribución y comunicación pública en todas sus formas.

El autor no podrá publicar ni difundir los trabajos que sean seleccionados para su publicación en Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral ni total ni parcialmente, ni tampoco autorizar su publicación a terceros, sin la preceptiva previa autorización expresa, otorgada por escrito, de la SEIOMM.