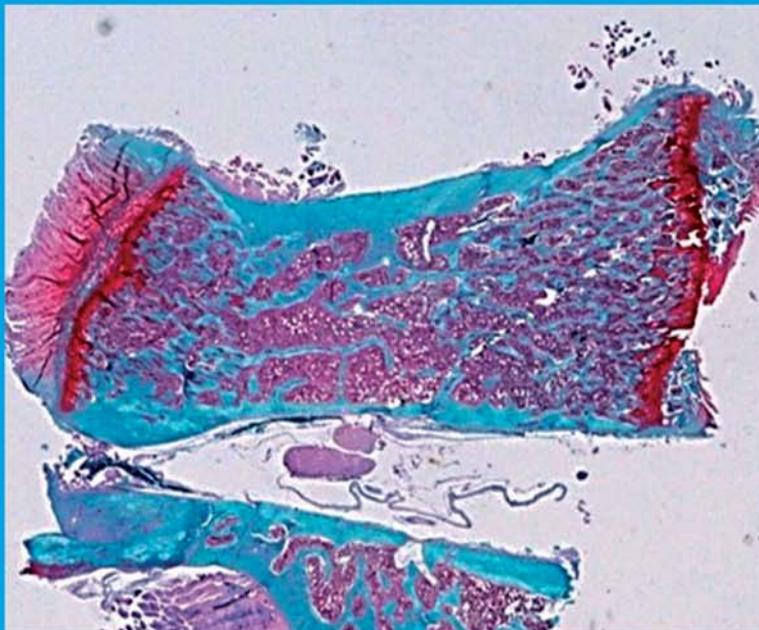
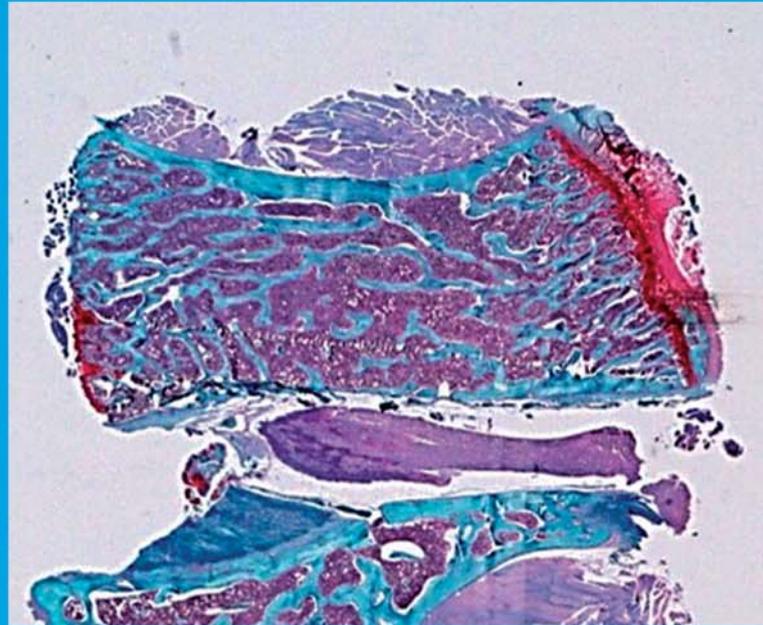
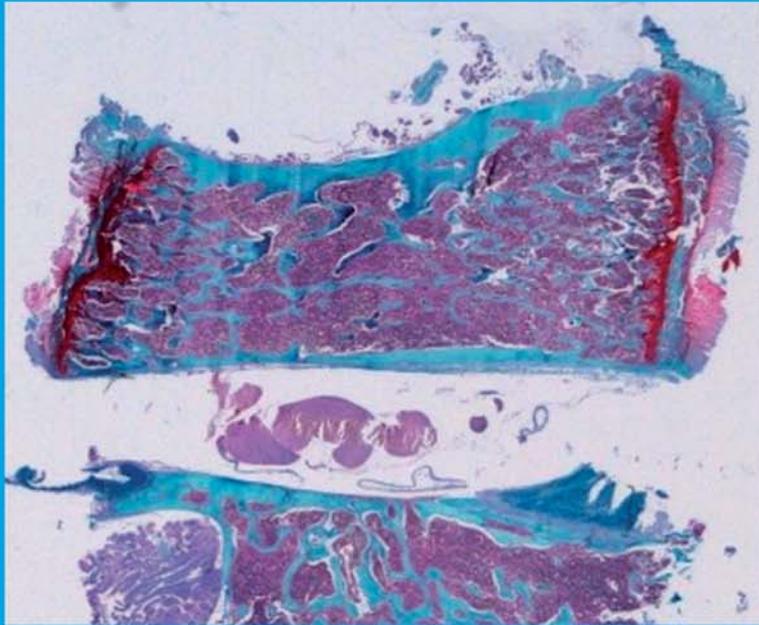


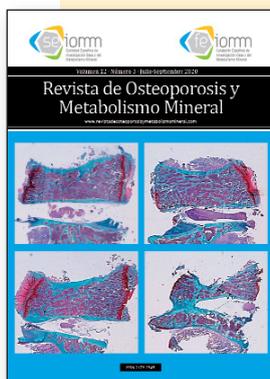
# Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

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



Director  
**Manuel Sosa Henríquez**

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



**Nuestra portada:** Tinción con safranina 4x. Componentes trabeculares de la vértebra L4 en ratas SHAM orquidectomizadas, tratadas con OPG-Fc y orquidectomizadas tratadas con testosterona.

**Autora:** Concepción de la Piedra Gordo. Departamento de Bioquímica Investigación. Instituto de Investigaciones Médicas. Fundación Jiménez Díaz. Madrid (España).



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

Presidente  
**Manuel Naves Díaz**

Vicepresidenta  
**Pilar Peris Bernal**

Secretaria  
**Minerva Rodríguez García**

Tesorero  
**José Luis Pérez Castrillón**

Vocales  
**Luis del Río Barquero**  
**José Antonio Riancho Moral**

Presidente Electo  
**Guillermo Martínez Díaz-Guerra**

Velázquez, 94 (1<sup>a</sup> planta)  
28006 Madrid

Tel: +34-648 949 755

seiommm@seiommm.org

www.seiommm.org

Edición



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

Maquetación  
**Concha García García**

Traducción inglés  
**David Shea**

ISSN: 2173-2345

Envío de originales:  
romm@ibanezyplaza.com

## Sumario

Vol. 12 - Nº 3 - Julio-Septiembre 2020

### EDITORIAL

**La importancia de identificar factores intrínsecos modificables de riesgo de caídas para implementar precozmente medidas preventivas**

*Formiga F, Tarazona-Santabalbina FJ* ..... 79

### ORIGINALES

**Efecto de la fragilidad y la sarcopenia sobre el riesgo de caídas y de fracturas osteoporóticas en población no seleccionada**

*Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Rodríguez-Rebollar A, Palomo-Antequera C, Martín-Vírgala J, Martín-Carro B, Fernández-Villabrille S, Rodríguez-Carrio J, Cannata-Andía JB, Naves-Díaz M* ..... 81

**Persistencia a los inhibidores de la aromatasa en la cohorte SIDIAP: mortalidad e influencia de los bifosfonatos**

*Pineda-Moncusí M, Vilalta-Carrera A, Ovejero D, Aymar I, Servitja S, Tusquets I, Prieto-Alhambra D, Díez-Pérez A, García-Giralt N, Nogués X* ..... 87

**Estudio de biocompatibilidad y osteointegración de nuevos materiales protésicos**

*Giner M, Santana L, Costa AF, Vázquez-Gámez MA, Colmenero M, Olmo FJ, Chicardi E, Torres Y, Montoya-García MJ* ..... 92

**Estudio de la expresión de factores óseos en el hueso murino ante la falta de pleiotrofina y sus cambios en la situación inflamatoria**

*Portal-Núñez S, Messa L, Sevillano J, Herradón G, Ramos MP, Gortazar AR* ..... 98

### IMAGENES EN OSTEOLOGÍA

**Displasia fibrosa simulando metástasis costal**

*García-Gómez FJ, de la Riva-Pérez PA, Calvo-Morón MC* ..... 105

### REVISIÓN

**Aceite de oliva y salud ósea**

*Rubert M, Torrubia B, Díaz-Curiel M, de la Piedra C* ..... 107

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

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

## Comité Editorial

**Dra. Teresita Bellido**

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

**Dr. Ernesto Canalis**

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

**Dra. Patricia Clark Peralta**

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

**Dr. Oswaldo Daniel Messina**

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

**Dra. Lilian I Plotkin**

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

**Dr. Manuel Naves Díaz**

Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). REDinREN del ISCIII. Universidad de Oviedo. Oviedo (España)  
Correo electrónico: mnaves.huca@gmail.com

**Dr. Manuel Díaz Curiel**

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

**Dr. Adolfo Díez Pérez**

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

**Dr. José Antonio Riancho Moral**

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

**Metodología, estudio de datos y estadística: Pedro Saavedra Santana**

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

**Dr. Manuel Sosa Henríquez (Director)**

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

**Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero (Redactora)**

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

# La importancia de identificar factores intrínsecos modificables de riesgo de caídas para implementar precozmente medidas preventivas

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000300001>

## Formiga F<sup>1</sup>, Tarazona-Santabalbina FJ<sup>2</sup>

*1 Servicio Medicina Interna. Hospital de Bellvitge. Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL). Universidad de Barcelona. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona (España)*

*2 Centro de Investigación Biomédica en Red Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES). Servicio de Geriátrica. Hospital Universitario de la Ribera. Alzira. Valencia (España)*

Las caídas en las personas mayores representan uno de los principales problemas de salud pública, tanto por su prevalencia como por sus consecuencias, siendo una de las más graves la fractura de fémur. La prevalencia anual de caídas en población mayor de 65 años oscila entre el 28 y el 35%, y frecuentemente estas caídas son de repetición<sup>1</sup>. Los factores responsables de una caída se dividen en intrínsecos (relacionados con el propio paciente) y extrínsecos (derivados de la actividad o del entorno), siendo la etiología en la mayoría de ocasiones multifactorial<sup>1</sup>. Al valorar los factores intrínsecos de una caída, debemos tener en cuenta las alteraciones fisiológicas relacionadas con la edad (entre ellas la presencia de alteraciones nutricionales, sarcopenia y fragilidad), las enfermedades agudas y crónicas presentes y la prescripción de determinados fármacos<sup>1</sup>. Por ello, ante una caída, es imprescindible el abordaje integral del adulto mediante una valoración geriátrica global que incluya la completa evaluación de la marcha y el equilibrio.

Previamente hemos nombrado el término fragilidad, el cual erróneamente se equipara como sinónimo de discapacidad y de comorbilidad. Sin embargo, la fragilidad es una situación potencialmente reversible en la que se presenta una disminución progresiva de la capacidad de reserva fisiológica y de la capacidad de adaptación de la homeostasis del organismo (homeostenosis) que se produce especialmente con el envejecimiento no fisiológico. La fragilidad, como entidad clínica, está influenciada por factores genéticos (individuales) y es acelerada por enfermedades agudas y crónicas, hábitos tóxicos, desuso y condicionantes sociales y asistenciales. Actualmente existen dos líneas fundamentales de abordaje de la fragilidad: una funcional y restrictiva, propuesta desde el fenotipo de Linda Fried, según la cual la fragilidad sería un estado previo a la discapacidad pero diferente de ella que se valora mediante cinco componentes (pérdida de peso, cansancio, debilidad, enlentecimiento psicomotriz e hipoactividad); y otra con una concepción más amplia pero menos definida en cuanto a una diferenciación menos nítida de fragilidad y discapacidad, y en la que la fragilidad sería la consecuencia de un acúmulo de déficits (índices acumulativos de fragilidad de Rockwood). Entre estas dos posturas, existe una importante multitud de opciones intermedias<sup>2</sup>.

Asimismo, es posible encontrar una interacción, y solapamiento, entre la presencia de fragilidad y de sarcopenia. Con la edad, a partir de los treinta años, se produce una pérdida progresiva de la masa y la fuerza del músculo esquelético<sup>3</sup>. Para avanzar en su conocimiento, en el año 2010 el Grupo Europeo de Trabajo sobre la Sarcopenia en Personas de Edad Avanzada publicó un documento en el que se exponía una definición clínica práctica y unos criterios diagnósticos de consenso de la sarcopenia relacionada con la edad. Así el diagnóstico de sarcopenia se basa en la confirmación de una masa muscular baja (criterio 1) más uno de los siguientes: baja fuerza muscular (criterio 2) o bajo rendimiento físico (criterio 3). Este grupo ha realizado una actualización de su consenso en la que se otorga una mayor atención a la fuerza muscular como dato clave en sarcopenia (relegando la medición de la masa muscular a un punto de investigación más que de uso en práctica clínica), modifica el algoritmo diagnóstico y establecen claros puntos de corte para el diagnóstico. Además, se recomienda el uso del cuestionario SARC-F como herramienta de cribado<sup>3</sup>. Actualmente se está realizando la importancia de la osteosarcopenia como fenotipo fruto de la combinación de sarcopenia y baja densidad mineral ósea, y que se asociaría un mayor riesgo de caídas y fracturas<sup>4</sup>.

Por todo ello siempre son bienvenidos estudios como el de Rodríguez-García y cols.<sup>5</sup> que evalúen factores de riesgo, como la fragilidad y sarcopenia sobre el riesgo de caídas y de fracturas osteoporóticas en el mundo real. Los autores evalúan aleatoriamente 624 habitantes (308 hombres y 316 mujeres) mayores de 50 años (edad media de 65 años, con un largo periodo de seguimiento de 8 años –alto porcentaje de seguimiento al final del estudio–) y calculan la incidencia de caídas y fracturas osteoporóticas no vertebrales. En la evaluación basal se midió la fuerza de agarre en manos y se cumplimentó un cuestionario con variables clínicas, factores de riesgo relacionados con la osteoporosis y cuestiones relativas a la dificultad o incapacidad para realizar actividades cotidianas. Se reportaron caídas en el 44,9% de las mujeres y el 23,5% de los hombres y fracturas no vertebrales en el 13,2% de las mujeres y el 2% de los hombres. La inci-



dencia de caídas aumentó con la edad y fueron más comunes en las mujeres<sup>1</sup>. La fuerza de agarre en manos no se asoció con la incidencia de caídas ni de fracturas. Sin embargo, la imposibilidad o dificultad de: “estar sentado más de 1 hora en silla dura”, “quitarse los calcetines o las medias” o de “inclinarse desde una silla para coger un objeto del suelo” se asociaron con la presencia de caídas. Además, la imposibilidad o dificultad de “llevar durante 10 metros un objeto de 10 kilos” y “levantar una caja con 6 botellas y ponerlas sobre una mesa” se asoció con fractura. Los autores concluyen que existe asociación entre la dificultad o incapacidad para realizar las actividades cotidianas y la presencia de fracturas y entre las actividades relacionadas con la capacidad funcional y la presencia de caídas.

El estudio tiene fortaleza (largo seguimiento, pocas pérdidas) y alguna debilidad que los autores reconocen (especialmente el curso dinámico tanto de la fragilidad como de la sarcopenia en el tiempo) y otras que comentaremos, probablemente derivadas de que el protocolo inicial del estudio no se diseñó específicamente para responder a la pregunta del título del artículo, sino para conocer la prevalencia de fractura vertebral a nivel europeo. Así, probablemente, habría sido más recomendable utilizar herramientas para diagnosticar la presencia o no de fragilidad o sarcopenia más consensuadas. El artículo tampoco define qué se consideró caída ni quién la refería (participante, cuidador, ¿ambos?) ni si existían factores

extrínsecos asociados. También es importante reflexionar, en el momento de analizar los resultados del estudio, sobre la importancia de una mayor edad de los participantes (por ejemplo, 75 años) en los resultados obtenidos: mayor número de caídas, peores resultados de las evaluaciones realizadas y una mayor posibilidad de encontrar asociaciones.

La realidad, positiva, nos informa de que cada vez es mayor el número de personas de edad avanzada que están siendo evaluadas por especialidades diferentes a la Geriátrica. Esto comporta la necesidad de aplicar los principios de la Medicina Geriátrica para avanzar conjuntamente empleando el mismo lenguaje<sup>6</sup>. La asociación entre caídas y fragilidad o sarcopenia es cada vez más reconocida en la literatura<sup>7,8</sup>, pero debemos hablar de las mismas entidades y debemos uniformar las pruebas de evaluación. Es en este caso concreto es todavía más importante, porque ambas situaciones presentan considerables posibilidades de reversión, principalmente a través de programas de ejercicio multicomponente y mediante una intervención nutricional adecuada e individualizada. Por ello, para evitar la incidencia de caídas y de sus consecuencias, es fundamental implementar programas de valoración e intervención multifactorial<sup>9,10</sup>. El mensaje final que no debemos olvidar es que, ante la presencia de una caída, siempre debemos valorar al adulto mayor e intervenir siempre que sea necesario y posible.



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

## Bibliografía

- Formiga F, Navarro M, Duaso E, Chivite D, Ruiz D, Perez-Castejon JM, et al. Factors associated with hip fracture-related falls among patients with a history of recurrent falling. *Bone*. 2008;43:941-4.
- Díez-Villanueva P, Arizá-Solé A, Vidán MT, Bonanad C, Formiga F, Sanchis J, et al. Recommendations of the Geriatric Cardiology Section of the Spanish Society of Cardiology for the assessment of frailty in elderly patients with heart disease. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2019;72:63-71.
- Cruz-Jentoft AJ, Sayer AA. Sarcopenia. *Lancet*. 2019;393(10191):2636-46.
- Cedeno-Veloz B, López-Dóriga Bonnardeaux P, Duque G. Osteosarcopenia: una revisión narrativa. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2019;54:103-8.
- Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Rodríguez-Rebollar A, Palomo-Antequera C, Martín-Vírgala J, Martín-Carro B, et al. Efecto de la fragilidad y la sarcopenia sobre el riesgo de caídas y de fracturas osteoporóticas en población no seleccionada. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2020;12(3): XX-YY.
- González-Montalvo JJ, Ramírez-Martín R, Menéndez Colino R, Alarcón T, Tarazona-Santabalbina FJ, Martínez-Velilla N, et al. Geriátrica transversal. Un reto asistencial para el siglo XXI. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2020;55:84-97.
- Bartosch PS, Kristensson J, McGuigan FE, Akesson KE. Frailty and prediction of recurrent falls over 10 years in a community cohort of 75-year-old women. *Aging Clin Exp Res*. 2020;32:2241-50.
- Su Y, Lam FMH, Leung J, Cheung WH, Ho SC, Kwok T. the predictive value of sarcopenia and falls for 2-year major osteoporotic fractures in community-dwelling older adults. *Calcif Tissue Int*. 2020;107:151-9.
- Ferrer A, Formiga F, Sanz H, de Vries OJ, Badia T, Pujol R; OCTABAIX Study Group. Multifactorial assessment and targeted intervention to reduce falls among the oldest-old: a randomized controlled trial. *Clin Interv Aging*. 2014;9:383-93.
- Pérez-Ros P, Martínez-Arnau F, Tormos Miñana I, López Aracil A, Oltra Sanchis MC, Pechene Mera LE, et al. Resultados preliminares de un programa comunitario de prevención de caídas: estudio Precari (prevención de caídas en La Ribera). *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2014;49:179-83.

# Efecto de la fragilidad y la sarcopenia sobre el riesgo de caídas y de fracturas osteoporóticas en población no seleccionada

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000300002>

Rodríguez-García M<sup>1</sup>, Gómez-Alonso C<sup>2</sup>, Rodríguez-Rebollar A<sup>3</sup>, Palomo-Antequera C<sup>4</sup>, Martín-Vírgala J<sup>2</sup>, Martín-Carro B<sup>2</sup>, Fernández-Villabrille S<sup>2</sup>, Rodríguez-Carrio J<sup>2,5</sup>, Cannata-Andía JB<sup>2</sup>, Naves-Díaz M<sup>2</sup>

1 Area Gestión Clínica de Nefrología

2 Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo

3 Laboratorio de Medicina

4 Unidad de Gestión Clínica de Medicina Interna

5 Investigación Básica y Traslacional en Enfermedades inflamatorias Crónicas

Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Red de Investigación Renal (REDinREN) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Oviedo (España)

Fecha de recepción: 05/08/2020 - Fecha de aceptación: 27/10/2020

## Resumen

**Objetivos:** Valorar si la fuerza de agarre y la dificultad para realizar actividades cotidianas podrían ser predictores de caídas y fracturas osteoporóticas.

**Material y métodos:** Se seleccionaron aleatoriamente 624 hombres y mujeres mayores de 50 años, que fueron seguidos durante 8 años para conocer la incidencia de caídas y fracturas osteoporóticas no vertebrales. Al inicio se midió la fuerza de agarre en manos y se cumplimentó un cuestionario con variables clínicas, factores de riesgo relacionados con la osteoporosis y cuestiones relativas a la dificultad o incapacidad para realizar actividades cotidianas.

**Resultados:** La fuerza de agarre en manos no se asoció con la incidencia de caídas y fracturas. Sin embargo, la imposibilidad o dificultad de “estar sentado más de 1 hora en silla dura”, “quitarse los calcetines o las medias” e “inclinarse desde una silla para coger un objeto del suelo” se asoció con caídas: 1,83 (1,16-2,89); 1,85 (1,14-3,00) y 1,68 (1,04-2,70), respectivamente. Del mismo modo, la imposibilidad o dificultad de “llevar durante 10 metros un objeto de 10 kilos” y “levantar una caja con 6 botellas y ponerlas sobre una mesa” se asoció con fractura: 2,82 (1,21-6,59) y 2,54 (1,12-5,81) respectivamente.

**Conclusiones:** No se encontró asociación entre la fuerza de agarre e incidencia de caídas y fracturas osteoporóticas, pero sí con dificultad o incapacidad para realizar actividades cotidianas. Las relacionadas con mayor fuerza se asociaron con fractura, mientras que las relacionadas con capacidad funcional se asociaron con caídas. Realizar cuestionarios sencillos podría ayudar a predecir eventos antes de que ocurran.

**Palabras clave:** fractura osteoporótica, sarcopenia, fragilidad, caídas, actividades cotidianas.

## INTRODUCCIÓN

La esperanza de vida se ha incrementado rápidamente en el último siglo debido al crecimiento económico que ha llevado aparejada una reducción de la mortalidad, una mejora de la calidad de vida, así como en una mayor disponibilidad de los cuidados de salud. De hecho, hay más personas de edad avanzada que en ninguna otra época de nuestra historia, y se prevé que dentro de los próximos años exista un mayor número de adultos mayores que de niños. Esta previsión hace imprescindible que las personas alcancen esta edad con un buen estado de salud, que evite el incremento del gasto sanitario debido al aumento de es-

tancias hospitalarias, reingresos y demanda de recursos sanitarios. Una de las alteraciones más comunes asociadas al envejecimiento es la osteoporosis, cuya consecuencia más letal es la fractura. Aproximadamente la mitad de las fracturas clínicas que ocurren en mujeres postmenopáusicas no presentan criterio de osteoporosis de acuerdo a su densidad mineral ósea<sup>1</sup>; de hecho, el mayor porcentaje de fracturas ocurren en mujeres osteopénicas. Por tanto, es necesario disponer de otras variables o herramientas que permitan identificar a las personas con alto riesgo de fracturas, condicionante de morbilidad en la población de edad avanzada.



Correspondencia: Manuel Naves Díaz (mnaves.huca@gmail.com)

La fragilidad es un síndrome geriátrico caracterizado por pérdida de peso, cansancio, debilidad, marcha lenta y disminución de la actividad física. Es secundaria a una desregulación endocrina y a un estado proinflamatorio y protrombótico. La sarcopenia, característica de la fragilidad, es una alteración asociada al envejecimiento que produce una pérdida de masa muscular y debilidad muscular, limitando la movilidad de la persona e incrementando el riesgo de caídas, fragilidad y fracturas<sup>2</sup>. Además del proceso natural de envejecimiento, otros factores, como los genéticos, una alimentación inadecuada, la inactividad física, el sedentarismo, el excesivo reposo en cama, las enfermedades crónicas y/o determinados tratamientos farmacológicos, pueden favorecer el desarrollo de sarcopenia contribuyendo a la fragilidad y fracturas, lo que ha llevado a que se hable del término osteosarcopenia<sup>3</sup>.

