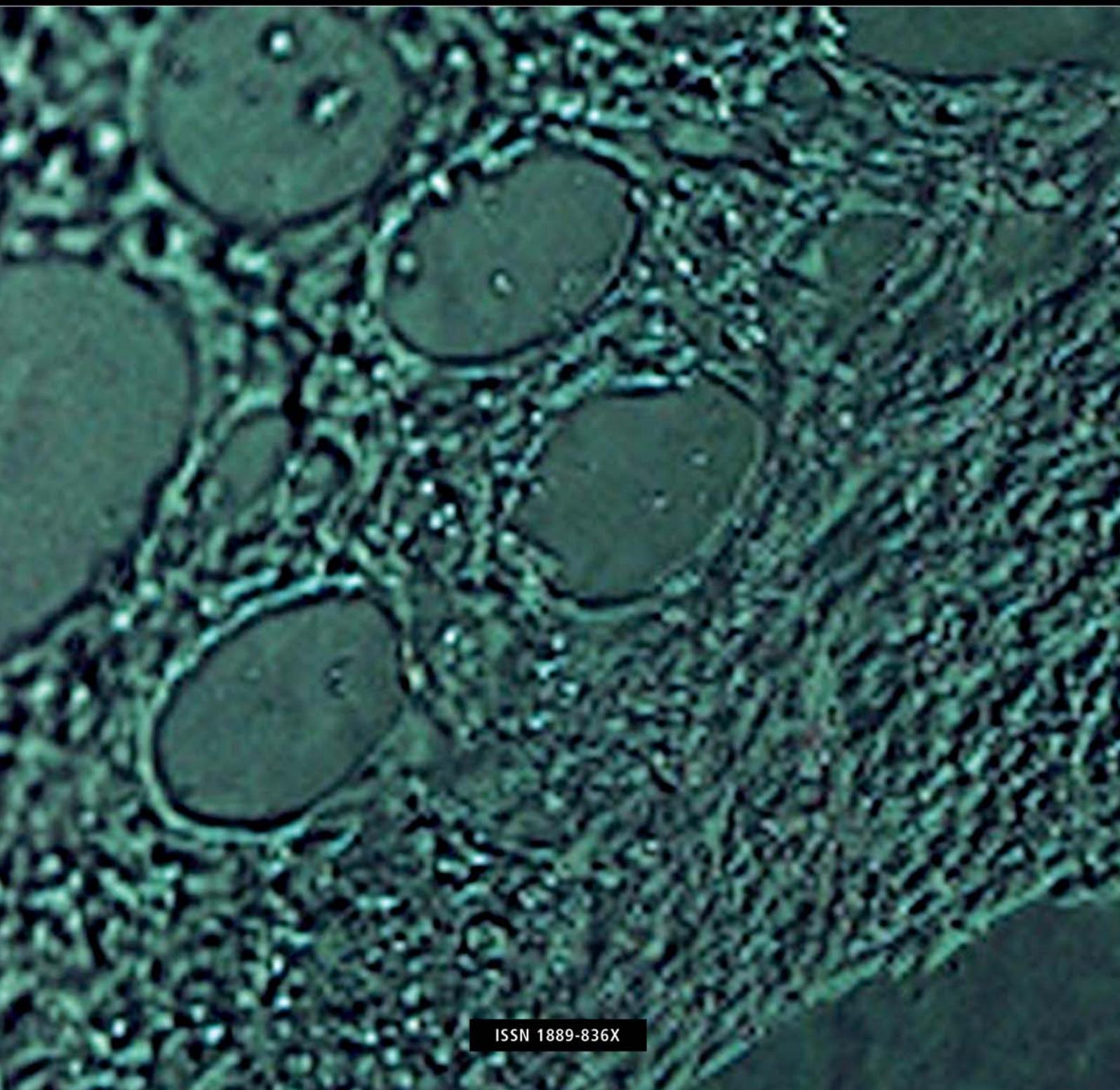
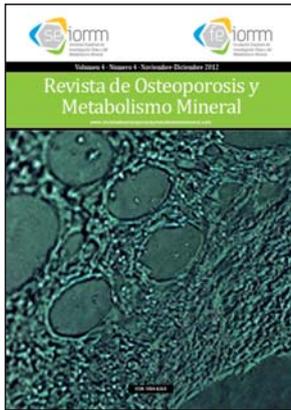


Volumen 4 · Número 4 · Noviembre-Diciembre 2012

Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com





Nuestra portada

Angiogénesis a partir de células endoteliales de la vena del cordón umbilical (HUVEC)

Autores:
Raquel Santiago Mora, Antonio Casado Díaz, y José Manuel Quesada

Director

Manuel Sosa Henríquez

Redactora Jefe

M^a Jesús Gómez de Tejada Romero

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

Presidente

Javier del Pino Montes

Vicepresidente

Josep Blanch Rubio

Secretaria

M^a Jesús Moro Álvarez

Tesorerera

Carmen Valero Díaz de Lamadrid

Paseo de la Castellana, 135 (7^a planta)
28046 Madrid

Tel: +34-917906834

Fax: +34-917906869

e-mail: seiomm@seiomm.org

<http://www.seiomm.org>

Edición



Avda. Reina Victoria, 47 (6^o D)
28003 Madrid

Tel./Fax +34-915 538 297

e-mail: correo@ibanezyplaza.com

<http://www.ibanezyplaza.com>

Maquetación

Concha García García

Traducción inglés

Andrew Stephens

Impresión

Imprenta Narcea

Soporte Válido

32/09-R-CM

Depósito Legal

AS-4777-09

ISSN 1889-836X

SUMARIO

Vol. 4 - Nº 4 - Noviembre-Diciembre 2012

105 EDITORIAL

Esclerostina y hueso en la diabetes mellitus tipo 2
Jódar Gimeno E

109 ORIGINALES

Variables que influyen en las concentraciones de esclerostina en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y su asociación con el metabolismo óseo

García-Martín A, Reyes-García R, Rozas-Moreno P, Varsavsky M, Luque-Fernández I, Avilés-Pérez MD, Muñoz-Torres M

117 Efectos osteogénicos de la PTHrP (107-111) cargada en biocerámicas en un modelo de regeneración ósea tras un defecto cavitario en el fémur de conejo

Lozano D, Trejo CG, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, Dapía S, Caeiro Rey JR, Gómez-Barrena E, Vallet-Regí M, García-Honduvilla N, Buján J, Esbrit P

127 Osteointegración y biocompatibilidad *in vivo* de cerámicas bioinspiradas de carburo de silicio en un modelo experimental en conejo

Guede D, Pereiro I, Solla E, Serra J, López-Peña M, Muñoz F, González-Cantalapiedra A, Caeiro JR, González P

133 Expresión de RANKL y OPG en osteoblastos primarios

Delgado-Calle J, Sañudo C, Sumillera M, Garcés CM, Riancho JA

141 NOTAS CLÍNICAS

Metástasis óseas y compresión medular como debut de carcinoma folicular de tiroides

Civantos Modino S, Navea Aguilera C, Pavón de Paz I, Almodovar Ruiz F, Elviro Peña MR

145 Metástasis costal derecha de adenocarcinoma de próstata

Espasa Font L, Supervía A, Del Baño F, Sarbu MI

149 Crisis hipercalcémica por tumoración paratiroidea compleja: un dilema diagnóstico y quirúrgico

Ovejero Gómez VJ, Díez Muñoz-Alique M, Díez Lizuaín ML, Pérez Martín A, Azcarretazabal González-Ontaneda T, Ingelmo Setien A

154 NORMAS DE PUBLICACIÓN

Envío de originales:

revistadeosteoporosisymetabolismomineral@ibanezyplaza.com

Versión on-line:

<http://www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com>

Comité Editorial

Teresita Bellido, Ph.D.

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

Ernesto Canalis, MD, PhD

St Francis Hospital and Medical Center, Hartford, Connecticut. University of Connecticut. School of Medicine, Farmington, Connecticut. Estados Unidos

Patricia Clark Peralta, MD, PhD

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

Dr. Javier del Pino Montes

Departamento de Medicina. Universidad de Salamanca. Sección de Reumatología. Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca. España

Dr. Manuel Díaz Curiel

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

Dr. Adolfo Díez Pérez

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

Dr. Oswaldo Daniel Messina

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

Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero

(Redactora Jefe)

Universidad de Sevilla. Departamento de Medicina. Sevilla. España

Dr. Manuel Sosa Henríquez

(Director)

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

Comité de Expertos

Pilar Aguado Acín

Javier Alegre López

María José Américo García

Abdón Arbelo Rodríguez

Miguel Arias Paciencia

Emilia Aznar Villacampa

Chesús Beltrán Audera

Pere Benito Ruiz

Santiago Benito Urbina

Miguel Bernard Pineda

Pedro Betancor León

Josep Blanch i Rubió

José Antonio Blázquez Cabrera

José Ramón Caeiro Rey

Javier Calvo Catalá

M^a Jesús Cancelo Hidalgo

Jorge Cannata Andía

Antonio Cano Sánchez

Cristina Carbonell Abella

Jordi Carbonell Abelló

Pedro Carpintero Benítez

Enrique Casado Burgos

Santos Castañeda Sanz

Fidencio Cons Molina

Sonia Dapia Robleda

Bernardino Díaz López

Casimira Domínguez Cabrera

Anna Enjuanes Guardiola

Pedro Esbrit Argüelles

Fernando Escobar Jiménez

José Filgueira Rubio

Jordi Fiter Areste

Juan José García Borrás

Juan Alberto García Vadillo

Eduardo Girona Quesada

Carlos Gómez Alonso

Milagros González Béjar

Jesús González Macías

Emilio González Reimers

Jenaro Graña Gil

Silvana di Gregorio

Daniel Grinberg Vaisman

Nuria Guañabens Gay

Roberto Güerri Fernández

Federico Hawkins Carranza

Diego Hernández Hernández

José Luis Hernández Hernández

Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Esteban Jódar Gimeno

Fernando Lecanda Cordero

Pau Lluç Mezquida

José Andrés López-Herce Cid

M^a Luisa Mariñoso Barba

Guillermo Martínez Díaz-Guerra

María Elena Martínez Rodríguez

Julio Medina Luezas

Leonardo Mellivobsky Saldier

Manuel Mesa Ramos

Pedro Mezquita Raya

Ana Monegal Brancos

Josefa Montoya García

María Jesús Moro Álvarez

Manuel Muñoz Torres

Laura Navarro Casado

Manuel Naves García

José Luis Neyro Bilbao

Xavier Nogués i Solán

Joan Miquel Nolla Solé

José Antonio Olmos Martínez

Norberto Ortego Centeno

Santiago Palacios Gil-Antuñano

Esteban Pérez Alonso

Ramón Pérez Cano

José Luis Pérez Castrillón

Luis Pérez Edo

Pilar Peris Bernal

Concepción de la Piedra Gordo

José Manuel Quesada Gómez

Enrique Raya Álvarez

Rebeca Reyes García

José Antonio Riancho Moral

Luis de Rio Barquero

Luis Rodríguez Arboleya

Minerva Rodríguez García

Antonia Rodríguez Hernández

Manuel Rodríguez Béjar

Montaña Román García

Inmaculada Ros Villamajó

Rafael Sánchez Borrego

Armando Torres Ramírez

Antonio Torrijos Eslava

Carmen Valdés y Llorca

Carmen Valero Díaz de Lamadrid

Ana Weruaga Rey

Jaime Zubieta Tabernero

METODOLOGÍA Y DISEÑO DE DATOS

Pedro Saavedra Santana

José María Limiñana Cañal

SUMMARY Vol. 4 - Nº 4 - November-December 2012

105 EDITORIAL

Sclerostin and bone in diabetes mellitus type 2

Jódar Gimeno E

109 ORIGINALS

Variables which influence concentrations of sclerostin in patients with diabetes mellitus type 2 and its association with bone metabolism

García-Martín A, Reyes-García R, Rozas-Moreno P, Varsavsky M, Luque-Fernández I, Avilés-Pérez MD, Muñoz-Torres M

Osteogenic effects of PTHrP (107-111) loaded in bioceramics in a model of bone regeneration after a cavitary defect in the femur of a rabbit

Lozano D, Trejo CG, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, Dapia S, Caeiro Rey JR, Gómez-Barrena E, Vallet-Regí M, García-Honduvilla N, Buján J, Esbrit P

Osteointegration and biocompatibility *in vivo* of bio-inspired silicon carbide ceramics in an experimental model in rabbits

Guede D, Pereiro I, Solla E, Serra J, López-Peña M, Muñoz F, González-Cantalapiedra A, Caeiro JR, González P

Expression of RANKL and OPG in primary osteoblasts

Delgado-Calle J, Sañudo C, Sumillera M, Garcés CM, Riancho JA

141 CLINICAL NOTES

Bone metastases and cord compression debut as follicular thyroid carcinoma

Civantos Modino S, Navea Aguilera C, Pavón de Paz I, Almodovar Ruiz F, Elviro Peña MR

Costal right metastasis of prostate adenocarcinoma

Espasa Font L, Supervía A, Del Baño F, Sarbu MI

Hypercalcemia crisis due to complex parathyroid tumour: a diagnostic and surgical dilemma

Ovejero Gómez VJ, Díez Muñoz-Alique M, Díez Lizuain ML, Pérez Martín A, Azcarretazabal González-Ontaneda T, Ingelmo Setien A

Revisores Volumen 4 (2012)

Bernardino Díaz López

José Luis Hernández Hernández

Juan José García Borrás

Federico Hawkins Carranza

Manuel Mesa Ramos

Norberto Ortego Centeno

Javier del Pino Montes

Enrique Casado Burgos

M^a Luisa Mariñoso Barba

Sonia Dapia Robleda

Beatriz González López de Valcárcel

Pedro Saavedra Santana

Manuel Sosa Henríquez

Mario Vicente Barrero

José Antonio Blázquez Cabrera

José Antonio Riancho Moral

José Luis Pérez Castrillón

Ana Monegal Brancos

Manuel Naves Díaz

Daniel Grinberg Vaisman

Ana Weruaga Rey

Laura Navarro Casado

Jordi Carbonell Abelló

José Luis Neyro Bilbao

M^a Jesús Cancelo Hidalgo

Guillermo Martínez-Díaz Guerra

Pilar Peris Bernal

Manuel Sosa Henríquez

M^a Jesús Gómez de Tejada Romero

Xavier Nogués i Solán

Jenaro Graña Gil

Pau Lluç Mezquida

Carlos Gómez Alonso

Diego Hernández Hernández

Silvana di Gregorio

Minerva Rodríguez García

Rebeca Reyes García

Esteban Pérez Alonso

Ernesto Canalis

Ramón Pérez Cano

Roberto Carlos Güerri Fernández

Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

La Junta Directiva de la SEIOMM y la Dirección de la Revista les agradece su inestimable colaboración.

Esclerostina y hueso en la diabetes *mellitus* tipo 2

Jódar Gimeno E

Jefe del Servicio de Endocrinología y Nutrición Clínica - Hospital Universitario Quirón - Madrid

Correspondencia: Esteban Jódar Gimeno - Hospital Universitario Quirón - C/Diego de Velázquez, 1 - 28223 Pozuelo de Alarcón - Madrid (España)
Correo electrónico: ejodar.mad@quiron.es

En el presente número, García-Martín y cols.¹ del grupo de trabajo del Dr. Muñoz de Granada publican que los niveles circulantes de esclerostina –la proteína codificada por el gen SOST que inhibe la vía osteoblástica Wnt– dependen del sexo, la edad y la función renal en pacientes con diabetes *mellitus* de tipo 2 (DM2). Además, demuestran, en contra de lo esperado, una relación negativa con los marcadores de remodelado óseo, y positiva con la densidad mineral ósea (DMO). Finalmente, muestran que los niveles séricos de esclerostina son menores en pacientes con DM2 y osteoporosis sin relación con la presencia de fracturas. La DM2 es una enfermedad de alta prevalencia –hasta el 12-15% de la población adulta de nuestro país²– y de enorme impacto sobre la morbimortalidad y sobre la calidad de vida. Es bien conocida su relación con complicaciones microvasculares –retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética– y macrovasculares –enfermedad coronaria arterial, arterial periférica y cerebro-vascular–. En fechas más recientes se han reconocido nuevas complicaciones claramente relacionadas con la diabetes, entre las que la osteoporosis o la enfermedad ósea metabólica de la diabetes es un ejemplo notable. La enfermedad ósea metabólica en los sujetos con DM2 se caracteriza por la presencia de una densidad mineral ósea (DMO) promedio incrementada a pesar de lo cual aparece un número de fracturas –especialmente apendiculares– claramente superior al esperado. Obviamente, esta situación se ha interpretado como una alteración de la calidad ósea, esto es, de las características materiales y estructurales del tejido óseo, relacionada más o menos directamente con la hiperglucemia crónica que sufren los sujetos con DM³. En este sentido, el trabajo de García-Martín y cols.¹ podría indicar que el aumento de esclerostina en sujetos con DM2 supone una reducción del remodelado que,

aunque disminuye la pérdida ósea y aumenta la DMO, origina un hueso bio-mecánicamente menos competente.

Por otra parte, durante la última década se han demostrado nuevas e inesperadas funciones del esqueleto sobre el resto del organismo. Hemos asistido al descubrimiento y caracterización del factor de crecimiento de fibroblastos-23 (FGF23), producido básicamente por los osteocitos, como no sólo un factor fosfatúrico, sino también una hormona de origen óseo inhibidora de hormonas calciotropas –PTH y hormona D⁻⁴.

Entre estas nuevas funciones emerge el papel del tejido óseo en el control del metabolismo energético que se alcanza a través de la secreción de osteocalcina (BGP), a la que también debemos considerar una hormona de producción osteoblástica reguladora de la secreción de insulina, de la sensibilidad a la insulina y del gasto energético. La vía de señalización de insulina en los osteoblastos (OBs) potencia la homeostasis corporal de glucosa a través de la regulación negativa de la carboxilación de BGP y su biodisponibilidad, mostrando un típico *feed-back* negativo hormonal. La señal insulínica en los OBs estimula no sólo la adquisición de hueso postnatal, sino también la resorción ósea a través del sistema simpático^{5,6}. Además, la leptina –una adipocina anorexígena secretada tras la adquisición de ácidos grasos por los adipocitos– que actúa sobre el hipotálamo también influencia la carboxilación de BGP, y, por lo tanto, regula el metabolismo óseo y el hidrocarbónado⁷.

El trabajo recogido en el presente número sugiere un papel de la esclerostina en la aparición de la enfermedad ósea de la DM2. Otras aportaciones de este mismo grupo han demostrado la presencia de mayores concentraciones de esclerostina en sujetos con DM2 frente a los controles que, además de relacionarse con la DMO y los marcadores de remodelado, se correlacionaron con el tiempo de evolución de la diabetes y con el control glucémico (medido como HbA1c)⁸.

Así las cosas, esta línea de investigación demuestra que la esclerostina está aumentada en sujetos con DM2 correlacionándose con la duración y control de la enfermedad, lo que hace de esta molécula, cuando menos, un potencial mediador en la génesis de la enfermedad ósea de la diabetes. Su exacto papel entre otros mediadores hormonales liberados por el hueso (a los que deberíamos empezar a llamar osteoquinas, si no hormonas óseas) está aún por dilucidarse y, lo que resulta aun más atractivo, podría acercarnos a encontrar el nexo entre la enfermedad ósea metabólica y el elevado riesgo cardiovascular en la DM2.

Bibliografía

1. García-Martín A, Reyes-García R, Rozas-Moreno P, Varsavsky M, Luque-Fernández I, Avilés-Pérez MD, et al. Variables que influyen en las concentraciones de esclerostina en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y su asociación con el metabolismo óseo. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2012 [Epub ahead of print].
2. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetología* 2012;55:88-93.
3. Leslie WD, Rubin MR, Schwartz AV, Kanis JA. Type 2 diabetes and bone. *J Bone Miner Res* 2012;27:2231-7.
4. Bergwitz C, Jüppner H. Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med* 2010;61:91-104.
5. Clemens TL, Karsenty G. The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res* 2011;26:677-80.
6. Schwetz V, Pieber T, Obermayer-Pietsch B. The endocrine role of the skeleton: background and clinical evidence. *Eur J Endocrinol* 2012;166:959-67.
7. Confavreux CB. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. *Kidney Int* 2011;121(Suppl.):S14-9.
8. García-Martín A, Rozas-Moreno P, Reyes-García R, Morales-Santana S, García-Fontana B, García-Salcedo JA, et al. Circulating Levels of Sclerostin Are Increased in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:234-41.

García-Martín A¹, Reyes-García R¹, Rozas-Moreno P^{1,2}, Varsavsky M³, Luque-Fernández I⁴, Avilés-Pérez MD¹, Muñoz-Torres M^{1,5}

1 Unidad de Metabolismo Óseo, Endocrinología y Nutrición - Hospital Universitario San Cecilio - Granada

2 Servicio de Endocrinología - Hospital General de Ciudad Real - Ciudad Real

3 Servicio de Endocrinología - Hospital San Pau i Santa Tecla - Tarragona

4 Servicio de Endocrinología y Nutrición - Hospital Virgen de la Salud - Toledo

5 Plataforma de Metabolismo Mineral y Óseo (RETICEF) - España

Variables que influyen en las concentraciones de esclerostina en los pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2 y su asociación con el metabolismo óseo

Correspondencia: Antonia García-Martín - Servicio de Endocrinología y Nutrición - Hospital Universitario San Cecilio - Avda. Dr. Oloriz, 16 - 18012 Granada (España)

Correo electrónico: garciamartin_r@hotmail.com

Fecha de recepción: 19/05/2012

Fecha de aceptación: 15/08/2012

Trabajo becado por la SEIOMM para asistir al 34 Congreso de la ASBMR (San Diego, California. 2011)

Resumen

Fundamento y objetivos: La diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) se asocia a un incremento del riesgo de fracturas cuyos mecanismos subyacentes son complejos. El objetivo de nuestro estudio fue analizar las variables que influyen en la concentración sérica de esclerostina y la relación con el metabolismo óseo en un grupo de pacientes DM2.

Pacientes y métodos: Estudio transversal de 76 pacientes con DM2. Se recogieron datos clínicos, parámetros bioquímicos básicos, hormonas calciotropas, marcadores de remodelado óseo, radiología vertebral y densidad mineral ósea (DMO). Se determinaron las concentraciones séricas de esclerostina mediante ELISA (Biomedica, Austria).

Resultados: Los varones presentaron concentraciones más elevadas que las mujeres ($63,15 \pm 27,03$ vs. $43,14 \pm 17,08$ pmol/L, $p < 0,001$). Encontramos una relación positiva entre esclerostina y edad en los varones con DM2 ($r = 0,338$, $p = 0,031$) y entre esclerostina y creatinina en la muestra total (ajuste a edad: $r = 0,362$, $p < 0,001$). Asimismo, se relacionó negativamente con la fosfatasa alcalina ósea (FAO) ($r = -0,259$, $p = 0,029$), el telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1 (CTX) ($r = -0,356$, $p = 0,002$) y la fosfatasa ácida tartrato resistente 5 β (TRAP5 β) ($r = -0,289$, $p = 0,013$). La DMO en columna lumbar, cuello femoral y cadera total se asoció de forma positiva con la esclerostina ($r = 0,373$, $r = 0,492$, $r = 0,524$, $p < 0,001$) ajustando por edad. Los niveles séricos de esclerostina fueron más bajos en pacientes con DM2 y osteoporosis frente a los no osteoporóticos ($42,96 \pm 19,16$ vs. $56,95 \pm 25,98$ pmol/L, $p = 0,041$).

Conclusiones: El sexo, la edad y la función renal son factores determinantes en los niveles circulantes de esclerostina en pacientes con DM2. Existe una relación negativa con los marcadores de remodelado, y positiva con la DMO. Los niveles séricos de esclerostina son más bajos en pacientes con DM2 y osteoporosis.

Palabras clave: esclerostina, diabetes *mellitus* tipo 2, metabolismo óseo.

Abreviaturas: CF: cuello femoral; CL: columna lumbar; CT: cadera total; CTX: telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2; DMO: densidad mineral ósea; DXA: absorciometría dual de rayos X; FAO: fosfatasa alcalina ósea; FG: filtrado glomerular; GBP: glucemia basal plasmática; HbA1c: hemoglobina glicada; IMC: índice de masa corporal; PTH: parathormona; OC: osteocalcina; TRAP5 β : fosfatasa ácida tartrato resistente 5 β ; 25(OH)D: 25-hidroxivitamina D.

Variables which influence concentrations of sclerostin in patients with diabetes mellitus type 2 and its association with bone metabolism

Summary

Background and objectives: Diabetes mellitus type 2 (DM2) is associated with an increased risk of fractures whose underlying mechanisms are complex. The objective of this study was to analyse the variables which influence blood concentrations of sclerostin and the relationship with bone metabolism in a group of DM2 patients.

Patients and methods: A transversal study of 76 patients with DM2. Clinical data, basic biochemical parameters, calciotropic hormones, markers for bone remodelling, vertebral X-rays and bone mineral density (BMD) were gathered. Blood concentrations of sclerostin were determined using ELISA (Biomedica, Austria).