Una forma rápida de identificar a los sujetos con riesgo de sarcopenia es utilizando herramientas que permiten evaluar la fuerza muscular a través de un sistema de evaluación y puntuación en el que se registran: fuerza, capacidad para caminar, levantarse de una silla, subir escaleras y frecuencia de caídas<sup>4</sup>.

El objetivo de este estudio fue valorar el papel que la fuerza muscular de "agarre en las manos" y determinadas actividades de la vida cotidiana podrían tener como instrumentos para predecir la incidencia de caídas y fracturas osteoporóticas. En la práctica clínica, disponer de herramientas sencillas que permitan conocer el grado de sarcopenia y fragilidad podría ayudar a establecer medidas preventivas antes de que la caída y la fractura se produzcan.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo inicial del estudio se diseñó para conocer la prevalencia de fractura vertebral a nivel europeo (estudio EVOS), en el que desde España participaron inicialmente 4 centros, siendo el nuestro uno de ellos. Para ello, se seleccionaron al azar del registro municipal de Oviedo 624 hombres y mujeres mayores de 50 años. Esta misma cohorte fue incluida en un estudio prospectivo que consistió en la realización de medidas de fuerza muscular de agarre en ambas manos con un dinamómetro, que posee una escala que va desde 0 a 300 mmHg. También se les hizo cumplimentar un cuestionario administrado, diseñado específicamente para el estudio EVOS, que tuvo un buen índice de reproducibilidad<sup>5,6</sup>. Este cuestionario contenía preguntas sobre variables clínicas (peso y altura entre otras, para calcular el índice de masa corporal -IMC-), factores de riesgo relacionados con la osteoporosis y una serie de cuestiones relativas a la dificultad o no para realizar determinadas actividades de la vida cotidiana.

Estas actividades se fundamentaron en un cuestionario que mide la discapacidad funcional ("Funktionsfragebogen Hannover, FFbHR")<sup>7</sup> y que posee varios ítems con tres respuestas posibles: *puede hacerlo sin dificultad, puede hacerlo con alguna dificultad y es incapaz de hacerlo o solo puede hacerlo con ayuda*. Asimismo, a toda la cohorte se le realizaron dos radiografías laterales (el estudio radiográfico no se completó solo en 2 casos) y la recogida de mediciones antropométricas, como altura y peso para determinar el IMC. Todos los sujetos tenían suficiente capacidad ambulatoria para subir dos pisos sin ascensor y el 99% vivía en su propio domicilio.

Tras la medición de fuerza muscular y la administración del cuestionario mencionado, esta cohorte fue seguida de forma prospectiva durante 8 años mediante 4

cuestionarios postales con objeto de investigar la frecuencia de caídas y la incidencia de fractura osteoporótica no vertebral durante dicho periodo. Todas las fracturas osteoporóticas, excluidas las de cráneo y extremidades, fueron confirmadas mediante radiografía o informe médico. El total de personas que participaron en el último seguimiento fue de 427, con un porcentaje de participación al octavo año del 81,3% (excluyendo los fallecimientos), siendo los porcentajes de los 3 seguimientos postales previos del 87,1, 87,5 y 82,4%, respectivamente.

Todos los estudios realizados siguieron los principios enunciados en la declaración de Helsinki y fueron formalmente aprobados por el Comité de Ensayos Clínicos del Principado de Asturias.

## Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando la versión 17.0 de SPSS para Windows. Las variables cuantitativas se analizaron mediante la t de Student. Las variables cualitativas se analizaron mediante la chi cuadrado.

Para analizar, a nivel multivariante, el efecto que posee la dificultad o incapacidad para realizar sin ayuda determinadas actividades de la vida cotidiana sobre la incidencia de caídas y fractura osteoporótica no vertebral, se utilizó una regresión logística ajustada por edad, sexo, IMC, fumador activo, fractura previa y antecedentes familiares de fractura de cadera. Como valor de referencia o comparación se utilizó el no tener dificultades para realizar dichas actividades.

## RESULTADOS

La tabla 1 muestra las características basales de la población a estudio. La edad en ambos sexos fue similar, con un IMC estadísticamente superior en el sexo femenino. La historia de fracturas previas, los antecedentes familiares de fractura de cadera en padres o hermanos, así como la prevalencia de fractura vertebral, fueron ligeramente superiores en las mujeres que en los hombres, pero sin alcanzarse diferencias estadísticamente significativas. El hábito tabáquico fue significativamente mayor en los hombres. La incidencia de fracturas osteoporóticas no vertebrales y la incidencia de caídas fue significativamente más elevada en las mujeres que en los hombres.

La tabla 2 muestra los valores de fuerza muscular en ambas manos en función de la presencia de caídas durante el período de seguimiento. La fuerza de las manos fue inferior en los que sufrieron caídas, siendo este efecto similar en ambas manos. El análisis de regresión logística ajustado por edad, sexo, IMC, fumador activo, fracturas previas y antecedentes familiares de fractura de cadera, no mostró efecto protector de la fuerza muscular (cada 10 mmHg de aumento), ni en la mano derecha: 0,97 (0,90-1,03), ni en la izquierda: 0,99 (0,92-1,05), sobre la incidencia de caídas.

En la tabla 2 pueden verse los porcentajes de personas que muestran incapacidad o dificultad para realizar actividades cotidianas en función de la incidencia de caídas. En relación a los sujetos que no tenían ninguna dificultad, los que tuvieron caídas presentaron una imposibilidad o dificultad de realizar las siguientes actividades: "llevar durante 10 metros un objeto de 10 kilos (p<0,001)"; "inclinarse hacia delante para coger un objeto del suelo (p=0,019)"; "lavarse el pelo en un lavabo (p=0,029)"; "estar sentado más de 1 hora en silla dura (p=0,003)"; "estar de pie en una cola durante 30 minutos (p=0,002)"; "incorporarse de la cama (p=0,020)"; "quitarse los calcetines o las medias (p<0,001)"; "inclinarse desde una silla

para coger un objeto del suelo ( $p < 0,001$ ); y “levantar una caja con 6 botellas y ponerlas sobre una mesa ( $p < 0,001$ )”.

El análisis de regresión logística ajustado por edad, sexo, IMC, hábito tabáquico, fracturas previas y antecedentes familiares de fractura de cadera mostró que la imposibilidad o dificultad de “estar sentado más de 1 hora en silla dura” se asoció significativamente con un aumento en la presencia de caídas: 1,83 (1,16-2,89). La dificultad o imposibilidad de “quitarse los calcetines o las medias”, así como “inclinarse desde una silla para coger un objeto del suelo” se asoció significativamente con un aumento en la presencia de caídas: 1,85 (1,14-3,00) y 1,68 (1,04-2,70), respectivamente. El análisis multivariante por sexos mostró en ambos sexos asociaciones entre la dificultad o imposibilidad de llevar a cabo determinadas actividades diarias con la incidencia de caídas. En concreto, en mujeres se asociaron con la incidencia de caídas “estar sentado más de 1 hora en silla dura: 1,74 (1,01-3,02)”; “estar de pie en una cola durante 30 minutos: 2,45 (1,41-4,25)”; y “quitarse las medias: 2,04 (1,18-3,55)”. Por el contrario, en hombres solo se encontró asociación con “inclinarse desde la silla para coger algo del suelo: 2,57 (1,27-5,21)”.

La tabla 3 muestra los valores de fuerza muscular en ambas manos en función de la presencia de fracturas osteoporóticas incidentes no vertebrales. La fuerza de las manos fue inferior en los que posteriormente se fracturaron, siendo este efecto más acusado en la fuerza de la mano derecha. El análisis de regresión logística ajustado por edad, sexo, IMC, fumador activo, fracturas previas y antecedentes familiares de fractura de cadera mostraron una ligera tendencia a un efecto protector de la fuerza muscular (cada 10 mmHg de aumento) sobre la incidencia de fractura osteoporótica no vertebral, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas ni en la mano derecha: 0,95 (0,86-1,03) ni en la izquierda: 0,97 (0,88-1,06).

En la tabla 3, también pueden verse los porcentajes de personas que tuvieron incapacidad o dificultad para realizar actividades cotidianas en función de la presencia de fracturas osteoporóticas incidentes no vertebrales. En relación a los sujetos que no tenían ninguna dificultad, aquellos individuos con fractura incidente presentaron una imposibilidad o dificultad de realizar las siguientes actividades: “coger un objeto de una estantería alta ( $p = 0,004$ )”; “llevar durante 10 metros un objeto de 10 kilos ( $p < 0,001$ )”; “estar sentado más de 1 hora en silla dura ( $p = 0,027$ )”; “estar de pie en una cola durante 30 minutos ( $p = 0,016$ )”; “incorporarse de la cama ( $p = 0,029$ )”; y “levantar una caja con 6 botellas y ponerlas sobre una mesa ( $p < 0,001$ )”.

Todas estas asociaciones univariantes se analizaron mediante un análisis multivariante. El análisis de regresión logística ajustado por edad, sexo, IMC, fumador activo, fracturas previas y antecedentes familiares de fractura de cadera mostró que la imposibilidad o dificultad de “llevar durante 10 metros un objeto de 10 kilos” se asoció significativamente con un aumento en la presencia de fractura osteoporótica incidente no vertebral: 2,82 (1,21-6,59). De forma similar, la incapacidad o dificultad para “levantar una caja con 6 botellas y ponerlas sobre una mesa” se asoció significativamente con un aumento en la presencia de fractura osteoporótica incidente no vertebral: 2,54 (1,12-5,81). El análisis multivariante separadamente por sexos solo mostró asociaciones entre la dificultad o imposibilidad de llevar a cabo las actividades diarias con la incidencia de fracturas osteoporóticas no vertebrales en el sexo femenino. En concreto, “coger un objeto de una estantería alta: 2,25 (1,00-5,05)”; “llevar durante 10 metros un objeto de 10 kilos: 3,47 (1,34-9,00)”; “estar sentado más de 1 hora en silla dura: 2,58 (1,11-6,00)”; y “levantar una caja con 6 botellas y ponerlas sobre una mesa: 3,03 (1,23- 7,49)”.

## DISCUSIÓN

El concepto de fragilidad en relación con la osteoporosis es un concepto cada vez más aceptado en personas de edad avanzada como predictor de fracturas osteoporóticas. Se estima que entre el 25 y el 50% de los mayores de 85 años presentan fragilidad<sup>8</sup>. La fragilidad viene determinada por factores genéticos, epigenéticos y ambientales. La sarcopenia representa la pérdida de la masa y fuerza muscular relacionada con el envejecimiento, siendo un componente clave de la fragilidad. Estrategias encaminadas a mejorar la fuerza y masa muscular, como una mayor ingesta proteica y un entrenamiento de resistencia y fuerza muscular, han demostrado disminuir la prevalencia de sarcopenia y fragilidad, así como mejorar la fuerza y el desempeño físico<sup>9-11</sup>.

Se han propuesto varios mecanismos plausibles entre la sarcopenia y el riesgo de fracturas. Por un lado, pequeños cambios de masa muscular en proteínas musculares como las miocinas asociados con el metabolismo anormal de la glucosa tienen un gran impacto en el metabolismo óseo<sup>12</sup>. Por otro lado, los individuos sarcopénicos poseen un alto riesgo de caídas, lo que conduce a una mayor incidencia de fracturas<sup>13</sup>. Por lo tanto, la sarcopenia se considera un predictor efectivo del riesgo de fractura en personas de edad avanzada<sup>14</sup>. Sin embargo, la prevalencia de sarcopenia es difícil de establecer.

**Tabla 1. Características sociodemográficas y variables clínicas de la población a estudio**

Estudio transversal			
VARIABLES	Hombre (308)	Mujer (316)	Valor de p
Edad (años)	65 ± 9	65 ± 9	0,988
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,0 ± 3,3	28,6 ± 4,3	<0,001
Fractura previa	77 (25,1%)	92 (29,2%)	0,197
Antecedentes familiares de fractura de cadera	18 (5,8%)	26 (8,2%)	0,245
Fumador activo	92 (30,1%)	15 (4,7%)	<0,001
Fractura vertebral prevalente	64 (21,1%)	83 (26,3%)	0,127
Estudio prospectivo			
VARIABLES	Hombre (200)	Mujer (227)	Valor de p
Incidencia fractura no vertebral	4 (2,0%)	30 (13,2%)	<0,001
Incidencia de caídas	47 (23,5%)	102 (44,9%)	<0,001

**Tabla 2. Efecto de la fuerza muscular y de la dificultad o incapacidad para realizar actividades cotidianas sobre la incidencia de caídas**

Fuerza muscular medida por dinamómetro	Sí caídas	No caídas	Valor de p
Fuerza en la mano derecha	264 ± 42	278 ± 34	<0,001
Fuerza en la mano izquierda	260 ± 42	275 ± 38	0,001
Incapacidad o tener dificultades para realizar determinadas actividades	Sí caídas	No caídas	Valor de p
Coger un libro de una estantería alta	36 (24,2%)	47 (17,2%)	0,083
Llevar durante 10 metros un objeto de 10 kilos	80 (53,7%)	97 (35,4%)	<0,001
Llavarse y secarse por sí mismo	21 (14,1%)	28 (10,2%)	0,234
Inclinarse hacia delante para coger un objeto del suelo	71 (47,7%)	98 (35,9%)	0,019
Llavarse el pelo en un lavabo	27 (18,1%)	29 (10,6%)	0,029
Estar sentado más de 1 hora en silla dura	60 (40,5%)	72 (26,4%)	0,003
Estar de pie en una cola durante 30 minutos	82 (55,4%)	108 (39,4%)	0,002
Incorporarse de la cama	48 (32,2%)	60 (21,9%)	0,020
Quitarse los calcetines o las medias	64 (43,0%)	69 (25,2%)	<0,001
Inclinarse desde una silla para coger un objeto del suelo	70 (47,0%)	80 (29,2%)	<0,001
Levantar una caja con 6 botellas y ponerlas sobre una mesa	77 (51,7%)	93 (33,9%)	<0,001

**Tabla 3. Efecto de la fuerza muscular y de la dificultad o incapacidad para realizar actividades cotidianas sobre la incidencia de fracturas osteoporóticas no vertebrales**

Fuerza muscular medida por dinamómetro	Fractura incidente	No fractura incidente	Valor de p
Fuerza en la mano derecha	248 ± 49	270 ± 41	0,001
Fuerza en la mano izquierda	250 ± 47	265 ± 44	0,024
Incapacidad o tener dificultades para realizar determinadas actividades	Fractura incidente	No fractura incidente	Valor de p
Coger un libro de una estantería alta	13 (38,8%)	70 (18,0%)	0,004
Llevar durante 10 metros un objeto de 10 kilos	26 (76,5%)	151 (38,8%)	<0,001
Llavarse y secarse por sí mismo	5 (14,7%)	44 (11,3%)	0,553
Inclinarse hacia delante para coger un objeto del suelo	16 (47,1%)	153 (39,4%)	0,384
Llavarse el pelo en un lavabo	7 (20,6%)	49 (12,6%)	0,187
Estar sentado más de 1 hora en silla dura	16 (48,5%)	116 (29,9%)	0,027
Estar de pie en una cola durante 30 minutos	22 (64,7%)	168 (44,3%)	0,016
Incorporarse de la cama	14 (41,2%)	94 (24,2%)	0,029
Quitarse los calcetines o las medias	14 (41,2%)	119 (30,6%)	0,202
Inclinarse desde una silla para coger un objeto del suelo	15 (44,1%)	135 (34,7%)	0,271
Levantar una caja con 6 botellas y ponerlas sobre una mesa	25 (73,5%)	145 (37,3%)	<0,001

Un metaanálisis encontró una gran variabilidad en la prevalencia en pacientes de edad avanzada ingresados en residencias desde el 1 al 29%<sup>15</sup>. En nuestro estudio, si bien a nivel univariante se asoció la menor fuerza muscular con el riesgo de caídas y fracturas, el análisis multivariante no arrojó diferencias significativas. No obstante, hubo una modesta tendencia a que un incremento de 10 de mmHg de fuerza muscular en las manos era capaz de disminuir hasta un 5% la incidencia de fractura osteoporótica no vertebral. En realidad, en el estudio solo se recogió la fuerza de agarre en las manos sin ningún otro parámetro medible de fuerza o masa muscular, por lo que creemos que este instrumento por sí solo no sirve para evaluar el grado de sarcopenia si no se acompaña de otras pruebas complementarias.

Existen evidencias de que el índice de fragilidad es predictivo de fracturas osteoporóticas independientes

de la edad cronológica en los pacientes<sup>16-19</sup>. De hecho, un estudio con datos del estudio canadiense de osteoporosis multicéntrico (CaMos) realizado en 9.423 adultos con una edad media de 62 años y un seguimiento de 10 años mostró un *hazard ratio* de 1,18 y 1,30 para fracturas de cadera y fracturas vertebrales clínicas por cada aumento de 0,10 en el índice de fragilidad<sup>19</sup>. Hay autores que indican la necesidad de validar los instrumentos de fragilidad antes de que los mismos puedan servir de guía a la hora de adoptar decisiones clínicas<sup>20</sup>.

En nuestro estudio, la incidencia de caídas no se asoció con una disminución de la fuerza muscular, pero sí con actividades cotidianas que reflejan estabilidad y adecuado estado físico, como poder permanecer "sentado más de 1 hora en una silla dura", "coger un objeto del suelo desde una silla" y poder "quitarse las medias o los calcetines". Otros autores han observado también que la fragilidad afecta a la incidencia de caídas<sup>21</sup>.

En este estudio se evaluó la fragilidad basándose en un cuestionario validado que mide el grado funcional en personas con dolor de espalda<sup>7</sup>. Este cuestionario contiene preguntas que hacen relación a las actividades de la vida cotidiana que forman parte de muchos de los instrumentos de medida de la fragilidad. Es interesante destacar que la pérdida de fuerza (levantar objetos y llevarlos unos metros) fueron los factores que mejor se asociaron con incrementos en la incidencia de fractura (de hasta 2,5 veces). El análisis separado por sexos mostró solo asociaciones positivas en la mujer, siendo estas actividades, así como otras (estirarse para coger un objeto o estar sentado 1 hora en silla dura), predictivas de incidencia de fracturas. En hombres no se observó ningún efecto, a diferencia de lo que referencian otros autores<sup>22</sup>. Esta discrepancia podría estar relacionada con el escaso número de fracturas incidentes en el sexo masculino (n=4) encontrado en nuestro estudio. Cabe mencionar que a lo largo del seguimiento de 8 años se produjeron otras 6 fracturas osteoporóticas incidentes en hombres, pero estos sujetos se excluyeron del análisis al no llegar al final del período de seguimiento indicado.

Se hizo un análisis posterior (datos no mostrados en resultados), utilizando una puntuación para graduar las dificultades para realizar las 11 actividades de la vida cotidiana incluidas en el cuestionario de discapacidad funcional, con un mínimo de 0 (los que no tenían ninguna dificultad para realizarlas) hasta un máximo de 22 (aquellas personas incapaces de hacer estas actividades por sí mismas). Se pudo observar que, al categorizar la puntuación en cuartiles, aquellos que tenían la peor condición (cuartil 4) tenían un incremento en la incidencia de caídas en el análisis multivariante de 2,37 (1,25-4,52) respecto a los que estaban en mejores condiciones (cuartil 1). Este efecto no pudo objetivarse para la incidencia de fractura, lo que tal vez nos esté indicando que una peor condición física sería un predictor de la aparición de caídas, pero no de fracturas, si bien las caídas son un factor de riesgo de la aparición de fractura. Por el contrario, aquellas actividades más relacionadas con la pérdida de fuerza, como levantar objetos y llevarlos unos metros, son las que se asociaron mejor con la incidencia de fractura, hasta más de 3 veces en el caso de las mujeres.

A tenor de estos resultados, la información sobre la evaluación de la fragilidad y la sarcopenia puede, en conjunto o en paralelo, ser otra herramienta de evaluación de osteoporosis, proporcionando una visión más integral de los riesgos que pueden tener estos pacientes<sup>23</sup>.

Este estudio tiene limitaciones; la medida de la fragilidad o fuerza muscular se hizo al inicio del seguimiento, con lo que no podemos descartar que se haya infravalorado el resultado obtenido durante un período prolongado de seguimiento de 8 años. Las preguntas que contenían cuestiones relativas a las dificultades para realizar actividades de la vida diaria no fue auto-administrado, sino administrado por un entrevistador, lo que podría haber sesgado las respuestas de los participan-

tes, especialmente en aquellas preguntas relativas a las dificultades para el propio aseo personal. El cuestionario utilizado para medir las dificultades para realizar actividades cotidianas estaba focalizado en evaluar la incapacidad funcional en personas con dolor de espalda; sin embargo, a pesar de ello, consideramos que las preguntas que contiene dan una idea del grado de deterioro físico y funcional del individuo. La información de cómo fueron las caídas para relacionarlas con la fractura acontecida hubiera sido una información muy valiosa, pero desgraciadamente esta posibilidad no estaba contemplada en las directrices del estudio EVOS-EPOS.

A pesar de estas limitaciones, creemos que este estudio posee también importantes fortalezas. Por un lado, la cohorte analizada participó en el estudio EVOS-EPOS, siendo el nuestro uno de los 5 centros que completaron todas las directrices del estudio. Por otro lado, la respuesta en los cuatro seguimientos postales realizados durante 8 años de seguimiento mostró una respuesta superior al 80%, lo que ampliamente avala la representatividad de la muestra analizada.

A modo de resumen, hemos sido capaces de comprobar que las dificultades para realizar determinadas actividades de la vida diaria o cotidiana pueden alertar de un deterioro de la capacidad física y estado funcional, pudiendo constituir una herramienta más en la anamnesis del paciente que ayude a predecir y probablemente evitar la aparición de caídas y fracturas osteoporóticas.

Como conclusiones de este trabajo, podemos afirmar que no se encontraron asociaciones entre la fuerza de agarre e incidencia de caídas y fracturas osteoporóticas, pero sí con dificultades o incapacidad para realizar actividades cotidianas. Aquellas actividades más relacionadas con una mayor fuerza se asociaron con fractura, mientras que las relacionadas con una mayor capacidad funcional se asociaron con caídas.

**Financiación:** Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Estudio Europeo sobre Osteoporosis Vertebral (EVOS), Unión Europea (1991-1993); Estudio Europeo Prospectivo sobre Osteoporosis (EPOS), Unión Europea (BIOMED 93-95), BMHI-CT 092-0182 (1993-1997); Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 94/1901-E); Retic REDinREN de ISCIII (RD06/0016/1013, RD12/0021/0023 y RD16/0009/0017); Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 y 2018 -2022 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028, IDI-2018-000152), Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT). Sara Fernández-Villabrille ha sido financiada por IDI-2018-000152; Julia Martín-Vírgala por una beca de la Universidad de Oviedo, Beatriz Martín Carro por ISCIII-FINBA (PI17/00384) y Javier Rodríguez-Carrio por un contrato Juan de la Cierva y Sara Borrell.



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

## Bibliografía

- Siris ES, Brenneman SK, Barrett-Connor E, Miller PD, Sajjan S, Berger ML, et al. The effect of age and bone mineral density on the absolute, excess, and relative risk of fracture in postmenopausal women aged 50-99: results from the National Osteoporosis Risk Assessment (NORA). *Osteoporos Int.* 2006;17:565-74.
- Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. European Working Group on Sarcopenia in Older People. European working group on sarcopenia in older people. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: report of the European working group on sarcopenia in older people. *Age Ageing.* 2010;39:412-23.
- Paintin J, Cooper C, Dennison E. Osteosarcopenia. *Br J Hosp Med (Lond).* 2018;79(5): 253-8.
- Parra-Rodríguez L, Szlejf C, García-González AI, Malmstrom TK, Cruz-Arenas E, Rosas-Carrasco O. Cross-cultural adaptation and validation of the Spanish-language version of the SARC-F to assess sarcopenia in Mexican community-dwelling older adults. *J Am Med Dir Assoc.* 2016;17:1142-6.
- O'Neill TW, Cooper C, Algra D, Pols HAP, Agnusdei D, Dequeker J, et al, on behalf of the European Vertebral Osteoporosis Study Group. Design and development of a questionnaire for use in a multicentre study of vertebral osteoporosis in Europe: The European vertebral osteoporosis study (EVOS). *Rheumatology in Europe.* 1995;24:75-81.
- O'Neill TW, Cooper C, Cannata JB, Diaz Lopez JB, Hoszowski K, Johnell O, et al, on behalf of the European Vertebral Osteoporosis Study (EVOS) Group. Reproducibility of a questionnaire on risk factors for osteoporosis in a multicentre prevalence survey: the European Vertebral Osteoporosis Study. *Int J Epidemiol.* 1994;23: 559-65.
- Kohlmann T, Raspe H. Der Funktionsfragebogen Hannover zur alltagsnahen Diagnostik der Funktionsbeeinträchtigung durch Rückenschmerzen (FFbH-R). *Rehabilitation.* 1996;35:I-VIII.
- Clegg A, Young J, Iliffe S, Rikkert MO, Rockwood K. Frailty in elderly people. *Lancet.* 2013;381(9868):752-62.
- Robinson SM, Reginster JY, Rizzoli R, Shaw SC, Kanis JA, Bautmans I, et al. ESCEO working group. Does nutrition play a role in the prevention and management of sarcopenia? *Clin Nutr.* 2018;37:1121-32.
- Nascimento CM, Ingles M, Salvador-Pascual A, Cominetti MR, Gomez-Cabrera MC, Viña J. Sarcopenia, frailty and their prevention by exercise. *Free Radic Biol Med.* 2019;132:42-9.
- Naseeb MA, Volpe SL. Protein and exercise in the prevention of sarcopenia and aging. *Nutr Res.* 2017;40:1-20.
- Kawao N, Kaji H. Interactions between muscle tissues and bone metabolism. *J Cell Biochem.* 2015;116: 687-95.
- Ormsbee MJ, Prado CM, Ilich JZ, Purcell S, Siervo M, Folsom A, et al. Osteosarcopenic obesity: the role of bone, muscle, and fat on health. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2014;5:183-92.
- Zhang Y, Hao Q, Ge M, Dong B. Association of sarcopenia and fractures in community-dwelling older adults: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Osteoporos Int.* 2018;29:1253-62.
- Cruz-Jentoft AJ, Landi F, Schneider SM, Zuniga C, Arai H, Boirie Y, et al. Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the international sarcopenia initiative (EWGSOP and IWGS). *Age Ageing.* 2014;43:748-59.
- Ensrud KE, Ewing SK, Taylor BC, Fink HA, Stone KL, Cauley JA, et al. Frailty and risk of falls, fracture, and mortality in older women: the study of osteoporotic fractures. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007;62:744-51.
- Tom SE, Adachi JD, Anderson Jr FA, Bononen S, Chapurlat RD, Compston JE, et al. Frailty and fracture, disability, and falls: a multiple country study from the global longitudinal study of osteoporosis in women. *J Am Geriatr Soc.* 2013;61:327-34.
- Fang X, Shi J, Song X, Mitnitski A, Tang Z, Wang C, et al. Frailty in relation to the risk of falls, fractures, and mortality in older Chinese adults: results from the Beijing Longitudinal Study of Aging. *J Nutr Health Aging.* 2012;16(10):903-7.
- Kennedy C, Ioannidis G, Rockwood K, Thabane L, Adachi J, Kirkland S, et al. A frailty index predicts 10-year fracture risk in adults age 25 years and older: results from the Canadian multicentre osteoporosis study (CaMos). *Osteoporos Int.* 2014;25:2825-32.
- Rockwood K, Theou O, Mitnitski A. What are frailty instruments for? An overview of osteoporosis and frailty in the elderly. *Age Ageing.* 2015;44(4): 545-7.
- de Vries OJ, Peeters GME, Lips P, Deeg JH. Does frailty predict increased risk of falls and fractures? A prospective population-based study. *Osteoporos Int.* 2013;24:2397-403.
- Yu R, Leung J, Woo J. Incremental predictive value of sarcopenia for incident fracture in an elderly Chinese cohort: Results from the osteoporotic fractures in men (MrOs) Study. *J Am Med Dir Assoc.* 2014;15:551-8.
- Li G, Thabane L, Papaioannou A, Ioannidis G, Levine MAH, Adachi JD. An overview of osteoporosis and frailty in the elderly. *BMC Musculoskelet Disord.* 2017;18:46.

# Persistencia a los inhibidores de la aromatasa en la cohorte SIDIAP: mortalidad e influencia de los bifosfonatos

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000300003>

**Pineda-Moncusí M<sup>1</sup>, Vilalta-Carrera A<sup>1</sup>, Ovejero D<sup>1</sup>, Aymar I<sup>1,2</sup>, Servitja S<sup>3</sup>, Tusquets I<sup>3</sup>, Prieto-Alhambra D<sup>4,5</sup>, Díez-Pérez A<sup>1,2</sup>, García-Giralt N<sup>1</sup>, Nogués X<sup>1,2</sup>**

*1 Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM). Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES). Barcelona (España)*

*2 Departamento de Medicina Interna. Hospital del Mar. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona (España)*

*3. Departamento de Oncología Médica. Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM). Barcelona (España)*

*4 Grupo de investigación en Enfermedades Prevalentes del Aparato Locomotor en Atención Primaria (GREMPAL). Instituto Universitario de Investigación en Atención Primaria Jordi Gol (IDIAP Jordi Gol) y Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES). Universidad Autónoma de Barcelona e Instituto de Salud Carlos III. Barcelona (España)*

*5 Centro de Estadística en Medicina (CSM). Departamento de Ortopedia, Reumatología y Ciencias Musculoesquelética de Nuffield (NDORMS). Universidad de Oxford. Oxford (Reino Unido)*

Fecha de recepción: 22/04/2020 - Fecha de aceptación: 27/09/2020

Trabajo enviado como prestación de la beca FEIOMM de Movilidad 2018

## Resumen

**Objetivo:** Evaluar la persistencia a la terapia con inhibidores de la aromatasa (IA), la mortalidad asociada a la discontinuidad al tratamiento y la influencia de los bifosfonatos (BF) orales, en la práctica clínica habitual.

**Material y métodos:** Estudio prospectivo observacional de mujeres con cáncer de mama en tratamiento con IA entre enero de 2006 y diciembre de 2015, registradas en la base de datos SIDIAP. Se excluyeron aquellas tratadas previamente con tamoxifeno. Se estudió la persistencia al tratamiento con IA con un análisis de supervivencia: se calculó el estimador de Kaplan-Meier, y se realizó un modelo de los riesgos proporcionales (regresión de Cox) entre usuarias y no usuarias de BF ajustando por edad. Se llevó a cabo un análisis de sensibilidad teniendo en cuenta la mortalidad como riesgo competitivo (modelos de Fine y Gray). Se comparó la diferencia de mortalidad entre grupos mediante una prueba Chi cuadrado.

**Resultados:** Se observó una persistencia a los IA del 87% a 5 años de tratamiento, con una mortalidad global del 19,75%. Se registró un 7,7% menos de mortalidad en aquellas pacientes que completaron los 5 años de tratamiento respecto a las que no. Las pacientes con BF mostraron una disminución de la mortalidad (6,6%) y una disminución del riesgo de abandono de la terapia (SHR ajustado: 0,62 [IC 95%: 0,55 a 0,70]) respecto a las no usuarias.

**Conclusiones:** La permanencia a los IA y el uso de BF está asociada a una disminución de la mortalidad global. Además, el uso de BF resulta en un aumento de la adherencia al tratamiento con IA.

**Palabras clave:** inhibidores de la aromatasa, bifosfonatos, cáncer de mama, mortalidad, persistencia.

## INTRODUCCIÓN

Los inhibidores de la aromatasa (IA) son la terapia adyuvante recomendada para tratar el cáncer de mama con receptores de estrógenos positivos<sup>1,2</sup>. Su efectividad para reducir el riesgo de recidiva y mortalidad es bien conocido<sup>3</sup>. Sin embargo, los IA también están asociados a diversos efectos secundarios que afectan a la calidad de vida de las pacientes, y, por lo tanto, comprometen la adherencia al tratamiento y la mortalidad asociada<sup>4</sup>.

Se conoce que hasta un 30% de pacientes con IA interrumpen su tratamiento debido a eventos adversos<sup>5</sup>, principalmente musculoesqueléticos<sup>6,7</sup>. Entre ellos, los más frecuentes son las artralgias<sup>8</sup> y la pérdida acelerada de masa ósea<sup>9</sup> asociada a un aumento de la fractura osteoporótica<sup>10,11</sup>. Para prevenir la pérdida de masa ósea, se recomienda tratar a las pacientes con antirresortivos, donde los más usados son los bifosfonatos (BF)<sup>12-14</sup>.



Correspondencia: Natalia García Giralt (ngarcia@imim.es)

El uso de los BF se ha relacionado con una mejora en la mortalidad asociada a la disminución de metástasis óseas<sup>13</sup>. Así mismo, se publicó un estudio en una población coreana donde se asoció el uso de BF a una mejora de la adherencia<sup>15</sup>.

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la persistencia a la terapia con IA, la mortalidad asociada a la discontinuidad al tratamiento y la influencia de los BF orales, en una cohorte basada en población con datos obtenidos de la práctica clínica habitual.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Base de datos

Datos de más de 7 millones de pacientes, provenientes de más de 350 centros de Atención Primaria de Cataluña, son registrados de forma anónima por el Sistema de Información para el Desarrollo de la Investigación en Atención Primaria (SIDIAP), cubriendo >80% del total de la población catalana (<http://www.sidiap.org>).

Esta base de datos contiene información de variables sociodemográficas, factores de riesgo del estilo de vida (consumo de alcohol, obesidad, tabaquismo, etc.), comorbilidades y dispensaciones farmacológicas. Los datos son recogidos por profesionales del sector sanitario, incluyendo los códigos de la clasificación internacional de enfermedades y problemas de salud relacionados, 10.<sup>a</sup> edición (CIE-10), así como formas estructuradas para la reunión de variables clínicas (tabaco, índice de masa corporal, etc.). SIDIAP también tiene registrados los datos de mortalidad, obtenidos del Registro Central de Personas Aseguradas, así como la migración fuera del área de captación<sup>16</sup>.

### Diseño del estudio y participantes

Estudio prospectivo observacional de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama con receptores hormonales positivos en tratamiento con IA. Se incluyeron las pacientes tratadas con IA en monoterapia entre enero de 2006 y diciembre de 2015 recogidas en la base de datos SIDIAP. Se identificaron a las usuarias de IA mediante los códigos ATC (sistema europeo de codificación de sustancias farmacéuticas y medicamentos): L02BG03 para anastrozol, L02BG04 para letrozol, y L02BG06 para exemestano. Se excluyeron aquellas con historia previa de cáncer (excepto cáncer local de piel no melanoma).

### Periodo de seguimiento de las pacientes

Para el estudio de la persistencia, las pacientes fueron seguidas desde el inicio de la terapia con IA hasta el primero de los siguientes acontecimientos: cese o abandono de la terapia con IA, fallecimiento, migración fuera del área de captación, o fin de la disponibilidad de datos en el SIDIAP (31 de diciembre, 2015). En el caso de la mortalidad, las pacientes fueron seguidas desde su entrada en el estudio hasta el 31 de diciembre de 2015.

### Variables de estudio

Las principales variables de estudio fueron la persistencia a los IA, y la supervivencia global. Se estudió el uso continuado de los IA mediante los registros de facturación provenientes de las farmacias. Se consideró el cese o abandono del tratamiento en aquellos registros sin dispensación con intervalos de 6 meses o más. Se reportó la supervivencia global, expresada en mortalidad, durante el periodo de seguimiento.

Se estudió el efecto de los BF en la persistencia y la mortalidad estratificando en usuarias y no usuarias: se clasificó como usuarias de BF a las pacientes con registros de BF orales (M05BA) con los códigos M05BA01 (ácido etidróico), M05BA02 (ácido clodróico), M05BA04 (ácido alendróico), M05BA05 (ácido tiludróico), M05BA06 (ácido ibandróico), M05BA07 (ácido risedróico), y M05BB03 (combinación de ácido alendróico y colecalciferol).

### Análisis estadístico

Se describieron las características de las pacientes utilizando la media  $\pm$  desviación estándar (DE) en las variables cuantitativas con distribución normal, y el número y porcentaje  $-n$  (%) para las variables categóricas.

Se estudió la persistencia al tratamiento con IA con un análisis de supervivencia: se calculó el estimador de Kaplan-Meier y se representó mediante modelos de probabilidad acumulada; se realizó un modelo de los riesgos proporcionales (regresión de Cox) entre usuarias y no usuarias de BF ajustando por edad, obteniendo el cociente de riesgo (HR, del inglés *Hazard Ratio*), y se verificó su proporcionalidad. Adicionalmente se llevó a cabo un análisis de sensibilidad teniendo en cuenta la mortalidad como riesgo competitivo (modelos de Fine y Gray), estimando la subdistribución de los cocientes de riesgo (SHR).

Finalmente, se comparó la diferencia de mortalidad entre grupos mediante una prueba Chi cuadrado.

Los análisis se realizaron con R 3.5.3 utilizando los paquetes *foreign*, *compareGroups*, *splines*, *survival*, y *survminer*. Estos se definieron como significativos con  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Se recogieron 18.455 datos de mujeres tratadas con IA. Sus características basales están descritas en la tabla 1. La persistencia [IC 95%] al tratamiento con IA fue del 99,8% [99,7 a 99,9] a 1 año, 98,3% [98,1 a 98,5] a 2 años, 95,8% [95,5 a 96,2] a 3 años, 92,9% [92,4 a 93,4] a 4 años y 87,0% [86,3 a 87,8] a 5 años de tratamiento (Figura 1).

La mortalidad se cuantificó mediante estratificación de las pacientes teniendo en cuenta las que finalizaron los 5 años de tratamiento, y, por otro lado, las que no. Se observó una mortalidad global del 19,75% (3.644/18.455): con un 21,2% (3.165/14.908) en las pacientes que no completaron 5 años de tratamiento con IA, y del 13,5% (479/3.547) en aquellas tratadas durante 5 años o más ( $p < 0,001$ ).

### Influencia de los BF

De las 18.455 pacientes incluidas en el estudio, el 21,7% ( $n=4.009$ ) fueron tratadas con BF orales (Tabla 2). Estas mostraron una mejor persistencia a los IA que aquellas no tratadas con BF: 99,9% [99,8 a 100] vs. 99,7% [99,6 a 99,8] a 1 año; 99,8% [99,6 a 99,9] vs. 97,8% [97,5 a 98,1] a 2 años; 98,5% [98,1 a 98,9] vs. 94,9% [94,4 a 95,3] a 3 años; 97,2% [96,6 a 97,8] vs. 91,2% [90,5 a 91,8] a 4 años; y 93,3% [92,2 a 94,4] vs. 84,5% [83,5 a 85,5] a 5 años de tratamiento, respectivamente (Figura 2). De esta manera, el cociente de riesgo de abandonar los IA en usuarias de BF respecto las no usuarias fue el siguiente: HR ajustado: 0,53 [IC 95%: 0,47 a 0,60], y SHR ajustado: 0,62 [IC 95%: 0,55 - 0,70].

Por otro lado, la mortalidad en las pacientes con BF fue de un 14,6% (587/4.009), mientras que en las no usuarias fue de un 21,2% (3.507/14.446) ( $p < 0,001$ ).

## DISCUSIÓN

Este estudio se ha centrado en evaluar la persistencia a la terapia con IA en una cohorte de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama con receptores hormonales positivos, así como la mortalidad y el efecto de los bifosfonatos, en la práctica clínica habitual. Se observó que la persistencia global a 5 años fue del 87% con una mortalidad global del 19,75%. La mortalidad en aquellas pacientes que completaron 5 años de terapia fue un 7,7% menor que aquellas que no. Por otro lado, las usuarias de BF mostraron una mejor persistencia al tratamiento con IA, con un 47% menos de riesgo de abandono de la terapia, y un 6,6% menos de mortalidad que las no usuarias.

Se ha descrito que los efectos secundarios de los IA influyen negativamente en la adherencia al tratamiento<sup>5</sup>. Diversos ensayos controlados aleatorios (ECA) han publicado tasas de persistencia que varían entre 76-90%<sup>17,18</sup>. Sin embargo, la fiabilidad de estos porcentajes puede ser cuestionada por la falta de resultados de discontinuidad de algunos ECA. Varios estudios de adherencia en bases de datos poblacionales muestran valores alrededor de 69-88% en periodos de observación cortos (un año de adherencia)<sup>19-21</sup>, y de 61-79% en tiempos de seguimiento más largos (3-4,5 años)<sup>20,22</sup>. Hershman y cols. (2010)<sup>22</sup> observaron una tasa de discontinuación del 30% en pacientes con IA a 4,5 años de seguimiento, mientras que Hadji y cols. (2013)<sup>23</sup> describieron una discontinuación entre el 44-55% a 3 años. Entre otros factores, la edad de las pacientes (a menor edad, menor adherencia), y el coste de los medicamentos y/o gastos médicos derivados –especialmente en sistemas sanitarios privados–, han sido descritos como variables asociadas a una mayor discontinuidad<sup>21</sup>. La alta persistencia observada en nuestra población podría ser explicada por una media de edad alta (media ± DE: 67,6 ± 11,6) respecto a la reportada en los ECA (media ± DE: 64,1±9,0 en el estudio ATAC<sup>24</sup>, y 64,3±8,1 en el estudio IES<sup>25</sup>; mediana [rango]: 61 [38-89] en el estudio BIG 1-98<sup>26</sup>; y mediana de 63,9 y 64,3 en pacientes con exemestano y anastrozol en el estudio MA.27<sup>27</sup>) y un sistema sanitario público, donde el coste del tratamiento es prácticamente despreciable.

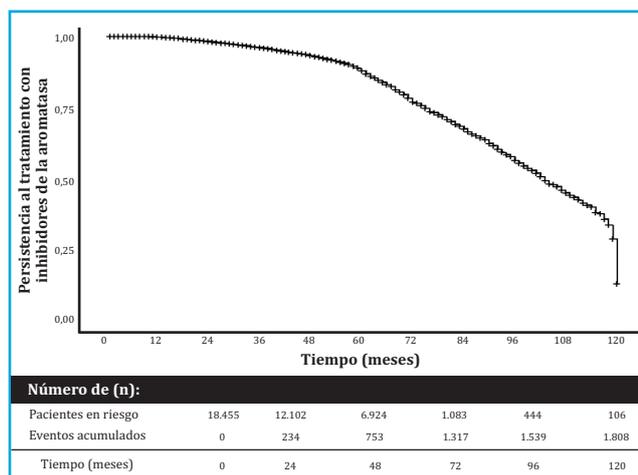
En el caso de la mortalidad global, existe una cierta diversidad de resultados en función del diseño del ECA. En el estudio BIG 1-98, se observó una mortalidad del 12,3%<sup>28</sup>. El estudio de seguridad del ATAC, detectó una mortalidad del 23,5% en todas las usuarias de IA en monoterapia, y del 21,5% en la subpoblación de mujeres con el estado tumoral conocido de receptores hormonales positivos<sup>29</sup>. En contraste, el estudio MA.27, publicado por Goss y cols. (2013), mostró una mortalidad del 5,7% a los 5 años<sup>27</sup>. A diferencia de los ECA, nuestro estudio utiliza datos de población general visitada en la asistencia primaria, consiguiendo una población más representativa de la clínica habitual. De manera interesante, los valores de mortalidad de nuestra población de estudio se asemejan a los descritos en el estudio ATAC. Este hecho podría deberse a que ambos reportan resultados de mortalidad de hasta 10 años de seguimiento.

Tabla 1. Características basales de las participantes incluidas en el estudio

Variable	Usuarías IA (N=18.455)
<b>Edad (media años ± DE)</b>	67,6 ± 11,6
<b>IMC (media kg/m<sup>2</sup> ± DE)</b>	29,7 ± 5,36
<i>No disponible [n (%)]</i>	13.555 (73,45%)
<b>Fumadores [n (%)]</b>	
No fumadores	10.269 (81,44%)
Fumadores	1.343 (10,65%)
Exfumadores	997 (7,91%)
<i>No disponible [n (%)]</i>	5.846 (31,68%)
<b>Riesgo de alcoholismo [n (%)]</b>	
Sin/Bajo	2.410 (85,58%)
Moderado	390 (13,85%)
Alto/Alcoholismo	16 (0,57%)
<i>No disponible [n (%)]</i>	15.639 (84,74%)
<b>Índice de comorbilidad de Charlson [n (%)]</b>	
0	2.315 (12,54%)
1	704 (3,81%)
2	9.840 (53,32%)
3	3.553 (19,25%)
≥4	2.043 (11,07%)
<b>Índice de privación MEDEA [n (%)]</b>	
Área rural	3.450 (20,28%)
Área urbana 1	3.498 (20,56%)
Área urbana 2	2.960 (17,40%)
Área urbana 3	2.692 (15,83%)
Área urbana 4	2.399 (14,10%)
Área urbana 5	2.012 (11,83%)
<i>No disponible [n (%)]</i>	1.444 (7,82%)
<b>Usuarías BF [n (%)]</b>	4.009 (21,7%)

BF: bifosfonatos; DE: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal; MEDEA: mortalidad en áreas pequeñas españolas y desigualdades socio-económicas y ambientales.

Figura 1. Persistencia al tratamiento con IA. El gráfico presenta una curva de Kaplan-Meier que muestra el riesgo de abandono de los IA en términos acumulativos. Abreviaturas: IA: inhibidores de la aromatasa

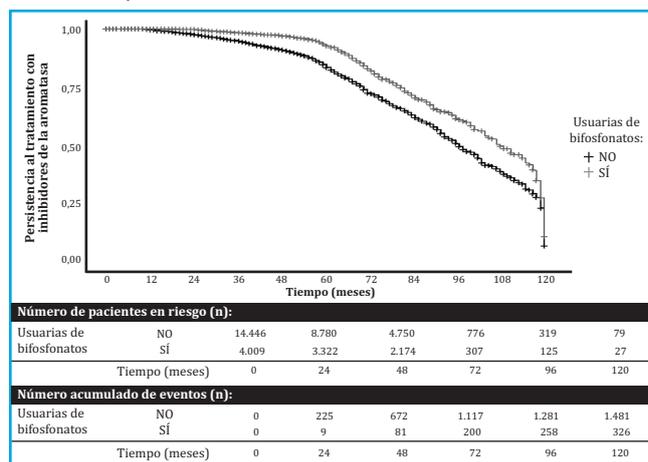


**Tabla 2. Características basales de las mujeres tratadas con IA según su uso de BF**

Variable	No usuarias BF (N=14.446)	Usuarias BF (N=4.009)
<b>Edad (media años ± DE)</b>	67,5 ± 12,0	68,0 ± 10,1
<b>IMC (media kg/m<sup>2</sup> ± DE)</b>	29,9 ± 5,45	29,0 ± 4,94
No disponible [n (%)]	10.602 (73,4%)	2.953 (73,7%)
<b>Fumadores [n (%)]</b>		
No fumadores	8.006 (80,7%)	2.263 (84,2%)
Fumadores	1.088 (11,0%)	255 (9,48%)
Exfumadores	826 (8,33%)	171 (6,36%)
No disponible [n (%)]	4.526 (31,3%)	1.320 (32,9%)
<b>Riesgo de alcoholismo [n (%)]</b>		
Sin/Bajo	1.901 (85,4%)	509 (86,1%)
Moderado	313 (14,1%)	77 (13,0%)
Alto/Alcoholismo	11 (0,49%)	5 (0,85%)
No disponible [n (%)]	12.221 (84,6%)	3.418 (85,3%)
<b>Índice de comorbilidad de Charlson [n (%)]</b>		
0	1.753 (12,13%)	562 (14,02%)
1	552 (3,82%)	152 (3,79%)
2	7.573 (52,42%)	2.267 (56,55%)
3	2.847 (19,71%)	706 (17,61%)
≥4	1.721 (11,91%)	322 (8,03%)
<b>Índice de privación MEDEA [n (%)]</b>		
Área rural	2.809 (21,13%)	641 (17,25%)
Área urbana 1	2.680 (20,16%)	818 (22,01%)
Área urbana 2	2.304 (17,33%)	656 (17,65%)
Área urbana 3	2.040 (15,35%)	652 (17,54%)
Área urbana 4	1.890 (14,22%)	509 (13,69%)
Área urbana 5	1.571 (11,82%)	441 (11,86%)
No disponible [n (%)]	1.152 (7,97%)	292 (7,28%)

BF: bifosfonatos; DE: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal; MEDEA: mortalidad en áreas pequeñas españolas y desigualdades socio-económicas y ambientales.