Results: The males had higher concentrations than the females (63.15 ± 27.03 vs 43.14 ± 17.08 pmol/L, $p < 0.001$). We found positive relationships between sclerostin and age in males with DM2 ($r = 0.338$, $p = 0.031$) and between sclerostin and creatinine in the whole sample (adjusted for age: $r = 0.362$, $p < 0.001$). Also, it had a negative relationship with bone alkaline phosphatase (BAP) ($r = -0.259$, $p = 0.029$), carboxy-terminal telopeptide of type 1 collagen (CTX) ($r = -0.356$, $p = 0.002$) and tartrate-resistant acid phosphatase 5 β (TRAP β) ($r = -0.289$, $p = 0.013$). BMD in the lumbar spine, femoral neck and total hip were positively associated with sclerostin ($r = 0.373$, $r = 0.492$, $r = 0.524$, $p < 0.001$) adjusted for age. Blood levels of sclerostin were lower in patients with DM2 and osteoporosis than those who were non-osteoporotic (42.96 ± 19.16 vs 56.95 ± 25.98 pmol/L, $p = 0.041$).

Conclusions: Sex, age and renal function are determining factors of levels of sclerostin in the circulation of patients with DM2. There is a negative relationship with remodelling markers and a positive one with BMD. Blood levels of sclerostin are lower in patients with DM2 and osteoporosis.

Key words: sclerostin, diabetes mellitus type 2, bone metabolism.

Abbreviations: FN: femoral neck; LS: lumbar spine; TH: total hip; CTX: carboxy-terminal telopeptide of type 1 collagen; DXA: dual X-ray absorptiometry; BAP: bone alkaline phosphatase; GF: glomerular filtration; BBG: basal blood glucose; HbA1c: glycated haemoglobin; BMI: body mass index; PTH: parathormone; OC: osteocalcin; TRAP β : tartrate-resistant acid phosphatase 5 β ; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D.

Introducción

La osteoporosis y la diabetes mellitus son dos enfermedades de alta prevalencia que se asocian a un aumento del riesgo de fracturas por fragilidad, y con un sustancial impacto sobre la morbilidad y mortalidad de la población general. Aunque diversos estudios observacionales han investigado la asociación entre ambas, el mecanismo por el que la diabetes favorece la aparición de fracturas no se encuentra adecuadamente establecido. El descubrimiento de la vía Wnt, que estimula la diferenciación de precursores osteoblásticos, ha supuesto un avance reciente en el conocimiento de la homeostasis ósea¹. Así, el papel de esta vía de señalización y sus antagonistas puede ser crucial en la patogenia de las alteraciones de la calidad ósea observadas en la diabetes mellitus.

Los datos publicados en animales de experimentación se centran en el análisis de la expresión génica y la concentración en el microambiente óseo de algunas de las proteínas involucradas. De hecho, un estudio en ratones con diabetes mellitus tipo 1 (DM1) inducida por estreptozotocina demostró supresión de la expresión génica de esclerostina, aumento de la apoptosis de los osteocitos y bajas

concentraciones de β -catenina total y nuclear². Por otro lado, Nuche-Berenguer y cols. demostraron que la expresión génica de Dkk1 y SOST en modelos de ratas con DM2 se encontraba suprimida, mientras que en modelos de ratas insulínresistentes se evidenció una sobreexpresión génica de SOST asociada a un aumento de los niveles de ARNm de LRP5³.

Previamente describimos que los niveles de esclerostina se encuentran elevados en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2)⁴, coincidiendo con los resultados de Nuti y cols.⁵. El objetivo de nuestro estudio fue analizar las variables que influyen en la concentración sérica de esclerostina y la relación con el metabolismo óseo en un grupo de pacientes con DM2.

Pacientes y métodos

Población del estudio

Nuestro estudio, de carácter transversal, incluyó un grupo de pacientes con DM2 diagnosticados según los criterios de la *American Diabetes Association*⁶. Fueron reclutados consecutivamente desde enero de 2006 a diciembre de 2007 en la consulta de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

Tabla 1. Características de la muestra de estudio

	n=76	Varones n=41	Mujeres n=35
Edad (años)	57,9±6,5	57,4±6,8	58,6±6,1
IMC (kg/m ²)	31,3±5,7	29,8±4,4	33±6,6
Duración diabetes (años)	13,4±7,5	13,2±6,7	13,6±8,5
Parámetros séricos:			
- GBP (mg/dL)	174,8±62,9	177±65,3	172,3±60,9
- HbA1c (%)	8±1,9	8,1±2	7,9±1,8
- Creatinina (mg/dL)	0,9±0,2	0,8±0,3	1±0,1
- IFG (ml/min/1,73 m ²)	93,4±26,9	95,8±29,5	92,3±24,3
- Calcio (mg/dL)	9,6±0,5	9,6±0,5	9,4±0,5
- Fósforo (mg/dL)	3,7±0,6	3,6±0,6	3,8±0,4
- PTH (pg/mL)	38,7±18,4	33,5±15,2	43,8±20
- 25(OH)D (ng/mL)	17,6±11,2	17,6±10,1	18,1±12,5
- OC (ng/mL)	1,45±1,27	1,35±1,19	1,62±1,33
- FAO (µg/L)	14,8±6,5	13,4±4,2	16,6±8,3
- CTX (ng/mL)	0,212±0,13	0,163±0,082	0,264±0,14
- TRAP5β (UI/L)	1,38±1	1,26±0,96	1,56±1,02
- Esclerostina (pmol/L)	53,93±24,95	63,15±27,03	43,14±17,08
Parámetros DXA:			
- DMO CL (g/cm ²)	0,949±0,142	0,963±0,131	0,932±0,153
- DMO CF (g/cm ²)	0,818±0,13	0,861±0,131	0,766±0,109
- DMO CT (g/cm ²)	0,905±0,142	0,942±0,145	0,859±0,127
- T-score CL	-1,3±1,3	-1,375±1,218	-1,317±1,452
- T-score CF	-0,59±1	-0,461±1,052	-0,758±0,981
- T-score CT	-0,61±1	-0,568±1	-0,661±1,03
Osteoporosis (%)	19,7	9,2	10,5
Fracturas vertebrales (%)	26,3	18,4	7,9

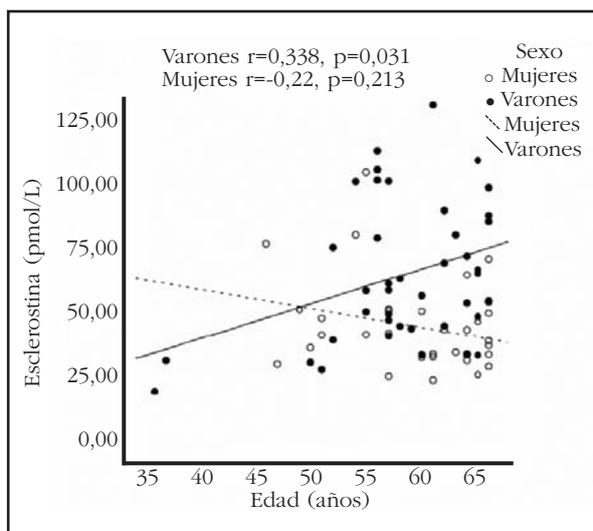
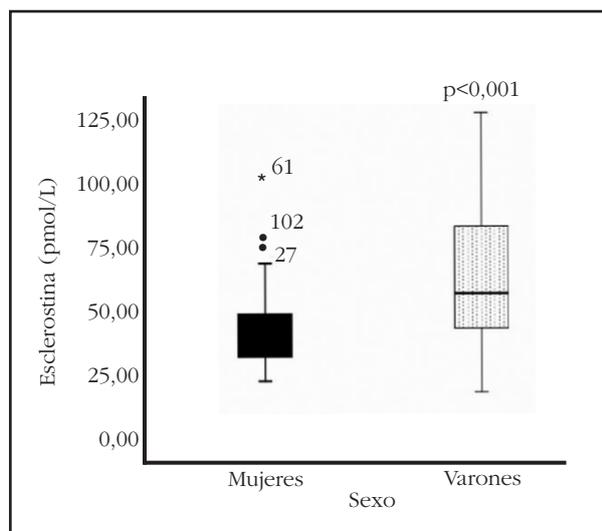
IMC: índice de masa corporal; GBP: glucemia basal plasmática; HbA1c: hemoglobina glicada; IFG: índice de filtrado glomerular; PTH: parathormona; 25(OH)D: 25-hidroxitamina D; OC: osteocalcina; FAO: fosfatasa alcalina ósea; CTX: telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1; TRAP5β: fosfatasa ácida tartrato resistente 5β; DMO: densidad mineral ósea; CL: columna lumbar; CF: cuello femoral; CT: cadera total.

Todos los pacientes cumplieron los siguientes criterios de inclusión: caucásicos, ambulatorios, edad entre 35 y 65 años y valores normales de hemograma, creatinina, función hepática, calcio y fósforo. Los criterios de exclusión fueron: enfermedad crónica excepto la DM2, situaciones que afectan el metabolismo óseo (enfermedad de Paget, artritis reumatoide, hiperparatiroidismo, hipercortisolismo, tumores malignos, trasplante) y tratamiento con fármacos que interfieren en el

metabolismo óseo (suplementos de calcio, preparados de vitamina D, moduladores selectivos del receptor estrogénico, calcitonina, terapia estrogénica, antirresortivos, tiazidas, glucocorticoides o anticonvulsivos).

El estudio se realizó con la aprobación del comité ético del hospital y se ajustó a las directrices pertinentes para la investigación en humanos. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para su inclusión.

Figura 1. Niveles séricos de esclerostina en función del sexo Figura 2. Correlación entre esclerostina y edad



Determinaciones analíticas

La glucemia basal plasmática (GBP), hemoglobina glicada (HbA1c), calcio, fósforo y creatinina fueron medidos usando las técnicas automatizadas del laboratorio. La tasa de filtrado glomerular (FG) fue estimada mediante la ecuación de Cockcroft-Gault. Se determinaron los niveles séricos de parathormona (inmunoensayo para PTH, Roche Diagnostics SL, Barcelona, España) y 25-hidroxivitamina D (25-OH-D, radioinmunoensayo, DiaSorin, Stillwater, Minnesota, EE.UU.).

Los marcadores del remodelado óseo de formación recogidos fueron: osteocalcina (OC, radioinmunoensayo, DiaSorin, Stillwater, Minnesota EE.UU.) y fosfatasa alcalina ósea (FAO, ELISA, Tandem-R Ostase TM, Hybritech Europe, Liège, Bélgica). Los marcadores de resorción incluidos fueron: fosfatasa ácida tartrato resistente 5 β (TRAP5 β , colorimetría, Hitachi 704 Boehringer Mannheim GmbH) y telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1 (CTX, inmunoensayo enzimático, analizador Elecsys CrossLaps, Roche Diagnostics SL, Barcelona, España).

Los niveles séricos de esclerostina fueron medidos mediante ELISA (Biomedica, Austria). En nuestro laboratorio, dos muestras de concentración conocida fueron testadas 6 veces para calcular la variabilidad intraensayo que fue del 4% y dos muestras de concentración conocida fueron testadas para calcular la variabilidad interensayo que fue del 3%. La medida de esclerostina se expresa en picomoles por litro (pmol/L) y el nivel mínimo de detección fue <10 pmol/L.

Densidad mineral ósea y estudio radiológico vertebral

La densidad mineral ósea (DMO) de columna lumbar (CL) L2-L4, cuello femoral (CF) y cadera total (CT) fue determinada en todos los pacientes mediante absorciometría dual de rayos X (DXA) usando el densitómetro Hologic® QDR-4500 (Whatman, MA; coeficiente de variación <1%). Todas las medidas fue-

ron hechas por el mismo operador. Usamos los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico de osteoporosis⁷. También se realizó radiología simple (RX) de columna dorsal y lumbar para el análisis de fracturas vertebrales morfométricas y se interpretó de acuerdo al algoritmo desarrollado por Genant y cols.⁸.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el programa SPSS (versión 15.0, Chicago, EE.UU.). Para variables continuas se evaluó si seguían una distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Se emplearon medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar, rango) para variables continuas y distribución de frecuencias absolutas y relativas para variables categóricas. Las diferencias para las variables de interés entre grupos de comparación se realizaron mediante el test de la *t* de Student para dos muestras independientes y el test de la U de Mann-Whitney en el caso de variables continuas. Para variables categóricas se utilizó el test de la Chi Cuadrado de Pearson y el test exacto de Fisher. La relación entre las variables cuantitativas se analizó usando el test de correlaciones bivariadas de Pearson o de Spearman. Para controlar el efecto de una o más variables sobre el coeficiente de correlación de Pearson se empleó el test de correlación parcial. Todos los tests estadísticos se realizaron a doble cola. Una *p*<0,05 fue considerada estadísticamente significativa.

Resultados

La Tabla 1 muestra las características clínicas, bioquímicas y densitométricas de la muestra total y según el sexo. Las mujeres diabéticas tuvieron un índice de masa corporal (*p*=0,016), niveles séricos de PTH (*p*=0,01) y CTX (*p*<0,001) mayores que los varones, mientras que éstos presentaron una mayor DMO en cuello femoral (*p*=0,002) y en

cadera total ($p=0,015$) respecto a las mujeres. No hubo diferencias en el resto de variables.

Los varones presentaron concentraciones más elevadas que las mujeres ($63,15 \pm 27,03$ frente a $43,14 \pm 17,08$ pmol/L, $p < 0,001$) (Tabla 1 y Figura 1).

En los varones, los niveles de esclerostina se correlacionaron positivamente con la edad ($r=0,338$, $p=0,031$), pero esta relación no se mantuvo en mujeres ($r=0,223$, $p=0,213$) (Figura 2).

En la muestra total, los niveles séricos de esclerostina mostraron una correlación positiva con los valores séricos de creatinina ($r=0,37$, $p < 0,001$) y negativa, aunque no significativa, con el filtrado glomerular ($r=-0,184$, $p > 0,05$). Tras el ajuste por edad esta relación se mantuvo significativa para los valores séricos de creatinina ($r=0,361$, $p=0,001$).

Los niveles de esclerostina se correlacionaron negativamente con el marcador de formación ósea FAO ($r=-0,277$, $p=0,021$) y con los marcadores de resorción ósea CTX ($r=-0,363$, $p=0,002$) y TRAP5 β ($r=-0,276$, $p=0,02$). No hubo relación con el marcador de formación OC (Figura 3).

Las DMO y T-score de columna lumbar, cuello femoral y cadera total se relacionaron positivamente con los niveles de esclerostina tras ajustar por la edad (Tabla 2).

En los pacientes con osteoporosis los niveles de esclerostina fueron significativamente más bajos que en los pacientes no osteoporóticos ($44,03 \pm 19,41$ pmol/L frente a $56,95 \pm 25,98$ pmol/L, $p=0,048$) (Figura 4). Sin embargo, no hubo relación con las fracturas morfológicas vertebrales ($54,03 \pm 26,55$ frente a $53,72 \pm 23,27$ pmol/L, $p > 0,05$).

Discusión

Los niveles de esclerostina se encontraron aumentados en varones. Estos resultados coinciden con lo descrito en una amplia cohorte poblacional de 362 mujeres y 318 varones donde las mujeres ya fueran pre o postmenopáusicas presentaron menores niveles de esclerostina que los varones⁹. Los autores postulan que el mayor tamaño del esqueleto, alrededor de un 21%, en el varón podría explicar las diferencias de género en las concentraciones séricas de esclerostina. Por otra parte, Mödder y cols. sostienen que los estrógenos influyen y regulan la síntesis de esclerostina basándose en las diferencias observadas en los niveles de esclerostina entre mujeres pre y postmenopáusicas, siendo éstos más bajos en premenopáusicas, y en un estudio previo en el que el tratamiento con estrógenos en postmenopáusicas desciende los niveles de esclerostina un 27%¹⁰. Los estudios moleculares apoyan el papel estrogénico en la regulación de la masa ósea a través de la vía Wnt mediante el receptor α estrogénico que interviene en el transporte al núcleo de la β -catenina en respuesta a la tensión mecánica del osteocito¹¹.

Observamos un aumento de los niveles séricos de esclerostina con la edad en varones. La influencia de la edad sobre los niveles de esclerostina está siendo estudiada en profundidad. Se sabe que la expresión de las proteínas de la vía Wnt por el osteoblasto están reguladas individualmente por la edad¹², y diversos estudios clínicos han confirma-

Figura 3. Correlación entre esclerostina y marcadores de remodelado óseo

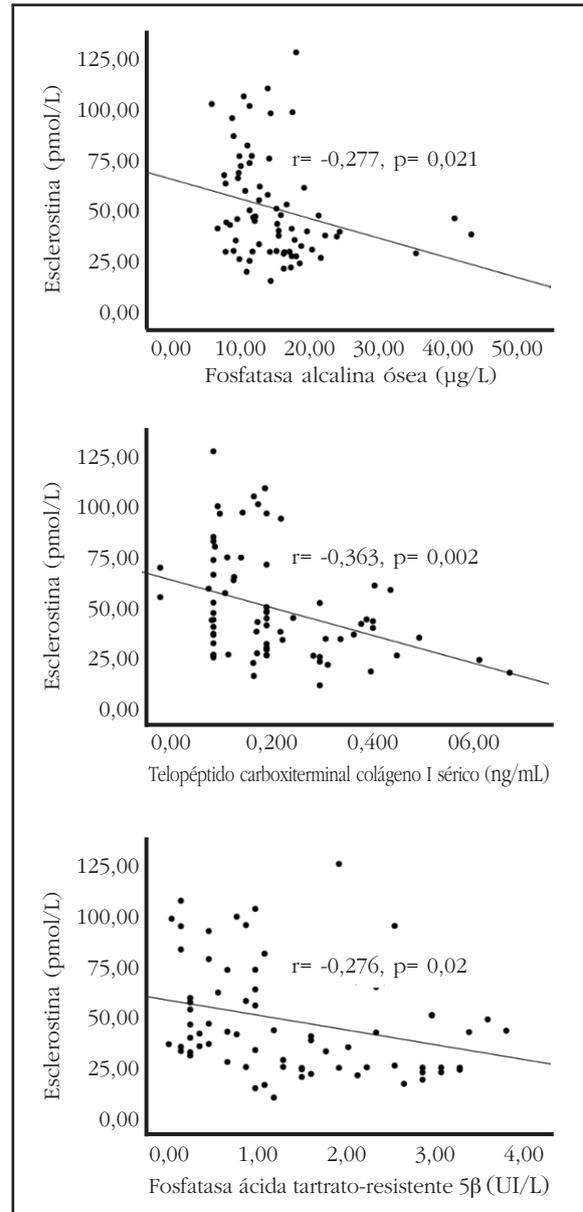


Figura 4. Niveles séricos de esclerostina en función del diagnóstico de osteoporosis

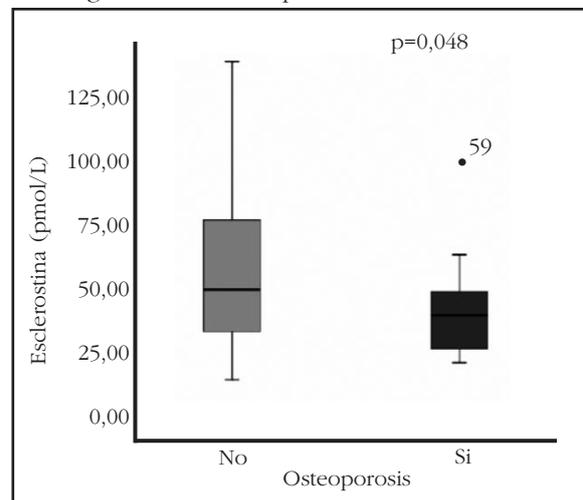


Tabla 2. Correlación entre esclerostina, DMO, T-score y Z-score sin ajustar y ajustada por edad

	Simple	Ajustada por edad
DMO CL (g/cm ²)	r=0,337**	r=0,373**
T-score CL	r=0,285*	r=0,313*
Z-score CL	r=0,199	r=0,192
DMO CF (g/cm ²)	r=0,487**	r=0,492**
T-score CF	r=0,405**	r=0,408**
Z-score CF	r=0,396**	r=0,391**
DMO CT (g/cm ²)	r=0,505**	r=0,524**
T-score CT	r=0,406**	r=0,427**
Z-score CT	r=0,328**	r=0,323**

DMO: densidad mineral ósea; CL: columna lumbar; CF: cuello femoral; CT: cadera total.

* p<0,05

** p<0,01

do esta relación tanto en varones como en mujeres^{9,13}. Así, en un trabajo poblacional realizado en 1.235 mujeres premenopáusicas y 568 mujeres postmenopáusicas en un rango de edad de 20 a 79 años, se analizan los cambios de las concentraciones séricas de esclerostina con la edad. Una de las conclusiones fue que entre los 35 y 45 años los niveles de esclerostina se mantienen estables, y a partir de los 45 años se incrementan progresivamente¹⁴. Algunos autores postulan que la producción de esclerostina en cada osteocito se incrementa con la edad, aunque no excluyen la posibilidad de que también se reduzca su aclaramiento⁹.

Aunque se desconoce la vía de eliminación de la esclerostina, la opción más probable, dado el tamaño y el peso molecular de esta proteína, es que su eliminación sea por vía renal. En nuestro estudio los niveles de esclerostina se relacionaron positivamente con las concentraciones séricas de creatinina y de forma negativa con el filtrado glomerular. Estos resultados coinciden con trabajos previos que muestran que los niveles de esclerostina aumentan con el deterioro de la función renal, sobre todo en la insuficiencia renal crónica grado 3 o superior, y sin relación con la función hepática¹⁵. Asimismo, en los pacientes con enfermedad renal crónica en hemodiálisis los niveles de esclerostina están elevados respecto a los controles¹⁶.

Conceptualmente, concentraciones elevadas de esclerostina deberían asociarse con un descenso de los marcadores de formación ósea. Sin embargo, encontramos que los niveles de esclerostina en los pacientes con diabetes se relacionaron negativamente tanto con marcadores de formación (FAO) como de resorción (CTX y TRAP). De forma similar, en mujeres mayores de 60 años los niveles de esclerostina se han asociado negati-

vamente tanto con la FAO y el propéptido aminoterminal del colágeno tipo 1 (PINP) como con el CTX sérico⁹. En las pacientes inmovilizadas tras un ictus, la esclerostina sérica se correlaciona de forma negativa con la FAO y de forma positiva con el CTX¹⁷. En cambio, en otros estudios no se ha encontrado relación entre esclerostina y marcadores de remodelado óseo^{13,16,18,19}. Por tanto, consideramos que los datos sobre esclerostina y marcadores de remodelado óseo son contradictorios, no permitiendo extraer conclusiones definitivas.

La masa ósea, expresada en DMO, T-score y Z-score, se relacionó positivamente con los niveles de esclerostina tanto en el grupo de DM2 como en el grupo control de nuestro estudio. Asimismo, la DMO fue la principal variable predictora de las concentraciones séricas de esclerostina. Estos hallazgos difieren de los observados en los pacientes con esclerosteosis o enfermedad de Van Buchem's^{20,21} y en los modelos de ratones *Knockout* para esclerostina o con sobreexpresión de esclerostina^{22,23}. Dado que el papel fisiológico de la esclerostina es la inhibición de la proliferación y actividad osteoblástica, lo esperable sería una relación negativa con la masa ósea. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con algunos trabajos en los que se examina este aspecto. Así, en pacientes con insuficiencia renal en hemodiálisis, los niveles de esclerostina se correlacionaron positivamente tanto con la DMO de cuello femoral, columna lumbar y radio, así como con la densidad trabecular y el número de trabéculas en el radio y la tibia medidos mediante tomografía computarizada (TC) periférica de alta resolución¹⁶. También la DMO y el CMO de columna lumbar y cadera se relacionan positivamente con la concentración de esclerostina en sujetos sanos tras ajustar por edad, sexo y función renal¹⁵. En la cohorte de Mödder y cols. también se encuentra una asociación positiva entre el CMO total y los niveles de esclerostina, pero que sólo es significativa a partir de los 40 años y es mayor a partir de los 60 años⁹. Además, los niveles de esclerostina se relacionan positivamente con la DMO de fémur distal y tibia proximal en pacientes con lesión medular crónica²⁴.

En concordancia con los hallazgos previos, los niveles de esclerostina fueron más bajos en pacientes con diabetes y osteoporosis densitométrica comparados con los pacientes con diabetes y sin osteoporosis densitométrica. En mujeres con osteoporosis postmenopáusica se ha descrito una relación entre osteoporosis y esclerostina similar a la que encontramos en DM2¹⁹.

Se barajan diversas hipótesis para explicar la relación positiva entre la esclerostina sérica y la masa ósea. La principal es que existan cambios en la producción de esclerostina por los osteocitos en relación con el envejecimiento con una mayor síntesis por cada osteocito individual⁹. Por otro lado, el aumento de los niveles de esclerostina supone un descenso de la formación ósea en base a sus funciones fisiológicas y, por tanto, permite que exista un recambio óseo disminuido. Un menor recambio óseo conllevaría una pérdida ósea enlentecida y una mayor masa ósea¹⁶.

En resumen, el sexo, la edad y la función renal son factores determinantes en los niveles circulantes de esclerostina en pacientes con DM2. Asimismo, encontramos una relación negativa con los marcadores de remodelado y positiva con la DMO. Finalmente, los niveles séricos de esclerostina son más bajos en pacientes con DM2 y osteoporosis, sin relación con la presencia de fracturas.

Conflicto de intereses: No existe conflicto de intereses por parte de los autores.

Bibliografía

1. Baron R, Rawadi G. Wnt Signaling and the regulation of bone mass. *Curr Osteoporos Rep* 2007;5:73-80.
2. Portal-Núñez S, Lozano D, de Castro LF, de Cortázar AR, Nogués X, Esbrit P. Alterations of the Wnt/beta-catenin pathway and its target genes for the N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in bone from diabetic mice. *FEBS Lett* 2010;584:3095-100.
3. Nuche-Berenguer B, Moreno P, Portal-Núñez S, Dapía S, Esbrit P, Villanueva-Peñacarrillo ML. Exendin-4 exerts osteogenic actions in insulin-resistant and type 2 diabetic states. *Regul Pept* 2010;159:61-6.
4. García-Martín A, Rozas-Moreno P, Reyes-García R, Morales-Santana S, García-Fontana B, García-Salcedo JA, et al. Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:234-41.
5. Nuti R, Valenti R, Merlotti D, Ceccarelli E, Ruvio M, Pietrini MG, et al. Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:1737-44.
6. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2005;28:S37-S42.
7. Kanis JA, Melton LJ 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltav N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994;9:1137-41.
8. Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Newitt MC. Vertebral fracture assessment using a semi-quantitative technique. *J Bone Miner Res* 1993;8:1137-48.
9. Mödder UI, Hoey KA, Amin S, McCready LK, Achenbach SJ, Riggs BL, et al. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *J Bone Miner Res* 2011;26:373-9.
10. Mödder UI, Clowes JA, Hoey K, Peterson JM, McCready L, Oursler MJ, et al. Regulation of circulating sclerostin levels by sex steroids in women and in men. *J Bone Miner Res* 2011;26:27-34.
11. Zaman G, Jessop HL, Muzylak M, De Souza RL, Pitsillides AA, Price JS, et al. Osteocytes use estrogen receptor alpha to respond to strain but their ERalpha content is regulated by estrogen. *J Bone Miner Res* 2006;21:1297-1306.
12. Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Age-dependent Wnt gene expression in bone and during the course of osteoblast differentiation. *Age (Dordr)* 2008;30:273-82.
13. Amrein K, Amrein S, Drexler C, Dimai HP, Dognig H, Pfeifer K, et al. Sclerostin and its association with physical activity, age, gender, body composition, and bone mineral content in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:148-54.
14. Ardawi MS, Al-Kadi HA, Rouzi AA, Qari MH. Determinants of serum sclerostin in healthy pre- and postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2011;26:2812-22.
15. Kim SH, Lim HJ, Yoon SY, Lee SC, Lim SK, Rhee Y. Decreased renal function but not liver function overpowers the circulating sclerostin level. *American Society Bone Mineral Research, 2011 Annual Meeting*, SU0406.
16. Cejka D, Jäger-Lansky A, Kieweg H, Weber M, Bieglmayer C, Haider DG, et al. Sclerostin serum levels correlate positively with bone mineral density and microarchitecture in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:226-30.
17. Gaudio A, Pennisi P, Bratengeier C, Torrisi V, Lindner B, Mangiafico RA, et al. Increased sclerostin serum levels associated with bone formation and resorption markers in patients with immobilization-induced bone loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2248-53.
18. Mirza FS, Padhi ID, Raisz LG, Lorenzo JA. Serum sclerostin levels negatively correlate with parathyroid hormone levels and free estrogen index in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1991-7.
19. Polyzos SA, Anastasilakis AD, Bratengeier C, Woloszczuk W, Papatheodorou A, Terpos E. Serum sclerostin levels positively correlate with lumbar spinal bone mineral density in postmenopausal women-the six-month effect of risedronate and teriparatide. *Osteoporos Int* 2012;23:1171-6.
20. Hamersma H, Gardner J, Beighton P. The natural history of sclerosteosis. *Clin Genet* 2003;63:192-7.
21. Staehling-Hampton K, Proll S, Paepfer BW, Zhao L, Charmley P, Brown A, et al. A 52-kb deletion in the SOST-MEOX1 intergenic region on 17q12-q21 is associated with van Buchem disease in the Dutch population. *Am J Med Genet* 2002;110:144-52.
22. Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res* 2008;23:860-9.
23. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 2003;22:6267-76.
24. Morse LR, Sudhakar S, Danilack V, Tun C, Lazzari A, Gagnon DR, et al. Association between sclerostin and bone density in chronic SCI. *J Bone Miner Res* 2012;27:352-9.

Lozano D¹, Trejo CG², Manzano M³, Doadrío JC³, Salinas AJ³, Dapía S⁴, Caeiro Rey JR⁵, Gómez-Barrena E⁶, Vallet-Regí M³, García-Honduvilla N², Buján J², Esbrit P¹

1 Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo - Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz - Madrid

2 Departamento de Especialidades Médicas - Facultad de Medicina - Universidad de Alcalá - Alcalá de Henares - Madrid

3 Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica - Facultad de Farmacia - Universidad Complutense - Madrid

4 Trabeculae S.L. - Orense

5 Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) - Reticef - Santiago de Compostela

6 Departamento de Traumatología - Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz - Madrid

Efectos osteogénicos de la PTHrP (107-111) cargada en biocerámicas en un modelo de regeneración ósea tras un defecto cavitario en el fémur de conejo

Correspondencia: Daniel Lozano - Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo - Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz - Avda. Reyes Católicos, 2 - 28040 Madrid (España)
Correo electrónico: dlozano@fjd.es

Fecha de recepción: 04/04/2012

Fecha de aceptación: 19/06/2012

Trabajo becado por la SEIOMM para asistir al Congreso de la ASBMR (Denver, 2009)

Resumen

Introducción: La proteína relacionada con la parthormona (PTHrP), un factor abundante en el tejido óseo, es un importante modulador de la formación ósea. Se ha demostrado que la PTHrP (107-111), conocida como osteostatina, cargada en el material cerámico mesoporoso SBA-15, ejerce acciones osteogénicas *in vitro*.

Objetivo: Comprobar si dicho material y una versión funcionalizada del mismo (C8-SBA-15) promueven la reparación ósea en un modelo de defecto cavitario en el fémur del conejo.

Material y métodos: Para ello se han llevado a cabo estudios histológicos e inmunohistoquímicos y de microtomografía computerizada (μ CT).

Resultados: Tras la implantación de los biomateriales no se observaron niveles significativos de inflamación ni resorción ósea (4 y 8 semanas). A las 8 semanas las biocerámicas no cargadas con la osteostatina se encontraban separadas de la médula ósea por una cápsula fibrosa, que disminuía de forma significativa en presencia del péptido. Se observó (por μ CT) un aumento de la neo-formación ósea a diferentes distancias de los biomateriales, principalmente en los cargados con la osteostatina. Además, estos resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica de marcadores osteoblásticos.

Conclusión: Nuestros hallazgos sugieren que estas biocerámicas cargadas con la osteostatina son una buena estrategia para acelerar la regeneración ósea.

Palabras clave: PTHrP, osteostatina, biocerámicas, regeneración ósea, defecto cavitario.

Osteogenic effects of PTHrP (107-111) loaded in bioceramics in a model of bone regeneration after a cavitory defect in the femur of a rabbit

Summary

Introducción: Parathyroid hormone-related protein (PTHrP), which is abundant in bone tissue, is an important modulator of bone formation. It has been shown that PTHrP (107-111), called osteostatin, loaded into mesoporous ceramic material SBA-15 exerts osteogenic action *in vitro*.

Objective: To confirm if this material and a functionalised version of the same material (C8-SBA-15) promote bone regeneration in a model of a cavitory defect in a rabbit femur.

Materials and methods: Histological, immunohistochemical and computerised microtomography (μ CT) studies were carried out in order to achieve the aims of the study.

Results: After the implantation of the biomaterials no significant levels of inflammation or bone resorption were observed (at 4 and 8 weeks). At 8 weeks the bioceramics not loaded with osteostatin were found to be separated from the bone medulla by a fibrous capsule which diminished significantly in the presence of the peptide. An increase was observed (using μ CT) in bone neo-formation at different distances from the biomaterials, principally in those loaded with the osteostatin. These results were also confirmed by immunohistochemistry of osteoblast markers.

Conclusion: Our results suggest that the use of these osteostatin-loaded bioceramics are a good strategy for accelerating bone regeneration.

Key words: PTHrP, osteostatin, bioceramics, bone regeneration, cavitory defect.

Introducción

La proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) se identificó inicialmente en la hipercalemia tumoral de origen humoral¹. Actualmente se sabe que la PTHrP y el receptor tipo 1 común para PTH/PTHrP (PTHR1) se expresan en una amplia variedad de tejidos, malignos y no malignos, donde la PTHrP ejerce efectos auto/paracrinos e intracrin². Si bien el fragmento 1-36 de la PTHrP, que presenta homología estructural con la PTH, ejerce acciones anabólicas en el hueso, estimulando la formación ósea³⁻⁶, los posibles mecanismos asociados son poco conocidos. El fragmento C-terminal de la PTHrP es un potente inhibidor de la actividad osteoclástica⁷⁻¹⁰. De hecho, el pentapéptido 107-111 de dicha proteína (llamado osteostatina), presenta una potente actividad antirresortiva *in vitro* e *in vivo*¹¹. Varios estudios *in vitro* han demostrado que la osteostatina aumenta la diferenciación de células osteoblásticas de ratón y de humano¹²⁻¹⁵, aunque su receptor en las células óseas es desconocido^{9,16}. Un estudio de nuestro laboratorio ha demostrado que el fragmento nativo de la PTHrP que contiene la secuencia 107-139 transactiva rápidamente el receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en células osteoblásticas¹⁷. Por otra parte, se ha demostrado que la administración diaria de este fragmento de la PTHrP durante dos semanas a ratones ovariectomizados protege de la pérdida de masa ósea observada en sus huesos largos, con efectos positivos en el hueso cortical y trabecular³. Recientemente, nuestro grupo también ha

demostrado que la PTHrP (107-139) revierte la osteopenia y aumenta la regeneración ósea en ratones tratados con 3-metilprednisolona o diabéticos^{18,19}.

La comprensión de los mecanismos de regeneración es fundamental para entender el comportamiento del tejido óseo tras el implante de una prótesis o durante la recuperación de una fractura. Se sabe que los procesos de reparación ósea en adultos reproducen el desarrollo normal del esqueleto durante la embriogénesis²⁰. La formación ósea en el feto comienza con la condensación de células mesenquimales seguida de su diferenciación a condrocitos (osificación endocondral) o directamente a osteoblastos (formación ósea intramembranosa). En la mayoría de las fracturas, la formación del callo implica una combinación de ambas osificaciones. Aunque no se conocen completamente las vías de señalización ni las interacciones celulares implicadas en la reparación ósea, existen diferentes estrategias para mejorar este proceso²⁰. Una de ellas implica la administración sistémica o local de factores osteogénicos que aumenten la formación ósea de *novo*. Se ha demostrado que inyecciones diarias de PTH mejoran la reparación ósea de fracturas en ratas normales y ovariectomizadas^{21,22}. Además, la administración sistémica de un análogo de la PTHrP (1-34) contrarrestó los efectos deletéreos en un defecto en ulna de conejos tratados con prednisolona²³. Un enfoque más directo para aumentar la reparación ósea consistiría en la liberación local de factores osteogénicos con biomateriales en la zona afectada.

Los biomateriales se pueden definir como “materiales implantables que desarrollan su función en contacto con tejidos vivos”²⁴. Recientemente, se han diseñado cerámicas mesoporosas bioactivas que permiten la adsorción y liberación de distintas moléculas con buenas expectativas en la aplicación clínica²⁵. El SBA (*Santa Barbara Amorphous*)-15 posee una estructura hexagonal de poros cilíndricos con un diámetro de 5-10 nm. Una ventaja de este tipo de cerámica es su mayor volumen de poro y la elevada concentración de grupos Si-OH²⁶⁻²⁸. Además, este material presenta una serie de microporos interconectados que promueven una mayor difusión iónica desencadenando una mayor respuesta bioactiva. De hecho, se ha estudiado la captación y la liberación del L-triptófano cargado en el material SBA-15 y en una versión funcionalizada (C8-SBA-15)²⁹. La superficie hidrofóbica del material C8-SBA-15 es capaz de interaccionar con el anillo indol del triptófano de diferentes péptidos y dejar un espacio disponible menor, ocupado por cadenas alquílicas. Nuestro grupo ha caracterizado la captación/liberación de la osteostatina cargada en dichos materiales, demostrando que el péptido les confiere actividad osteogénica en osteoblastos de ratón¹⁴.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad del material cerámico SBA-15, funcionalizado o no con grupos C8 (C8-SBA-15), cargado con la PTHrP (107-111) para inducir osteogénesis en un modelo de defecto cavitario en el fémur del conejo.

Materiales y Métodos

Preparación de los materiales

El material mesoporoso SBA-15 fue sintetizado utilizando un método basado en el uso de un surfactante, como agente director de estructura, y tetraetilortosilicato (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) como fuente de sílice³⁵. Esta estructura fue confirmada por difracción de rayos X (DRX) y análisis de adsorción de N₂. La funcionalización de sílice se llevó a cabo con el método post-sintético o *grafting* del anclaje de un alcóxido silano, N-octiltrietoxisilano (C8, Sigma-Aldrich), como se describe³⁰. Se confirmó por espectroscopia infrarroja utilizando transformadas de Fourier y por análisis elemental. El material funcionalizado resultante contiene un 11% en peso (0,97 mmol/g) de fracciones orgánicas, lo que permite calcular el grado de funcionalización.

Para los experimentos, ambos tipos de material SBA-15 fueron conformados en discos de 50 mg (6x2 mm) por presión uniaxial (1MPa) e isostática (1MPa). Los materiales fueron expuestos a radiación ultravioleta en una cámara de cultivos celulares (FLV120, Tecnología para Diagnóstico e Investigación, Madrid) durante toda la noche para su esterilización. La unión de la PTHrP (107-111) (Bachem, Bubendorf, Suiza) al material se efectuó por inmersión en una solución del péptido (100 nM) en 1 ml de tampón salino fosfato (TSF), pH 7,4, a 4 °C con agitación durante 24 horas^{31,32}.

Producción del defecto cavitario en conejo

Se utilizaron conejos blancos Nueva Zelanda hembras (Granja San Bernardo, Valencia, España)

con una edad de 24-30 semanas [n=2 para microtomografía computerizada (μ CT) y 5 para estudios histológicos]. Estos animales fueron estabilizados individualmente en jaulas en las instalaciones del Animalario de la Fundación Jiménez Díaz durante dos semanas. Los animales tuvieron acceso libre a agua y a una dieta estándar (Panlab, Reus, España) en una habitación mantenida a temperatura ambiente con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Todos los estudios fueron desarrollados con la aprobación del Comité de Experimentación Animal de la Fundación Jiménez Díaz. El dolor y el sufrimiento de los animales se disminuyeron de acuerdo a la normativa europea.

La intervención quirúrgica se realizó bajo anestesia general. Los conejos fueron rasurados en ambas rodillas para crear los defectos cavitarios lateral y medial con una fresa de media velocidad (5 mm de diámetro y 4-5 mm de profundidad)³³. A continuación, se implantaron los materiales a ensayar y las heridas fueron suturadas. El defecto lateral femoral derecho recibió el material SBA-15 sin el péptido; y el defecto medial derecho el biomaterial SBA15 cargado con PTHrP (107-111). El defecto femoral lateral izquierdo recibió el material SBA-15 funcionalizado con C8, mientras que el biomaterial C8-SBA-15 cargado con PTHrP (107-111) fue implantado en el defecto femoral medial izquierdo. Los animales fueron sacrificados a las 4 y 8 semanas de estas intervenciones. Los fémures se distribuyeron para exámenes histológicos e inmunohistoquímicos y análisis de μ CT.

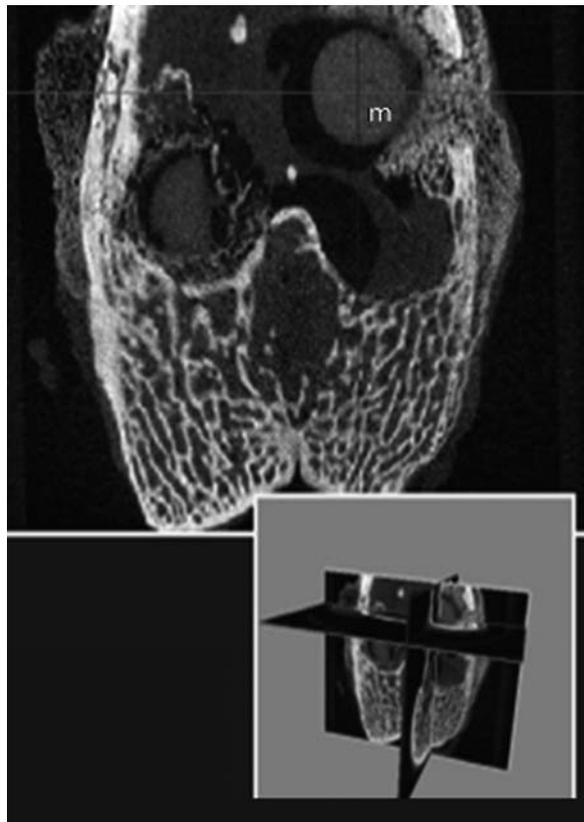
Histología

Los fémures de conejo se fijaron en p-formaldehído al 4% en TSF a 4°C. Las muestras fueron descalcificadas (24 h) en Osteosoft (48/72 h) (Merk, Whitehouse Station, N.J.), deshidratadas e incluidas en parafina. Los análisis histológicos se llevaron a cabo en secciones de 8 μ m sobre el plano sagital, depositadas sobre portaobjetos pretratados con L-lisina (Polylysine, Thermo, Waltham, MA), y tinción con hematoxilina/eosina. Antes de la tinción, las muestras se mantuvieron a 60°C durante 6-24 horas para fijar los tejidos al portaobjetos. Se desparafinaron incubándolas secuencialmente en xilol, etanol 100%, 70% y agua destilada. Tras la tinción, las muestras se deshidrataron y montaron con resina DPX (una mezcla de distireno, plastificante y xilol). Se utilizaron dos secciones histológicas de cada conejo de un total de 2-4 conejos por grupo experimental. Todas las evaluaciones de las muestras fueron analizadas por 3 observadores independientes.

Inmunohistoquímica

Los cortes histológicos obtenidos de las muestras óseas fueron desparafinados y rehidratados. Se realizó el bloqueo y la permeabilización en albúmina bovina de suero en (4% en TSF con 0,1% de Tritón X-100) durante 30 minutos a T/A. Se utilizaron anticuerpos frente a osteocalcina (OC) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), VEGF (Abcam, Cambridge, MA), RAM11 (Dako) y TRAP

Figura 1. Imagen por microtomografía computarizada (μ CT) del fémur distal del conejo con el biomaterial (m) incorporado



(Santa Cruz Biotechnology), y un anticuerpo policlonal frente a esclerostina (R&D, Minneapolis, MN). Los anticuerpos primarios se incubaron en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C, salvo en el caso de la esclerostina que fue incubada dos horas a temperatura ambiente (T/A). En todos los anticuerpos, menos en la esclerostina, se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado. Se incubó con el complejo extravidina-fosfatasa alcalina (dilución 1:200), durante 60 minutos a T/A y se lavó con TSF, tres veces, durante 5 minutos. En el caso de la esclerostina el anticuerpo secundario estaba unido a peroxidasa, que fue incubado durante 1 hora a T/A. Se realizó el revelado mediante incubación con el sustrato cromogénico DAB durante 10 minutos. Se incluyó siempre una muestra sin anticuerpo primario como control negativo. Las muestras fueron contrastadas con hematoxilina. Las células con positividad para los diferentes anticuerpos se determinaron en 10 campos próximos al material. En el caso de los osteocitos positivos para esclerostina, éstos se cuantificaron en 5 campos aleatorios en el hueso cortical.

Análisis de μ CT

Las muestras de fémur de conejo se cortaron con un disco hiperflexible de granulometría fina (15 μ m) y abrasión suave conectado a un motor quirúrgico (KaVo. Dental GmbH, Biberach,

Alemania) a una velocidad de 15.000 rpm. Durante el proceso de corte, la muestra se irrigó constantemente con suero salino para prevenir el sobrecalentamiento y su deshidratación. Las muestras fueron escaneadas con un sistema de microtomografía de alta resolución (SkyScan 1172, Skyscan N.V., Aartselaar, Bélgica), con un tubo de rayos X con un voltaje de 100 kV y una corriente de 100 μ A sin filtro. Una vez escaneadas, se generaron las imágenes con la aplicación *DataViewer* (SkyScan), que fueron reconstruidas en función del algoritmo de Feldkamp³⁴. El ángulo de rotación del escaneo fue de 360°. Para el análisis cuantitativo y cualitativo del crecimiento óseo alrededor del implante se utilizó la aplicación *CTAn* (SkyScan). De cada muestra se analizaron un total de 70 imágenes. Los parámetros trabeculares fueron calculados en regiones seleccionadas (Figura 1) entre 0 y 5 pixels y 10 y 15 pixels, siendo 1 pixel equivalente a 21,8 μ m. Mediante la aplicación *CTVol* (SkyScan), se crearon los modelos tridimensionales tanto del biomaterial (que se ha considerado como un cilindro para mayor claridad de la representación) como del hueso formado a diferentes distancias de la superficie del implante. El sistema de análisis proporcionó el cálculo de los siguientes parámetros trabeculares:

- Porcentaje de volumen óseo (BV/TV): Relaciona el volumen de tejido óseo calcificado respecto del volumen total del área analizada (%).
- Factor de patrón de hueso trabecular (Tb.Pf): Índice de conectividad del hueso trabecular. Está basado en el principio de que una mayor concavidad trabecular indica una mayor conectividad, al aumentar la probabilidad de nodos de conexión entre las trabéculas. De esta forma, un Tb.Pf menor indica una mayor conectividad trabecular (mm^{-1}).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). La comparación no paramétrica entre dos muestras se realizó por la prueba de Mann Whitney. Se utilizó ANOVA no paramétrica para comparar varias muestras (Kruskal-Wallis), seguido de una prueba *post-hoc* (Dunn). Todos los valores con $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

Resultados

Se utilizaron técnicas de histología y μ CT para comprobar la respuesta del tejido al biomaterial y el efecto de la PTHrP (107-111) tras el defecto cavitario en el fémur del conejo, a las 4 y 8 semanas.

Del análisis histopatológico de las muestras óseas se obtuvieron los siguientes resultados:

SBA-15

A las 4 semanas de implantar el material SBA-15, éste se hallaba intacto rellenando el defecto cavitario producido en el fémur. La zona de entrada del biomaterial estaba ocupada por abundante tejido conectivo denso. Alrededor del biomaterial se observó una gran presencia de osteoide (Figura 2A) en zonas corticales, y una cápsula fibrosa que

aísla y envuelve al material, sin interferir aparentemente con el área medular. No se observó reacción inflamatoria. A las 8 semanas, el biomaterial en contacto con la médula ósea no presentaba modificaciones significativas, permaneciendo aislado por la cápsula fibrosa. Además, en la zona en contacto con el hueso cortical se observó la formación de trabéculas en las proximidades del implante (Figura 4A).

C8-SBA-15

En los animales implantados con este material se observó un comportamiento similar al descrito para el implante de SBA-15 sin funcionalizar a las 4 semanas. Sin embargo, el C8-SBA-15 se encontraba aislado por una cápsula fibrosa de mayor espesor (Figura 2C). La reparación ósea observada a las 8 semanas, abarcaba todo el defecto cavitario, observándose una cápsula fibrosa externa bien definida rodeada por osteoide que ocupaba la luz de la cavidad de entrada del biomaterial y trabéculas óseas de hueso neoformado rodeando la cara cortical del biomaterial (Figura 4C).

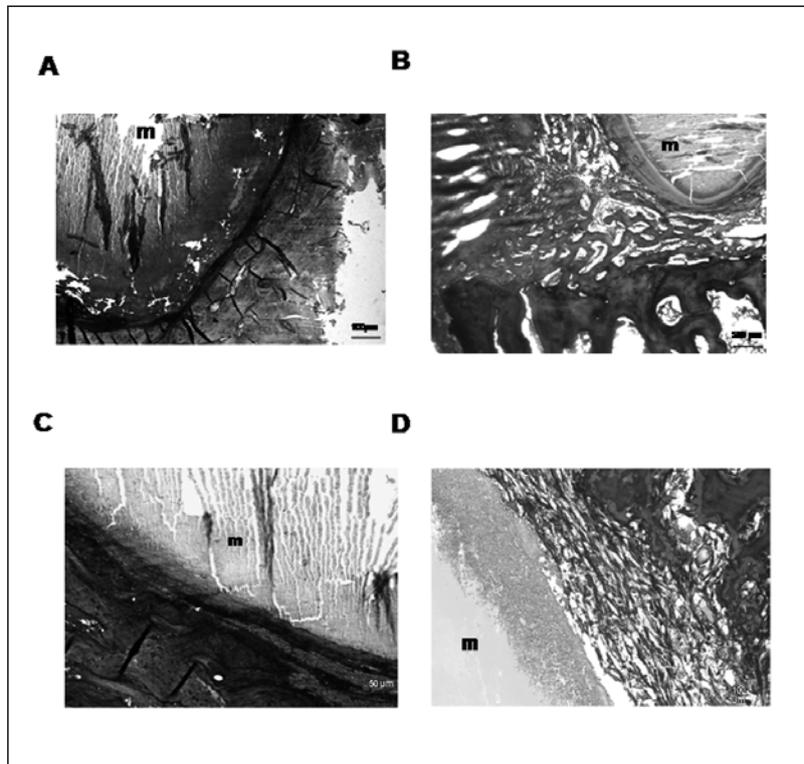
SBA-15 + PTHrP (107-111)

A las 4 semanas de implantar el SBA-15 cargado con PTHrP (107-111), se observó una intensa cicatrización que abarcaba desde la cavidad de entrada del biomaterial (ahora ocupada por una gruesa capa de tejido conjuntivo fibroso y cartilago articular) y gran cantidad de osteoide rodeando al mismo. El biomaterial en contacto con el área medular se hallaba rodeado por hueso trabecular situado en la periferia de la superficie de osteoide (Figura 2B). Por otra parte, el osteoide descrito aumentó significativamente alrededor de la cara cortical del biomaterial en dirección a la superficie externa a las 8 semanas; siendo, por el contrario, más limitada hacia la zona medular donde se observaban áreas trabeculares rodeando el biomaterial implantado (Figura 4B).