**Figura 2. Persistencia al tratamiento con IA entre usuarias y no usuarias de BF. El gráfico presenta una curva de Kaplan-Meier que muestra el riesgo de abandono de los IA en términos acumulativos entre los grupos de estudio: usuarias y no usuarias de BF. Abreviaturas: IA: inhibidores de la aromatasa; BF: bifosfonatos**



Por otro lado, y en concordancia con nuestros resultados, el uso de BF fue reportado por Lee y cols. (2014)<sup>15</sup> como un factor que mejora la adherencia al tratamiento con IA. Así mismo, el uso de BF fue asociado a una disminución de la incidencia de metástasis óseas del 34% y una reducción de la mortalidad del 17%<sup>13</sup>. En general, el uso de BF disminuye la mortalidad global, aumenta la esperanza de vida y previene la aparición de varios cánceres en población general<sup>30</sup>. Esta mejora de la esperanza de vida no solo se atribuye a la disminución de fracturas<sup>31</sup>, sino a una posible prevención de la fragilidad y una mayor capacidad del individuo de hacer frente a diferentes patologías<sup>32</sup>.

Teniendo todo eso en cuenta, la mayor adherencia a los IA en pacientes tratadas con BF podría ser explicada por una mejoría en el tratamiento de los eventos adversos que impactaría positivamente en la paciente, mientras que la disminución en la mortalidad global derivada del uso de los BF podría atribuirse tanto a una disminución de las metástasis óseas como a la mayor adherencia a los IA.

Una limitación del estudio es que la base de datos del SIDIAP no dispone de los datos que hacen referencia a la causa de mortalidad ni el motivo de discontinuación del tratamiento. Debido a esto, en este estudio solo tenemos en cuenta la mortalidad global, pero existe un riesgo de sesgo en que la mortalidad antes de los 5 años no sea consecuencia del abandono de la terapia. Se necesitan estudios adicionales para comprobar que la diferencia observada en la mortalidad no es debida a un sesgo en las poblaciones estudiadas (entre aquellas pacientes que completaron 5 años vs. las que no, y entre usuarias y no usuarias de BF). Sin embargo, nuestro estudio corrobora los resultados observados en los estudios previos.

En conclusión, se ha observado una persistencia a los IA del 87% a 5 años en la práctica clínica habitual, la cual mejora con el uso de BF. Por otro lado, completar 5 años de terapia con IA y el uso de BF estarían asociadas a una disminución de la mortalidad.

**Declaración de ética:** Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación (CEI) del IDIAP Jordi Gol y el Comité Científico del SIDIAP (P16/031). Los datos provenientes de la base SIDIAP fueron anonimizados, con un riesgo de identificación nulo, de acuerdo con la ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre. Por consiguiente, no se requirió la firma de un consentimiento informado por parte de las pacientes.

**Financiación:** Este trabajo ha sido financiado por la Beca FEIOMM de Movilidad 2018, el Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES; CB16/10/00245), el FIS (PI16/00818) del ISCIII y los fondos FEDER.

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

## Bibliografía

- Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1194-220.
- Liedtke C, Jackisch C, Thill M, Thomsen C, Muller V, Janni W, et al. AGO Recommendations for the diagnosis and treatment of patients with early breast cancer: Update 2018. *Breast Care (Basel)*. 2018;13(3):196-208.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet*. 2015;386(10001):1341-52.
- Ryden L, Heibert Arnlin M, Vitols S, Hoistad M, Ahlgren J. Aromatase inhibitors alone or sequentially combined with tamoxifen in postmenopausal early breast cancer compared with tamoxifen or placebo - Meta-analyses on efficacy and adverse events based on randomized clinical trials. *Breast*. 2016;26:106-14.
- Kadakia KC, Snyder CF, Kidwell KM, Seewald NJ, Flockhart DA, Skaar TC, et al. Patient-reported outcomes and early discontinuation in aromatase inhibitor-treated postmenopausal women with early stage breast cancer. *Oncologist*. 2016;21(5):539-46.
- Henry NL, Azzouz F, Desta Z, Li L, Nguyen AT, Lemler S, et al. Predictors of aromatase inhibitor discontinuation as a result of treatment-emergent symptoms in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(9):936-42.
- Pineda-Moncusi M, Servitja S, Tusquets I, Diez-Perez A, Rial A, Cos ML, et al. Assessment of early therapy discontinuation and health-related quality of life in breast cancer patients treated with aromatase inhibitors: B-ABLE cohort study. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;177(1):53-60.
- Niravath P. Aromatase inhibitor-induced arthralgia: a review. *Ann Oncol*. 2013;24(6):1443-9.
- Pineda-Moncusi M, Servitja S, Casamayor G, Cos ML, Rial A, Rodriguez-Morera J, et al. Bone health evaluation one year after aromatase inhibitors completion. *Bone*. 2018;117:54-9.
- Goldvaser H, Barnes TA, Seruga B, Cescon DW, Ocana A, Ribnikar D, et al. Toxicity of extended adjuvant therapy with aromatase inhibitors in early breast cancer: A Systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(1):31-9.
- Pineda-Moncusi M, Garcia-Giralt N, Diez-Perez A, Servitja S, Tusquets I, Prieto-Alhambra D, et al. Increased fracture risk in women treated with aromatase inhibitors versus tamoxifen: beneficial effect of bisphosphonates. *J Bone Miner Res*. 2019;35(2):291-7.
- Hadji P, Coleman RE, Wilson C, Powles TJ, Clezardin P, Aapro M, et al. Adjuvant bisphosphonates in early breast cancer: consensus guidance for clinical practice from a European Panel. *Ann Oncol*. 2016;27(3):379-90.
- Hadji P, Aapro MS, Body JJ, Gnani M, Brandi ML, Reginster JY, et al. Management of Aromatase Inhibitor-Associated Bone Loss (AIBL) in postmenopausal women with hormone sensitive breast cancer: Joint position statement of the IOF, CABS, ECTS, IEG, ESCEO IMS, and SIOG. *J Bone Oncol*. 2017;7:1-12.
- Tremollieres FA, Ceausu I, Depypere H, Lambrinouadaki I, Mueck A, Perez-Lopez FR, et al. Osteoporosis management in patients with breast cancer: EMAS position statement. *Maturitas*. 2017;95:65-71.
- Lee HS, Lee JY, Ah YM, Kim HS, Im SA, Noh DY, et al. Low adherence to upfront and extended adjuvant letrozole therapy among early breast cancer patients in a clinical practice setting. *Oncology*. 2014;86(5-6):340-9.
- Bolibar B, Fina Aviles F, Morros R, Garcia-Gil M del M, Hermsilla E, Ramos R, et al. Base de datos SIDIAP: la historia clinica informatizada de Atencion Primaria como fuente de informacion para la investigacion epidemiologica. *Med Clin (Barc)*. 2012;138(14):617-21.
- Verma S, Madarnas Y, Sehdev S, Martin G, Bajcar J. Patient adherence to aromatase inhibitor treatment in the adjuvant setting. *Curr Oncol*. 2011;18 Suppl 1:S3-9.
- Chlebowski RT, Geller ML. Adherence to endocrine therapy for breast cancer. *Oncology*. 2006;71(1-2):1-9.
- Ziller V, Kalder M, Albert US, Holzhauser W, Ziller M, Wagner U, et al. Adherence to adjuvant endocrine therapy in postmenopausal women with breast cancer. *Ann Oncol*. 2009;20(3):431-6.
- Partridge AH, LaFountain A, Mayer E, Taylor BS, Winer E, Asnis-Alibozek A. Adherence to initial adjuvant anastrozole therapy among women with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(4):556-62.
- Sedjo RL, Devine S. Predictors of non-adherence to aromatase inhibitors among commercially insured women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;125(1):191-200.
- Hershman DL, Kushi LH, Shao T, Buono D, Kershenbaum A, Tsai WY, et al. Early discontinuation and nonadherence to adjuvant hormonal therapy in a cohort of 8,769 early-stage breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2010;28(27):4120-8.
- Hadji P, Ziller V, Kyvernitakis J, Bauer M, Haas G, Schmidt N, et al. Persistence in patients with breast cancer treated with tamoxifen or aromatase inhibitors: a retrospective database analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138(1):185-91.
- Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klajn JG, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet*. 2002;359(9324):2131-9.
- Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(11):1081-92.
- Thurlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, et al. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(26):2747-57.
- Goss PE, Ingle JN, Pritchard KI, Ellis MJ, Sledge GW, Budd GT, et al. Exemestane versus anastrozole in postmenopausal women with early breast cancer: NCIC CTG MA.27--a randomized controlled phase III trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(11):1398-404.
- Mouridsen H, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Thurlimann B, Paridaens R, Smith I, et al. Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(8):766-76.
- Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(12):1135-41.
- Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011;49(1):2-19.
- Zhou J, Ma X, Wang T, Zhai S. Comparative efficacy of bisphosphonates in short-term fracture prevention for primary osteoporosis: a systematic review with network meta-analyses. *Osteoporos Int*. 2016;27(11):3289-300.
- Colón-Emeric CS, Mesenbrink P, Lyles KW, Pieper CF, Boonen S, Delmas P, et al. Potential mediators of the mortality reduction with zoledronic acid after hip fracture. *J Bone Miner Res*. 2010;25(1):91-7.

# Estudio de biocompatibilidad y osteointegración de nuevos materiales protésicos

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000300004>

**Giner M<sup>1</sup>, Santana L<sup>2</sup>, Costa AF<sup>3</sup>, Vázquez-Gómez MA<sup>4</sup>, Colmenero M<sup>3</sup>, Olmo FJ<sup>3</sup>, Chicardi E<sup>2</sup>, Torres Y<sup>2</sup>, Montoya-García MJ<sup>4</sup>**

*1 Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica. Universidad de Sevilla. Sevilla (España)*

*2 Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Materiales y del Transporte. Escuela Politécnica Superior de Sevilla. Sevilla (España)*

*3 Medicina Interna. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla (España)*

*4 Departamento de Medicina. Universidad de Sevilla. Sevilla (España)*

Fecha de recepción: 10/07/2020 - Fecha de aceptación: 28/09/2020

Trabajo premiado con una beca FEIOMM de Investigación Traslacional 2018

## Resumen

**Objetivo:** Los implantes óseos son utilizados cada vez con mayor frecuencia en la práctica clínica y, entre los materiales, el Ti o sus aleaciones son los de mejor rendimiento por sus propiedades fisicoquímicas. Aleaciones como TiNbTa han demostrado mejorar las características biomecánicas del Ti puro comercial (c.p.), sin embargo, su capacidad osteointegradora necesita ser evaluada.

El objetivo del presente estudio fue valorar la citotoxicidad y la capacidad de adhesión, proliferación y diferenciación de células osteoblásticas en cultivo, influida por discos de material TiNbTa frente a Ti c.p.

**Materiales y métodos:** Analizamos a los 4 y 7 días del cultivo la línea celular MC3T3, la viabilidad celular (AlamarBlue Cell Viability Reagent. Invitrogen, España), así como la proliferación y diferenciación celular (actividad de fosfatasa alcalina (ALP) y microscopía electrónica de barrido (Fijación para SEM). Se realizó la prueba t de Student para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de discos de estudio.

**Resultados:** Los resultados obtenidos demuestran muy buena viabilidad celular durante el periodo de estudio, sin diferencias significativas para ambos materiales. Así mismo, detectamos una caída en los niveles de ALP que fue significativa para ambos componentes entre los días 4 y 7 del estudio ( $p < 0,05$ ). Las imágenes de microscopía electrónica revelaron buena capacidad de adhesión al material, así como diferenciación celular frente a ambos tipos de discos.

**Conclusiones:** La aleación de TiNbTa como material para implantes óseos cuenta con una buena capacidad osteointegradora, además de resolver problemas de biomecánica que presenta el titanio puro como componente.

**Palabras clave:** TiNbTa, citotoxicidad, biocompatibilidad, células osteoblásticas, cultivo celular, adhesión celular, módulo de Young.

## INTRODUCCIÓN

La generación de tejido funcional mediante ingeniería tisular tiene un alto impacto en diversas áreas de la medicina regenerativa, entre las que se encuentra el tejido esquelético. Los primeros implantes fueron utilizados en el ámbito de la medicina, en concreto en 1909, cuando se desarrollaron las agujas de Kirschner y los clavos de Steinman para la fijación de fracturas óseas, donde el material utilizado fue el acero inoxidable. A lo largo de los años, se procedió a la mejora del acero, buscando que este fuese más resistente a la corrosión y que no provocase efectos nocivos en el cuerpo humano. En 1940 se comenzó el estudio del titanio (Ti) como biomaterial para implante óseo<sup>1</sup>.

El cambio de fase determina el cambio de estructura cristalina del material cuando es sometido a cambios de temperatura. El titanio es un metal cuya transformación

alotrópica ocurre a 882°C y pasa de una fase  $\alpha$ , que presenta una estructura hexagonal y compacta (HCP), poco deformable y resistente a temperatura ambiente, a una fase  $\beta$  caracterizada por estructura cúbica y centrada en el cuerpo (BCC), la cual es fácilmente deformable, lo que permite la realización de tratamientos térmicos que tienen como finalidad optimizar las propiedades del material<sup>2</sup>.

Entre las características que hacen del titanio uno de los mejores materiales para implantes óseos podemos destacar su mayor resistencia específica (resistencia/densidad), su alta ductilidad y su inferior módulo de Young<sup>3</sup> frente a otros elementos como, por ejemplo, el acero inoxidable. A su vez, se trata de un material no ferromagnético, lo que no presenta inconvenientes a la hora de realizar una prueba al paciente con implante de Ti por resonancia magnética. El anclaje al tejido óseo es posible gracias a la capa de óxido formada en el material al ser pasivado<sup>4</sup>.



Correspondencia: Mercè Giner (mginer@us.es)

Actualmente se utiliza el Ti comercial puro (c.p.) y otras aleaciones como Ti-6Al-4V principalmente para los implantes óseos<sup>5</sup>. Sin embargo, ambos elementos presentan un alto módulo elástico (E: 100-112 GPa) en comparación con el módulo elástico del hueso cortical (18,6-20,7 GPa) y trabecular (10,4-14,8 GPa) (Tabla 1) lo que produce el efecto de apantallamiento de tensiones o *stress-shielding*<sup>6</sup>. Este fenómeno se debe a que la rigidez del material del implante óseo es superior a la rigidez del hueso, lo que hace que toda la carga recaiga sobre el implante óseo. El remodelado óseo se ve en gran medida regulado por las cargas mecánicas a las que se ve sometido, de manera que la presencia de cargas estimula su formación ósea, y la ausencia de las mismas aumenta la reabsorción. Como consecuencia de la disminución de carga soportada por el hueso, este disminuye su densidad en la zona próxima al implante y, por tanto, puede producirse tanto la fractura prematura del mismo como el aflojamiento del implante<sup>5</sup>.

En la actualidad, para eliminar el fenómeno del apantallamiento de tensiones, se busca disminuir el módulo elástico, para lo cual se dispone de varias soluciones. Una de ellas, disminuir la densidad del material empleado, mediante la porosidad. Sin embargo, al aumentar la porosidad, se produce la disminución de la resistencia mecánica. Otro enfoque sería la búsqueda de aleaciones de Ti de estructura cúbica centrada en las caras (BCC) o aleaciones  $\beta$ -Ti, las cuales son de bajo módulo elástico y no presentan disminución de resistencia mecánica. Para la estabilización de la fase  $\beta$  se requiere de elementos  $\beta$ -estabilizadores: el Mo, V, Ta, Nb y Zr como elementos  $\beta$ -isomorfos y Cr, Co, Cu, Fe y Ni como elementos  $\beta$ -eutectoides. La ventaja de los elementos  $\beta$ -isomorfos es su alta cantidad de solución sólida sustitutiva y su incapacidad de formar compuestos intermetálicos de Ti, que poseen E elevado. Por tanto, se ha demostrado que elementos como el Nb y el Ta poseen un elevado nivel de biocompatibilidad y habilidad para prevenir el incremento de partículas, lo cual evitaría una mala interfaz de cohesión<sup>7</sup>.

El niobio (Nb) y el tantalio (Ta) son dos metales de transición muy utilizados en aleaciones; en especial, el Nb se utiliza en la formación del acero. Hasta 1866, se pensó que ambos elementos eran el mismo, ya que presentan características físico-químicas muy similares. La aleación de TiNbTa destaca por su alta estabilización de comportamiento, por la ausencia de fase  $\alpha$ , lo que permite una disminución del módulo elástico (49 + 3 GPa), su excelente resistencia elástica ( $\sigma_y > 1860$  MPa) y su alta biocompatibilidad<sup>7,8</sup>. Por lo tanto, un material como el TiNbTa, con una buena combinación de alta resistencia y bajo módulo de Young cercano al del hueso, podría utilizarse para evitar el aflojamiento de los implantes para así evitar la cirugía de revisión (Tabla 1).

En los últimos años, se han desarrollado toda una serie de técnicas con el objetivo de obtener materiales porosos que presenten un módulo de Young más cercano al del hueso cortical. En concreto, Chicardi *et al.* han conseguido fabricar una aleación de TiNbTa con propiedades fisicoquímicas más semejantes a las que presenta el hueso<sup>9</sup>. No obstante, la mejora en el diseño de materiales, destinados a ser utilizados como injertos óseos, debe considerar la capacidad de osteointegración de los mismos, y en este sentido es necesario evaluar la citotoxicidad y la capacidad de adhesión, proliferación y diferenciación de células osteoblásticas influida por el material. Nuestro objetivo principal fue evaluar las ca-

racterísticas osteointegradoras de la aleación TiNbTa, con un módulo de Young similar al del hueso trabecular, y compararlas con el Ti puro.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Cultivo celular

La línea celular MC3T3 (subclon 4) de ATTC (Manassas, Virginia, EE.UU.) se cultivó en medio  $\alpha$ -MEM (Gibco, Thermo Fischer Scientific, España) suplementado con 1% de L-glutamina (200 mM) y 10% de suero bovino fetal. Para inducir la diferenciación, las células fueron tratadas con un medio de cultivo osteogénico suplementado con ácido ascórbico 50 g/ml (Merck, Alemania) y  $\beta$ -glicerofosfato 10 nM (StemCell Technologies, Canadá). Las células fueron sembradas en discos, de 3 mm de espesor y 7 mm, de titanio c.p. y de TiNbTa a una densidad de  $5 \times 10^3$ , en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Se realizaron cambios de medios cada 48 h. Los cultivos se realizaron por triplicado y las lecturas de la viabilidad celular y la actividad fosfatasa alcalina se realizaron después de 4 y 7 días.

### 2. Viabilidad celular

El ensayo Alamar Blue (AlamarBlue Cell Viability Reagent, Invitrogen, España) se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. AlamarBlue es un compuesto no tóxico, permeable a las células, que es de color azul y no fluorescente. Las células viables mantienen un ambiente reductor dentro de su citoplasma. El reactivo AlamarBlue es una forma oxidada de redox y de color azul. Cuando se incuba con células viables cambia de color azul a rojo y se vuelve fluorescente. Este cambio se puede detectar utilizando métodos de absorbancia.

A los 4 y 7 días se transfieren los discos con crecimiento celular a un nuevo pocillo y se añaden 80  $\mu$ L de AlamarBlue sobre el disco y posteriormente se añaden 720  $\mu$ L de medio de cultivo; este medio se incuba durante 2 horas a 37°C y se mide la absorbancia a la longitud de onda de excitación y emisión respectiva de 570 y 600 nm (TECAN, Infinity 200 Pro). Los resultados se presentan como el porcentaje de reducción. Los experimentos se realizaron por triplicado en cada cultivo.

### 3. Fosfatasa alcalina

Analizamos la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) de acuerdo con el protocolo del fabricante (kit de ensayo de fosfatasa alcalina Colorimétrica, Abcam ab83369, Reino Unido) en el sobrenadante de cultivo. El ensayo se realizó a los 4 y 7 días, a través de la conversión de un fosfato de p-nitrofenilo incoloro en un p-nitrofenol de color. Se mide la absorbancia a 405 nm de 4-nitrofenol (TECAN, Infinity 200 Pro), y la actividad de ALP se calculó a partir de una curva estándar. Los experimentos se realizaron por triplicado en cada cultivo.

### 4. Fijación para SEM

Para visualizar las células en la microscopía electrónica de barrido (SEM), las células MC3T3 se cultivaron en discos de titanio c.p. y TiNbTa durante 4 y 7 días por triplicado. Las muestras fueron fijadas con formol 10%, seguido de un paso de deshidratación con soluciones etanólicas y recubiertos por recubrimiento de oro utilizando un revestimiento de espato (Pelco 91000, Ted Pella, Redding, California, EE.UU.). Todas las micrografías se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6330F y el voltaje de aceleración fue de 10 kV para imágenes SEM.

**Tabla 1. Características físicas del titanio puro, las distintas fases y el hueso: módulo elástico y resistencia elástica**

Grupo	Compuesto	Módulo Young (GPa)	Límite de fluencia (MPa)
Titanio puro	Ti c.p.	100	650
Fase $\alpha+\beta$	Ti-6Al-4V	112	1140
Fase $\beta$	TiNbTa	46-52	1860
Hueso	Trabecular	0,5-2,0	40-60
	Cortical	20-25	150-180

### 5. Análisis estadístico

Todos los experimentos *in vitro* se realizaron por triplicado para cada condición estudiada. Las variables fueron analizadas para la distribución de la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se realizó la prueba t de Student para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Para el manejo estadístico de resultados se ha utilizado el paquete SPSS versión 22.0 para Windows (IBM Corp., Armonk, Nueva York, EE.UU.). En todos los casos se consideró como nivel de significación  $p < 0,05$ .

Los datos son expresados como media  $\pm$  desviación estándar (DS).

### RESULTADOS

Los cultivos celulares en los discos de Ti c.p. y en la aleación tuvieron un crecimiento celular similar. A los 7 días de crecimiento las células presentaron al microscopio óptico (M.O.) una morfología columnar y basófila compatible con el inicio de la diferenciación (Figura 1). La superficie del disco no deja pasar la luz, por lo que resulta complejo apreciar las células con claridad. Sin embargo, en las partes destacadas se pudo observar que se había producido cierta adhesión celular en el material, lo cual indicaría que la aleación presenta buenas cualidades para ser utilizada en implantes.