C8-SBA-15 + PTHrP (107-111)

El comportamiento del C8-SBA-15 cargado con la PTHrP (107-111) fue similar al descrito en el grupo anterior, manteniéndose un mayor espesor de la cápsula fibrosa en comparación con los grupos que no estaban funcionalizados con C8 (Figura 2D). A las 8 semanas, durante el proceso de reparación, se observó una hiperplasia conjuntiva externa y del cartilago hialino y una hiperplasia ósea que conformaban el estrato tisular de las

Figura 2. Imágenes representativas de la tinción de Masson en los fémures de conejos con los implantes de los biomateriales SBA-15 (A) o C8-SBA15 (C) sin cargar o cargados (B y D, respectivamente) con la PTHrP (107-111) a las 4 semanas del defecto cavitario. m= material correspondiente



neoformaciones de osteoide que rodean al implante. Lo más destacado de este grupo fue la reacción interna observada en la cápsula fibrosa, la cual aparecía desdoblada permitiendo la aparición de un espacio ocupado por osteoide no calcificado que perfila la superficie intacta del biomaterial (Figura 4D).

Las observaciones realizadas en el estudio histológico a 4 y 8 semanas para cada uno de los biomateriales fueron confirmadas por estudios de μ CT. En las imágenes representativas de cada grupo experimental se puede observar la formación ósea de *novo*, con presencia de trabéculas, a diferentes distancias del material implantado (Figuras 3 y 5). El aumento de formación ósea observado en las imágenes correspondientes a los materiales cargados con PTHrP (107-111) se evidenció por el aumento del % de BV/TV y la disminución del Tb.Pf. en el fémur del conejo (Tabla 1).

Los cambios observados en la histología y en la estructura ósea del fémur del conejo se correlacionaron con un aumento significativo de la tinción de OC en las muestras con materiales cargados con PTHrP (107-111) (Figura 6A). Se observó un aumento significativo de la tinción en los fémures que contenían los biomateriales cargados con PTHrP (107-111) en comparación con aquellos que no contenían el péptido. De especial interés es señalar que la presencia del péptido en el biomaterial C8-SBA-15 indujo un mayor efecto en

Tabla 1. Parámetros estructurales óseos a diferentes distancias de cada uno de los biomateriales implantados, con o sin PTHrP (107-111) a las dos y cuatro semanas del defecto cavitario producido en el fémur de conejo

4 semanas	SBA-15		SBA-15+ PTHrP (107-111)		C8-SBA-15		C8-SBA-15+ PTHrP (107-111)	
Distancia (µm)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)
109	0,50±0,09	60,82±1,14	27,74±1,04*	28,01±0,35*	2,01±0,98	35,62±1,46	26,75±1,10*	0,59±0,10*
327	3,82±0,35	28,27±2,22	14,48±0,90*	14,35±1,45	4,03±1,20	28,37±0,23	17,60±0,53*	8,01±0,42*
8 semanas	SBA-15		SBA-15+ PTHrP (107-111)		C8-SBA-15		C8-SBA-15+ PTHrP (107-111)	
Distancia (µm)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)
109	13,65±0,22	17,42±0,89	24,24±0,95*	19,92±0,72	1,95±0,59	35,24±0,92	2,86±0,44	8,75±0,21*
327	25,75±0,58	14,68±0,11	44,08±1,22*	6,25±0,15*	1,13±0,12	44,96±1,41	23,29±0,82*	4,11±0,33*

BV/TV (%) porcentaje de volumen óseo; Tb.Pf. factor de patrón de hueso trabecular. Los datos corresponden a un conejo representativo de cada grupo. *p<0,05 vs. material sin cargar correspondiente.

este marcador que en el SBA-15 (Figura 6A). En ninguno de los fémures estudiados se observó un aumento del componente inflamatorio en presencia de los diferentes materiales estudiados.

Además, la presencia de células positivas para la inmunotinción de TRAP o de RAM11 (Figura 6B y C) (marcaje de macrófagos) fue muy baja en todos los grupos de estudio (por debajo del 3%), siendo prácticamente nula en el caso de los materiales con PTHrP (107-111). No se pudieron cuantificar las diferencias en la inmunotinción positiva para VEGF (Figura 6D), ya que el marcaje fue muy débil para este marcador en la mayoría de los grupos de estudio.

Discusión

Los resultados expuestos anteriormente demuestran la capacidad osteogénica de la osteostatina, cargada en los materiales cerámicos SBA-15 y C8-SBA-15, en un modelo de regeneración ósea. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas en el contexto de la reparación ósea, ya que sugieren que la exposición local a este pentapéptido en el entorno óseo promovería la regeneración ósea. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado la capacidad de los materiales SBA-15 y C8-SBA-15 con la PTHrP (107-111) para liberar al medio el péptido y se observó que el primero liberaba aproximadamente un 4% más que el segundo a lo largo del tiempo. Esta diferencia en el perfil de liberación con ambos biomateriales es similar a la obtenida con los mismos materiales cerámicos cargados con L-triptófano, el aminoácido C-terminal de la PTHrP (107-111)²⁹. Hay que tener en cuenta que las cargas negativas del SBA-15 al pH fisiológico

utilizado en el proceso de captura del péptido promueven las interacciones electrostáticas con las cargas ligeramente positivas de los grupos amino en la PTHrP (107-111) a este pH. Sin embargo, la superficie hidrofóbica del C8-SBA-15 es capaz de interactuar con el anillo indol del triptófano en este péptido; aunque esta funcionalización deja un espacio disponible menor (ocupado por cadenas alquílicas) para la adsorción del péptido en el interior de los poros en comparación con el SBA-15²⁹. Esto justifica que este material retenga menos PTHrP (107-111) que el C8-SBA-15.

Considerando estos hallazgos *in vitro*, nos propusimos determinar la capacidad osteogénica de la osteostatina cargada en estos materiales mesoporosos *in vivo*. Con tal finalidad, se desarrolló un modelo de regeneración ósea tras provocar un defecto cavitario en el fémur de conejo. A las 4 semanas del defecto, tanto el SBA-15 como el C8-SBA-15 promovieron la osteointegración, con presencia de tejido conectivo y osteoide, de acuerdo con estudios anteriores con otros materiales cerámicos³⁵. Este efecto fue mayor en el caso de ambos materiales con la osteostatina adsorbida, como indica la presencia de trabéculas neoformadas en las inmediaciones del biomaterial y un menor grosor de la cápsula fibrosa, sobre todo a 8 semanas. La falta de respuesta inflamatoria con estos biomateriales, como indica la ausencia significativa de células con tinción de RAM11 (macrófagos) y TRAP, como consecuencia de su estabilidad (sin degradación aparente), constituye una ventaja de este tipo de biomateriales³⁶. Sin embargo, una inflamación sostenida asociada a la degradación de materiales

como el β -TCP (fosfato tricálcico ultraporoso) o el DCaS (sulfato de calcio denso) puede comprometer la regeneración ósea en defectos óseos, como consecuencia del desacoplamiento entre regeneración y resorción ósea³⁶. Además, aunque la inmunotinción para VEGF fue débil, se pudo observar una revascularización de la zona del defecto. En este sentido, dos estudios recientes de nuestro grupo demostraron que la administración sistémica de la PTHrP (107-139) estimula la angiogénesis y el sistema VEGF en la tibia en regeneración de ratones osteopélicos diabéticos o tratados con glucocorticoides^{18,19}.

Las propiedades de la PTH y del fragmento N-terminal de la PTHrP como agentes anabólicos cuando se administran de forma sistémica en humanos y en modelos animales de osteoporosis y/o fractura ósea son conocidas³⁷. En concreto, estudios en los que se utiliza la PTHrP (1-36) o un análogo sintético de la PTHrP (RS-66271) han demostrado un aumento de la densidad mineral ósea (DMO) de la columna vertebral en mujeres postmenopáusicas³⁸, así como del hueso cortical y trabecular en ratas osteopénicas³⁹. Además, el RS-66271 administrado de modo sistémico ha demostrado ser eficaz para aumentar la reparación ósea en conejos tratados con glucocorticoides (osteopélicos), aumentando la DMO y los parámetros biomecánicos y normalizando los cambios histológicos asociados a la pérdida de hueso²³. Por otro lado, diferentes factores locales óseos, como la IL-1/6, IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1), TGF- β (factor transformante del crecimiento) o las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs), han sido propuestos como posibles agentes para promover la reparación ósea⁴⁰, aunque existen pocos estudios del efecto de dichos factores incorporados a un material en este contexto.

La liberación local de factores de crecimiento en defectos óseos, como representa el modelo usado en este trabajo, se ha demostrado como eficaz y ventajosa frente a su administración exógena. Así, un estudio en ratas con un defecto segmentario en el fémur e implantadas con matrices degradables que contenían ADN plasmídico de BMP4 y/o del fragmento 1-34 de la PTH aumentaron (en mayor medida cuando la matriz poseía ambos factores) la neo-formación ósea en dicho defecto⁴¹. Algunos autores han estudiado la interacción entre la PTHrP y el IGF-1 endógenos como reguladores de la reparación ósea tras la fractura en ratas⁴². En este modelo, al inicio de la formación del callo cartilaginoso,

Figura 3. Imágenes representativas (analizadas por μ CT) de la neoformación ósea a diferentes distancias de cada uno de los biomateriales estudiados, con o sin PTHrP (107-111) a las 4 semanas de realizar el defecto cavitario en el fémur del conejo

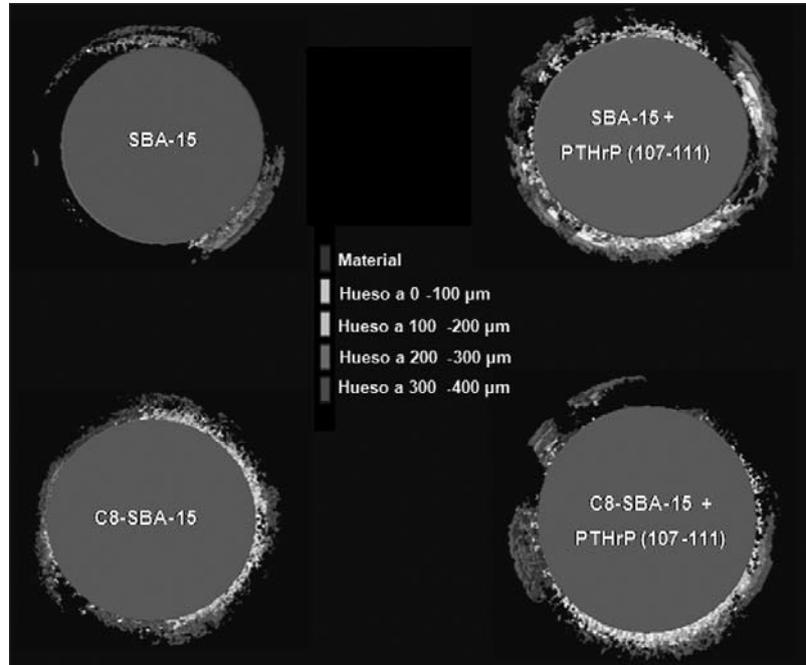


Figura 4. Imágenes representativas de la tinción de Masson en los fémures de conejos con implantes de los biomateriales SBA-15 (A) o C8-SBA15 (C) sin cargar o cargados (B y D, respectivamente) con la PTHrP (107-111) a las 8 semanas del defecto cavitario. m= material correspondiente

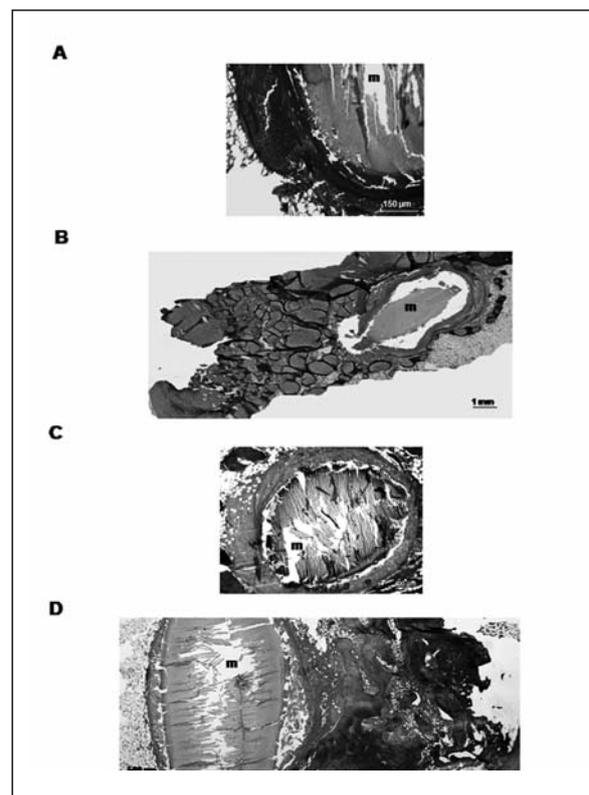


Figura 5. Imágenes representativas (analizadas por μ CT) de la neoformación ósea a diferentes distancias de cada uno de los biomateriales estudiados, con o sin PTHrP (107-111) a las 8 semanas de realizar el defecto cavitario en el fémur del conejo

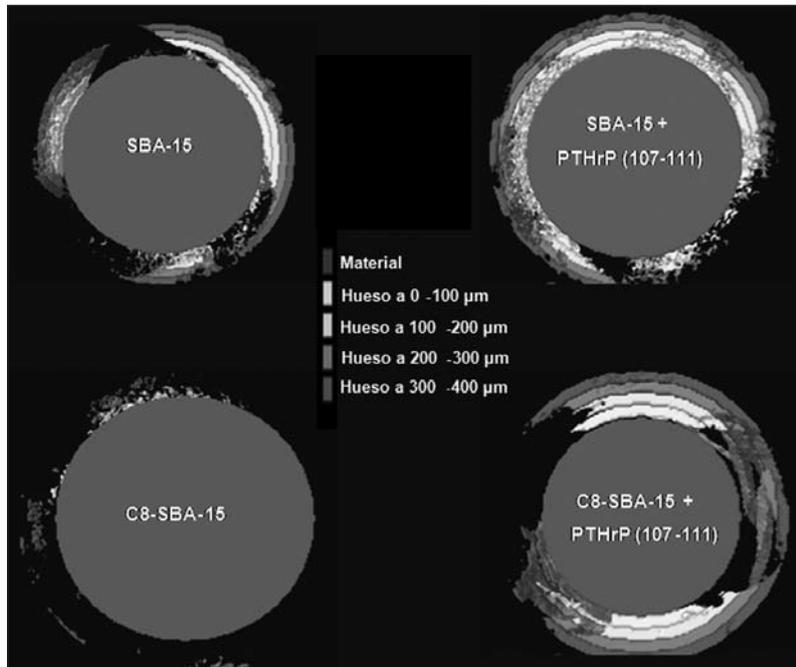
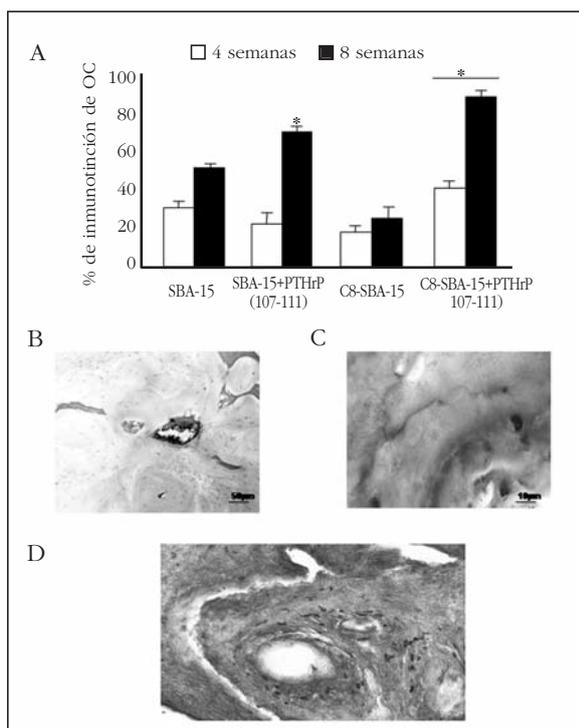


Figura 6. (A) Inmunotinción de osteocalcina (OC) en las proximidades de los biomateriales estudiados cargados o no con PTHrP (107-111), a las 4 y 8 semanas del defecto cavitario producido en el fémur del conejo. Los resultados son medias \pm EEM de 3 conejos por cada grupo experimental. * $p < 0,05$ vs material sin cargar correspondiente. Imágenes representativas de la inmunotinción de TRAP (B), de RAM11 (C) y de VEGF (D) en las proximidades del material



el IGF-1 parece aumentar la condrogénesis, mientras que la PTHrP regularía la tasa de diferenciación de condrocitos y, tras la osificación endocondral, ambos factores parecen actuar coordinadamente para aumentar la osteogénesis a través de acciones autocrinas/paracrinas. La PTHrP, cuya expresión aumenta en las células preosteoblásticas a través de su fragmento N-terminal, podría estimular la diferenciación y síntesis de colágeno en estas células a través del IGF-1⁴². Los resultados obtenidos en este modelo de defecto cavitario apoyan la hipótesis de que el fragmento C-terminal de la PTHrP ejerce efectos anabólicos locales para promover la reparación ósea, posiblemente independientes del IGF-1, basándonos en datos previos *in vitro*¹³. Los datos expuestos resaltan la importancia de la osteostatina como factor anabólico liberado de forma local en las inmediaciones de mate-

riales implantados; como demuestra la histología y el análisis de μ CT.

La existencia de cierta variabilidad en los resultados obtenidos se puede deber a las siguientes razones: se intentó reducir el número de conejos utilizados de acuerdo con las guías éticas de Protección Animal realizando multi-intervenciones en ambos fémures. Además, la reproducibilidad del defecto cavitario así como el análisis histológico (dificultad del corte en parafina con un material) y de μ CT tiene sus limitaciones debido a lo expuesto anteriormente.

A la vista de los resultados expuestos, la PTHrP (107-111) cargada en el material C8-SBA-15 ejerce un mayor efecto osteogénico en comparación con el material sin funcionalizar. Es posible que este mayor efecto se deba al péptido remanente adsorbido en la cerámica, cuyas concentraciones residuales demostraron ser suficientes para estimular la proliferación de células osteoblásticas *in vitro*, en comparación con el SBA-15 en el que el péptido es liberado de forma más rápida¹⁴.

Conclusiones

Como conclusión, queda probada la capacidad de los biomateriales cerámicos SBA-15 y C8-SBA-15 como soportes de liberación local de la PTHrP (107-111) para favorecer la regeneración ósea tras un defecto cavitario en el fémur del conejo. Además, la funcionalización del SBA-15 con grupos C8 y su posterior carga con PTHrP (107-111) permite obtener un biomaterial idóneo para promover la regeneración ósea en este sentido. Los hallazgos aquí presentados apoyan la posible uti-

lización de dichos materiales cargados con la osteostatina como alternativa terapéutica en la reparación y la regeneración ósea.

Agradecimientos: Este estudio fue realizado gracias a las ayudas procedentes del Instituto de Salud Carlos III (PI050117, PI080922, and RETICEF RD06/0013/1002), Ministerio de Educación y Ciencia de España (SAF2005-05254), Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT, España) (MAT2008-736) y Comunidad Autónoma de Madrid (S2009/MAT-1472). DL es un investigador posdoctoral asociado al proyecto de la Comunidad de Madrid (S2009/MAT-1472).

Bibliografía

1. Philbrick WM, Wysolmersky JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 1996;76:127-73.
2. Martin TJ, Moseley JM, Williams DE. Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine. *J Endocrinol* 1997;154:23-37.
3. de Castro LF, Lozano D, Portal-Núñez S, Maycas M, De la Fuente M, Caeiro JR, Esbrit P. Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *J Cell Physiol* 2012;227:1752-60.
4. Horwitz MJ, Tedesco MB, Gundberg C, García-Ocana A, Stewart AF. Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:569-75.
5. Stewart AF, Cain RL, Burr DB, Jacob D, Turner CH, Hock JM. Six-month daily administration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties: a comparison of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hormone-related protein 1-36, and SDZ-parathyroid hormone 893. *J Bone Miner Res* 2000;15:1517-25.
6. Stewart AF. PTHrP (1-36) as a skeletal anabolic agent for the treatment of osteoporosis. *Bone* 1996;19:303-6.
7. Fenton AJ, Kemp BE, Hammonds RG, Mitchelhill D, Moseley JM, Martin TJ, et al. A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved peptide region of PTHrP (107-111). *Endocrinology* 1991;129:3424-6.
8. Fenton AJ, Kemp BE, Kent GN, Moseley JM, Zheng MH, Rowe DJ, et al. A carboxyl-terminal peptide from the parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology* 1991;129:1762-8.
9. Fenton AJ, Martin TJ, Nicholson GC. Long-term culture of disaggregated rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and reduction of osteoclast-like cell number by calcitonin and PTHrP[107-139]. *J Cell Physiol* 1993;155:1-7.
10. Cornish J, Callon KE, Nicholson GC, Reid IR. Parathyroid hormone-related protein-(107-139) inhibits bone resorption in vivo. *Endocrinology* 1997;138:1299-304.
11. Boileau G, Tenenhouse HS, Desgrois L, Crine P. Characterization of PHEX endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid-hormone-related peptide 107-139 as a substrate and osteocalcin, PPI and phosphate as inhibitors. *Biochem J* 2001;355:707-13.
12. Cornish J, Callon KE, Lin C, Xiao C, Moseley JM, Reid IR. Stimulation of osteoblast proliferation by C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res* 1999;14:915-22.
13. De Gortázar AR, Alonso V, Álvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Transient exposure to PTHrP (107-139) exerts anabolic effects through vascular endothelial growth factor receptor 2 in human osteoblastic cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 2006;79:360-9.
14. Lozano D, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, Vallet-Regí M, Gómez-Barrena E, et al. Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation. *Acta Biomater* 2010;6:797-803.
15. Valín A, Guillén C, Esbrit P. C-terminal parathyroid hormone-related protein (PTHrP) (107-139) stimulates intracellular Ca²⁺ through a receptor different from the type 1 PTH/PTHrP receptor in osteoblastic osteosarcoma UMR 106 cells. *Endocrinology* 2001;142:2752-9.
16. Guillén C, Martínez P, de Gortázar AR, Martínez ME, Esbrit P. Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by NF-κB activation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2002;277:28109-17.
17. Alonso V, de Gortázar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Álvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol* 2008;217:717-27.
18. Fernández de Castro L, Lozano D, Dapía S, Portal-Núñez S, Caeiro JR, Gómez-Barrena E, et al. Role of the N- and C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein as putative therapies to improve bone regeneration under high glucocorticoid treatment. *Tissue Eng Part A* 2010;16:1157-68.
19. Lozano D, Fernández-de-Castro L, Portal-Núñez S, López-Herradón A, Dapía S, Gómez-Barrena E, et al. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low turnover osteopaenia. *Br J Pharmacol* 2011;162:1424-38.
20. Deschaseaux F, Sensébé L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med* 2009;15:417-29.
21. Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Relat Res* 1997;342:218-27.
22. Andreassen TT, Ejersted C, Oxlund H. Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. *J Bone Miner Res* 1999;14:960-8.
23. Bostrom MP, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Hill E, Avnur Z, et al. Parathyroid hormone-related protein analog RS-66271 is an effective therapy for impaired bone healing in rabbits on corticosteroid therapy. *Bone* 200;26:437-42.
24. Vallet-Regí M, Balas F, Arcos D. Mesoporous materials for drug delivery. *Angew Chem Int Ed* 2007;46:7548-58.
25. Vallet-Regí M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *Comptes Rendus Chimie* 2010;13:174-85.
26. Manzano M, Colilla M, Vallet-Regí M. Drug delivery from ordered mesoporous matrices. *Expert Opin Drug Deliv* 2009;6:1383-400.
27. Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, et al. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science* 1998;279:548-52.
28. Vallet-Regí M. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Trans* 2006;28:5211-20.
29. Balas F, Manzano M, Colilla M, Vallet-Regí M. L-Trp adsorption into silica mesoporous materials to promote bone formation. *Acta Biomater* 2008;4:514-22.
30. Zhao D, Huo Q, Fena J, Chmelka BF, Stucky GD. Non ionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant synthesis of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *J Am Chem Soc* 1998;120:6024-36.
31. Zambonin G, Camerino C, Greco G, Patella V, Moretti B, Grano M. Hydroxyapatite coated with hepatocyte growth factor (HGF) stimulates human osteoblasts in vitro. *J Bone Joint Surg* 2000;82:457-60.
32. Zambonin G, Grano M, Greco G, Oreffo ROC, Triffitt JT. Hydroxyapatite coated with insulin-like growth fac-

- tor 1 (IGF1) stimulates human osteoblast activity in vitro. *Acta Orthop Scand* 1999;70:217-20.
33. Hoemann CD, Sun J, McKee MD, Chevrier A, Rossomacha E, Rivard GE, et al. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:78-89.
 34. Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am A* 1984;1:612-9.
 35. Kosmulski M. PH-dependent surface charging and points of zero charge. II.Update. *J Colloid Interface Sci* 2004;275:214-24.
 36. Hing KA, Wilson LF, Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine J* 2007;7:475-90.
 37. Lozano D, de Castro LF, Dapía S, Andrade-Zapata I, Manzarbeitia F, Álvarez-Arroyo MV, et al. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. *Endocrinology* 2009;150:2027-35.
 38. Horwitz MJ, Tedesco MB, Gundberg C, García-Ocana A, Stewart AF. Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:569-75.
 39. Vickery BH, Avnur Z, Cheng Y, Chiou SS, Leaffer D, Caulfield JP, et al. RS-66271, a C-terminally substituted analog of human parathyroid hormone-related protein (1-34), increases trabecular and cortical bone in ovariectomized, osteopenic rats. *J Bone Miner Res* 1996;11:1943-51.
 40. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 1996;19:1S-12S.
 41. Fang J, Zhu YY, Smiley E, Bonadio J, Rouleau JP, Goldstein SA, et al. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5753-8.
 42. Okazaki K, Jingushi S, Ikenoue T, Urabe K, Sakai H, Iwamoto Y. Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing. *J Orthop Res* 2003;21:511-20.

Guede D^{1,2}, Pereiro I³, Solla E³, Serra J³, López-Peña M⁴, Muñoz F⁴, González-Cantalapiedra A⁴, Caeiro JR^{2,5}, González P³

1 Trabeculae - Empresa de Base Tecnológica, S.L. - Ourense

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

3 Grupo de Nuevos Materiales - Departamento de Física Aplicada - Universidad de Vigo - Pontevedra

4 Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias - Facultad de Veterinaria - Universidad de Santiago de Compostela - Lugo

5 Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología - Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela - A Coruña

Osteointegración y biocompatibilidad *in vivo* de cerámicas bioinspiradas de carburo de silicio en un modelo experimental en conejo

Correspondencia: David Guede - Trabeculae, S.L. Parque Tecnológico de Galicia - Edificio "Tecnópole I" Local 22 - 32900 San Cibrao das Viñas - Ourense (España)
Correo electrónico: dguede@trabeculae.com

Fecha de recepción: 27/07/2012

Fecha de aceptación: 02/11/2012

Trabajo becado por la FEIOMM para asistir al 33 Congreso de la ASBMR (San Diego, 2011)

Resumen

Fundamento: La nueva generación de materiales para implantes debe imitar las estructuras jerárquicas de la naturaleza. El carburo de silicio bioinspirado (bioSiC) es una cerámica producida a partir de madera, que presenta una estructura similar al hueso, con la propiedad única de una porosidad interconectada, que permite el crecimiento interno de los tejidos y favorece la angiogénesis.

Objetivos: Valorar la biocompatibilidad y osteointegración del bioSiC en defectos óseos femorales en un modelo experimental en conejo.

Material y métodos: Se obtuvieron 36 cilindros de bioSiC mediante pirólisis de madera de sapelli e infiltración con silicio fundido de la preforma de carbono resultante. Dieciocho cilindros se recubrieron con Si-HA por deposición con láser pulsado. Los cilindros se implantaron en cóndilos femorales de conejos que se sacrificaron a las 1, 4 ó 12 semanas. Las muestras se analizaron histológicamente mediante microscopía óptica y por microtomografía computarizada para evaluar el crecimiento de hueso.

Resultados: Los implantes de bioSiC mostraron una buena osteointegración presentando tanto crecimiento hacia fuera (*ongrowth*) como hacia dentro (*ingrowth*). A las 4 semanas de la implantación la integración era casi completa, sin diferencias frente a las 12 semanas. El recubrimiento no mejora el valor de ningún parámetro con respecto a los implantes no recubiertos.

Conclusiones: Las cerámicas de bioSiC fabricadas a partir de madera porosa presentan una buena osteointegración y su porosidad interconectada es colonizada por el tejido óseo. No requieren además la bioactividad de un revestimiento para mejorar la aposición de hueso neoformado. El bioSiC se erige como un material a tener en cuenta en aplicaciones biomédicas.

Palabras clave: carburo de silicio, sustitutos óseos, osteointegración, técnicas histológicas, microtomografía computarizada de rayos X.

Osteointegration and biocompatibility *in vivo* of bio-inspired silicon carbide ceramics in an experimental model in rabbits

Summary

Background: The new generation of materials for implants should imitate the hierarchical structures found in nature. Bio-inspired silicon carbide ceramic (bioSiC) is a ceramic produced from wood, which has a similar structure to bone, with a unique property of interconnected porosity, which allows the internal growth of tissue and favours angiogenesis.

Objectives: To evaluate the biocompatibility and osteointegration of bioSiC in femoral bone defects in an experimental model in rabbits.

Material and methods: 36 cylinders of bioSiC were obtained through pyrolysis of sapelli wood and infiltration with molten silicon of the resulting carbon preform. Eighteen cylinders were coated with Si-HA by pulsed laser deposition. The cylinders were implanted in femoral condyles of rabbits which were sacrificed at 1, 4 or 12 weeks. The samples were analysed histologically using an optical microscope and computerised microtomography to assess bone growth.

Results: The bioSiC implants showed good osteointegration, there being both outward growth (ongrowth) and inward growth (ingrowth). At 4 weeks from implantation the integration was almost complete, with no difference from that seen at 12 weeks. The coating did not improve the value of any parameter with respect to the non-coated implants.

Conclusions: BioSiC ceramics produced from porous wood have good osteointegration and their interconnected porosity is colonised by bone tissue. In addition, they do not require the bioactivity of a coating to improve the apposition of neoformed bone. BioSiC stands as a material to be taken into account in biomedical applications.

Key words: *silicon carbide, bone substitutes, osteointegration, histological techniques, X-ray computerised microtomography.*

Introducción

Tradicionalmente, los defectos óseos se han tratado implantando tejido autólogo (procedente del propio paciente), alogénico (procedente de otro individuo de la misma especie) o xenogénico (obtención de hueso de un animal de otra especie), o bien implantando materiales sustitutos. Los autoinjertos, aunque han mostrado un alto porcentaje de éxito, se ven limitados por la cantidad de tejido que puede extraerse y por la morbilidad del sitio de extracción¹. Por su parte, los aloinjertos y los xenoinjertos (estos últimos mucho menos utilizados) pueden causar reacciones inmunes y transmitir patógenos al paciente. Con respecto a los sustitutos óseos sintéticos, todos ellos gozan de una serie de ventajas sobre los injertos de hueso, como su ilimitada disponibilidad o su sencilla esterilización. Sin embargo, a pesar de su gran variabilidad, el principal problema de todos estos materiales es su limitación para proporcionar soporte mecánico a la zona afectada². Las demandas actuales de la ingeniería de tejidos para la regeneración de tejido óseo plantean nuevos retos en ciencia de materiales e ingeniería biomédica. Así surge una tendencia tecnológica basada en la biomimética para el desarrollo de nuevos biomateriales, que se inspiren en los modelos y bioestructuras que nos ofrece la naturaleza, y que han sido perfeccionados y optimizados a lo largo del proceso evolutivo.

Los materiales cerámicos bioinspirados, basados en precursores naturales como madera, plantas o algas, reúnen varios de los requisitos que se

le exigen a esa nueva generación de biomateriales: buenas prestaciones biomecánicas, ligeros, tenaces y con una estructura con porosidad jerarquizada e interconectada que se asemeja al tejido óseo para favorecer el crecimiento de tejido en su interior y la angiogénesis, es decir, la osteointegración del material en el tejido huésped³. Las cerámicas de carburo de silicio bioinspiradas (bioSiC) reúnen los requisitos biomecánicos adecuados para utilizarse como sustituto óseo. Estas cerámicas pueden ser fabricadas a partir de diversas estructuras naturales^{4,5}. El proceso tecnológico de fabricación se basa en la ceramización de los precursores naturales, obteniéndose como resultado final una pieza de carburo de silicio con una porosidad interconectada que mantiene la jerarquía estructural en cuanto a tamaño y distribución de poros del original.

Los ensayos mecánicos indican que las propiedades de estos materiales pueden ser ajustadas a medida, mediante una selección apropiada del precursor vegetal de partida, dependiendo de las características del tipo de hueso que se pretenda reparar, y modificando las condiciones experimentales de fabricación. Así, a semejanza del hueso, cabe señalar que el bioSiC presenta propiedades mecánicas anisotrópicas con valores que se comparan positivamente con los del hueso. A modo de ejemplo, el bioSiC obtenido a partir de madera de sapelli (*Entandrophragma cylindricum*) presenta valores de resistencia a la compresión en dirección longitudinal (eje de crecimiento del árbol) de 210 ± 20 a 1.160 ± 100 MPa, y en dirección

radial desde 120 ± 10 a 430 ± 50 MPa, en función de la cantidad de Si infiltrado⁶⁷. La resistencia a la compresión de especímenes de hueso cortical humano varía entre 167 y 215 MPa⁸.

La biocompatibilidad de un material se refiere a la capacidad de funcionar como un sustrato que soportará la actividad celular apropiada, facilitando los sistemas de señalización molecular y mecánica, con el fin de optimizar la regeneración de los tejidos, sin provocar reacciones indeseables en el huésped⁹. El objetivo de este estudio ha sido comprobar la capacidad de osteointegración de cerámicas de bioSiC en un modelo animal de defecto óseo en conejo, comprobando su biocompatibilidad *in vivo* mediante la comparación de implantes sin recubrimiento e implantes con un recubrimiento bioactivo.

Material y métodos

Fabricación de SiC bioinspirado

El proceso de fabricación de las cerámicas bioinspiradas consiste en dos fases básicas. La primera de ellas es el proceso de pirólisis, donde el precursor natural seco o liofilizado se somete a alta temperatura en condiciones inertes. Se procede al calentamiento de la muestra con una rampa controlada de $2^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta $600\text{-}800^\circ\text{C}$; se mantiene a esta temperatura durante 1 h y se enfría lentamente hasta temperatura ambiente. El material resultante es una proforma carbonácea que mantiene todos los detalles bioestructurales del sistema vascular del precursor original.

La segunda fase consiste en un proceso de infiltración, donde la proforma de carbón se cubre con polvo de silicio y se expone a alta temperatura en un horno controlable en condiciones de vacío. Se alcanza una temperatura de 1.550°C , a razón de $5\text{-}10^\circ\text{C}/\text{min}$, se mantiene 30 min a temperatura máxima, se procede al enfriado controlado a $20^\circ\text{C}/\text{min}$ y se obtiene una pieza de carburo de silicio.

Para este estudio se obtuvieron 36 cilindros de bioSiC a partir de madera de sapelli, de los cuales 18 se recubrieron con Si-HA (7,5 at. %) mediante deposición por láser pulsado (PLD). La fabricación de los recubrimientos de Si-HA se llevó a cabo con un láser excímero (193 nm, 175 mJ y 10 Hz) a partir de una pastilla sintética de hidroxiapatita (HA) y silicio en polvo (7,5 at. % de Si). El depósito se realizó en una atmósfera de vapor de agua (0,45 mbar) manteniendo el sustrato de bioSiC a 460°C durante el crecimiento del recubrimiento.

Modelo animal

Para investigar la biocompatibilidad *in vivo* del material, se diseñó un modelo experimental de defecto óseo en fémur de conejo. Los cilindros de bioSiC se implantaron en los cóndilos laterales de los fémures de 18 conejos *New Zealand*, para lo que se realizó un abordaje lateral longitudinal distal sobre el muslo de ambas extremidades. Con una broca se practicó un orificio en la epífisis distal del fémur donde se implantó aleatoriamente un cilindro de bioSiC sin recubrimiento o un cilindro de bioSiC con recubrimiento bioactivo de Si-HA. Los animales se sacrificaron mediante administración intravenosa de

pentobarbital sódico a las 1, 4 y 12 semanas tras la implantación y se obtuvieron las muestras que fueron fijadas en formol tamponado al 10%. De este modo, se obtuvieron 6 grupos experimentales ($n=6$), los tres primeros con implantes sin recubrimiento a los tres tiempos de estudio, y los tres últimos con implantes recubiertos. Todos los experimentos se han llevado a cabo conforme a la Ley 14/2007 y al Real Decreto 1201/2005, y siguiendo las directrices de las normas UNE-EN 30993-3:1994 e ISO 10993-2:2006.

Análisis histológico

Las muestras se procesaron para su estudio utilizando las técnicas de inclusión en metacrilato descritas por Donath¹⁰ siguiendo los pasos de fijación, deshidratación, infiltración, inclusión y polimerización. Posteriormente se realizaron secciones longitudinales del cóndilo del fémur de aproximadamente $30\ \mu\text{m}$ de espesor, que fueron teñidas mediante la tinción de Lévai-Laczkó.

Una vez preparadas, las muestras se observaron con lupa binocular y se estimó la fracción del área total de poros ocupada por hueso, la cantidad de hueso neoformado en la periferia del implante y el porcentaje de la superficie del implante en contacto con hueso¹¹. La calibración posterior se realizó con la aplicación informática Microimage.

Análisis mediante micro-CT

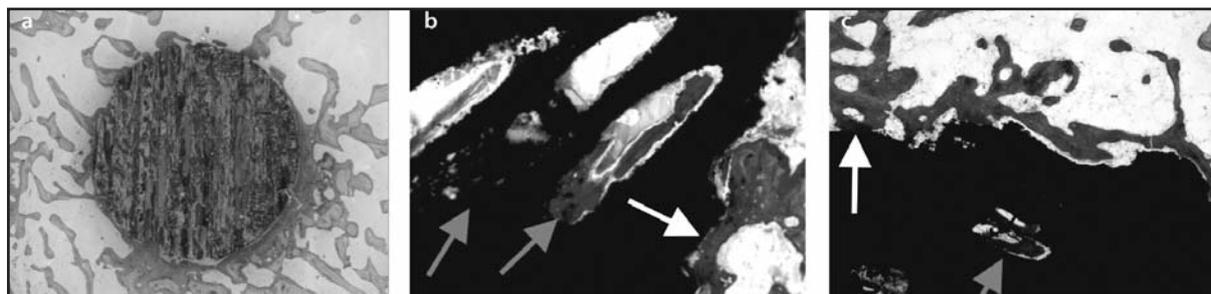
La formación de hueso alrededor del implante se analizó también mediante microtomografía computarizada (micro-CT). Las muestras se escaneron mediante un microtomógrafo de rayos X de alta resolución SkyScan 1172 (Bruker micro CT NV, Kontich, Bélgica) a 60 kV y $167\ \mu\text{A}$ de intensidad de la fuente de rayos X. Se empleó una resolución nominal de $7,90\ \mu\text{m}$ y un filtro de Al de 1 mm de grosor para obtener un intervalo restringido de longitudes de onda. El paso de rotación fue de $0,2^\circ$ con una rotación total de 360° y un valor de *frame averaging* (imágenes por paso) de tres. Las imágenes obtenidas se reconstruyeron mediante el algoritmo de Feldkamp modificado¹² y se analizaron mediante la aplicación comercial CTAnalyzer (Bruker micro CT NV, Kontich, Bélgica). Para ello, se seleccionó un volumen de interés de un grosor de $160\ \mu\text{m}$ desde la superficie del implante, en el que se determinó la fracción volumétrica ósea (BV/TV). Se calculó además la superficie de intersección del hueso con el implante refiriéndola a la superficie total del implante (i.S/TS).

Análisis estadístico

Los datos recogidos del estudio se introdujeron en una base de datos de texto que se exportó posteriormente al paquete estadístico SPSS 18.0 (IBM, Armonk, NY, USA) para su posterior análisis estadístico. Seguidamente se procedió con el análisis descriptivo de las variables de estudio. Los datos estadísticos descriptivos de las variables numéricas se expresaron como media \pm desviación estándar.

El estudio estadístico comparativo de todos los resultados numéricos obtenidos para los distintos grupos de estudio se llevó a cabo mediante la apli-

Figura 1. Imágenes histológicas de un cilindro de bioSiC tras 12 semanas de implantación: a) se observa crecimiento óseo alrededor y dentro de los poros del implante, sin apreciarse tejido fibroso separando hueso e implante; b y c) se observa la colonización de la porosidad por el tejido óseo a mayor magnificación y el contacto del mismo con la cerámica biomórfica



cación del test *U* de Mann-Whitney debido a que las variables no superaban los criterios de normalidad aplicados. La relación existente entre los resultados obtenidos mediante histología y micro-CT se estudió con la correlación de Pearson.

El nivel de significación estadística se estableció en valores de $p < 0,05$ para todas las variables analizadas.

Resultados

La biocompatibilidad *in vitro* de las cerámicas de bioSiC se demostró mediante el cultivo de la línea celular osteoblástica humana MG-63 en un estudio previo⁷. Para investigar la biocompatibilidad *in vivo* de estas biocerámicas se llevó a cabo un modelo experimental en fémur de conejo. Los cortes histológicos obtenidos de las muestras tras la implantación se examinaron mediante microscopía óptica y microtomografía computarizada.

Mediante el análisis histológico, se puede observar crecimiento de hueso neoformado en la superficie de los implantes, no apreciándose signos de inflamación ni aparición de tejido fibroso alrededor de las muestras. Es destacable que el hueso neoformado penetra por los poros de la misma. A mayores aumentos en el microscopio podemos comprobar dicha colonización así como el contacto óseo con el implante, lo cual representa una característica resaltante (Figura 1).

En los implantes sin recubrimiento, a la primera semana de implantación se observa que un 10,38% del área de poros ha sido colonizada por hueso nuevo, porcentaje que aumenta hasta el 37,52% a las 4 semanas ($p=0,017$). En el área seleccionada en la periferia del implante, el hueso neoformado a la primera semana ocupa el 21,25%, mientras que a las 4 semanas es del 32,30% ($p=0,030$). A las 12 semanas no se observan diferencias en ninguna variable con respecto a las muestras de las 4 semanas (Figura 2).

En el análisis con micro-CT, la región de interés seleccionada para el análisis del crecimiento de hueso fue de 160 μm desde la superficie del implante. Tras la primera semana de la colocación de los implantes de bioSiC, el BV/TV de la región analizada fue de 11,49%, lo que implica que del volumen analizado alrededor del implante, dicho porcentaje

estaba ocupado por hueso. A las 4 semanas, el BV/TV se incrementó hasta 45,36% ($p=0,030$ vs. 1ª semana). El valor a las 12 semanas no muestra diferencias significativas frente al valor de las 4 semanas. Del mismo modo, la i.S/TS, que representa el porcentaje de la superficie del implante en contacto con hueso, aumenta hasta la cuarta semana, tras la cual su valor parece estabilizarse, quedando aproximadamente la mitad de la superficie del implante en contacto con hueso neoformado. No se han encontrado tampoco diferencias entre los grupos de las 4 y 12 semanas (Figuras 2 y 3).

Se ha estudiado la relación existente entre los resultados obtenidos con ambas técnicas, mediante correlación de Pearson. El BV/TV calculado por micro-CT presenta una correlación positiva con el porcentaje de hueso neoformado en la periferia determinado mediante histología ($r=0,588$, $p < 0,001$); de igual modo que la superficie de intersección microtomográfica (i.S/TS) con el porcentaje de contacto óseo histológico ($r=0,677$, $p < 0,001$) (Figura 4).

Discusión

La naturaleza ofrece una gran variedad de especies con porosidad muy diversa, por lo que debemos seleccionar el precursor original más adecuado para la estructura ósea que se desee replicar. Entre sus características comunes destaca la disposición de una estructura porosa jerárquica que se replica en las cerámicas bioinspiradas.

En el caso del sapelli, observamos una combinación de macrocanales con un diámetro entre 80 y 100 μm , que tienen incidencia en la promoción de la vascularización, transporte de nutrientes y productos de desecho. También se observan microporos de unos 4 μm que participan en la formación de la capilaridad⁷. Por otro lado, es destacable la presencia de poros en la escala nanométrica, que juegan un papel interesante en aspectos relacionados con la difusión molecular para la nutrición y señalización. La interconexión de los poros proporciona el canal para la migración celular y permite la formación de vasos sanguíneos; y la rugosidad del material contribuye a incrementar el área superficial favoreciendo la adsorción de proteínas y el intercambio iónico³.

Figura 2. Representación gráfica de los resultados de las variables estructurales obtenidas mediante micro-CT: a) fracción volumétrica ósea (BV/TV), b) porcentaje de superficie de intersección del hueso con el implante (i.S/TS); y mediante histología: c) porcentaje de área de hueso formado en la periferia del implante, d) porcentaje de la superficie del implante en contacto con hueso, y e) porcentaje de área de hueso formado en el interior del implante en relación al área total de poros

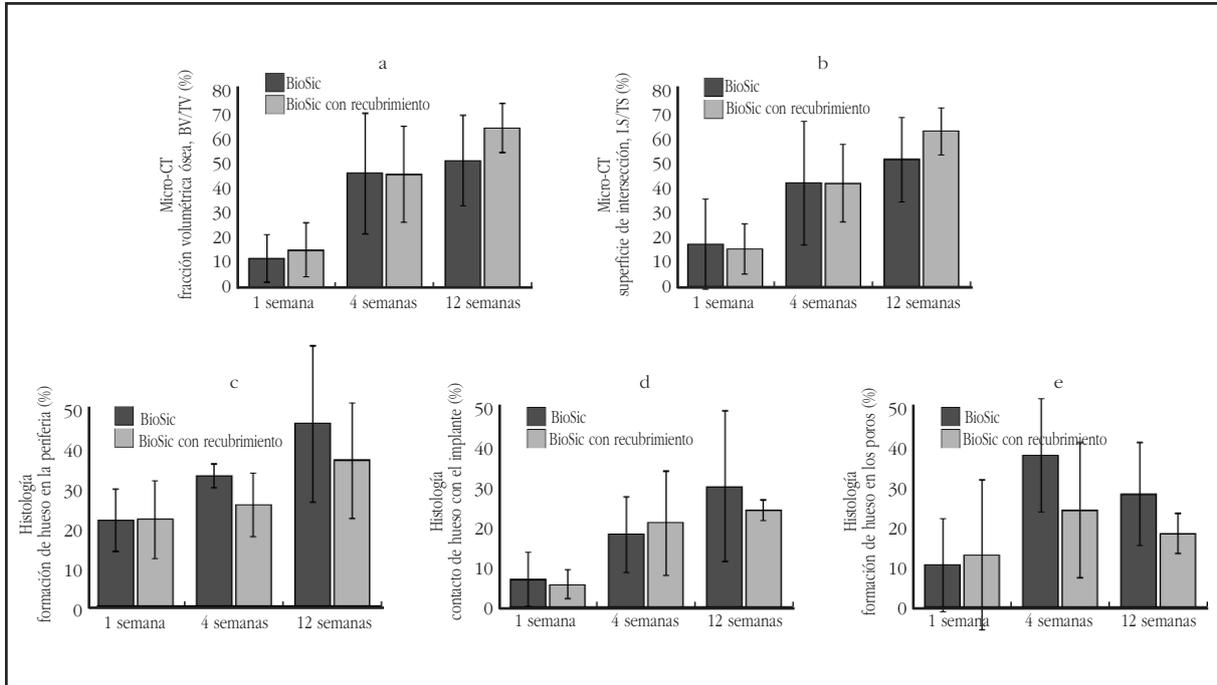


Figura 3. Modelos tridimensionales de las cerámicas de bioSiC a las 1, 4 y 12 semanas (a, b y c) y de bioSiC con recubrimiento bioactivo de Si-HA (d, e y f). Los cilindros cerámicos se representan en gris oscuro el hueso neoformado en la periferia del implante en gris claro