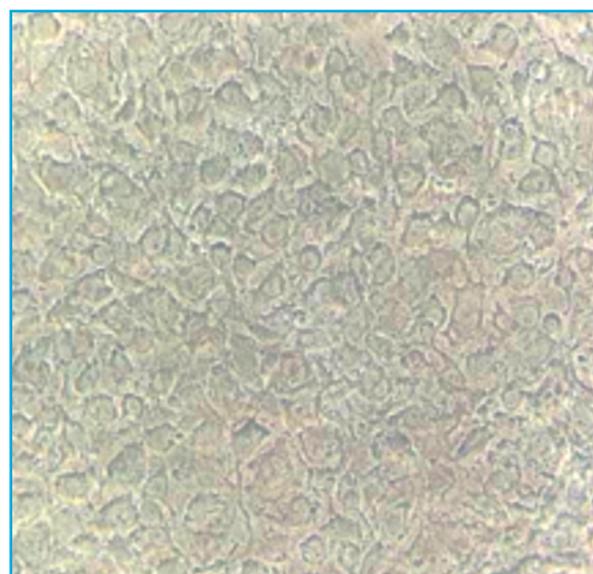
#### Viabilidad celular

La figura 2 representa la viabilidad de la línea celular en función del tiempo de crecimiento celular (4 y 7 días) sobre los discos de Ti c.p. y TiNbTa. A los 4 días de cultivo, la viabilidad celular en los discos de TiNbTa fue similar a la de los discos de Ti c.p. Mientras que a los 7, observamos un ligero ascenso de la viabilidad en las muestras de TiNbTa y un descenso en las muestras de Ti c.p., aunque sin diferencias significativas. En todos los casos el porcentaje de viabilidad siempre fue superior al 150%. Se considera efecto tóxico cuando la viabilidad es inferior al 75%, por lo que, con los resultados obtenidos, se puede deducir que el cultivo celular es viable a lo largo de toda la duración del cultivo en todas las condiciones.

#### Actividad fosfatasa alcalina

Cuantificamos los valores de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en los cultivos de células MC3T3 a los 4 y 7 días. La figura 3 representa la media y la desviación estándar de los resultados obtenidos en ambas condiciones de cultivos. En los discos de Ti c.p., los resultados obtenidos mostraron una disminución de la actividad enzimática, siendo estadísticamente significativa la diferencia encontrada entre los días 4 y 7 ( $p = 0,001$ ). En los discos de TiNbTa, también se observó una disminución de la actividad con el tiempo de cultivo y existió una

**Figura 1. Fotografía de microscopio óptico invertido (Olympus CKX53) con objetivo de medio aumento 40X, de las células crecidas a los 7 días en los discos de TiNbTa**

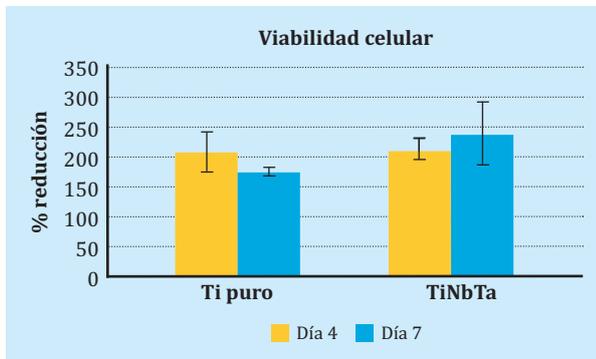


diferencia significativa entre los días 4 y 7 de cultivo ( $p = 0,006$ ). En ambas condiciones a los 4 días se obtuvo la máxima actividad enzimática, dado que hay una mayor proliferación y crecimiento celular; como los valores de viabilidad corroboraron, y a partir del día 7, las células presentaron un fenotipo más diferenciado, como observamos en las imágenes de SEM, y la actividad de la ALP disminuyó.

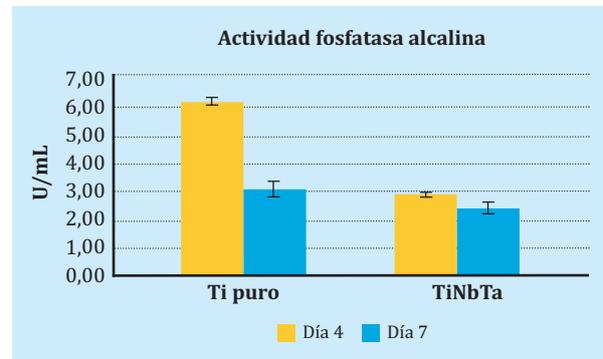
#### Morfología celular por microscopía electrónica de barrido

Se realizó un estudio preliminar para estudiar la morfología y adhesión celular sobre el material de estudio TiNbTa comparado con el crecimiento en Ti c.p. Para ello, visualizamos las muestras de ambos tipos de disco a los 4 y 7 días de cultivo. A los 4 días, se observaron pequeñas agrupaciones celulares en ambos tipos de superficie y de densidad similar. A los 7 días, las imágenes demostraron un crecimiento en monocapa en toda la superficie del disco, siendo similar en ambos materiales. También se observaron uniones entre célula-células y célula-biomaterial. Las células se adhirieron a través de filopodios (finas proyecciones celulares, flecha amarilla) y lamelopodios (extensiones más amplias, asterisco amarillo), demostrando de esta forma la conexión de las células con el biomaterial. Empezamos a observar la presencia de pequeñas vesículas de estructura hexagonal, sugiriendo una posible nucleación de hidroxiapatita, sobre la superficie celular, sugiriendo el inicio del desarrollo del proceso de mineralización (Figura 4).

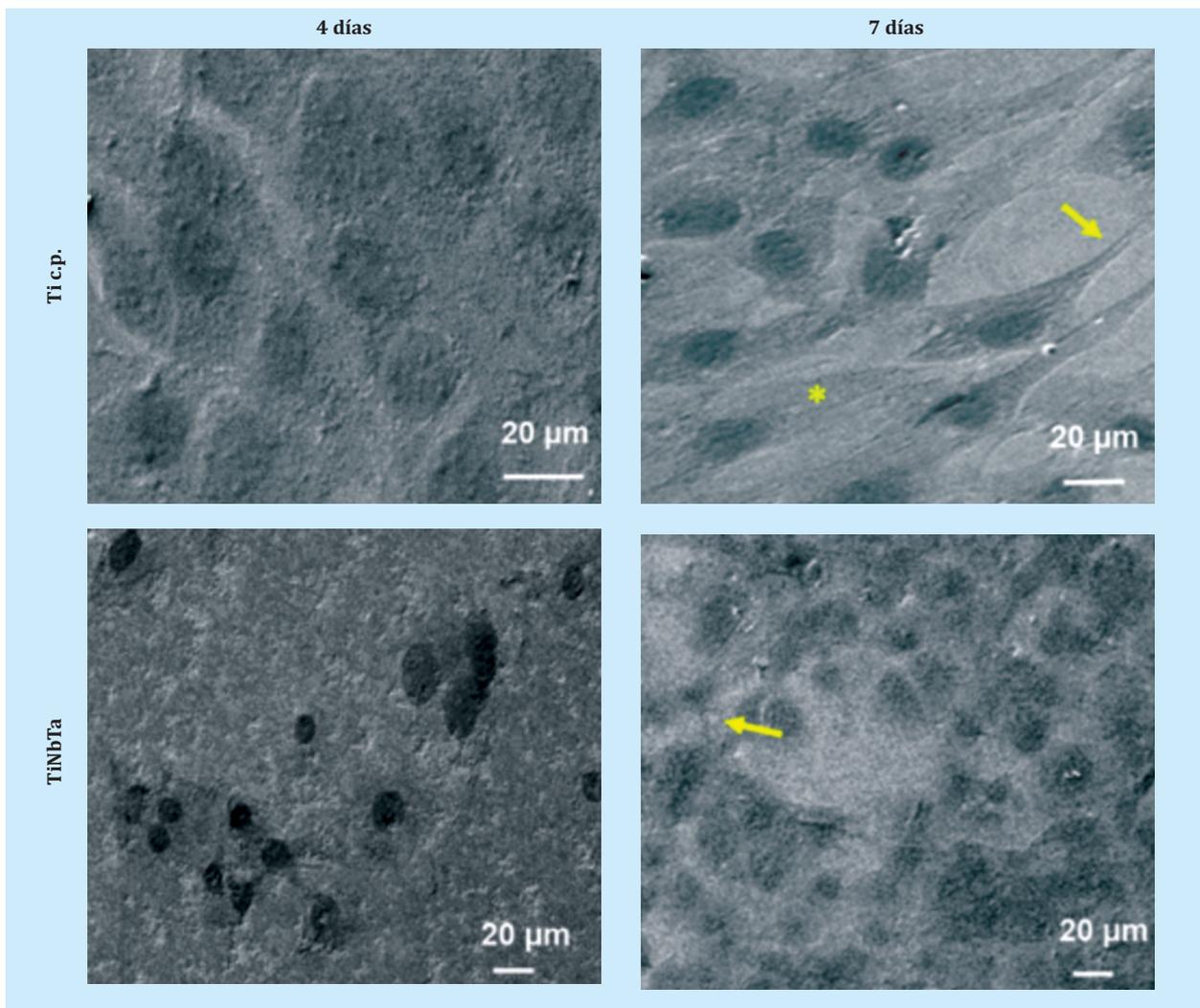
**Figura 2. Viabilidad celular de las células cultivadas en discos de Ti c.p. o la aleación TiNbTa a los 4 y 7 días del crecimiento celular. Resultados presentados como media  $\pm$  desviación estándar**



**Figura 3. Actividad de la fosfatasa alcalina en crecimiento celular sobre discos de Ti c.p. o TiNbTa durante 4 y 7 días. \* Tic.p. 4 días vs. 7 días; \*\* TiNbTa 4 días vs. 7 días.  $P < 0,05$**



**Figura 4. Microfotografías de microscopio electrónico de barrido a 4 y 7 días de cultivos de osteoblastos sobre la superficie de Ti cp. o TiNbTa. La morfología celular y proliferación es mostrada en las dos superficies testadas. Interacciones célula-célula a través de filopodios (flechas amarillas) e interacciones célula-superficie mediante lamelopodios (asterisco amarillo)**



## DISCUSIÓN

Los problemas inflamatorios y degenerativos de los huesos y articulaciones afectan a millones de personas en todo el mundo. De hecho, representan la mitad de las enfermedades crónicas en personas mayores de 50 años en países desarrollados<sup>10</sup>. Estas enfermedades a menudo requieren

cirugía, incluida el reemplazo de toda la articulación en casos de deterioro. Este hecho, acompañado del aumento de la esperanza de vida y el envejecimiento de la población, ha traído consigo una gran demanda de derivados sanitarios, entre los que destacan el desarrollo de implantes quirúrgicos y materiales con mayor periodo de vida útil.

Los biomateriales constituyen uno de los avances más importantes en la medicina actual: estos mejoran la calidad de vida de los pacientes y reducen el tiempo de curación y la convalecencia de enfermedades. En 2009, Bjursten resaltó la importancia de incrementar la unión del implante al hueso, dado que la vida media de un implante está comprendida entre 10 y 15 años<sup>7,8</sup>, lo que implica un aumento en el número de intervenciones quirúrgicas de revisión.

En nuestro estudio hemos realizado pruebas para valorar un material nuevo, la aleación TiNbTa, con un módulo de Young similar al del hueso trabecular. Numerosos estudios han demostrado la disminución del módulo elástico en aleaciones con Nb y Ta, como por ejemplo el Ti35Nb5Ta7Zr, que muestra un módulo elástico de 55GPa<sup>11</sup>. La ventaja en comparación con el Ti c.p. o la aleación Ti-6Al-4V sería el inferior módulo de Young de la aleación estudiada, lo cual reduciría considerablemente el apantallamiento de tensiones.

El porcentaje de viabilidad se relaciona ampliamente con las propiedades biocompatibles y citotóxicas del material; diversos autores<sup>12,13</sup> han demostrado cómo porcentajes elevados de viabilidad son óptimos para considerar un material candidato a ser utilizado como implante óseo en humanos. Nuestros cultivos, a los diferentes tiempos de estudio, presentaron un alto grado de biocompatibilidad, así como una ausencia de toxicidad. Se obtuvieron resultados positivos entre la línea celular y el material. Se podría sugerir que si este material fuese implantado tendería a sintetizar la matriz ósea, se adheriría bien al hueso y resultaría biocompatible<sup>14-15</sup>.

Los valores de viabilidad nos demuestran que no existen diferencias en el crecimiento celular entre la aleación TiNbTa y Ti c.p., y en todas las condiciones los valores se encuentran por encima del 75%. Por tanto, ambos materiales resultarían no citotóxicos y por tanto viables. Por otro lado, la adecuada actividad del metabolismo celular confirma que la aleación no libera residuos tóxicos para nuestras células<sup>15-18</sup>. Estudios previos de implantación animal de materiales como el Nb y el Ta en tejidos blandos y duros de ratas han demostrado la elevada biocompatibilidad de los metales y la osteogénesis<sup>19,20</sup>.

También cuantificamos la actividad celular midiendo la actividad de ALP. Una actividad aumentada de ALP se relaciona directamente con la proliferación celular y es un marcador de diferenciación del fenotipo osteoblás-

tico. En tejidos como huesos y cartílagos, la ALP se expresa en las fases iniciales del proceso de calcificación y más adelante, en el desarrollo, la expresión de la ALP disminuye. Se ha demostrado que cuando la actividad ALP disminuye, aumenta la diferenciación celular<sup>14</sup>.

Nuestros valores confirman que el cultivo en los discos con el nuevo material presenta actividad ALP que varía según el tiempo de estudio. Al inicio del cultivo, a los 4 días, las células MC3T3 presentaron una mayor proliferación celular en Ti c.p. que las cultivadas sobre el material de aleación, indicando un crecimiento más lento en los discos de TiNbTa durante los primeros días de cultivo. A los 7 días, los valores de ALP fueron similares en ambas muestras e inferiores a los iniciales, lo que demuestra que el cultivo se está comportando con características similares en cuanto a proliferación y diferenciación. En las imágenes obtenidas por SEM, observamos que a los 7 días las células tapizaron en su totalidad la superficie de los discos, el crecimiento celular se dio por igual en ambas muestras y llegaron a la confluencia celular, y la menor actividad concordó con las imágenes de células que están iniciando el proceso de mineralización. Además, empezamos a observar la secreción de material que formará la matriz extracelular por parte de los osteoblastos, y se observó en la superficie de las células un aumento de moléculas con apariencia de hidroxiapatita<sup>21</sup>. Por otro lado, los osteoblastos presentaron filopodios y lamelopodios, estructuras celulares esenciales durante el proceso de adhesión celular, lo que nos indica que la unión a otras células y al material es directa; otros autores describen estas uniones en células MC3T3 y discos de Ti c.p.<sup>22,23</sup>.

En conclusión, nuestro estudio *in vitro* nos permite concluir que la aleación novedosa que combina elementos como el Nb y el Ta con el Ti, además de mejorar las propiedades mecánicas del material, resulta, a corto plazo, biocompatible con las células osteoblásticas, comportándose con características de viabilidad, proliferación, diferenciación y capacidad de adhesión de líneas celulares osteoblásticas, de forma muy semejante a como lo hace el Ti puro.

**Financiación:** Este trabajo ha estado financiado por la Fundación Española de Investigación Ósea y Metabolismo Mineral (FEIOMM), por la beca Traslacional FEIOMM de 2018.



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

## Bibliografía

1. Geetha M, Singh A-K, Asokamani R, Gogia A-K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants. *Prog Mater Sci.* 2009;54:397-425.
2. Lütjering G, Williams JC. *Titanium*. Ed. Springer Science & Business Media, 2007.
3. Kaur M, Singh K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;102:844-62.
4. Kirkpatrick CJ, Krump-Konvalinkova V, Unger RE, Bittinger F, Otto M, Peters K. Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomol Eng.* 2002;19:211-7.
5. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell J-A. Biomaterials in orthopaedics. *Soc Interface.* 2008;5:1137-58.
6. Rho JY, Ashman RB, Turner CH. Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and micro-tensile measurements. *J Biomech.* 1993;26:111-9.
7. Bjursten LM, Rasmusson L, Oh S, Smith GC, Brammer KS, Jin S. Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92:1218-24.
8. Lario-Femenía J, Amigó-Mata A, Vicente-Escuder A, Segovia-López F, Amigó-Borrás V. Desarrollo de las aleaciones de titanio y tratamientos superficiales para incrementar la vida útil de los implantes. *Rev Metal.* 2016;52:84.
9. Chicardi E, Gutiérrez-González CF, Sayagués MJ, García-Garrido C. Development of a novel TiNbTa material potentially suitable for bone replacement implants. *Mater Des.* 2018;145:88-9.
10. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2018;392:1789-858.
11. Saji VS, Choe HC, Brantley WA. An electrochemical study on self-ordered nanoporous and nanotubular oxide on Ti-35Nb-5Ta-7Zr alloy for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2009;5:2303-10.
12. Matsuno H, Yokoyama A, Watari F, Uo M, Kawasaki T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials.* 2001;22:1253-62.
13. Hussein AH, Gepreel MA, Gouda MK, Hefnawy AM, Kandil SH. Biocompatibility of new Ti-Nb-Ta base alloys. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;61:574-8.
14. Beck GR Jr, Sullivan EC, Moran E, Zeller B. Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Biochem.* 1998;68:269-80.
15. Sista S, Wen C, Hodgson PD, Pande G. Expression of cell adhesion and differentiation related genes in MC3T3 osteoblasts plated on titanium alloys: role of surface properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33:1573-82.
16. Tolde Z, Starý V, Cvrček L, Vandrovová M, Remsa J, Daniš S, et al. Growth of a TiNb adhesion interlayer for bioactive coatings. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;80:652-8.
17. Biesiekierski A, Lin J, Li Y, Ping D, Yamabe-Mitarai Y, Wen C. Investigations into Ti-(Nb,Ta)-Fe alloys for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2016;32:336-47.
18. Kesteven J, Kannan MB, Walter R, Khakbaz H, Choe HC. Low elastic modulus Ti-Ta alloys for load-bearing permanent implants: enhancing the biodegradation resistance by electrochemical surface engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;46:226-31.
19. Yate L, Coy LE, Gregurec D, Aperador W, Moya SE, Wang G. Nb-C nanocomposite films with enhanced biocompatibility and mechanical properties for hard-tissue implant applications. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7:6351-8.
20. Thull R, Handke KD, Karle EJ. Tierexperimentelle Prüfung von Titan mit Oberflächen-beschichtungen aus (Ti,Nb)ON und (Ti,Zr)O [Animal experiment study of titanium with surface coatings of (Ti,Nb)ON and (Ti,Zr)O]. *Biomed Tech (Berl).* 1995;40:289-95.
21. Civantos A, Giner M, Trueba, Lascano S, Montoya-García MJ, Arévalo C, et al. In vitro bone cell behavior on porous titanium samples: influence of porosity by loose sintering and space holder techniques. *Metals.* 2020;10:696-716.
22. Schlie-Wolter S, Ngezahayo A, Chichkov BN. The selective role of ECM components on cell adhesion, morphology, proliferation and communication in vitro. *Exp Cell Res.* 2013;319:1553-61.
23. Muñoz S, Pavón J, Rodríguez-Ortiz JA, Civantos A, Allain JP, Torres Y. On the influence of space holder in the development of porous titanium implants: Mechanical, computational and biological evaluation. *Mater Charact.* 2015;108:68-78.

# Estudio de la expresión de factores óseos en el hueso murino ante la falta de pleiotrofina y sus cambios en la situación inflamatoria

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000300005>

Portal-Núñez S<sup>1</sup>, Messa L<sup>1</sup>, Sevillano J<sup>2</sup>, Herradón G<sup>3</sup>, Ramos MP<sup>2</sup>, Gortazar AR<sup>1</sup>

*1 Instituto de Medicina Aplicada. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina*

*2 Departamento de Química y Bioquímica. Facultad de Farmacia*

*3 Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Salud. Facultad de Farmacia*

*Universidad San Pablo-CEU. Madrid (España)*

Fecha de recepción: 07/09/2020 - Fecha de aceptación: 24/11/2020

Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM de Investigación Traslacional 2015

## Resumen

La pleiotrofina (PTN) es un péptido implicado en el desarrollo y el mantenimiento del tejido óseo, y con importantes funciones en los procesos inflamatorios. Sin embargo, la delección de la PTN en modelos murinos no produce un deterioro óseo significativo, sin que hasta la fecha se hayan estudiado los mecanismos que compensan su pérdida. Con este estudio quisimos comprobar cómo afecta la delección de PTN y la inflamación aguda a la expresión de factores óseos. Para ello empleamos ratones hembra de tres meses deficientes para la PTN (PTN<sup>Ko</sup>) a las que indujimos una inflamación aguda por administración de lipopolisacárido (LPS). Se aislaron las vértebras y las tibias para poder medir la expresión de genes y realizar un recuento de osteocitos. En cultivos celulares comprobamos si la PTN podía proteger a células MC3T3 (osteoblásticas) y MLOY4 (osteocitos) de la inducción de muerte celular producida por etopósido. Nuestros resultados muestran que la expresión de osteocalcina está incrementada en las vértebras de los ratones PTN<sup>Ko</sup>, y que la inflamación produjo el incremento de expresión de podoplanina (E11), conexina 43 (Cox43) y el péptido relacionado con la parathormona (PTHrP) en los ratones PTN<sup>Ko</sup> tratados con LPS. La administración de PTN redujo de manera significativa la muerte inducida por etopósido en cultivos de células MC3T3 y MLOY4. En conclusión, la deficiencia de PTN indujo un aumento de la expresión de OCN, y la inflamación aguda produjo la sobreexpresión de E11, PTHrP, y Cox43 en ratones PTN<sup>Ko</sup>. La PTN aumentó la viabilidad de células osteoblásticas y osteocitos frente al tratamiento con etopósido.

**Palabras clave:** pleiotrofina, homeostasis ósea, modelo murino.

## INTRODUCCIÓN

La pleiotrofina (PTN) es una citoquina secretada por múltiples tejidos durante el desarrollo embrionario, y que en edades adultas se expresa de manera abundante en el cerebro y en el hueso<sup>1,2</sup>. La PTN está compuesta por 136 aminoácidos y su secuencia es muy rica en lisina y cisteína. Esta citoquina constituye junto a la midquina (Mdk), con quien comparte un 50% de homología, la familia de los factores de crecimiento y diferenciación de unión a heparina, teniendo ambas afinidad por la matriz extracelular ósea<sup>3-5</sup>. La PTN también es conocida como el factor estimulante de osteoblastos 1 (OSF-1) o factor de crecimiento unido a heparina (HB-GAM)<sup>6</sup>. Esta citoquina fue aislada inicialmente

de los tejidos óseos y neuronales de ratas recién nacidas<sup>2,7,8</sup> y posteriormente se han encontrado sus homólogos en muchas especies incluido el ser humano, siendo de un 90% la homología entre las distintas especies<sup>9,10</sup>.

Se ha descrito que la PTN ejerce sus efectos a través de su unión a los glucosamin-glucanos de varios receptores como el N-sindecano, también llamado sindecano 3<sup>11</sup>, los sindecanos 1 y 4<sup>12</sup>, la integrina  $\alpha_v\beta_3$ <sup>13</sup> y el receptor proteína tirosina fosfatasa beta/zeta (PTRP $\beta/\zeta$ )<sup>14</sup>. También se ha postulado que la nucleolina pueda ser un receptor de baja afinidad de PTN<sup>15</sup> y que la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) puede tener alguna función en la señalización de PTN<sup>16</sup>.