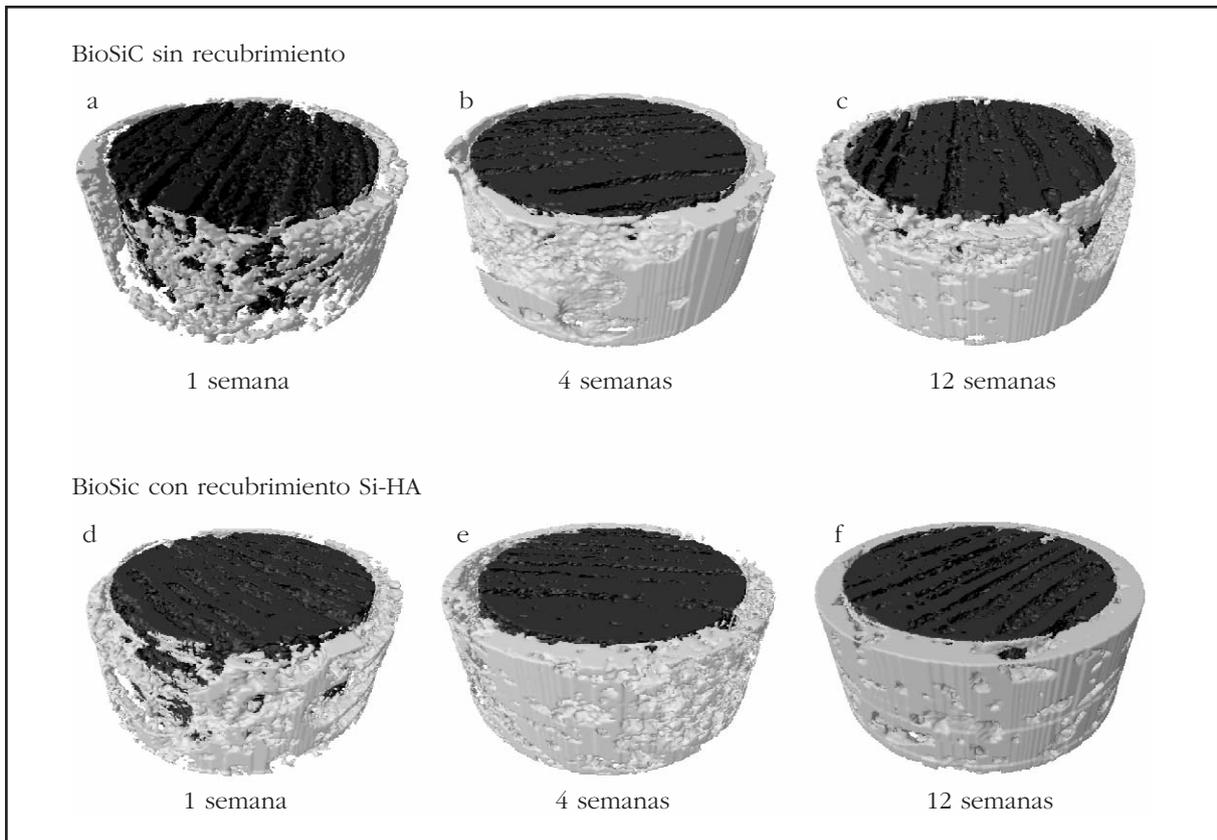
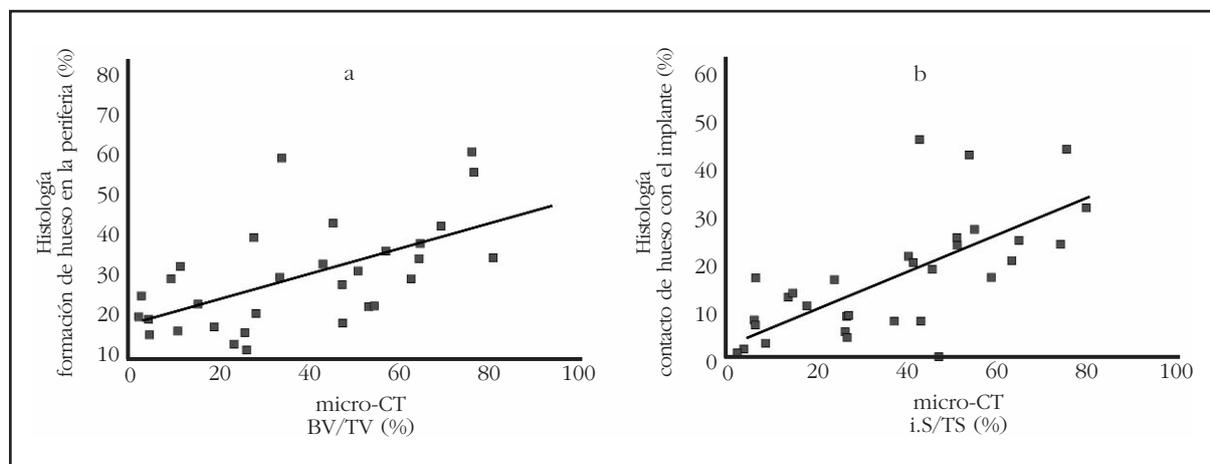


Figura 4. Diagramas de dispersión con los datos de los parámetros obtenidos mediante micro-CT e histología: a) la fracción volumétrica ósea microtomográfica frente a la formación de hueso en la periferia determinada por histología, ambas variables que cuantifican el hueso formado alrededor de los implante de bioSiC; b) el porcentaje de la superficie del implante en contacto con hueso, medida por micro CT y por histología



De los valores obtenidos tanto mediante el análisis histológico como del análisis microestructural con micro-CT se deduce que la osteointegración se completa a las 4 semanas. Ninguno de los parámetros analizados por una u otra técnica muestra diferencias significativas entre las muestras de 4 y 12 semanas, ya sea en las muestras con recubrimiento o en las que carecen de él. Las muestras en las que se ha aplicado el recubrimiento de Si-HA no presentan diferencias significativas frente a las muestras de bioSiC sin recubrimiento para ninguna de las variables analizadas. De este hecho se deduce que las cerámicas bioinspiradas de SiC no necesitan de la aportación del recubrimiento para resultar biocompatibles, y el recubrimiento no mejora su contacto con el hueso.

Las cerámicas bioinspiradas de carburo de silicio presentan por tanto un alto potencial como nuevo biomaterial para aplicaciones biomédicas. Se demuestra la viabilidad de producción de dispositivos cerámicos ligeros, tenaces y con porosidad interconectada susceptibles de utilizarse como sustituto óseo. Los ensayos *in vivo* de implantes de bioSiC indican que la porosidad de este biomaterial es colonizada por tejido óseo y se favorece su mineralización. También se comprueba que presenta una buena aposición de hueso neoformado y una adecuada osteointegración en tiempos relativamente cortos tras la implantación.

Bibliografía

- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004;4:743-65.
- Vicario Espinosa C. Los aloinjertos óseos en Cirugía Ortopédica y Traumatología (1). *Patología Aparato Locomot* 2004;2:214-32.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (eds). *Biomaterials Science: Introduction to Materials in Medicine*, 2nd Edition. London: Elsevier Academic Press; 2004.
- Martínez-Fernández J, Varela-Feria FM, Singh M. High temperature compressive mechanical behavior of biomorphic silicon carbide ceramics. *Scr Mater* 2000;43:813-8.
- De Arellano-López AR, Martínez-Fernández J, González P, Domínguez C, Fernández-Quero V, Singh M. Biomorphic SiC: A new engineering ceramic material. *Int J Appl Ceram Technol* 2004;1:56-67.
- Kardashev BK, Burenkov YuA, Smirnov BI, de Arellano-López AR, Martínez-Fernández J, Varela-Feria FM. Elasticity and inelasticity of biomorphic silicon carbide ceramics. *Phys Solid State* 2004;46:1873-7.
- González P, Borrajo JP, Serra J, Chiussi S, León B, Martínez-Fernández J, et al. A new generation of bio-derived ceramic materials for medical applications. *J Biomed Mater Res A* 2009;88:807-13.
- An YH. Mechanical properties of bone. In: An YH, Draughn RA (eds.). *Mechanical testing of bone and the bone-implant interface*. Boca Raton, Florida, (USA): CRC Press; 2000.
- Williams D. Revisiting the definition of biocompatibility. *Med Device Technol* 2003;14:10-3.
- Donath K. Preparation of histologic sections by the cutting-grinding technique for hard tissue and other material not suitable to be sectioned by routine methods. Norderstedt: Institute for Pathologie, University of Hamburg; Exakt-Kulzer-Publication; 1995.
- Tonino AJ, Thèrin M, Doyle C. Hydroxyapatite-coated femoral stems: Histology and histomorphometry around five components retrieved at post mortem. *J Bone Joint Surg Br* 1999;81:148-54.
- Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am A* 1984;1:612-9.

Delgado-Calle J¹, Sañudo C¹, Sumillera M², Garcés CM², Riancho JA¹

¹ Departamento de Medicina Interna - H.U. Marqués de Valdecilla - IFIMAV - Universidad de Cantabria - Santander

² Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología - H.U. Marqués de Valdecilla - Santander

Expresión de RANKL y OPG en osteoblastos primarios

Correspondencia: José A. Riancho - Departamento de Medicina Interna - Hospital U.M. Valdecilla - IFIMAV - Universidad de Cantabria - Av. Marqués de Valdecilla, s/n - 39008 Santander (España)
Correo electrónico: rianchoj@unican.es

Fecha de recepción: 20/06/2012

Fecha de aceptación: 19/11/2012

Resumen

Objetivo: Los osteoblastos son células especializadas encargadas principalmente de la formación ósea. Además son capaces de modular la osteoclastogénesis a través de la producción de RANKL y OPG. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de estas citocinas en osteoblastos primarios.

Material y métodos: Se obtuvieron osteoblastos primarios usando tejido óseo trabecular de pacientes sometidos a colocación de una prótesis de cadera por fractura (n=28) o artrosis (n=26). Se excluyeron del estudio aquellos pacientes con osteoporosis secundaria, con fracturas debidas a traumatismos de alta energía o artrosis secundaria. La expresión de RANKL y OPG se estudió mediante PCR cuantitativa.

Resultados: La expresión de RANKL y OPG no varió significativamente durante un proceso de mineralización *in vitro*. Además, la expresión de OPG fue marcadamente superior a la de RANKL. Dado que en un trabajo previo encontramos una mayor abundancia de RANKL y un mayor cociente RANKL/OPG en el tejido óseo de pacientes osteoporóticos que en el de artrósicos, decidimos estudiar si esta expresión anormal en tejido se daba también en los osteoblastos. Sin embargo, en cultivos de osteoblastos primarios no encontramos diferencias en los niveles de expresión de RANKL, ni de OPG, entre los dos grupos de pacientes.

Conclusiones: En conjunto, nuestros datos confirman que los osteoblastos son capaces de producir RANKL y OPG. Sin embargo, las diferencias de expresión encontradas a nivel de tejido óseo entre pacientes osteoporóticos y artrósicos no parecen relacionarse con diferentes características intrínsecas de sus osteoblastos, pues no se reproducen en los cultivos primarios.

Palabras clave: osteoclastogénesis, remodelado óseo, osteoporosis, artrosis.

Expression of RANKL and OPG in primary osteoblasts

Summary

Objective: Osteoblasts are specialized cells responsible for bone formation. Furthermore, these cells modulate osteoclast formation and maturation, mainly by the production of RANKL and OPG. We previously reported that the bone tissue of osteoporotic patients showed increased RANKL expression and RANKL/OPG ratio when compared to osteoarthritic patients. Thus we decided to explore whether this aberrant expression may be related to an abnormal expression of these genes by osteoblasts. The aim of this study was to explore the transcriptional levels of these factors in primary osteoblasts.

Methods: Primary human osteoblasts (hOBs) were obtained by the primary explant technique from bone tissue of patients undergoing hip replacement surgery for hip fractures (n=28) or osteoarthritis (n=26). Patients with secondary osteoporosis, fractures due to high-energy trauma or secondary osteoarthritis were excluded. RANKL and OPG gene expression was explored by real time quantitative PCR.

Results: No statistical differences in RANKL and OPG gene expression were found along the *in vitro* mineralization of hOBs. Interestingly, OPG transcriptional levels were markedly higher than RANKL levels. However, no differences in the transcriptional levels of RANKL and OPG were observed between both groups.

Conclusions: Overall, our data confirm that osteoblasts produce RANKL and OPG. However, our results suggest that the gene expression differences found in the osteoporotic and osteoarthritic bone tissue are not explained by the intrinsic characteristics of osteoblasts.

Key words: osteoclastogenesis, bone remodeling, osteoporosis, osteoarthritis.

Introducción

El hueso es una forma especializada de tejido de sostén formado por diferentes tipos celulares y materiales mineralizados que le confieren rigidez y resistencia marcadas, a la vez que le permiten conservar un cierto grado de elasticidad. Debido a esta peculiar composición, el tejido óseo también es un importante reservorio de calcio y otros iones inorgánicos, y participa activamente en el mantenimiento de la homeostasis del calcio. Cada uno de los huesos es esculpido mediante un complicado proceso denominado modelado¹. Además, el tejido óseo es renovado constantemente por un proceso conocido como remodelado². El remodelado desempeña un papel esencial en la homeostasis del calcio y además preserva la solidez de los huesos al sustituir el hueso viejo por nuevo hueso.

A diferencia del modelado, el remodelado óseo requiere la acción coordinada de osteoclastos, células que se encargan de resorber hueso, y osteoblastos, células formadoras de hueso. Básicamente, el proceso de remodelado se puede dividir en cuatro fases^{3,4}. La primera fase, conocida como de activación, implica el proceso de comienzo de remodelado mediante la activación de osteoclastos en una región determinada del hueso a través de la atracción de precursores de osteoclastos y la inducción de su diferenciación a osteoclastos maduros. En una segunda etapa, de resorción, los osteoclastos se fijan a la matriz ósea creando una cavidad de resorción. La fase de resorción finaliza con la apop-

tos de los osteoclastos. Conjuntamente a la apoptosis osteoclástica se producen señales responsables del reclutamiento de osteoblastos hacia las cavidades de resorción (fase de proliferación). Este acoplamiento entre la acción de los osteoclastos y osteoblastos es secuencial, de forma que los procesos de resorción y formación ósea no conviven en el tiempo ni en el espacio. Además es crítico para que se de un adecuado proceso de remodelado. Finalmente, durante la última etapa, conocida como de formación, los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica no mineralizada, y posteriormente son responsables de su mineralización.

A pesar de que no se conocen con detalle todos los mecanismos moleculares responsables de este proceso, sí se han logrado identificar algunos de ellos. El sistema de señalización RANKL-RANK, crítico para el inicio de la osteoclastogénesis, es quizás el mecanismo molecular más importante para la diferenciación de los osteoclastos⁵. El ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) es una proteína producida por varios tipos celulares; entre ellos, los osteoblastos son una de las principales fuentes en el tejido óseo⁶. Esta proteína se une al receptor activador del factor nuclear κ B (RANK), presente en la membrana de precursores de osteoclastos, induciendo la diferenciación de éstos a través de la activación en un último término del factor de transcripción NFATc-1, que se encarga de modular la expresión de los genes necesarios para formar un osteoclasto maduro y preparado para resorber

hueso⁷. Por otro lado, los osteoblastos también son capaces de producir osteoprotegerina (OPG), otra proteína que actúa como un receptor soluble para el RANKL, bloqueando de esta forma la posible interacción entre el RANKL y su receptor RANK⁸. De hecho, el cociente RANKL/OPG determina en buena medida la tasa de la osteoclastogénesis. Directamente relacionado con esto, en un trabajo previo hemos observado que la expresión génica de RANKL y el cociente RANKL/OPG en el tejido óseo son significativamente mayores en pacientes con fracturas osteoporóticas que en pacientes artrósicos, sugiriendo que los pacientes con osteoporosis podrían tener una mayor activación de la osteoclastogénesis, y como consecuencia un desequilibrio en el remodelado óseo que provoca una pérdida de masa ósea y una mayor probabilidad de sufrir fracturas⁹. A pesar de que los datos de otros autores confirman estos resultados^{10,11}, por el momento se desconocen las razones que provocan estas diferencias en la producción de RANKL y OPG.

Dada su capacidad de producir RANKL y OPG, los osteoblastos no son sólo cruciales para la formación ósea, sino que también son esenciales para el inicio de la osteoclastogénesis y un correcto acoplamiento resorción-formación. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en la expresión de RANKL y OPG en osteoblastos primarios durante un proceso de mineralización *in vitro* y comparar los niveles de transcripción en osteoblastos procedentes de pacientes osteoporóticos y artrósicos.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Se obtuvieron muestras de tejido óseo procedentes de la cabeza femoral durante artroplastias sustitutivas. El estudio fue aprobado por el Comité Regional de Ética en Investigación Clínica, y todas las muestras se recogieron tras obtener consentimiento informado. Los osteoblastos primarios se obtuvieron mediante la técnica de explante¹², usando tejido óseo trabecular de la parte central de la cabeza femoral, evitando el área fracturada y regiones subcondrales. Los osteoblastos se cultivaron en DMEM, complementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos, y se mantuvieron en un incubador a 37°C, con un 5% de CO₂ y a una humedad relativa superior al 90%.

Para los experimentos de mineralización se plaquearon las células a una densidad de 40.000 células/cm². Una vez que las células llegaron a confluencia, se añadió medio osteogénico (DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos, 50 µM de ácido ascórbico y 10 mM de β-glicerofosfato). Se estudió el progreso de la calcificación mediante tinción con Alizarin Red S¹³. Para el análisis de la expresión de RANKL y OPG en pacientes artrósicos y osteoporóticos se utilizaron cultivos de osteoblastos primarios con una confluencia del 80% (pases 1-2) procedentes de pacientes sometidos a colocación de una prótesis de cadera por fractura o artrosis. Para la selección de pacientes se utilizaron criterios de evaluación determinantes para diagnosticar la osteoporosis y

la artrosis, como son la presencia de fracturas en el caso de los primeros, o de artrosis grave en el caso de los segundos. Se excluyeron del estudio a aquellos pacientes con osteoporosis secundaria, con fracturas debidas a traumatismos de alta energía o con artrosis secundaria.

Expresión génica

Se extrajo ARN de los cultivos de osteoblastos primarios semiconfluentes usando Trizol, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Para la síntesis de cDNA se usó 1 µg de ARN y se siguieron las instrucciones del fabricante para el kit Superscript III First Strand (Invitrogen). Durante el cultivo de las células en medio osteogénico se extrajo ARN de forma consecutiva cada 7 días.

Se cuantificó la expresión génica de RANKL y OPG mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR) con sondas TaqMan siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Para evitar la variabilidad inter-experimental se incluyeron muestras de los dos grupos en cada uno de los análisis realizados. Las sondas TaqMan usadas fueron: TNFSF11 (isoforma I, RANKL): Hs00243519_m1 y TNFRSF11B (OPG): Hs00900360_m1. Para cada gen se calculó la expresión relativa, usando como referencia la expresión del gen de la proteína de unión a cajas TATA (TBP), expresado constitutivamente en las células. La expresión fue calculada usando el método 2-ΔCt, siendo ΔCt la diferencia entre el ciclo umbral (Ct) del gen de interés y TBP.

Análisis estadísticos

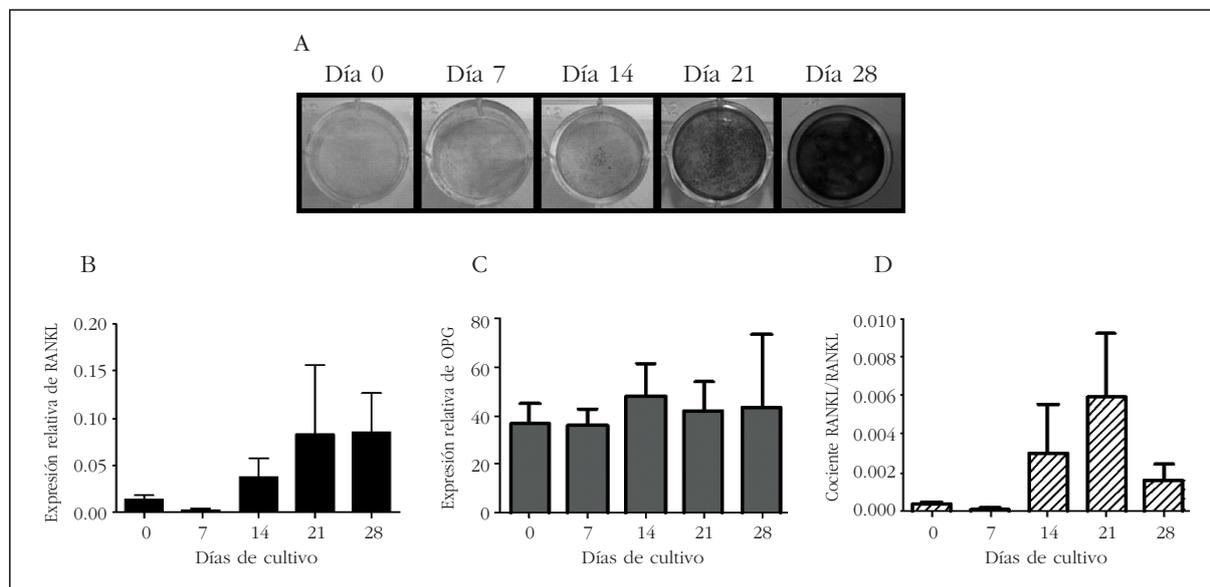
Para la comparación de la expresión de RANKL y OPG a lo largo del proceso de diferenciación osteogénica se usó el test t-Student de dos colas. La significación estadística de las diferencias entre los pacientes con osteoporosis y la artrosis se estudió con el test de Mann-Whitney de dos colas. Se fijó el valor p=0,05 como límite de la significación estadística. Los datos se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism, versión 5.01.

Resultados

Estudio de la expresión de RANKL y OPG durante un proceso de mineralización *in vitro*

Los cultivos de osteoblastos primarios en condiciones osteogénicas mostraron una mineralización progresiva, puesta de manifiesto mediante tinción con Alizarin Red S (Figura 1A). De forma paralela estudiamos la expresión de RANKL y OPG a lo largo del proceso (Figura 1B). La expresión de RANKL mostró una tendencia a aumentar con el avance de la calcificación, haciéndose notable a partir de las tres semanas de cultivo, si bien no llegó a ser estadísticamente significativa. Por otro lado, no detectamos diferencias en los niveles transcripcionales de OPG (Figura 1C). Cabe destacar que la expresión génica de OPG fue muy superior a la de RANKL durante todo el proceso. En consecuencia, los valores del cociente RANKL/OPG fueron llamativamente bajos, aunque de nuevo observamos una tendencia no significativa a aumentar con el tiempo de cultivo (Figura 1D).

Figura 1. Expresión génica de RANKL y OPG en un proceso de mineralización *in vitro* en osteoblastos primarios. A) Cada 7 días, se valoró la deposición mineral mediante Alizarin Red S. B) La expresión de RANKL mostró una tendencia no significativa a aumentar con el tiempo. C) La expresión de OPG fue constante a lo largo del proceso de mineralización *in vitro*. D) El cociente RANKL/OPG aumenta de forma no significativa en los últimos días del proceso. En las figuras se ha representado la media y la desviación estándar de los valores de expresión relativa obtenidos a partir de procesos de mineralización con 4 muestras independientes de osteoblastos primarios



Estudio de la expresión de RANKL y OPG en osteoblastos primarios procedentes de pacientes con fractura y con artrosis

En la Tabla 1 se resume las características de los pacientes de los que se obtuvieron las muestras. No encontramos diferencias significativas en la expresión génica de RANKL, OPG, ni tampoco en el cociente RANKL/OPG, entre los dos grupos de osteoblastos analizados (Tabla 2). Al igual que en los cultivos en medio de mineralización, en ambos grupos la expresión de OPG fue llamativamente superior a la de RANKL. Por otro lado, analizamos los resultados estratificando las muestras por edades. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas, los osteoblastos obtenidos de pacientes artrósicos con edades comprendidas entre los 81 y los 90 años mostraron una clara tendencia a expresar más OPG. Asimismo, el cociente RANKL/OPG fue menor en los cultivos de osteoblastos procedentes de pacientes artrósicos (Tabla 3).

Finalmente analizamos los datos separando las muestras por sexos. No se encontraron diferencias entre hombres o mujeres cuando se compararon los dos grupos de osteoblastos. Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres dentro del mismo grupo (Tabla 4).

Discusión

Desde el descubrimiento del sistema de señalización RANKL-OPG-RANK han sido muchos los estudios diseñados para comprender los mecanismos que regulan este sistema. Los estudios con ratones "knock out" han demostrado que la ausencia de estos genes está directamente relacionada con

cambios en la masa ósea¹⁴. Por tanto, este sistema se ha convertido en una diana terapéutica valiosa para el tratamiento de enfermedades esqueléticas prevalentes como la osteoporosis. De hecho, los anticuerpos frente a RANKL han demostrado reducir el número de fracturas en pacientes osteoporóticas postmenopáusicas¹⁵. Por tanto, parece claro que estamos ante uno de los mecanismos de señalización críticos para la homeostasis ósea, capaz de inclinar la balanza hacia una mayor o menor resorción en función de la relación entre la producción de RANKL y de OPG.