**Correspondencia:** Sergio Portal Núñez ([sergio.portalnunez@ceu.es](mailto:sergio.portalnunez@ceu.es))

Probablemente el receptor mejor estudiado de PTN y que además se ha demostrado que se expresa en osteoblastos<sup>17</sup>, es PTRPβ/ζ. Este receptor es una proteína tirosina fosfatasa cuya activación por parte de PTN produce su desestabilización y, por tanto, el cese en su actividad fosfatasa. Esto desencadena el aumento de fosforilación de sus sustratos (*e.g.* fyn-quinasa) dando lugar, entre otros efectos, a la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκβ)<sup>18</sup>. Recientemente se ha confirmado la presencia de este receptor en el tejido óseo y su activación a través de PTN y de otro ligando, como es la proteína de unión 2 del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-2)<sup>19</sup>. Por otro lado, también se ha demostrado la expresión de N-sindecano en osteoblastos y su relación con la regeneración ósea<sup>6</sup>. En este caso la unión de PTN a N-sindecano produciría la fosforilación de src, lo que a su vez daría lugar a reorganizaciones en el citoesqueleto celular que permitirían un aumento de la migración celular<sup>20</sup>.

Entre sus las funciones más destacadas de la PTN, está su papel como promotor de la angiogénesis y de la migración de células endoteliales<sup>13,21</sup>, el crecimiento de las neuritas<sup>22</sup> y su papel modulador de los procesos inflamatorios gobernados por la microglia en el sistema nervioso central<sup>23</sup>. Las funciones de PTN en el tejido óseo son diversas. Así, se ha descrito que PTN es capaz de inducir la proliferación de células osteoblásticas de manera dependiente a su concentración y a la expresión de sus receptores<sup>24</sup>, promueve la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos durante el desarrollo óseo<sup>25</sup>, y aumenta la migración y la adhesión a la matriz extracelular de células óseas<sup>6,26</sup>. De hecho, se ha investigado el papel de la PTN en relación con la masa ósea realizando experimentos de delección o sobreexpresión del gen en modelos murinos. En el primer caso, se ha encontrado que la ausencia del gen no produjo un descenso en la masa ósea ni cambios significativos en las propiedades biomecánicas de estos huesos<sup>27</sup>. Estudios posteriores también encontraron que la estructura ósea de los ratones sin PTN no se veía alterada, pero que había un retraso en la maduración ósea en ratones de 2 meses de edad<sup>28</sup>.

También se ha estudiado del papel de la PTN en la mecanotransducción osteocitaria con diferentes resultados. En estudios *in vitro* se ha determinado que la carga mecánica conduce a una disminución de la expresión de PTN en las células óseas SaOs-2 y en osteoblastos primarios sometidos a este estímulo<sup>29</sup>. Sin embargo, Imai y cols. demostraron que células MLOY-4 (línea celular de osteocitos), tratadas con carga mecánica incrementaban su producción de PTN<sup>28</sup>. Estos datos están en consonancia con los hallados en un modelo animal de ratones hembra C57BL/6J sometidas a carga mecánica, en los que se produjo un aumento de la expresión de esta citoquina<sup>29</sup>. Además, en el mismo estudio se demostró que la ausencia de PTN (usando un ratón con el gen de la PTN delecionado) no influía en el aumento de masa ósea producido por la carga mecánica.

Por otro lado, los efectos de la sobreexpresión de la PTN en el tejido óseo sí que parecen tener un efecto protector en situaciones de pérdida de masa ósea, como la ingravidez. Los ratones transgénicos para la PTN están parcialmente protegidos frente a la pérdida de masa producida por el estado de ingravidez al ser sometidos a una estancia en la estación espacial internacional, relacionándose esta protección con un aumento de actividad osteoblástica<sup>30</sup>.

Dado que, como se ha comentado, la ausencia de PTN en hueso no parece influir de manera significativa en la estructura esquelética de los modelos murinos, en este trabajo nos propusimos averiguar cómo se alteraba la expresión de factores asociados con el mantenimiento correcto del metabolismo óseo en ausencia de PTN. Además, quisimos investigar cómo la expresión de estos genes estaba regulada ante una situación de inflamación aguda producida por inyección de LPS, tanto en presencia como en ausencia de PTN. Por último, comprobamos el efecto protector de la PTN en osteoblastos y osteocitos ante la presencia de un estímulo de muerte como es el etopósido.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Modelo animal

Se usaron ratones hembra de 3 meses deficientes en PTN (PTN<sup>Ko</sup>) y con genotipo normal (WT) siendo el número de ratones empleados 9 para WT, 9 para PTN<sup>Ko</sup> por grupo. Todos los ratones provenían de nuestro animalario, donde son criados de manera rutinaria. Para inducir un estado de inflamación aguda se inyectó por vía intraperitoneal una dosis de 7,5 mg/kg de lipopolisacárido 16 horas antes del sacrificio en 6 ratones WT y 5 ratones PTN<sup>Ko</sup>. Los protocolos animales contaron con la aprobación del Comité de Bienestar Animal de la Universidad CEU-San Pablo y de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid, de acuerdo con el real decreto R.D. 53/2013 y la directriz europea 2010/63/EU.

### Procesamiento de las muestras óseas y purificación del RNA

El RNA total fue extraído de las vértebras después de retirar los tejidos no óseos de las vértebras de las lumbares 1 a la 3, por medio de un pulverizador de tejido y por la disolución de este pulverizado en trizol (Invitrogen, Groningen, Holanda). El RNA fue extraído por medio de purificaciones por el método de clorformo:isoamílico (Sigma-Aldrich), seguido de precipitación con isopropanol, lavados posteriores con etanol al 70% y resuspensión en agua estéril libre de RNAsas. La retrotranscripción del ARN para obtener ADN complementario se llevó a cabo a partir de 2 µg de ARN usando el *cDNA High capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) en un termociclador Eppendorf mastercycler, siguiendo el siguiente protocolo secuencial: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C.

### PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa se realizó en un termociclador AB 7500 HD (Applied Biosystems). Usando sondas TaqMan MGB (Assay-by-Design™ System, Applied Biosystems) para medir la expresión de los siguientes genes: osteoprotegerina (OPG), ligando del receptor activador para el factor nuclear κB (RANKL), osteocalcina (OCN), péptido relacionado con la parathormona (PTHrP), podoplanina (E11), conexina 43 (Cox43), el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 2 (VEGFR2) y dickkopf-1 (Dkk1). Para producir la reacción de PCR se usó la polimerasa incluida en el kit *Taqman mastermix* (Applied Biosystems) aplicando el siguiente protocolo de 1 minuto a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C, recogiendo los datos de fluorescencia en cada paso de 60°C. La expresión de del gen 18S ribosomal fue usado como gen de referencia para normalizar la expresión.

La variación de expresión de cada uno de los genes en los diversos grupos se calculó con relación a la expresión obtenida en los ratones WT siguiendo la siguiente fórmula:

Expresión gen de interés =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  
donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  tratamiento -  $\Delta Ct$  basal<sup>31,32</sup>. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

### Contaje de osteocitos

Las tibias de los ratones fueron también extraídas en el momento de sacrificio y conservadas en formalina 10% para su posterior procesamiento histológico. Una vez procesadas y teñidas con hematoxilina-eosina, se realizó el conteo de los osteocitos embebidos en las trabéculas en 2 a 4 cortes no seriados correspondientes a la región inmediatamente inferior a la placa epifisaria de cada una de las tibias. El número de osteocitos se normalizó por su área correspondiente de tejido óseo calculada por medio del programa Image J (ImageJ 15.3a, National Institutes of Health, EE.UU.), y siguiendo las recomendaciones de la *American Society for Bone and Mineral Research*<sup>33</sup>. El número de osteocitos resultantes se calculó haciendo la media de cada conteo por ratón, y se expresó como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM).

### Cultivos de células *in vitro* y ensayo de viabilidad

Las células osteoblásticas murinas MC3T3-E1 se cultivaron en medio alfa MEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich) y un 1% de penicilina-estreptomocina. La línea estable de osteocitos murinos MLOY-4 fue mantenida en placas de cultivo previamente colagenizadas y con medio alfa MEM al 2,5% de suero de ternero (Sigma-Aldrich), 2,5% de FBS y 1% de penicilina-estreptomocina. Ambas líneas celulares se incubaron a 17°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Para los ensayos de viabilidad, ambas líneas celulares se incubaron en subconfluencia del 75% en placas de 6 pocillos y fueron pre-tratadas o no durante una hora con PTN (5,5 nM), y posteriormente incubadas en presencia de etopósido 50  $\mu$ M (agente apoptótico) en 1% de suero fetal bovino durante 48 horas. A las 48 horas se contaron las células incluyendo las que había en el sobrenadante de los pocillos y el tripsinizado de cada pocillo, y se hizo un recuento celular con Trypan Blue 0,4% en PBS en la cámara de Neubauer, distinguiendo las células vivas de las muertas. Se calculó el porcentaje de células muertas de cada uno de los experimentos. Se realizaron 3 experimentos con cada condición por triplicado y se expresó el resultado como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM).

### Estadística

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). La comparación entre varios grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con test *a posteriori* de U Mann-Whitney si procedía. Se consideró una  $p < 0,05$  como significativa. Los análisis se llevaron a cabo con el programa informático Graphpad InStat (San Diego, California, EE.UU.).

## RESULTADOS

### Expresión de genes en el tejido óseo en ausencia de PTN

En primer lugar, quisimos comprobar cómo variaba la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo en ausencia de PTN y en presencia de condiciones inflamatorias tras la administración de LPS. Entre la ex-

presión de todos los genes analizados encontramos que la OCN estaba sobreexpresada de manera muy significativa en los ratones PTN<sup>Ko</sup> (Figura 1A). Sin embargo, la expresión de un marcador de diferenciación osteocítico temprano como es la podoplanina (E11) no sufrió cambios significativos (Figura 1B). De la misma manera, no sufrieron cambios significativos en el ratón PTN<sup>Ko</sup> la expresión de los moduladores de la actividad osteoblásticas y osteoclastica OPG y RANKL (Figuras 1C, 1D); el inhibidor de la vía Wnt, Dkk1 (Figura 1E); el VEGFR2 (Figura 1F); y los niveles de PTHrP (Figura 1G) y de Cox43 (Figura 1H). Por otro lado, cuando se trataron los ratones normales WT con LPS, encontramos que los niveles de OCN, Dkk-1 y VEGFR2 estaban significativamente disminuidos (Figuras 1A, 1D, 1F). Con respecto a los ratones PTN<sup>Ko</sup> tratados con LPS encontramos un incremento significativo de la expresión de E11 (Figura 1B), PTHrP (Figura 1G) y Cox43 (Figura 1H) con respecto a los ratones WT tratados con LPS.

### El número de osteocitos no sufrió cambios en ratones PTN<sup>Ko</sup>, WT+LPS y PTN<sup>Ko</sup>+LPS

Después de observar que el único gen cuya expresión estaba regulada era OCN, un gen relacionado con los estados muy avanzados de maduración osteoblástica<sup>34</sup>, y que esta estaba regulada al alza, pensamos que esta expresión podía reflejar un aumento del número de osteocitos en los ratones PTN<sup>Ko</sup> (ampliamos también este conteo a los grupos WT y PTN<sup>Ko</sup> tratados con LPS). Para ello teñimos las tibias aisladas de los ratones y realizamos un conteo exhaustivo de los osteocitos que se hallaban en las secciones de hueso tibial. Como se puede apreciar en las figuras 2A, 2B, el número de osteocitos fue similar en todos los grupos de ratones, no hallándose diferencias significativas en ningún caso.

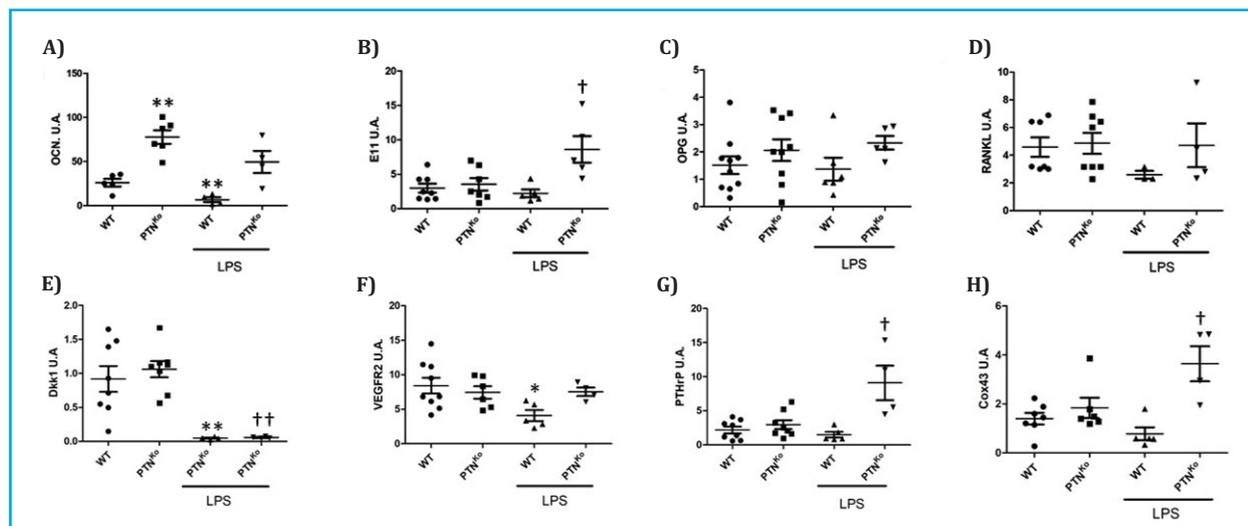
### Efecto protector de la PTN ante la inducción de muerte en células óseas

Dado que se ha descrito previamente el efecto proliferador de la PTN en osteoblastos MC3T3<sup>24</sup>, quisimos comprobar el efecto protector de la PTN frente a la inducción de la muerte por etopósido en dos líneas de células murinas, una de osteoblastos (MC3T3) y otra de osteocitos (MLOY-4), *in vitro*. La administración de la PTN previamente al tratamiento con etopósido produjo un efecto protector, pues la muerte de células inducida por este agente se redujo significativamente en la línea MC3T3 de un 20,8% a un 11,5% y en la línea MLOY4 de un 27,5% a un 18,1% (Figuras 3A, 3B).

## DISCUSIÓN

Es notorio el hecho de que la delección de un gen tan importante para el desarrollo y mantenimiento del tejido óseo como la PTN no produzca un fenotipo acusado de alteraciones óseas. En primer lugar, se podría pensar que, ya que la PTN y Mdk tienen expresiones paralelas y funciones similares, la falta de PTN podría ser compensado por el aumento de Mdk. Sin embargo, esto no parece ser así, pues se ha demostrado que los ratones deficientes en Mdk tienen un incremento en la masa ósea<sup>29</sup>, apuntando a que en el tejido óseo ambas citoquinas no comparten las mismas funciones de manera total. En este trabajo quisimos comprobar cómo era la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo y si esta variación pudiera justificar, al menos en parte, la falta de efectos óseos en los ratones PTN<sup>Ko</sup>.

**Figura 1. Expresión de diferentes genes en las vértebras de ratones WT o PTN<sup>KO</sup> tratados o no con inyección de LPS**



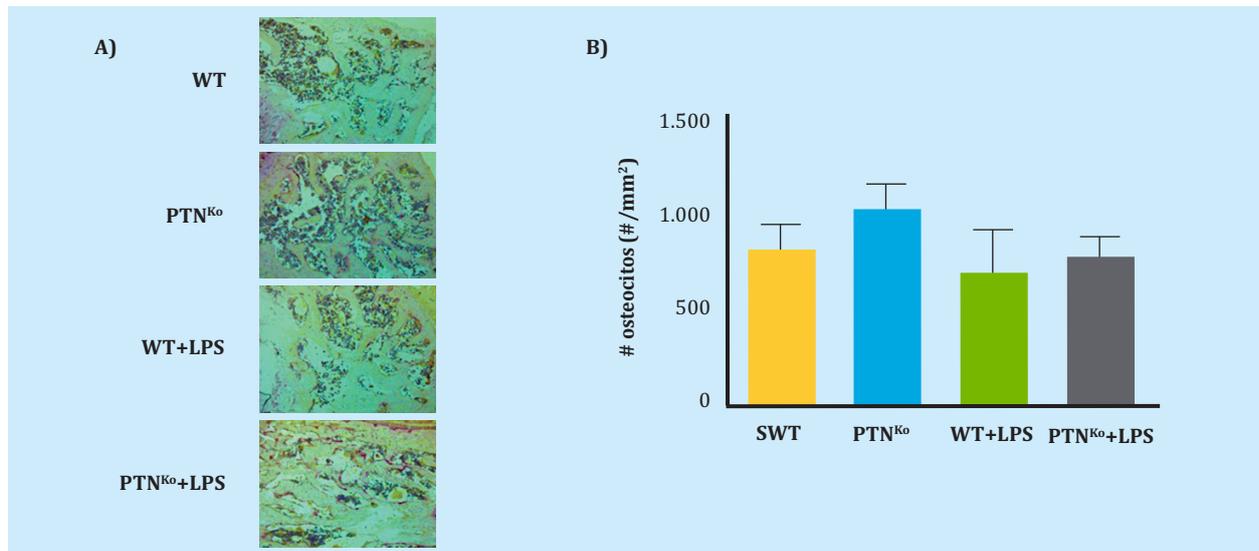
A) Osteocalcina (OCN) vs. WT, \*\* $p < 0,05$ ; B) Podoplanina (E11) vs. WT+LPS, † $p < 0,05$ ; C) Osteoprotegerina (OPG); D) Ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL); E) Dickkopf1 (Dkk1) vs. WT, \*\* $p < 0,01$ ; Dkk1 vs. WT+LPS, †† $p < 0,01$ ; F) Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 2 (VEGFR2) vs. WT, \* $p < 0,05$ ; G) Péptido relacionado con la parathormona (PTHrP) vs. WT+LPS, † $p < 0,05$ ; H) Conexina43 (Cox43), vs. WT+LPS, † $p < 0,05$ . Los resultados de la qPCR se expresan con unidades arbitrarias (U.A.) una vez normalizados con el gen de control 18 S ribosomal.

Recientes investigaciones han desvelado que la OCN es una proteína que actúa regulando el correcto alineamiento de los cristales de hidroxapatita con el colágeno, lo cual está directamente relacionado con la calidad ósea<sup>35</sup>, aunque también es usada como marcador de maduración osteoblástica<sup>36</sup>, y en estos momentos está bajo debate su papel como hormona producida por el hueso<sup>37-39</sup>. El hecho de que esté aumentada en los ratones PTN<sup>KO</sup> nos llevó a pensar que quizá el número de osteocitos de manera paralela podría estar incrementado en estos ratones, al ser un marcador de maduración tardía de los osteoblastos justo antes de convertirse en osteocitos, y pudiendo ser este uno de los mecanismos celulares de compensación de la falta de la PTN. Sin embargo, nuestros resultados (Figura 2A, 2B) demuestran que el número de osteocitos no varía significativamente en los ratones PTN<sup>KO</sup> comparados con los ratones WT ni tampoco en el resto de los grupos experimentales. Estos resultados concuerdan con los mostrados por Lehman y cols., en los cuales se observó un aumento de la expresión de OCN en cultivos primarios procedentes de ratones PTN<sup>KO</sup> y con un número equivalente de osteocitos entre los ratones normales y los PTN<sup>KO</sup><sup>27</sup>. Cabe pensar que es probable que el aumento de osteocalcina tenga otros efectos en hueso y que la matriz ósea de estos ratones tenga una composición alterada. Para comprobar este extremo serían necesarios estudios posteriores de resonancia magnética nuclear donde se analice la calidad y composición del hueso de los ratones PTN<sup>KO</sup>.

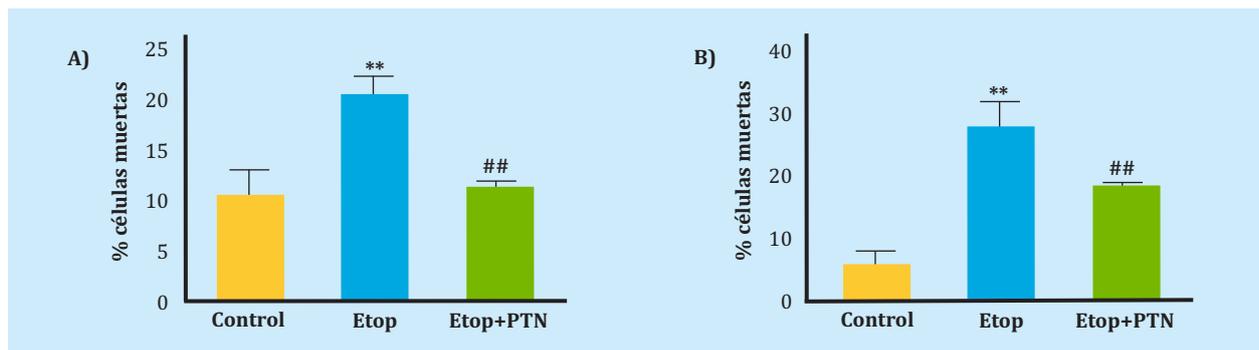
Por otra parte, y dada la importancia que tiene PTN en determinados procesos inflamatorios, quisimos también investigar cuál era su papel en la expresión de estos genes ante una inflamación aguda provocada por inyección de LPS. En este caso descubrimos que la expresión de E11, PTHrP y Cox43 estaba incrementada en los ratones PTN<sup>KO</sup> frente a los ratones WT tratados con LPS. La PTHrP es una citoquina que modula el remodelado óseo asemejando de manera local las acciones de la parathormona<sup>40</sup>. Esta citoquina está implicada en los procesos inflamatorios que se dan en la médula ósea, pues promueve la expresión del factor inflamatorio MCP-1 en las células endoteliales y osteoblastos<sup>41</sup>. E11 gobierna los primeros pasos de la transición

osteoblasto-osteocito<sup>42</sup>, siendo su sobreexpresión un marcador de tumores óseos<sup>43</sup> y de inflamación en otros tejidos y diversos tumores<sup>44</sup>. Por otro lado, la Cox43 forma parte de las comunicaciones que establecen los osteocitos entre ellos para formar la red osteocitaria. El papel de las conexinas en los procesos inflamatorios es diverso y variable en función de los distintos tejidos<sup>45</sup>. Se han descrito incrementos de expresión de Cox43 que están relacionados con enfermedades como la artrosis<sup>46</sup>, y una mayor expresión en sinoviocitos ante estímulos como el LPS<sup>47</sup>. Parece ser que la disminución de los niveles de Cox43 estaría relacionado con una disminución de los procesos inflamatorios en los procesos de artritis<sup>47</sup>. En nuestro estudio, la ausencia de PTN, al menos en el compartimento óseo, tendría un papel perjudicial desde un punto de vista inflamatorio, pues permitiría la sobreexpresión de los tres genes citados (Figuras 1B, 1G, 1H) al contrario de lo que ocurre en el ratón WT tratado con LPS, y, por tanto, daría lugar a efectos indeseados. Evidentemente, la verificación última de estas observaciones requiere posteriores estudios tanto *in vivo* como *in vitro* para desentrañar los mecanismos moleculares desencadenados por la ausencia de PTN en este contexto.

Una de las limitaciones de este estudio es que la edad de los ratones era de 3 meses, un poco alejado de los 5 meses en que se puede considerar un ratón maduro desde el punto de vista esquelético. Hay que tener en cuenta que los modelos murinos no sufren cierre de las placas de crecimiento ni depleción estrogénica, lo cual hace que siempre tengan un pequeño crecimiento óseo a lo largo de su vida. A este respecto, hay que señalar que se no se han descrito en ratones deficientes para PTN de 50 semanas graves defectos óseos<sup>27</sup>, aunque otros autores si han encontrado pequeños retrasos del crecimiento en ratones de 4 meses<sup>28</sup>. Además, en este último estudio, se ha demostrado que las características biomecánicas de los huesos largos están alteradas al tener disminuidos los parámetros de rigidez, resistencia a la ruptura, y dureza óseas<sup>28</sup>. Dado que la PTN contribuye a la correcta alineación de los cristales de hidroxapatita, futuros estudios en los huesos de ratones adultos o, incluso, envejecidos con ausencia de PTN, deberían incluir análisis

**Figura 2. Número de osteocitos en la sección trabecular de las tibias de los ratones WT y PTN<sup>Ko</sup>**

A) Imágenes representativas de las secciones de tibia donde se realizó el conteo de osteocitos debajo de la placa epifisaria de las tibias de los diferentes grupos experimentales; B) Cuantificación del número de osteocitos por mm<sup>2</sup> de tejido óseo en los ratones WT, PTN<sup>Ko</sup>, WT+LPS y PTN<sup>Ko</sup>+LPS.