Por el momento, no se conocen con exactitud cuales son los mecanismos que desencadenan el comienzo del remodelado óseo, pero se cree que son los osteocitos los encargados de señalar el lugar y reclutar a los precursores de osteoclastos a la región, supuestamente a través de procesos de quimioatracción^{16,17}. La producción de RANKL por parte de los osteoblastos y, según recientemente se ha publicado, por los osteocitos¹⁸, induce la maduración de los precursores de osteoclastos y el comienzo de la resorción. Sin embargo, osteoclastos y osteoblastos no conviven en el tiempo, ni en el espacio. Por un lado, se sabe que los osteoclastos sufren apoptosis y desaparecen. Por otro lado, nuestros datos procedentes de mineralización *in vitro* usando osteoblastos primarios sugieren que durante la formación ósea hay una mayor expresión génica de OPG que de RANKL. Esto, teóricamente, reduciría las posibilidades de una interacción entre el RANKL y RANK, previniendo así una posible activación de la osteoclastogénesis durante la formación ósea. Curiosamente, la expresión de RANKL y

Tabla 1. Distribución de sexos y edades de las muestras recogidas para el análisis de la expresión de RANKL y OPG

	N			Edad		
	Total	Mujeres	Hombres	Total	Mujeres	Hombres
FRX	28	23	5	81±6	82±6	79±5
ART	26	9	17	75±6	73±9	76±4
Valor p				0,003	0,20	0,02

Tabla 2. Valores de expresión génica (media y desviación estándar) para los genes RANKL y OPG en osteoblastos primarios

	OPG	RANKL	RANKL/OPG
FRX	25,52±4,06	0,024±0,013	0,001±0,0006
ART	45,86±19,67	0,042±0,023	0,042±0,039
Valor p	0,57	0,50	0,81

Tabla 3. Análisis estratificado por edad de la expresión génica de RANKL y OPG en osteoblastos primarios (media y desviación estándar)

	Edad		OPG		RANKL		RANKL/OPG	
	70-80	81-90	70-80	81-90	70-80	81-90	70-80	81-90
FRX	75±1	85±3	24,9±4,7	26,92±6,36	0,02±0,01	0,02±0,02	0,002±0,001	0,0006±0,0002
ART	73±1	82±2	25,0±8,2	133±93,76	0,03±0,02	0,05±0,05	0,049±0,048	0,0001±0,0001
Valor p	0,21	0,14	0,69	0,09	0,57	0,23	0,18	0,052

Tabla 4. Análisis estratificado por sexo de la expresión génica de RANKL y OPG en osteoblastos primarios (media y desviación estándar)

	OPG		RANKL		RANKL/OPG	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
FRX	26,73±0,01	23,02±7,05	0,028±0,012	0,008±0,004	0,0013±0,0007	0,0003±0,0001
ART	96,77±53,88	18,96±5,02	0,096±0,066	0,014±0,006	0,1131±0,1129	0,0017±0,0011
Valor p	0,35	0,47	0,93	0,31	0,40	0,64

OPG no se vio modificada de forma significativa durante el proceso de mineralización. Sin embargo, sí se observó una ligera tendencia de aumento en la expresión de RANKL en días más avanzados, en los que la mineralización era más patente. Este ligero aumento en la expresión de RANKL se acompaña de un ligero aumento del cociente RANKL/OPG.

La osteoporosis y la artrosis son dos enfermedades esqueléticas que se caracterizan por tener valores de masa ósea opuestos¹⁹. Mientras que los pacientes osteoporóticos presentan una reducción de la masa ósea en comparación con sujetos sanos, los pacientes artrósicos tienden a tener una mayor masa ósea. Dado el impacto que el RANKL y la OPG tienen sobre la homeostasis ósea, cabría espe-

rar que las diferencias en la producción de estas proteínas podrían explicar, al menos en parte, las diferencias en la masa ósea entre estos pacientes. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado recientemente que la producción de RANKL, y en consecuencia el cociente RANKL/OPG está aumentado en el tejido óseo de pacientes osteoporóticos⁹. Otros autores han descrito resultados similares, lo que sugiere que realmente estamos ante un patrón de expresión característico de los pacientes osteoporóticos. En un intento de buscar una explicación a esta disregulación de la expresión de RANKL, estudiamos si había diferencias en la metilación de la región promotora de este gen en el tejido óseo de pacientes osteoporóticos y artrósicos, pero no

fue el caso. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el tejido óseo está formado por diferentes tipos celulares, varios de los cuales son capaces de producir RANKL y OPG. Por ello decidimos estudiar la expresión de estos genes de forma selectiva en osteoblastos primarios procedentes de pacientes osteoporóticos y artrósicos. Al igual que observamos en los osteoblastos primarios en mineralización, tanto en pacientes osteoporóticos como en pacientes artrósicos los valores de expresión de OPG fueron superiores a los de RANKL. En el análisis global de los resultados no encontramos diferencias significativas en la expresión de RANKL u OPG entre los dos grupos estudiados. Estos resultados están en sintonía con observaciones previas realizadas por otros grupos^{20,22}. Tampoco encontramos diferencias al analizar la expresión por sexos o por edades. Sin embargo, sí encontramos una clara tendencia a expresar más OPG en pacientes artrósicos con edades comprendidas entre los 81 y los 90 años, y en consecuencia los mismos pacientes mostraron un cociente RANKL/OPG inferior. En conjunto, estos datos sugieren que las diferencias observadas a nivel de tejido óseo no se deben a que los osteoblastos de pacientes artrósicos y osteoporóticos sean intrínsecamente diferentes en cuanto a la expresión de estos genes. Cabe la posibilidad de que las diferencias a nivel tisular puedan explicarse por la producción diferencial por parte de otros tipos celulares, como los osteocitos o las células del sistema inmune. En consonancia con esto último, el cociente RANKL/OPG encontrado en los cultivos de los osteoblastos primarios era mucho menor que el encontrado a nivel de tejido óseo⁹, lo que supone que otras células distintas a los osteoblastos contribuyen a la producción de RANKL en el tejido óseo. En este mismo sentido, recientemente se ha sugerido que los osteocitos son la fuente principal de RANKL en el hueso, al menos en el ratón¹⁸. Por tanto, es posible especular que las diferencias encontradas puedan deberse a una producción diferencial de RANKL específica en este tipo celular. De hecho, no sería sorprendente que los osteocitos de los pacientes osteoporóticos presentaran una producción anormal de RANKL, pues ya hemos observado en trabajos previos una alteración de la expresión de varios genes implicados en el metabolismo óseo²³. Del mismo modo, las células osteoblásticas de revestimiento, consideradas como osteoblastos inactivos, podrían estar implicadas en las diferencias de expresión de RANKL en el tejido óseo, pues nuestros estudios indican que el patrón de metilación del promotor del gen RANKL permite que estas células sean capaces de expresar tanto RANKL como OPG⁹.

Por otro lado, no debemos olvidar que, al trabajar con células primarias, éstas se encuentran aisladas de su entorno habitual, el microambiente óseo, sin verse estimuladas por factores capaces de modular positiva o negativamente la producción de RANKL y OPG. Diversas moléculas, como la hormona paratiroidea o los estrógenos, entre muchas otras, pueden alterar la expresión de estos

genes y, por tanto, pueden ser responsables de la desregulación descrita en los pacientes osteoporóticos. Finalmente, nuestros análisis se han centrado exclusivamente en la expresión génica, sin valorar la cantidad de proteína presente. En este sentido, trabajos previos han demostrado que, a pesar de no encontrar diferencias a nivel transcripcional, la síntesis de OPG está aumentada en osteoblastos derivados de pacientes osteoporóticos^{20,22}. Las causas de esta desincronización entre los niveles transcripcionales y proteicos son actualmente desconocidas. Cabría especular con una posible desregulación de la expresión de determinados miRNAs capaces de influir en el proceso de traducción del ARN mensajero o cambios en marcas post-traduccionales que afectan la estabilidad o vida media de la proteína. En este sentido, sería interesante realizar estudios que confirmen que las diferencias observadas a nivel de transcripcional también ocurren a nivel proteico, así como profundizar en los mecanismos post-transcripcionales y post-traduccionales que influyen en la cantidad de proteína producida.

En conjunto, nuestros datos sugieren que las diferencias en la producción de RANKL y OPG encontradas a nivel del tejido óseo entre pacientes osteoporóticos y artrósicos no se deben a las características intrínsecas de los osteoblastos de estos pacientes, sino que han de tener su origen en otras células esqueléticas, o ser la consecuencia de las complejas interacciones celulares y moleculares que tienen lugar en el microambiente óseo. Serán necesarios nuevos estudios centrados en otros tipos celulares para identificar los mecanismos que subyacen a la desregulación de la expresión de RANKL en el hueso osteoporótico.

Financiación: El trabajo fue financiado con una beca AMGEN S.A. (AMGEN--SEIOMM 2009). Jesús Delgado-Calle tiene una beca predoctoral del IFI-MAV. Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Teti, A. Bone development: Overview of bone cells and signaling. *Curr Osteoporos Rep* 2011;9:264-73.
2. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1092:385-96.
3. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 2010;285:25103-8.
4. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:444-51.
5. Boyce BF, Xing, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007;9(Suppl1):S1.
6. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3597-602.
7. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 2008;29:155-92.

8. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.
9. Delgado-Calle J, Sañudo C, Fernández AF, García-Renedo R, Fraga MF, Riancho JA. Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone. *Epigenetics* 2012;7:83-91.
10. Logar DB, Komadina R, Prezelj J, Ostanek B, Trost Z, Marc J. Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and in osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2007;25:219-25.
11. D'Amelio P, Roato I, D'Amico L, Veneziano L, Suman E, Sassi F, et al. Bone and bone marrow pro-osteoclastogenic cytokines are up-regulated in osteoporosis fragility fractures. *Osteoporos Int* 2011;22:2869-77.
12. Velasco J, Zarrabeitia MT, Prieto JR, Perez-Castrillon JL, Perez-Aguilar MD, Perez-Nuñez MI, et al. Wnt pathway genes in osteoporosis and osteoarthritis: differential expression and genetic association study. *Osteoporos Int* 2010;21:109-18.
13. Delgado-Calle J, Sañudo C, Sánchez-Verde L, García-Renedo RJ, Arozamena J, Riancho JA. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone* 2011;49:830-8.
14. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001;142:5050-5.
15. Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK, Kendler DL, Wang H, Liu Y, et al. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2149-57.
16. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 2010;21:1457-69.
17. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011;26:229-38.
18. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 2011;17:1231-4.
19. Dequeker J, Aerssens J, Luyten FP. Osteoarthritis and osteoporosis: clinical and research evidence of inverse relationship. *Aging Clin Exp Res* 2003;15:426-39.
20. Giner M, Rios MJ, Montoya MJ, Vázquez MA, Miranda C, Pérez-Cano R. Alendronate and raloxifene affect the osteoprotegerin/RANKL system in human osteoblast primary cultures from patients with osteoporosis and osteoarthritis. *Eur J Pharmacol* 2011;650:682-7.
21. Giner M, Montoya MJ, Vázquez MA, Rios MJ, Moruno R, Miranda MJ, et al. Modifying RANKL/OPG mRNA expression in differentiating and growing human primary osteoblasts. *Horm Metab Res* 2008;40:869-74.
22. Giner M, Rios MA, Montoya MA, Vázquez MA, Naji L, Pérez-Cano R. RANKL/OPG in primary cultures of osteoblasts from post-menopausal women. Differences between osteoporotic hip fractures and osteoarthritis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;113:46-51.
23. Delgado-Calle J, Arozamena J, García-Renedo R, García-Ibarbia C, Pascual-Carra MA, González-Macías J, et al. Osteocyte deficiency in hip fractures. *Calcif Tissue Int* 2011;89:327-34.

Civantos Modino S¹, Navea Aguilera C¹, Pavón de Paz I¹, Almodovar Ruiz F², Elviro Peña MR¹

¹ Servicio Endocrinología y Nutrición - Hospital Universitario de Getafe - Madrid

² Servicio Endocrinología y Nutrición - Fundación Hospital Alcorcón - Madrid

Metástasis óseas y compresión medular como debut de carcinoma folicular de tiroides

Correspondencia: Soralla Civantos Modino - Carretera de Toledo Km 12,5 - 28995 Getafe - Madrid (España)

Correo electrónico: zulemaciv@hotmail.com

Fecha de recepción: 11/03/2012

Fecha de aceptación: 03/09/2012

Resumen

En el carcinoma de tiroides, las metástasis a distancia son poco frecuentes (10-15% de los foliculares). Los sitios más comunes son pulmón, huesos (presentación en forma de lesiones líticas), el cerebro, el hígado, la vejiga y la piel. El diagnóstico de carcinoma folicular a través de una complicación de la metástasis es excepcional, pero se debe considerar en el diagnóstico diferencial de una fractura patológica. Presentamos tres casos de aparición excepcional.

Palabras clave: *carcinoma, tiroides, metástasis, cirugía.*

Bone metastases and cord compression debut as follicular thyroid carcinoma

Summary

In thyroid carcinoma, distant metastases are infrequent (10-15% of the follicles). The most common sites are the lungs, bones (appearing in the form of lytic lesions), the brain, the liver, the bladder and the skin. The diagnosis of follicular carcinoma through a metastatic complication is exceptional, but it should be considered in the differential diagnosis of a pathological fracture. We present three cases of exceptional occurrence.

Key words: *carcinoma, thyroid, metastasis, surgery.*

Introducción

El carcinoma diferenciado de tiroides es la neoplasia endocrinológica más frecuente. Corresponde a uno de los tumores con mayor probabilidad potencial de curación y con un pronóstico de enfermedad metastásica más favorable caracterizándose por una progresión lenta con una supervivencia a los 10 años del 34-40%^{1,2}.

Las metástasis a distancia son poco frecuentes (10-15% de los foliculares), pero en el caso de presentarse, los lugares más comunes son pulmón, hueso (presentando lesiones líticas), cerebro, hígado, vejiga y piel³. El diagnóstico de un carcinoma folicular a través de una complicación de su metástasis es un hecho excepcional, pero se debe plantear en el diagnóstico diferencial de una fractura patológica⁴. En este estudio se presentan 3 casos de pacientes con compresión medular por metástasis óseas como forma de debut de un carcinoma folicular de tiroides. Creemos que son de interés general por lo inusual de los hallazgos y el manejo interdisciplinar llevado a cabo.

Caso 1

Mujer de 68 años que en abril de 2010 comenzó con dolor dorsal refractario y parestesias con pérdida de fuerza en miembros inferiores. En la radiografía simple se identificó un colapso en tercera vértebra dorsal, e ingresó en el Servicio de Traumatología con sospecha de metástasis *vs.* mieloma. La resonancia nuclear magnética (RNM) evidenció una afectación de todo el cuerpo vertebral y el arco posterior, con masa de partes blandas asociada que se introducía en el canal neural comprimiendo la médula espinal. También afectó el foramen neural de segunda, tercera y cuarta vértebras dorsales (Figura 1). Los hallazgos sugirieron lesión tumoral, probablemente metastásica sin descartar la posibilidad de tumor primario, tipo mieloma. En la tomografía axial computerizada (TAC) toraco-abdominal se evidenciaron pequeñas lesiones nodulares múltiples en ambos pulmones sugerentes de enfermedad metastásica, y que en la tomografía por emisión de positrones (PET)/TAC eran hipermetabólicas. El resto de la exploración no evidenció hallazgos significativos. Durante ese mismo ingreso se intentó una embolización tumoral, sin éxito, y se efectuó una descompresión medular con fusión de vértebras dorsales desde D1 a D6. La anatomía patológica indicó que se trataba de un carcinoma folicular tiroideo variedad de células de Hürthle. En la anamnesis dirigida destacó como antecedentes una hemitiroidectomía más istmectomía realizadas en 1999 en otro Centro Hospitalario por evidenciarse un nódulo con resultado de "oncocitoma", sin más datos ni seguimiento.

Se realizó una ecografía tiroidea, que mostró un hemitiroides derecho normal. Se realizó una tiroidectomía total, sin evidenciarse malignidad en la pieza quirúrgica, y finalmente fue tratada con dosis ablativa de Iodo 131 (I_{131}) (200 mCi). El rastreo corporal total (RCT) postdosis mostró una captación intensa en las áreas metastásicas eviden-

ciadas en PET/TAC. A los doce meses de evolución la paciente continúa en seguimiento y tratamiento por los Servicios de Endocrinología y Traumatología, con control de sintomatología y signos de enfermedad estable.

Caso 2

Mujer de 60 años en quien, en un estudio por dolor dorsal y miembros inferiores de 3-4 meses de evolución, se objetivó en la radiografía simple lesiones sugerentes de metástasis en cuello fémur izquierdo, columna dorsal (D1, D2 y D12, con infiltración del canal raquídeo), diáfisis femoral izquierda y trocánter mayor izquierdo. Se hizo un enclavado profiláctico femoral. El estudio histológico fue de metástasis de carcinoma folicular de tiroides. La paciente refirió que en 1993 se realizó una hemitiroidectomía izquierda por causa no aclarada en otro Centro. Se hizo una ecografía tiroidea sin hallazgos significativos y se completó una tiroidectomía total sin evidencia de malignidad en la pieza quirúrgica. La tiroglobulina (Tg) inicial fue de 67 ng/ml, con anticuerpos antitiroglobulina negativos. Fue tratada con I_{131} a dosis de 200 mCi, con evidencia de enfermedad estable en la actualidad.

Caso 3

Mujer de 71 años con lumbalgia de empeoramiento progresivo y aparición de parestesias en extremidades inferiores en mayo 2008. La RNM evidenció lesión lítica en L4 y compresión medular compatible con lesión metastásica, que precisó una vertebrectomía con fusión desde la segunda vértebra lumbar hasta la primera sacra (L2-S1). El estudio anatomopatológico sugirió metástasis de un tumor primario tiroideo. La ecografía fue informada como "bocio multinodular con nódulos hipocogénicos en istmo y lóbulo tiroideo izquierdo, y adenopatía de 2,7 cm en espacio yugulocarotídeo izquierdo, con punción-aspiración con aguja fina (PAAF) de proliferación onco-cítica" (*sic*). Tras una tiroidectomía total, el diagnóstico final fue de carcinoma folicular tiroideo variedad de células de Hürthle. Tras la primera dosis ablativa de I_{131} (200 mCi) persistió un valor de Tg de 17 ng/ml con anticuerpos antitiroglobulina negativos, por lo que se decidió dar una segunda dosis de I_{131} (150 mCi) ocho meses después. En el PET de control se evidenció captaciones de nueva aparición en L4, ala ilíaca y clavícula derechas (Figura 2), por lo que se administró una tercera dosis con 200 mCi (dosis acumulada de 550 mCi) seis meses tras la segunda. Los rastreos postdosis captaron de forma intensa en las áreas evidenciadas en las pruebas de imagen. Tras quince meses del último tratamiento presenta datos de enfermedad estable sin complicaciones derivadas del tratamiento con I_{131} .

Discusión

El carcinoma diferenciado de tiroides tiene buen pronóstico en general, pero la evolución natural de la enfermedad en algunos casos es hacia la diseminación a distancia, lo que conlleva un pronóstico ominoso con unas tasas de mortalidad del 65% y

75% a los 5 y 10 años, respectivamente. Las metástasis óseas son de tipo osteolítico y son difíciles de visualizar en radiografía simple. Por fortuna los casos de metástasis vertebrales como forma de diagnóstico de la enfermedad son muy raros, y prueba de ello es que los casos publicados son escasos⁵.

Ante una lesión lítica en columna vertebral se debe hacer el diagnóstico diferencial fundamentalmente entre mieloma y metástasis. Entre éstas últimas, el tumor primario más frecuente se encontrará en próstata, mama y pulmón, y menos comúnmente en riñón, colon, piel y tiroides.

Cuando se sospecha metástasis óseas se debería realizar un rastreo corporal total o un PET/TAC para localizarlas. La RNM es particularmente útil en pacientes con afectación espinal y para caracterizar las metástasis una vez están diagnosticadas. También es válido realizar una TAC.

La biopsia de la lesión es fundamental para identificar el origen de la metástasis, pero no discrimina la estirpe folicular o papilar. Por esto, es esencial investigar el tiroides con ecografía y PAAF.

Se debe tratar con dosis ablativas de I_{131} entre 100 y 200 mCi, a determinar mediante dosimetría. La dosis se puede repetir a los 6-10 meses dependiendo de la evolución.

Numerosos estudios avalan el beneficio en pacientes con metástasis óseas líticas (más concretamente las originadas por el carcinoma de mama) del uso de bifosfonatos, en especial el zoledronato intravenoso, ya que estos fármacos inhiben la actividad osteoclástica; lo que hace que se esté extendiendo su uso para el tratamiento de otras formas de metástasis líticas, como las del carcinoma diferenciado de tiroides⁶.

Nuevos fármacos que afectan al remodelado óseo son los inhibidores del RANK-ligando, como el denosumab, que limitan la actividad osteoclástica y reducen la resorción ósea, y se han obtenido buenos resultados en metástasis óseas de carcinomas, como los de próstata y pulmón⁷.

La radioterapia está indicada en pacientes con dolor intenso sin complicación medular o con déficit neurológico de comienzo y progresión lentos e incompletos, siempre que se descarte inestabilidad vertebral osteoarticular, punto clave de indicación quirúrgica. En los casos en que el pronóstico sea malo a corto plazo, o la situación general del paciente contraindique la cirugía, es la única opción.

La embolización es útil para reducir la vascularización de la metástasis, facilitando la cirugía posterior, y el crecimiento tumoral⁸.

Los corticoides son usados por su efecto anti-edema, y no se utilizarán de forma aislada salvo cuando la situación del paciente no permita otro tratamiento.

La cirugía paliativa está indicada ante un dolor de intensidad creciente incontrolable con otros métodos, un déficit neurológico agudo, completo y de instauración rápida, o cuando la destrucción ósea provoque una inestabilidad segmentaria de la columna vertebral. También puede utilizarse como intento curativo si la metástasis es única o en escaso número. Consiste en la resección del

tejido tumoral, liberación de toda compresión sobre el tejido medular, y fijación mediante osteosíntesis vertebrales asociadas a injertos óseos por vías de abordaje anterior y/o posterior, intentando la fusión del segmento afectado con los inmediatamente superior e inferior^{9,10}.

En conclusión, el diagnóstico de un carcinoma folicular tiroideo desde el hallazgo de metástasis óseas es una forma excepcional de debut, pero debe considerarse dentro del diagnóstico diferencial de estas lesiones. El tratamiento exige una coordinación y cooperación interdisciplinaria para un manejo óptimo de la enfermedad.



Figura 1. RNM: Colapso del cuerpo de 3ª vértebra dorsal y arco posterior con masa de partes blandas asociada que se introduce en el canal neural comprimiendo la médula espinal



Figura 2. PET: Captación patológica en 4ª vértebra lumbar

Bibliografía

1. Schlumberger MJ. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Eng J Med* 1998;338:297-306.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics 2010. *Cancer J Clin* 2010;60:277-300.
3. Benbassat C, Mechlis-Frishi S, Hirsch D. Clinicopathological characteristics and long-term outcome in patients with distant metastases from differentiated thyroid cancer. *World J Surg* 2006;30:1088-95.
4. Goldberg H, Stein M, Ben-Itzhak O, Duek D, Ravkin A, Gaitini D. Metastatic spinal cord compression as initial presentation of follicular thyroid carcinoma. *J Surg Oncol* 1998;67:186-9.
5. Scarrow A, Colina JL, Levy E. Thyroid carcinoma with isolated spinal metastasis: case history and review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg* 1999;101:245-8.
6. Wexler J. Approach to the thyroid cancer patient with bone metastases. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2296-307.
7. Paller CJ, Carducci MA, Philips GK. Management of bone metastases in refractory prostate cancer: role of denosumab. *Clin Interv Aging* 2012;7:363-72.
8. Smit J, Vielvoye G, Goslings B. Embolization for vertebral metastases of follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:989-94.
9. Carty S, Cooper D, Doherty G, Duh QY, Kloos RT, Mandel SJ, et al. Consensus statement on the terminology and classification of central neck dissection for thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1153-8.
10. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association Management Guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1167-214.

Espasa Font L¹, Supervía A², Del Baño F², I Sarbu M³

1 Servicio de Oncología

2 Servicio de Urgencias

3 Servicio de Reumatología

Hospital Universitario del Mar - Parc de Salut Mar - Barcelona

Metástasis costal derecha de adenocarcinoma de próstata

Correspondencia: August Supervía - Servicio de Urgencias - Hospital Universitario del Mar - Ps. Marítim 25-29 - 08003 Barcelona (España)

Correo electrónico: Asupervia@hospitaldelmar.cat

Fecha de recepción: 20/04/2012

Fecha de aceptación: 31/08/2012

Resumen

El cáncer de próstata es uno de los cánceres más frecuentes en varones. Su incidencia ha aumentado en los últimos años, debido, en parte, a la detección precoz mediante el cribado con la determinación del antígeno prostático específico (PSA). El hueso es la localización más común de las metástasis, las cuales son frecuentemente sintomáticas, produciendo dolor, debilidad y afectación funcional. Las metástasis óseas son usualmente osteoblásticas, aunque también se ha demostrado incremento de la resorción ósea. Se presenta el caso de un varón de 49 años, diagnosticado recientemente de cáncer de próstata, que acudió al Servicio de Urgencias por dolor torácico derecho. La exploración física mostró dolor de características mecánicas en 5^a-7^a costillas. La radiografía de tórax mostró ausencia del 6^o arco costal.

Palabras clave: *cáncer de próstata, metástasis óseas, lisis costal.*

Costal right metastasis of prostate adenocarcinoma

Summary

Prostate cancer is one of the most frequent cancers in man and its incidence is growing constantly due to early diagnosis that is now being made by determining levels of PSA in the general health controls. The most common site of metastasis is bone, and these lesions are frequently symptomatic, causing pain, debility, and functional impairment. Skeletal metastases in men with prostate cancer are usually osteoblastic although increases in bone resorption have been consistently demonstrated. A 49 years old man with a recent diagnosis of prostate cancer was admitted to Emergency Department for right thoracic pain. The physical examination showed pain of mechanical characteristics corresponding to the 5th-7th ribs. The chest radiography showed absence of the 6th rib.