**Figura 3. Efecto protector de la PTN ante la inducción de muerte con etopósido en células óseas**

A) Células MC3T3 vs. control, \*\* $p < 0,01$ ; Células MC3T3 vs. etopósido, ## $p < 0,01$ ; B) Células MLOY4 vs. control, \*\* $p < 0,05$ ; Células MLOY4 vs. etopósido, # $p < 0,05$ .

de estos huesos por medio de resonancia magnética nuclear para determinar si la ausencia de PTN puede provocar la creación de un hueso frágil en edades avanzadas. Otra de las limitaciones del estudio, es que, dado que no se han incluido zonas corticales al contar los osteocitos, no podemos establecer si existen diferencias entre los compartimentos cortical y esponjoso, por lo que este tipo de análisis debe de ser realizado en estudios posteriores.

Es de destacar que se ha comprobado previamente, que la administración de la PTN *in vitro* promueve la proliferación y la diferenciación de células osteoblásticas<sup>24</sup>. Por ello, quisimos comprobar, hasta donde sabemos por primera vez, el efecto protector de la PTN frente a un estímulo pro-apoptótico como es el etopósido en células osteoblásticas (MC3T3) y osteocitos (MLOY4), observando que la PTN tiene una acción protectora. Este resultado apunta a un posible papel adicional de la PTN en situaciones de fractura o inflamación crónica en las cuales podría proteger, al menos parcialmente, a las células óseas. Es cierto que en este estudio no se ha comprobado el papel de protección que pueda desempeñar la PTN en cuanto a la muerte medida por LPS. En este sentido, estudios previos han demostrado que este agente produce un fenotipo senescente en los osteocitos y un aumento

de la resorción ósea mediada por la producción del IL-6 y RANKL por los osteocitos, más que una muerte en un corto periodo de tiempo, como es el tiempo de administración de LPS que se ha realizado en este estudio. Sin embargo, sería interesante estudiar el papel de la PTN en estos contextos en estudios posteriores y en modelos adecuados<sup>48,49</sup>.

Por todo lo anterior, podemos concluir que la deficiencia de PTN está acompañada de un aumento de la expresión de OCN, y que la inducción de inflamación aguda por medio de LPS en ratones deficientes para PTN produce la sobreexpresión de E11, PTHrP, y Cox43. Así mismo, hemos demostrado el papel protector de la PTN en células osteoblásticas y en osteocitos ante un estímulo de muerte celular.

**Financiación:** Este trabajo ha sido financiado por los proyectos del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-095615-B-I00), de la Comunidad de Madrid (S2017/BMD-3684) y de la beca FEIOMM de Investigación Traslacional 2015 "Impacto de la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico en la expresión con en la expresión de miRNAs relacionados con la artrosis".



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

## Bibliografía

- Vanderwinden JM, Maillieux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ. Cellular distribution of the new growth factor Pleiotrophin (HB-GAM) mRNA in developing and adult rat tissues. *Anat Embryol (Berl)*. 1992;186:387-406.
- Mitsiadis TA, Salmivirta M, Muramatsu T, Muramatsu H, Rauvala H, Lehtonen E, et al. Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development*. 1995;121:37-51.
- Li YS, Milner PG, Chauhan AK, Watson MA, Hoffman RM, Kodner CM, et al. Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science*. 1990;250:1690-4.
- Merenmies J, Rauvala H. Molecular cloning of the 18-kDa growth-associated protein of developing brain. *J Biol Chem*. 1990;265:16721-4.
- Tomomura M, Kadomatsu K, Matsuura S, Muramatsu T. A retinoic acid-responsive gene, MK, found in the teratocarcinoma system. Heterogeneity of the transcript and the nature of the translation product. *J Biol Chem*. 1990;265:10765-70.
- Imai S, Kaksonen M, Raulo E, Kinnunen T, Fages C, Meng X, et al. Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Cell Biol*. 1998;143:1113-28.
- Rauvala H. An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J*. 1989;8:2933-41.
- Tezuka K, Takeshita S, Hakeda Y, Kumegawa M, Kikuno R, Hashimoto-Gotoh T. Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;173:246-51.
- Kilpeläinen I, Kaksonen M, Kinnunen T, Avikainen H, Fath M, Linhardt RJ, et al. Heparin-binding growth-associated molecule contains two heparin-binding  $\beta$ -sheet domains that are homologous to the thrombospondin type I repeat. *J Biol Chem*. 2000;275:13564-70.
- Englund C, Birve A, Falileeva L, Grabbe C, Palmer RH. Miple1 and miple2 encode a family of MK/PTN homologues in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol*. 2006;216:10-8.
- Raulo E, Chernousov MA, Carey DJ, Nolo R, Rauvala H. Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3). *J Biol Chem*. 1994;269:12999-3004.
- Deepa SS, Yamada S, Zako M, Goldberger O, Sugahara K. Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors: A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*. 2004;279:37368-76.
- Mikelis C, Sfaelou E, Koutsoumpa M, Kieffer N, Papadimitriou E. Integrin  $\alpha v \beta 3$  is a pleiotrophin receptor required for pleiotrophin-induced endothelial cell migration through receptor protein tyrosine phosphatase  $\beta/\zeta$ . *FASEB J*. 2009;23:1459-69.
- Pantazaka E, Papadimitriou E. Chondroitin sulfate-cell membrane effectors as regulators of growth factor-mediated vascular and cancer cell migration. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840:2643-50.
- Said EA, Courty J, Svab J, Delbé J, Krust B, Hovanessian AG. Pleiotrophin inhibits HIV infection by binding the cell surface-expressed nucleolin. *FEBS J* 2005; 272:4646-4659.
- Deuel TF. Anaplastic lymphoma kinase: 'Ligand Independent Activation' mediated by the PTN/RPTP $\beta/\zeta$  signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1834:2219-23.
- Schinke T, Gebauer M, Schilling AF, Lamprianou S, Priemel M, Mueldner C, et al. The protein tyrosine phosphatase Rptpzeta is expressed in differentiated osteoblasts and affects bone formation in mice. *Bone*. 2008;42:524-34.
- Panicker N, Saminathan H, Jin H, Neal M, Harischandra DS, Gordon R, et al. Fyn kinase regulates microglial neuroinflammatory responses in cell culture and animal models of parkinson's disease. *J Neurosci* 2015;35:10058-10077.
- Xi G, Demambro VE, D'costa S, Xia SK, Cox ZC, Rosen CJ, et al. Estrogen stimulation of pleiotrophin enhances osteoblast differentiation and maintains bone mass in IGFBP-2 null mice. *Endocrinology*. 2020;161(4):bqz007.
- Huang C, Ni Y, Wang T, Gao Y, Haudenschild CC, Zhan X. Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997;272:13911-5.
- Perez-Pinera P, Berenson JR, Deuel TF. Pleiotrophin, a multifunctional angiogenic factor: Mechanisms and pathways in normal and pathological angiogenesis. *Curr Opin Hematol*. 2008;15:210-4.
- Rauvala H. An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J* 1989;8:2933-41.
- Fernández-Calle R, Vicente-Rodríguez M, Gramage E, Pita J, Pérez-García C, Ferrer-Alcón M, et al. Pleiotrophin regulates microglia-mediated neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):46.
- Tare RS, Oreffo ROC, Clarke NMP, Roach HI. Pleiotrophin/osteoblast-stimulating factor 1: Dissecting its diverse functions in bone formation. *J Bone Miner Res*. 2002;17:2009-20.
- Bouderlique T, Henault E, Lebouvier A, Frescaline G, Bierling P, Rouard H, et al. Pleiotrophin commits human bone marrow mesenchymal stromal cells towards hypotrophy during chondrogenesis. *PLoS One*. 2014;9:e88287.
- Yang X, Tare RS, Partridge KA, Roach HI, Clarke NMP, Howdle SM, et al. Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering. *J Bone Miner Res*. 2003;18:47-57.
- Lehmann W, Schinke T, Schilling AF, Catalá-Lehnen P, Gebauer M, Pogoda P, et al. Absence of mouse pleiotrophin does not affect bone formation in vivo. *Bone*. 2004;35:1247-55.
- Imai S, Heino TJ, Hienola A, Kurata K, Büki K, Matsusue Y, et al. Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin) is associated with bone formation and mechanical loading. *Bone*. 2009;44:785-94.
- Neunaber C, Catalá-Lehnen P, Beil FT, Marshall RP, Kanbach V, Baranowsky A, et al. Increased trabecular bone formation in mice lacking the growth factor midkine. *J Bone Miner Res*. 2010;25:1724-35.
- Tavella S, Ruggiu A, Giuliani A, Brun F, Canciani B, Manescu A, et al. Bone turnover in wild type and pleiotrophin-transgenic mice housed for three months in the international space station (ISS). *PLoS One*. 2012;7:e33179.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-8.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008;3:1101-8.
- 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.
- Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci*. 2007;12:3068-92.
- Nikel O, Laurencin D, McCallum SA, Gundberg CM, Vashishth D. NMR investigation of the role of osteocalcin and osteopontin at the organic-inorganic interface in bone. *Langmuir*. 2013;29:13873-82.
- Weinreb M, Shinar D, Rodan GA. Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J Bone Miner Res*. 1990;5:831-42.
- Wei J, Karsenty G. An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Rev Endoc Metab Disord*. 2015;16:93-8.
- Diegel CR, Hann S, Ayturk UM, Hu JCW, Lim KE, Droscha CJ, et al. An osteocalcin-deficient mouse strain without en-

- doocrine abnormalities. *PLoS Genet.* 2020;16 (5):e1008361.
39. Moriishi T, Ozasa R, Ishimoto T, Nakano T, Hasegawa T, Miyazaki T, et al. Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. *PLoS Genet* 2020;16 (5):e1008586.
40. Uy HL, Guise TA, Mata JD La, Taylor SD, Story BM, Dallas MR, et al. Effects of parathyroid hormone (pth)-related protein and pth on osteoclasts and osteoclast precursors in vivo. *Endocrinology.* 1995;136:3207-12.
41. Lu Y, Xiao G, Galson DL, Nishio Y, Mizokami A, Keller ET, et al. PTHrP-induced MCP-1 production by human bone marrow endothelial cells and osteoblasts promotes osteoclast differentiation and prostate cancer cell proliferation and invasion in vitro. *Int J Cancer.* 2007; 121:724-33.
42. Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, Kotha S, Dallas M, Lu Y, et al. E11/gp38 Selective Expression in Osteocytes: Regulation by Mechanical Strain and Role in Dendrite Elongation. *Mol Cell Biol.* 2006;26:4539-52.
43. Ariizumi T, Ogose A, Kawashima H, Hotta T, Li G, Xu Y, et al. Expression of podoplanin in human bone and bone tumors: New marker of osteogenic and chondrogenic bone tumors. *Pathol Int.* 2010;60:193-202.
44. Quintanilla M, Montero LM, Renart J, Villar EM. Podoplanin in inflammation and cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20 (3):707.
45. Willebrords J, Crespo Yanguas S, Maes M, Decroock E, Wang N, Leybaert L, et al. Connexins and their channels in inflammation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2016;51:413-39.
46. Casagrande D, Stains JP, Murthi AM. Identification of shoulder osteoarthritis biomarkers: Comparison between shoulders with and without osteoarthritis. *J Shoulder Elb Surg.* 2015; 24:382-90.
47. Tsuchida S, Arai Y, Kishida T, Takahashi KA, Honjo K, Terauchi R, et al. Silencing the expression of connexin 43 decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. *J Orthop Res.* 2013;31:525-30.
48. Yu K, Ma Y, Li X, Wu X, Liu W, Li X, et al. Lipopolysaccharide increases IL-6 secretion via activation of the ERK1/2 signaling pathway to up-regulate RANKL gene expression in MLO-Y4 cells. *Cell Biol Int.* 2017;41:84-92.
49. Aquino-Martinez R, Rowsey JL, Fraser DG, Eckhardt BA, Khosla S, Farr JN, et al. LPS-induced premature osteocyte senescence: Implications in inflammatory alveolar bone loss and periodontal disease pathogenesis. *Bone.* 2020; 132:115220.

# Displasia fibrosa simulando metástasis costal

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000300006>

**García-Gómez FJ, de la Riva-Pérez PA, Calvo-Morón MC**

*Servicio de Medicina Nuclear. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla (España)*

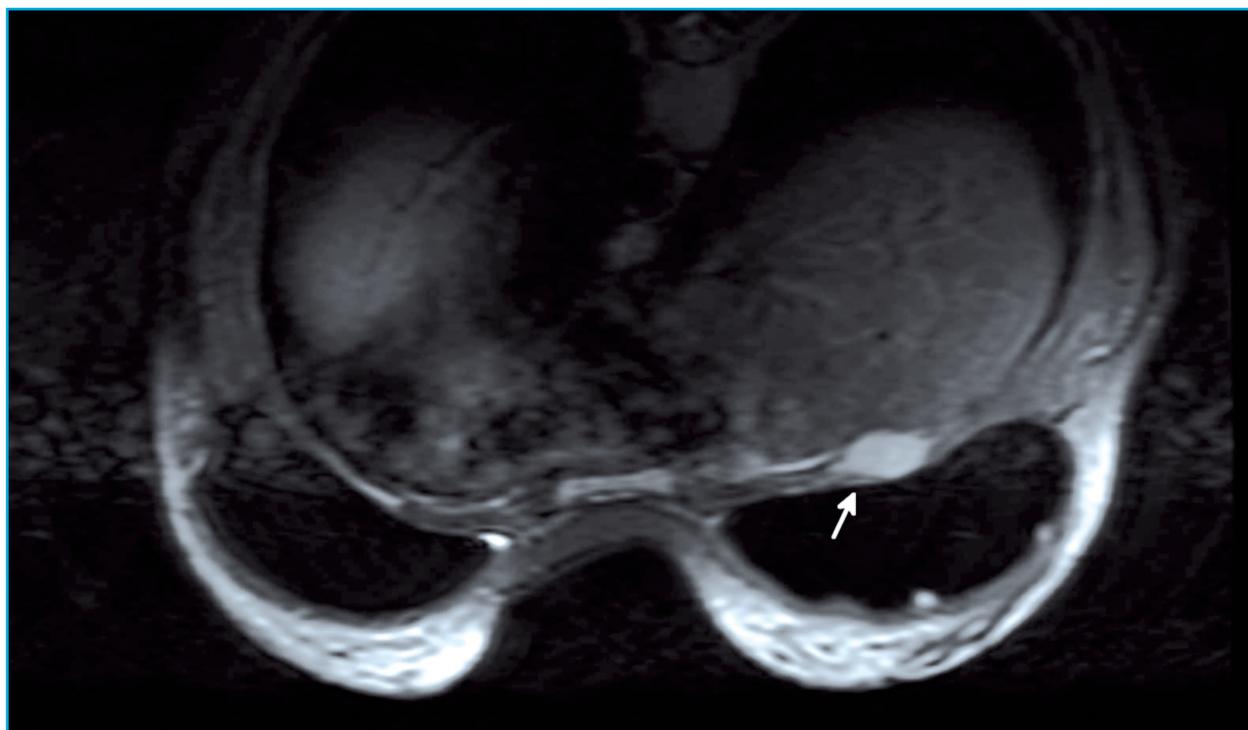
Fecha de recepción: 02/08/2020 - Fecha de aceptación: 15/09/2020

Presentamos las imágenes diagnósticas de una mujer de 30 años, portadora asintomática de mutación BRCA1 y en seguimiento clínico-radiológico por fibroadenomas mamarios bilaterales. En la resonancia magnética de control (Figura 1) destacó la aparición una lesión nodular posterior a la prótesis mamaria derecha, relativamente bien delimitada y de contornos lobulados. Ante la sospecha de enfermedad ósea metastásica, se realizó una tomografía por emisión de positrones (PET/CT) con 18F-fluorodesoxiglucosa (18F-FDG) para valorar su actividad metabólica y extensión de la enfermedad, siendo esta la única lesión activa, con un diámetro de 2,6 cm y alta actividad metabólica, estando localizada en cuarto arco costal derecho (Figura 2). En este contexto, se prac-

ticó exéresis de la lesión para descartar etiología neoplásica, demostrándose en el estudio anatomopatológico que se trataba de displasia fibrosa, una enfermedad pseudotumoral benigna y lentamente progresiva, y que representa menos del 5% de los tumores óseos.

La displasia fibrosa se caracteriza por la sustitución de tejido óseo normal por tejido conectivo osteofibroso, adoptando un patrón esclerótico, quístico-lítico o mixto<sup>1,2</sup>. La enfermedad se debe a un desequilibrio en la función de las células osteogénicas, desencadenando en lesiones osteolíticas expansivas que afectan al hueso normal adyacente y al tejido fibroso<sup>1</sup>. La variante monostótica supone el 70% de los casos, pudiendo ser asintomáticas y detectarse de forma casual<sup>2</sup>. En las formas monostóticas

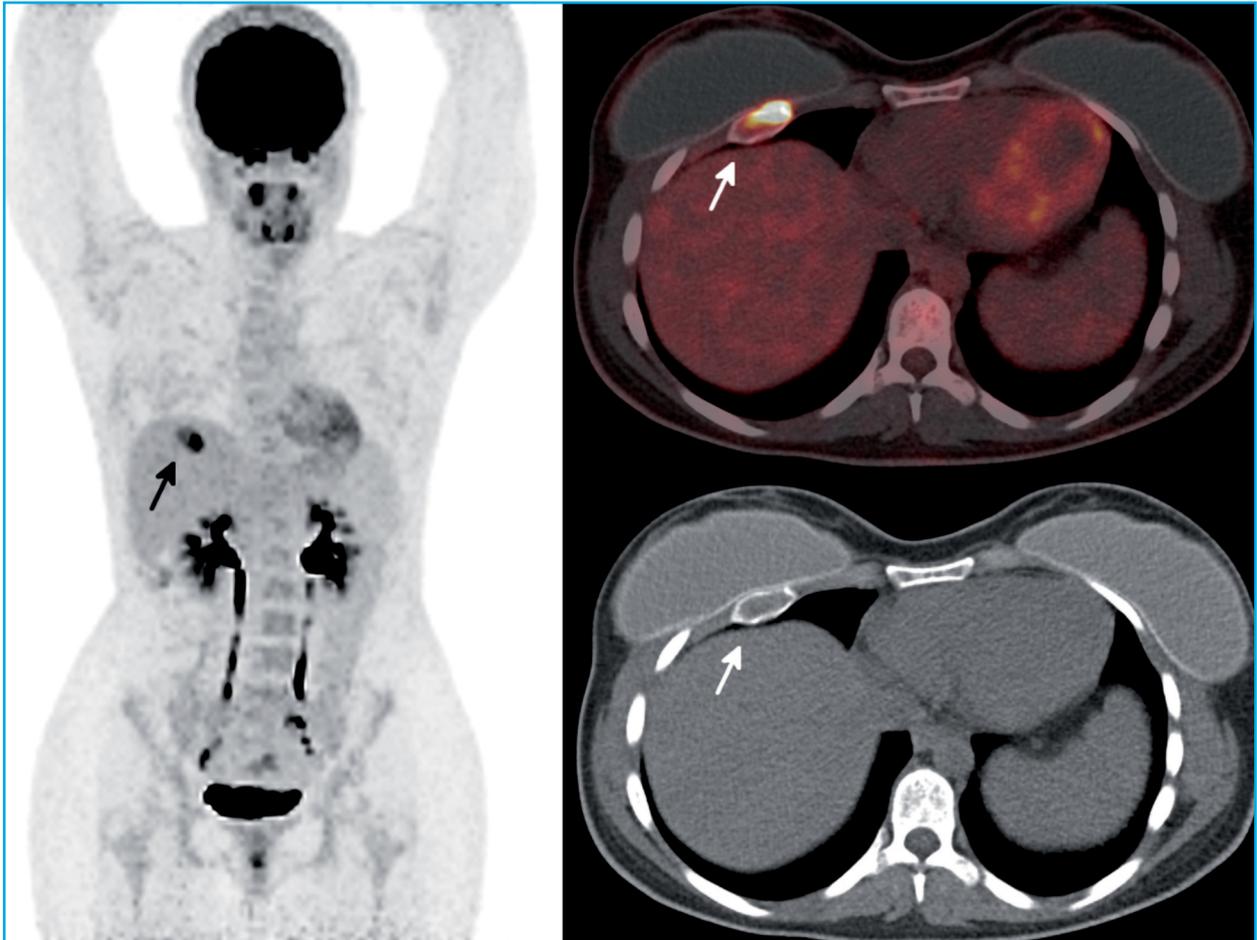
**Figura 1. Resonancia magnética en la que se aprecia lesión nodular en pared torácica anterior derecha (flecha), posterior a la prótesis mamaria, con intenso realce con el contraste, captación rápida intensa y lavado precoz, compatible con posible naturaleza neoformativa primaria o secundaria, sin descartar otras opciones diagnósticas**



los huesos que se afectan con más frecuencia son, por orden decreciente, los maxilares, el fémur proximal, la tibia, el húmero, las costillas, la calota craneal, el radio y el iliaco<sup>1,2</sup>. En su diagnóstico serán de utilidad las técnicas de diagnóstico por imagen. Al tratarse de lesiones con alta tasa de recambio óseo, mostrarán una elevada

captación tanto en gammagrafía ósea como en PET/CT, convirtiéndolas en técnicas cruciales en la determinación objetiva de la extensión, actividad metabólica y predecir la evolución de la enfermedad<sup>3,4</sup>. Cuando existan dudas en el diagnóstico, puede realizarse una biopsia o exéresis ósea con estudio mutacional.

**Figura 2.** PET/CT con 18F-FDG, en la que destaca una única lesión hipermetabólica circunscrita al tercio anterior del cuarto arco costal derecho (flecha), con muy elevada actividad metabólica (SUVmáx: 15.5)



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

## Bibliografía

1. Lacombe Latre EM, Sánchez Lalana E, Bescós Marín JM. Fibrous rib dysplasia. *Med Clin (Barc)*. 2017;148(9):e51.
2. Florez H, Peris P, Guañabens N. Fibrous dysplasia. Clinical review and therapeutic management. *Med Clin (Barc)*. 2016;147(12):547-553.
3. Collins MT, Kushner H, Reynolds JC, Chebli C, Kelly MH, Gupta A, et al. An instrument to measure skeletal burden and predict functional outcome in fibrous dysplasia of bone. *J Bone Miner Res*. 2005;20:219-226.
4. Tuncel M, Kiratli PO, Gedikoglu G. SPECT-CT imaging of poliostotic fibrous dysplasia. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*. 2012;31:47-48.

# Aceite de oliva y salud ósea

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000300007>

Rubert M<sup>1</sup>, Torrubia B<sup>2</sup>, Díaz-Curiel M<sup>3</sup>, de la Piedra C<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Equipo de Soporte Hospitalario. Cuidados Paliativos. Hospital Universitario de Móstoles. Móstoles. Madrid (España)

<sup>2</sup> Bioquímica Investigación. Instituto de Investigaciones Médicas. Fundación Jiménez Díaz. Madrid (España)

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Interna. Instituto de Investigaciones Médicas. Fundación Jiménez Díaz. Madrid (España)

## Resumen

**Objetivo:** Existen en la literatura una serie de trabajos que demuestran que la incidencia de osteoporosis y fracturas asociadas es menor en países en los que la dieta mediterránea es predominante. El aceite de oliva es la principal característica común de toda la dieta mediterránea suponiendo un tercio de la ingesta de grasas vegetales. Se ha realizado una amplia revisión de trabajos que demuestran que la ingesta de aceite de oliva, tanto en animales de experimentación, en especial ratas ovariectomizadas, como en humanos, produce acciones positivas sobre el hueso. Se han revisado los efectos de diferentes componentes del aceite de oliva virgen como la oleuropeína, un compuesto fenólico, y otros alcoholes fenólicos como el tirosol y el hidrotirosol. La oleuropeína no sólo ejerce acciones sobre el hueso de ratas ovariectomizadas, sino que produce acciones sobre la formación de osteoblastos y descende la formación de células "osteoclasto-like". Los compuestos fenólicos del aceite de oliva han demostrado ejercer acciones anti-oxidantes *in vitro* e *in vivo*. El tirosol y el hidrotirosol ejercen acciones sobre la pérdida de hueso en ratas ovariectomizadas e inhiben la formación de osteoclastos de modo dosis-dependiente. Un trabajo realizado por nuestro grupo ha demostrado que el aceite de oliva virgen ejerce también acciones sobre los parámetros biomecánicos del hueso como el módulo de Young y la dimensión fractal en ratas ovariectomizadas. Los resultados de esta revisión muestran que el aceite de oliva ejerce una acción positiva sobre la salud ósea. Sus componentes poseen propiedades anti-oxidantes y anti-inflamatorias, siendo candidatos potenciales para la prevención de la osteoporosis.

**Palabras clave:** osteoporosis, aceite de oliva virgen, oleuropeína, tirosol, hidrotirosol.

## INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es la enfermedad ósea que más afecta al ser humano y predispone a una persona a presentar fracturas. Constituye un serio problema de salud pública debido al impacto que tiene sobre la calidad de vida de los pacientes y por la carga económica que representa: se ha calculado que la osteoporosis afecta a más de 200 millones de personas<sup>1</sup>. Por ello, resulta de extraordinaria importancia tomar todas las medidas posibles para mitigar su desarrollo.

El modelado y el remodelado óseo vienen determinados, entre otros factores, por el estatus nutricional<sup>2</sup>. La nutrición tiene efectos relevantes sobre el pico de masa ósea, la pérdida ósea con la edad y la fuerza muscular<sup>3</sup>. Por supuesto, los principales nutrientes para el hueso son el calcio y la vitamina D<sup>4</sup>, ya que el calcio es el componente mayoritario del hueso y su aporte está regulado por la vitamina D, optimizando, por tanto, el pico de masa ósea. Sin embargo, la Unión Europea ha indicado la relevancia de otros nutrientes sobre el desarrollo óseo y la conveniencia de realizar investigaciones de estos sobre el desarrollo del hueso<sup>5</sup>. La principal ventaja de la nutrición a la hora de evaluar su importancia para la salud ósea es que puede ser modificable.

La dieta mediterránea se caracteriza por una alta ingesta de frutas, vegetales y aceite de oliva. La incidencia de osteoporosis y fracturas asociadas parece ser menos en países en que la dieta mediterránea es predominante<sup>6</sup>.

En este trabajo nos vamos a centrar en el aceite de oliva, que es la principal característica común de toda la dieta mediterránea, suponiendo un tercio de la ingesta de grasas vegetales<sup>7</sup>.

El aceite de oliva contiene ácido oleico (C1 8:1) (55 – 83%), ácido palmítico (C1 6:0) (7,5 – 20%), ácido linoleico (C1 8:2) (3,5 – 21%), y más de otros 200 compuestos químicos<sup>8</sup>. Además de los triglicéridos, nos interesa destacar aquí los compuestos fenólicos. La oleuropeína es el principal compuesto fenólico en las hojas del olivo, aceitunas y aceite de oliva, con una cantidad en el mismo entre 1 ppb y 11 ppm. Un grupo de compuestos bioactivos muy importantes del aceite de oliva son los alcoholes fenólicos como el tirosol y el hidrotirosol<sup>9</sup>. También son abundantes los flavonoides, uno de los cuales es la luteína<sup>10</sup>. En general, en este trabajo nos vamos a centrar en el aceite de oliva virgen, porque el aceite de oliva refinado no contiene polifenoles, que, como veremos más adelante, se ha demostrado ejercen importantes acciones positivas sobre el hueso.



## EFEECTO DE LA DIETA MEDITERRÁNEA SOBRE EL HUESO

Savanelli y cols.<sup>11</sup> realizaron un estudio en 418 personas sanas (105 hombres y 313 mujeres) entre 50±14 años de edad. Los resultados demostraron una correlación positiva entre salud ósea y adherencia a la dieta mediterránea (mayor consumo de aceite de oliva virgen, vegetales, fruta, legumbres, pescado), siendo asociada negativamente con el consumo de carne roja, sugiriendo que la mayor adherencia a la dieta mediterránea favorece la salud del hueso.

Silva y cols.<sup>12</sup> estudiaron 105 mujeres sanas postmenopáusicas entre 45 y 65 años de edad. Aquellas que presentaban una mayor adherencia a la dieta mediterránea presentaban mayores valores de densidad mineral ósea (DMO) lumbar (1,076±0,146 vs. 0,997±0,143 g/cm<sup>2</sup>, p= 0,007). Se demuestra así que la adherencia a la dieta mediterránea está positivamente asociada a mayores valores de DMO en una región no mediterránea, ya que este trabajo se realizó en Brasil. La adherencia a la dieta mediterránea se ha asociado con un descenso de la incidencia de fracturas en el *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study* que comprendía 188.795 sujetos seguidos durante 9 años<sup>13</sup>. Keiler y cols.<sup>6</sup> describieron que la incidencia de osteoporosis y fracturas asociadas es menor en países en los que la dieta mediterránea es predominante. Kontogianni y cols.<sup>14</sup> demostraron que la adherencia a la dieta mediterránea estaba relacionada positivamente con la masa ósea sugiriendo potenciales propiedades de preservación ósea de la misma.

Se ha demostrado también que la adherencia a la dieta mediterránea tiene efectos beneficiosos sobre la DMO en el calcáneo, medida por absorciometría dual de rayos X (DXA) en una muestra de mujeres sanas del sur de España<sup>15</sup>. De la misma manera se ha demostrado una menor incidencia de fracturas en Grecia, donde se consume una mayor proporción de aceite de oliva que en EE.UU. o en los países del norte de Europa<sup>16</sup>. Sin embargo, en una población anciana de Francia, una dieta de tipo mediterráneo no se asoció con un descenso en el riesgo de fractura<sup>17</sup>.

El problema de la interpretación de estos datos es que no podemos asegurar que sea con toda seguridad el aceite de oliva el que produce los efectos de la dieta mediterránea. Ésta contiene muchas frutas, verduras, pescado..., pero hay autores como Keiler y cols.<sup>6</sup> que tienen casi la completa certeza de que estos efectos positivos se deben a los compuestos activos del aceite de oliva virgen y especialmente a los compuestos fenólicos. En los trabajos que vamos a presentar a continuación ya sí nos vamos a centrar en los efectos del propio aceite o de sus componentes.

Existe una amplia literatura que demuestra los efectos positivos del aceite de oliva sobre el hueso en animales de experimentación. Ostrowska y cols.<sup>18</sup> administraron aceite de oliva virgen (19% peso/peso) a cerdos y observaron un incremento de 6,28 mg/cm<sup>2</sup> de DMO/día en dichos animales. Bullon y cols.<sup>19</sup> demostraron que una dieta basada en aceite de oliva virgen prevenía la resorción alveolar debida a la edad en ratas mediante un mecanismo mitocondrial. En un interesante trabajo Saleh y cols.<sup>20</sup> administraron a ratas Wistar hembras de 12-14 meses aceite de oliva virgen (1 ml/kg de peso corporal) durante 12 semanas, 4 antes de la ovariectomía y 8 semanas después. Las ratas ovariectomizadas mostraron un descenso significativo en el calcio plasmático y un aumento en la fosfatasa alcalina, malondialdehído y niveles de nitratos

(estos dos últimos indicando una reducción del estrés oxidativo). Estos cambios fueron atenuados por el aceite de oliva. La tibia de las ratas ovariectomizadas mostró un descenso de la anchura cortical y del espesor trabecular y un incremento significativo en el número de osteoclastos. Estos parámetros mejoraron considerablemente en el grupo tratado con aceite de oliva.

Reza y cols.<sup>21</sup> observaron que, sustituyendo los lípidos de la dieta por aceite de oliva durante 6 semanas, aumentaban la longitud femoral, el volumen y la DMO en ratones. Liu y cols.<sup>22</sup> compararon la efectividad del tratamiento con aceite (1 ml/100 g de dieta) y con dietilestilbestrol (25 µg/kg de dieta), un estrógeno sintético, para mimetizar la terapia de reemplazamiento hormonal en los humanos. Ambos tratamientos produjeron un aumento de la DMO lumbar y del fémur en ratas ovariectomizadas. Esto podría ser debido a un descenso del estrés oxidativo en los grupos tratados, señalado por el malondialdehído y los niveles de nitrato.

En contraposición con estos resultados, Tagliaferri y cols.<sup>23</sup> encontraron que para paliar la pérdida ósea inducida por la ovariectomía en ratas no basta el aceite de oliva virgen, sino que es necesaria la adición de un suplemento de vitamina D.

En un trabajo realizado en humanos, Roncero Martín y cols.<sup>24</sup> administraron a 523 mujeres de una edad media de 50 años (entre 23 y 81) aceite de oliva virgen. Las mujeres se dividieron en dos grupos: las que ingerían más de 18,32 g/día de aceite y las que ingerían menos de esa cantidad. Observaron un aumento significativo de la DMO (p<0,001) en el grupo con mayor ingesta de aceite de oliva.

Liu y cols.<sup>22</sup> realizaron un trabajo en mujeres entre 30 y 50 años que habían sido histerectomizadas. Un grupo fue tratado con 50 ml de aceite de oliva diariamente y otro grupo control no recibió ningún suplemento. Después de 1 año, la DMO de la L2, L3 y L4 y del fémur izquierdo descendió significativamente en el grupo control y no en el tratado con aceite.

## EFECTOS DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL ACEITE DE OLIVA SOBRE LA SALUD ÓSEA

Puel y cols.<sup>25</sup> evaluaron los efectos de la oleuropeína en un modelo de ratas ovariectomizadas con y sin inflamación. Este compuesto fenólico (0,15 g oleuropeína/kg/día) era capaz de ejercer efectos positivos sobre la pérdida de masa ósea en las ratas con inflamación, pero no en las que no tenían inflamación.

La oleuropeína aumenta la formación de osteoblastos a partir de las células madre de la médula ósea y desciende la generación de adipocitos y células grasas, sugiriendo que la ingesta de oleuropeína podría tener efectos preventivos contra la pérdida de hueso asociada a la osteoporosis y a la edad<sup>26</sup>.

En términos de resorción ósea, la oleuropeína a 10 µM descendió la formación de células "osteoclasto-like" (positivas a la fosfatasa ácida tartrato resistente) en un cultivo de células de bazo. A una concentración de 50 µM y 100 µM, la oleuropeína suprimió completamente la formación de estas células *in vitro*<sup>27</sup>.

García Martínez y cols.<sup>28</sup> investigaron los efectos de los extractos fenólicos del aceite de oliva virgen siciliano sobre el crecimiento de los osteoblastos utilizando para ello la línea de osteosarcoma MG-63. El tratamiento de las células osteoblásticas con los extractos fenólicos aumentó el número de células entre un 13,77 y un 30,98% con respecto a los controles.

Células de la misma línea MG-63 fueron cultivadas durante 24 h con  $10^{-6}$  M de los compuestos fenólicos ácido fenílico, ácido cafeico, ácido cumárico, apigenina o luteolina. La expresión por las células MG-63 de los marcadores de crecimiento y diferenciación/maduración se modificó después del tratamiento con  $10^{-6}$  M de los compuestos fenólicos antes mencionados, incrementándose la expresión génica del factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF-  $\beta 1$ ), el receptor TGF1, 2 y 3, la proteína morfogenética ósea 2 y 7, el factor de transcripción-run 2, la fosfatasa alcalina, osteocalcina, colágeno tipo I y osteoprotegerina. Se puede afirmar que los componentes fenólicos del aceite de oliva virgen tienen un efecto beneficioso sobre el hueso modulando la fisiología del osteoblasto, lo que apoya su efecto protector contra las patologías óseas<sup>29</sup>.

Los compuestos fenólicos del aceite de oliva han demostrado poseer propiedades antioxidantes *in vivo* e *in vitro*<sup>30,31</sup>. La toma de fenoles puede influenciar la DMO actuando como radicales libres, previniendo el daño inducido por la oxidación sobre las células óseas.

Una amplia revisión realizada desde el año 2001 al 2014 en las bases de datos del MEDLINE L'EMBASE y la *Cochrane Library*, usando como entradas "dieta mediterránea", "aceite de oliva virgen", "fenoles", "hueso", "osteoblastos" y "osteoporosis", sugiere que los fenoles del aceite de oliva pueden ser beneficiosos para prevenir la pérdida de masa ósea. Se ha demostrado que pueden inducir la capacidad proliferativa y la maduración celular de los osteoblastos incrementando la actividad fosfatasa alcalina y depositando iones de calcio en la matriz extracelular<sup>28</sup>.

Antes mencionamos los alcoholes fenólicos, el tirosol y el hidroxitirosol, como componentes del aceite de oliva. Se ha comprobado que el hidroxitirosol elimina la pérdida de hueso trabecular en fémures de ratas ovariectomizadas<sup>27</sup>. Por otra parte, el hidroxitirosol a concentraciones de entre 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M inhibe la formación de osteoclastos multinucleados de modo dosis-dependiente. En un cultivo de células de bazo el hidroxitirosol (50 y 100  $\mu$ M) y el tirosol (100  $\mu$ M) redujeron la formación de fosfatasa ácida-tartrato-resistente celular<sup>27</sup>.

Aunque, como hemos mencionado, existen diversos trabajos en la literatura en los que se demuestra que el tratamiento con aceite de oliva aumenta la DMO, no se

ha podido demostrar que se haya producido un aumento en los parámetros biomecánicos<sup>32,33</sup>. Sin embargo, en un trabajo realizado recientemente por nuestro grupo<sup>34</sup> hemos tratado a un grupo de ratas Wistar de 6 meses de edad ovariectomizadas con aceite de oliva por sonda oral durante 3 meses (100  $\mu$ l/día ó 200  $\mu$ l/día). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con 100  $\mu$ l de aceite de oliva recuperó el valor del módulo de Young en el eje x, que había descendido con la ovariectomía y el tratamiento con 200  $\mu$ l de aceite produjo una mejora en el eje z del módulo de Young con respecto a las ratas ovariectomizadas, es decir, que el aceite de oliva influyó sobre los parámetros biomecánicos. En este mismo trabajo encontramos que los grupos tratados con 200  $\mu$ l de aceite de oliva presentaron un valor de la dimensión fractal D2D y D3D mayor que el de las ratas ovariectomizadas. La dimensión fractal expresa el grado de complejidad del contorno de una estructura en el llenado de una superficie o volumen. Estos resultados indican que la composición del hueso de las ratas tratadas con 200  $\mu$ l de aceite de oliva virgen es más compleja y más irregular y, por esta razón, más similar al hueso normal. A pesar de estas mejoras en la salud ósea en nuestro trabajo no encontramos diferencias en la DMO de las ratas tratadas ni en los parámetros micromorfométricos, pero no se pueden desestimar los resultados obtenidos en el módulo de Young y en la dimensión fractal que indican una mejora en la calidad ósea de las ratas ovariectomizadas tratadas. Es importante destacar que en nuestro trabajo damos a las ratas 100  $\mu$ l ó 200  $\mu$ l de aceite de oliva virgen/día. Teniendo en cuenta que las ratas pesaban 320 g al principio del estudio, ello equivaldría a dar 18,7 ó 37 ml de aceite de oliva/día a una persona de 60 kg, una dosis que podría ser consumida normalmente. Muchos de los trabajos experimentales publicados suministran a las ratas una cantidad de aceite muy elevada en relación de lo que podría ser la dieta normal de una persona.

Los resultados de esta revisión muestran, sin lugar a duda, que el aceite de oliva virgen ejerce una acción positiva sobre la salud ósea. Posiblemente ello se deba a la acción de sus componentes fenólicos que incluyen oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol. Se ha demostrado que estos agentes tienen propiedades anti-oxidantes y anti-inflamatorias, y que, por ello, pueden ser candidatos potenciales para la prevención de la osteoporosis.



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

## Bibliografía

- Cooper C, Harvey N, Dennison E. Worldwide epidemiology of osteoporotic fractures. En: Reginster J-Y & Rizzoli, R. (Eds). *Innovations in skeletal medicine*. Elsevier Masson S. A. S., Cedex, France. 2008: pp 95-112.
- Bonjour JP. Protein intake and bone health. *Int J Vitamin Nutr Res*. 2011; 81:134-142.
- García-Martínez O, Rivas A, Ramos-Torrecilla J, De Luna-Bertos E, Ruiz C. The effect of olive oil on osteoporosis prevention. *Int J Food Sci Nutr*. 2014; 65:834-40.
- Pedrerá-Zamorano JD, Calderón-García JF, Roncero-Martín R, Mañas-Núñez P, Morán JM, Lavado-García JM. The protective effect of calcium on bone mass in postmenopausal women with high selenium intake. *J Nutr Health Aging*. 2012;16:743-748.
- Díaz Curiel M, Gil A, Mataix J. *Nutrición y salud ósea*. Madrid, España: Sociedad Española de Investigaciones Óseas y Metabolismo Mineral. Instituto Omega 3 y Fundación Hispana de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas. 2004
- Keiler AM, Zierau O, Bernhardt R, Scharnweber D, Lemonakis N, Termetzi A, et al. Impact of a functionalized olive oil extract on the uterus and the bone in a model of postmenopausal osteoporosis. *Eur J Nutr*. 2014;53: 1073-1081.
- Pelucci C, Bosetti C, Negri E, Lipworth L, La Vecchia C. Olive oil and cancer risk: an update of epidemiological findings. *Curr Pharm Design*. 2010;17:805-812.
- Boskou D, Blekas G, Tsimidou M. Olive oil composition. En: Boskou D ed. *Olive oil, chemistry and technology* second edition. AOCS Press Champaign, 2006, Illinois 41-72.
- Kanakis P, Termetzi A, Michel T, Gikas E, Halabaki M, Skaltsounis AL. From olive drupes to olive oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta Med*. 2013;79:1576-1587.
- Kim TH, Jung JW, Ha BG, Hong JM, Park EK, Kim HJ et al. The effects of luteolin on osteoclast differentiation function in vitro and ovariectomy-induced bone loss. *J Nutr Biochem*. 2011;22:8-15.
- Savanelli MC, Barrea L, Macchia PE, Savastano S, Falco A, Renzullo A, et al. Preliminary results demonstrating the impact of Mediterranean diet on bone health. *J Transl Med*. 2017;15: 81.
- Silva TDR, Martins CC, Ferreira LL, Spritzer PM. Mediterranean diet is associated with bone mineral density and muscle mass in postmenopausal women. *Climateric*. 2019;22:162-168.
- Benetou V, Orfanos P, Pettersson-Kymmer U, Bergstrom U, Svensson O, Johanson I, et al. Mediterranean diet and incidence of hip fractures in an European cohort. *Osteoporosis Int*. 2013;24:1587-1598.
- Kontogianni MD, Melistas L, Yannakoulia , Malagaris I, Panagiotakos DB, Yiannakouris N. Association between dietary patterns and indices of bone mass in a sample of Mediterranean women. *Nutrition*. 2009;25:165-171.
- Rivas A, Romero A, Mariscal-Arcas M, Monteagudo C, Feriche B, Lorenzo ML, et al. Mediterranean diet and bone mineral density in two age groups of women. *Int J Food Sci Nutr*. 2013;64: 155-161.
- Trichopoulou A, Georgiou E, Bassiakos Y, Lipworth L, Lagiou P, Proukakis C, et al. Energy intake and monounsaturated fat in relation to bone mineral density among women and men in Greece. *Prev Med*. 1997;26:395-400.
- Feart C, Lorrain S, Ginder CV, Samieri C, Letenneur L, Paineau D, et al. Adherence to a Mediterranean diet and risk of fractures in French older persons. *Osteoporosis Int*. 2013;3031-3041.
- Ostrowska E, Gabler NK, Ridley D, Suster D, Eagling DR, Dunshea FR. Extravirgin and refined olive oil decrease plasma triglyceride, moderately affect lipoprotein oxidation susceptibility and increase bone density in growing pigs. *J Sci Food Agric*. 2006;86:1955-1963.
- Bullon P, Battino M, Varela-lópez A, Pérez-López P, Granados-Principal S, Ramirez-Tortosa MC, et al. Diets based in virgin olive oil or fish oil but not on sunflower oil prevent age-related alveolar bone resorption by mitochondrial-related mechanism. 2013; *Plos One* 8: e74234.
- Saleh NK, Saleh HA. Olive oil effectively mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2011;11:10.
- Rezq AA, Labib FA, Attia AEM. Effect of some dietary oils and fats on serum lipid profile, calcium absorption and bone mineralization in mice. *Pakistan J Nutr*. 2010;9:643-650.
- Liu H, Huang H, Li B, Wu D, Wang F, Zheng XH, et al. Olive oil in the prevention and treatment of osteoporosis after artificial menopause. *Clin Interv Aging*. 2014;9:2087-2095.
- Tagliaferri C, Davicco MJ, Lebecque P, George S, Amiot MJ, Mercier S, et al. Olive oil and vitamin D synergistically prevent bone loss in mice. *PLOS ONE* 2014;9: e115817.
- Roncero-Martín R, Aliaga Vera I, Moreno-Corral LJ, Moran JM, Lavado-García JM, Pedrerá-Zamorano JD, et al. Olive oil consumption and bone microarchitecture in Spanish Women. *Nutrients*. 2018;10:968.
- Puel C, Quintin A, Agalias A, Mathey J, Obled C, Mazur A, et al. Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomized rat. *Br J Nutr*. 2004;92:119-127.
- Santiago-Mora R, Casado-Díaz A, De Castro MD, Quesada-Gómez JM. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporosis Int*. 2011;22:675-684.
- Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur J Pharmacol*. 2011;662:78-84.
- García-Martínez O, Rivas A, Ramos-Torrecilla J, De Luna-Bertos E, Ruiz C. The effect of olive oil on osteoporosis prevention. *Int J Food Sci Nutr*. 2014; 65:834-40.
- Melguizo-Rodríguez L, Manzano Moreno FJ, De Luna-Bertos E, Rivas A, Ramos-Torrecillas J, Ruiz C, et al. Effect of olive phenolic compounds on osteoblast differentiation. *Eur J Clin Invest*. 2018;48.
- Cicerale S, Lucas LJ, Keast RS. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. 2012; *Curr Opin Biotechnol*. 2012;23:129-135.
- Oliveras-López MJ, Molina JJ, Mir MV, Rey EF, Martín F, De la Serrana HL. Extra virgin olive oil consumption and anti-oxidant status in healthy institutionalized elderly humans. *Arch Gerontol Geriatr*. 2013;57:234-242.
- Puel C, Mardon J, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Obled C, et al. Black lucques olives prevented bone loss caused by ovariectomy and talc granulomatosis in rats. *Brit J Nutr*. 2007;97:1012-1020.
- Puel C, Mardon J, Agalias A, Davicco MJ, Lebecque P, Mazur A, et al. Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experiment model. *J Agric Food Chem*. 2008;56:9417-9422.
- Díaz Curiel M, Torrubia B, Martín-Fernández M, Rubert M, De la Piedra C. Effects of virgin olive oil on bone health in ovariectomized rats. *Nutrients*. 2020;12:1270.