Key words: *prostate cancer, bone metastases, lysis costal.*

Introducción

La incidencia del cáncer de próstata ha aumentado en los últimos años debido en parte a la detección precoz mediante la determinación de antígeno prostático específico (PSA). Su histología más frecuente es el adenocarcinoma (ADC). En su etiología se han implicado distintos aspectos, destacando el papel hormonal, especialmente androgénico¹. Se presenta el caso de un varón joven afecto de ADC de próstata que consultó por dolor costal y al que se diagnosticó de lisis tumoral de un arco costal.

Caso clínico

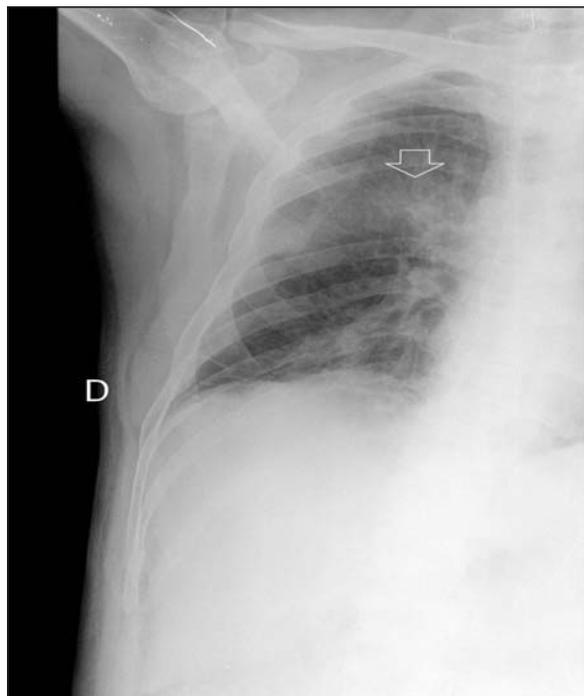
Hombre de 49 años con antecedentes de traumatismo craneoencefálico, que se resolvió con secuelas cognitivo-conductuales, y de ADC prostático. Su primer ingreso fue por clínica de lumbociática persistente de dos meses de evolución junto a dolor costal bilateral de características neuropáticas. El diagnóstico al alta fue de ADC de próstata diseminado. Las exploraciones complementarias mostraron la existencia de metástasis (M1) óseas múltiples, así como la presencia de una masa en arco costal derecho posterior. El PSA fue de 13.000 U/l y la fosfatasa alcalina (FA) de 478 U/l. La gammagrafía ósea evidenció depósitos patológicos del trazador en calota craneal, vértebras dorsales, húmero derecho, trocánter menor, diáfisis femoral derecha y rama isquiática izquierda, sin que se observaran depósitos en parrillas costales que sugirieran lesiones blásticas. La biopsia de la masa costal fue positiva para M1 de ADC de próstata, el cual se confirmó con una biopsia prostática poste-

rior. Durante el ingreso presentó una alteración de la marcha, por lo que se realizó una resonancia magnética (RM) de columna dorsal que mostró una compresión medular secundaria a M1 epidural en vértebra DVII, iniciándose radioterapia (recibió una dosis total de 30 Grays). El paciente fue tratado con bicalutamida 50 mg/día, una inyección subcutánea trimestral de gosorelina 10,8 mg y ácido zoledrónico (2 dosis i.v. de 4 mg/mes diluidos en 50 cc de suero fisiológico), siguiendo una evolución satisfactoria. Se inició rehabilitación de la marcha, siendo dado de alta a los 33 días del ingreso. A los 23 días del alta acudió al Servicio de Urgencias por aparición de dolor en hemitórax derecho. La exploración física mostró dolor a la palpación en 5^a-7^a costillas. Se realizó un análisis sanguíneo que mostró un calcio de 7,14 mg/dl, una proteína C reactiva de 3,4 mg/dl y una FA de 1.297 UI/l. La radiografía de parrilla costal derecha mostró ausencia del arco posterior de la 6^a costilla (Figura 1). Reingresó en U.H. de Oncología donde continuó tratamiento. En la actualidad, tras cuatro años de seguimiento, se encuentra en fase de hormonorresistencia con aparición de M1 óseas blásticas politópicas.

Discusión

La presencia de M1 óseas en estudios necrópsicos de pacientes fallecidos por neoplasia prostática alcanzan el 90%². El crecimiento del cáncer de próstata en el hueso promueve el recambio óseo, lo cual produce M1 osteoblásticas con lesiones líticas subyacentes³. En la actividad osteoblástica se ha implicado al sistema Wnt³, mientras que la actividad osteolítica puede deberse a una inhibición de la actividad de Wnt³ y a la participación del sistema OPG-RANKL⁴. El porcentaje de células tumorales que expresan OPG y RANKL aumentan significativamente en los pacientes con M1 óseas. Una combinación de ambos mecanismos podría explicar la lisis de la costilla de este paciente. Dada la coexistencia de mecanismos osteoblásticos y osteolíticos en la génesis de las M1, no creemos que la predominancia de uno de ellos haya podido influir en la evolución de la enfermedad de este paciente. En cuanto al tratamiento, en los últimos años se han evaluado distintos fármacos con acción sobre el metabolismo óseo para el tratamiento de las afecciones óseas de las neoplasias. En el caso del cáncer de próstata, la existencia de M1 líticas ha hecho que se evaluarán los bifosfonatos. Así, la administración simultánea de ácido zoledrónico junto al tratamiento hormonal en pacientes con M1 óseas en el momento del diagnóstico puede retrasar la progresión de la enfermedad⁵, hecho que podría explicar la larga supervivencia en el paciente que nos ocupa. No obstante, este efecto no es extensible a otros bifosfonatos⁶. Otro fármaco que ha mostrado su efectividad es el denosumab, que incluso ha resultado ser más efectivo que el ácido zoledrónico⁷. Por último, apuntar que la aparición de hormonorresistencia podría ser consecuencia de la evolución del tumor hacia un ADC de próstata neuroendocrino,

Figura 1. Radiografía de parrilla costal derecha, donde se observa ausencia del arco posterior de la 6^a costilla (flecha)



un subtipo más agresivo⁸. En este sentido, la demostración de una sobreexpresión de la proteína Aurora A quinasa hubiera sido de utilidad para demostrar esta posible transformación⁸.

Bibliografía

1. Stewart BW and Kleihues P (Eds): World cancer report (International Agency for Research on Cancer). World health organization (WHO). World Cancer Report. Lyon: IAR Press;2003.
2. Bubendorf L, Schopfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N, et al. Metastatic patterns of prostate cancer: An autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol* 2000;31:578-83.
3. Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Sella ET. Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res* 2005;65:7554-60.
4. Brown JM, Corey E, Lee ZD, True LD, Yun TJ, Tondravi M, et al. Osteoprotegerin and RANK ligand expression in prostate cancer. *Urology* 2001;57:611-6.
5. Uemura H, Yanagisawa M, Ikeda I, Fujinami K, Iwasaki A, Noguchi S, et al. Possible anti-tumor activity of initial treatment with zoledronic acid with hormonal therapy for bone-metastatic prostate cancer in multicenter clinical trial. *Int J Clin Oncol* 2012 Apr 11. [Epub ahead of print]. Doi: 10.1007/s10147-012-0406-8.
6. Mackiewicz-Wysocka M, Pankowska M, Wysocki PJ. Progress in the treatment of bone metastases in cancer patients. *Expert Opin Investig Drugs* 2012;21:785-95.
7. Fizazi K, Garducci M, Smith M, Damiao R, Brown J, Karsh L, et al. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer. *Lancet* 2011;377:813-22.
8. Beltran H, Rickman DS, Park K, Chae SS, Sboner A, MacDonald TY, et al. Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. *Cancer Discov* 2011;1:487-95.

Ovejero Gómez VJ¹, Díez Muñiz-Alique M², Díez Lizuáin ML³, Pérez Martín A¹, Azcarretazábal González-Ontaneda T⁴, Ingelmo Setien A¹

1 Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo

2 Servicio de Endocrinología y Nutrición

3 Servicio de Radiodiagnóstico

4 Servicio de Anatomía Patológica

Hospital Sierrallana de Torrelavega - Cantabria

Crisis hipercalcémica por tumoración paratiroidea compleja: un dilema diagnóstico y quirúrgico

Correspondencia: Víctor J. Ovejero Gómez - Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo - Hospital Sierrallana de Torrelavega - Barrio de Ganzo, s/n - 39300 - Torrelavega - Cantabria (España)
Correo electrónico: vovejerohcas@msn.com

Fecha de recepción: 13/06/2012

Fecha de aceptación: 11/11/2012

Resumen

La manifestación clínica del hiperparatiroidismo primario (HPTP) como tormenta hipercalcémica debe plantear un diagnóstico diferencial entre diversos procesos clínicos de pronóstico variable y la consideración de una patología tiroidea subyacente.

El adenoma quístico paratiroideo representa una de sus causas más infrecuentes en el conjunto de las neoplasias quísticas glandulares a nivel cervical.

El diagnóstico de su carácter funcional, apoyado en la determinación de calcemia, parathormona inmunoreactiva (PTHi) sérica e intraquística, y la interpretación correlacionada de los estudios de imagen, puede contribuir en su sospecha diagnóstica.

Su tratamiento de elección es quirúrgico mediante paratiroidectomía selectiva con inclusión quística completa y extendida al tiroides según su grado de implicación, aunque esta técnica podría experimentar modificaciones dependiendo del nivel de confianza en el diagnóstico preoperatorio.

Palabras clave: *hipercalcemia, neoplasia paratiroidea, quiste, hiperparatiroidismo.*

Hypercalcemia crisis due to complex parathyroid tumour: a diagnostic and surgical dilemma

Summary

The clinical manifestation of primary hyperparathyroidism (PHPT) as a hypercalcemic crisis should give rise to the consideration of a differential diagnosis between various different clinical processes for variable prognosis and the consideration of an underlying thyroid pathology.

Cystic parathyroid adenoma is one of its most infrequent causes in the group of glandular cystic neoplasms in the cervix.

The diagnosis of its functional character, supported by the determination of calcemia, blood and intracystic immunoreactive parathormone (PTHrP), and the interpretation correlated with imaging studies, may contribute to its suspected diagnosis.

Its treatment of choice is surgery by means of selective parathyroidectomy with complete cystic inclusion, and extended to the thyroid depending on their degree of involvement, although this technique may experience modifications depending on the level of confidence in preoperative diagnosis.

Key words: *hypercalcemia, parathyroid neoplasia, cyst, hyperparathyroidism.*

Introducción

La hipercalcemia puede ser la primera manifestación de un hiperparatiroidismo primario (HPTP), pero su expresión como crisis paratiroidea es una emergencia metabólica de presentación infrecuente. Una actuación médica efectiva resulta vital para reducir su elevado riesgo de mortalidad asociada.

El adenoma solitario suele ser la causa más frecuente del HPTP¹, pero su presentación como tormenta hipercalcémica obliga a plantear otras posibilidades diagnósticas de gravedad pronóstica dispar, especialmente si se considera el carcinoma.

La concomitancia de patología tiroidea con repercusión operatoria debería motivar un estudio preoperatorio que clarifique la indicación quirúrgica, ya que la información aportada por las pruebas de imagen puede distorsionar la trascendencia de dicha patología en ausencia de semiología específica².

Presentamos una paciente con HPTP agudo secundario a un adenoma quístico de paratiroides concomitante con un hipertiroidismo por enfermedad de Graves-Basedow y una difícil interpretación diagnóstica. Exponemos una revisión práctica del cuadro que puede contribuir en su diagnóstico y resolución quirúrgica.

Caso clínico

Mujer de 57 años con antecedentes de histerectomía por mioma y en tratamiento depresivo con paroxetina que fue valorada por cuadro de náuseas, vómitos, astenia, pérdida de 5 kg de peso, poliuria y polidipsia de varias semanas de evolución; detectándose en la exploración sequedad mucosa y un nódulo cervical derecho bajo indoloro, que resultó móvil con la deglución, sin adenopatías cervicales palpables ni otros hallazgos semiológicos de interés.

El estudio analítico reveló una calcemia de 14,6 mg/dl (N=8,4-10,2) con calcio corregido de 15,9 mg/dl (N=8,4-10,2), fosfatemia de 2,6 mg/dl (N=2,4-4,7), proteínas totales de 5,7 g/dl (N=6,4-8,3), albuminemia de 2,6 g/dl (N=3,5-5), TSH <0,03 µUI/ml (N=0,49-4,67) y T_{4L} de 3 ng/dl (N=0,7-1,59).

Inicialmente la paciente ingresó con diagnóstico de hipercalcemia grave, hipertiroidismo primario y sospecha de nódulo tiroideo derecho presentando una calciuria de 912 mg (N=100-300) y fosfaturia de 704 mg (N=600-950) para una diuresis de 4.000 ml en 24 horas. Se consiguió su estabilidad clínica y analítica mediante sueroterapia salina al 0,9%, bifosfonatos, furosemida y metimazol.

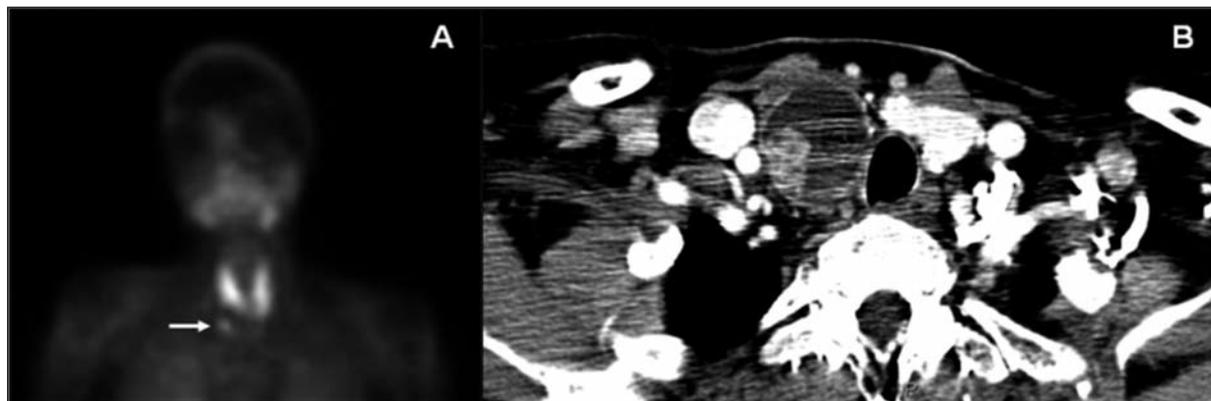
El estudio se completó ambulatoriamente con una PTHrP de 1.205,8 pg/ml (N=5-65), anticuerpos antiperoxidasa tiroidea negativo y anti-receptor TSI de 1,5 U/L (N=0-0,7).

Una ecografía tiroidea demostró solamente un nódulo quístico de 3 centímetros en el polo inferior derecho con P.A.A.F. de un líquido amarillento claro portador de escasa celularidad inflamatoria y nula epitelial, que se informó como compatible con contenido de quiste simple.

Una gammagrafía con ^{99m}Tc-sestamibi (Figura 1A) visualizó un foco de captación patológico, localizado en mediastino superior, lateral al polo inferior del tiroides derecho; sugerente de adenoma paratiroideo ectópico.

Con vistas a una planificación quirúrgica se realizó una tomografía computarizada (TC) cervical (Figura 1B) con contraste, que mostró un nódulo de 3,6 cm, con tumoración mural de probable naturaleza paratiroidea que rectificaba ligeramente el contorno lateral derecho de la tráquea; y presencia de pequeñas adenopatías hipocaptantes a nivel yúgulo-digástrico.

Figura 1. Composición de secuencias radiológicas evidenciando la lesión paratiroidea: Gammagrafía con ^{99m}Tc -sestamibi mostrando un foco hipercaptante patológico único sugerente de adenoma ectópico en mediastino superior (A). Sección axial de TC con nódulo hipodenso bien delimitado en lóbulo tiroideo derecho que contiene un nódulo hipercaptante en su pared lateral y condiciona ligera compresión traqueal (B)



A la paciente se le realizó una resección quirúrgica en bloque que incluyó hemitiroidectomía derecha, paratiroidectomía, timectomía parcial con inclusión de tejido paratraqueal derecho y linfadenectomía del compartimento central. Las determinaciones seriadas de PTHi intraoperatoria fueron de 762,3 pg/ml, 129,4 pg/ml, 110,8 pg/ml y 87,9 pg/ml, respectivamente.

No presentó ninguna complicación postoperatoria, y el estudio histopatológico fue informado como adenoma paratiroideo quístico (Figura 2), sin evidencia de malignidad en el tejido tímico y en las diversas adenopatías aisladas, e hiperplasia nodular sobre el hemitiroides derecho.

Durante el seguimiento posterior, la enferma se encuentra con metimazol en dosis descendente y un buen control del metabolismo fosfo-cálcico.

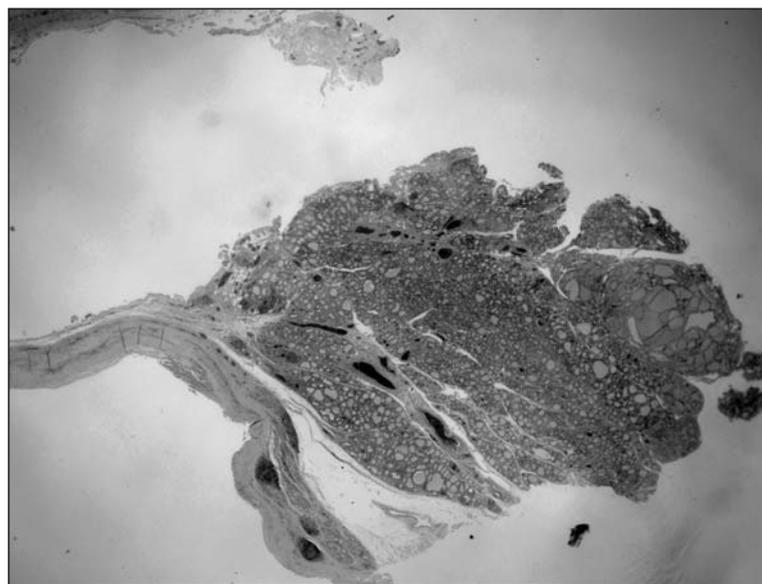
Discusión

La etiología más frecuente del HPTP es el adenoma solitario, cuya forma de presentación habitual es una hipercalcemia en una paciente postmenopáusica entre 50 y 60 años¹, y que excepcionalmente alcanza el rango clínico de crisis paratiroidea.

Las tumoraciones paratiroideas quísticas representan el 0,6% de las lesiones tiroideas y paratiroideas. Su relación con una tumoración cervical quística no supera el 5%^{3,4}, y el hecho de que menos del 10% de los quistes paratiroideos cursen con hiperparatiroidismo dificultan su filiación clínica⁵.

No obstante, una tumoración quística asociada a una crisis hiperparatiroidea debería orientar a un diagnóstico diferencial centrado en los diferentes

Figura 2. Sección histológica de una formación quística de cápsula fibrosa y tapizada de células parietales, en cuya pared se identifica tejido paratiroideo con características de adenoma y dudosas imágenes de pseudoinvasión capsular. Tinción de H-E. 4 x



procesos que pueden afectar a este tipo de glándulas. Clínicamente, se han propuesto diversos criterios sugerentes de malignidad⁶, como la presencia de una tumoración palpable mayor de 3 cm, calcemia superior a 14 mg/dl o semiología de hiperparatiroidismo grave.

Además, existe una asociación cercana al 40% entre el HPTP y algún tipo de patología tiroidea concomitante⁷, fundamentalmente benigna, con implicación quirúrgica que debería motivar su consideración preoperatoria con el fin de planificar una estrategia quirúrgica. En nuestra paciente se interpretó que la formación quística dependía del tiroides, al presentar concomitantemente un hipertiroidismo primario de forma independiente al tejido paratiroideo sospechoso de adenoma.

Las glándulas paratiroides presentan una gran variabilidad en número, tamaño, forma y localización, pero el diagnóstico por imagen de una lesión quística en vecindad a una estructura compatible radiológicamente con tejido paratiroideo en la región caudal del cuello, y concomitante con un HPTP agudo, debería obligar a descartar su relación con dichas glándulas, aunque se contemple la posibilidad de formaciones quísticas o alteraciones funcionales a nivel tiroideo. Nuestra paciente es un ejemplo manifiesto de esta interrelación semiológica.

En este sentido, debemos considerar que los microquistes paratiroides son frecuentes en las glándulas sanas por infiltración grasa con el paso del tiempo, pero los macroquistes son excepcionales, y suelen afectar con mayor frecuencia a las paratiroides inferiores, aunque su repercusión clínica difiere según el quiste sea funcionante o no funcionante^{8,9}.

Los primeros afectan fundamentalmente al hombre, con hipercalcemias superiores a 13 mg/dl como signo guía de un HPTP, y sin una localización anatómica precisa, lo cual explica una expresividad variable: desde la ausencia de síntomas a disnea, disfonía o disfagia, según la estructura comprimida en su crecimiento⁹. La presencia de hemorragia intraquística podría influir en un diagnóstico erróneo de malignidad.

En cambio, los no funcionantes son de predominio femenino, suponen el 90% de los quistes y carecen de actividad metabólica.

Esta clasificación enfatiza la importancia de nuestra aportación al tratarse de una mujer con afectación glandular inferior y carácter funcionante.

Su génesis no ha sido aclarada¹⁰, aunque se cree que podrían derivar del crecimiento y secreción coloide de células primordiales persistentes de la tercera y cuarta hendidura branquial, o bien de la fusión de microquistes de glándulas sanas. En ambas teorías la tumoración quística probablemente sería no funcionante, y su traducción clínica sería anecdótica, por cuanto que cursa con elevación de PTH intraquística sin hipercalcemia.

En cambio, si la tumoración quística deriva de la degeneración de un adenoma paratiroideo existente, como podría ser nuestro caso, la presencia de hipercalcemia definiría su carácter funcionante por elevación de PTH intraquística y sérica. La presencia de focos hemorrágicos intraquísticos también podría apoyar su origen adenomatoso. Algunos autores asocian la hemorragia quística con la aparición de una crisis hipercalcémica¹¹.

Estas características deberían servir de apoyo en el diagnóstico clínico debido a la limitación de los estudios de imagen actuales, que no suelen aportar detalles prácticos más allá de su naturaleza quística si no existe una sospecha clínica fundada, resultando frecuente su asociación errónea con la glándula tiroidea, como se constató en nuestra enferma. En estos casos podría resultar de gran ayuda la punción con aguja fina, al obtener un líquido claro con una concentración alta de PTH.

Esta determinación podría haber evitado la realización de dos pruebas de imagen que no facilitaron el diagnóstico ni la planificación quirúrgica, ya que sí orientaron hacia una patología paratiroidea, pero no aclararon la dependencia de la tumoración quística ni descartaron la posibilidad de malignidad.

En este sentido, consideramos que cualquier paciente con hipercalcemia y PTHi sérico elevado que presente una lesión quística por ecografía a nivel de la celda tiroidea debería ser sometido a una P.A.A.F. de la misma para determinación de PTH y a una gammagrafía ^{99m}Tc-MIBI debido a la alta sensibilidad y especificidad de ésta¹² para el adenoma paratiroideo solitario con respecto a otros estudios de imagen, con objeto de evaluar un abordaje cervical selectivo; aunque algunos autores resaltan el valor de la ecografía en manos de radiólogos expertos para aquellos casos sospechosos de adenoma quístico, por cuanto que la escasez de tejido paratiroideo en su periferia y el rápido lavado del radiotrazador podría contribuir a falsos negativos^{4,13} en estos casos.

En nuestra paciente la gammagrafía fue capaz de identificar el adenoma, pero no pudo relacionarlo con la formación quística adyacente que fue considerada dependiente de la glándula tiroidea.

El resto de estudios de imagen debería limitarse para casos muy específicos, debido a su aportación limitada.

Una orientación preoperatoria adecuada podría contribuir a reducir la agresividad quirúrgica, basada en la posibilidad de una crisis hipercalcémica de naturaleza maligna. En nuestra paciente, un diagnóstico más fiable de benignidad habría limitado la exéresis a la paratiroides quística y el tejido tiroideo adyacente, al encontrarse el quiste parcialmente incluido en éste.

La complejidad diagnóstica de esta patología justificaría una exploración quirúrgica metódica del resto de glándulas¹¹ para descartar una enfermedad multiglandular en forma de coexistencia individualizada de quiste y adenoma, afectación quística poliglandular o enfermedad hiperplásica concomitante, aunque la determinación de PTH intraoperatoria podría orientarnos hacia la persistencia o resolución del proceso con una elevada fiabilidad una vez extirpado el tejido sospechoso¹⁴, reduciendo el tiempo quirúrgico y el riesgo de morbilidad asociada a exploraciones innecesarias.

En conclusión, la escasez de casos documentados en la literatura puede dificultar la sospecha diagnóstica preoperatoria de una tumoración quística funcionante benigna de paratiroides, para cuya confirmación se deberían cumplir criterios clínicos y bioquímicos de hiperparatiroidismo, identificación de tejido paratiroideo en la pared quística en ausencia de signos histológicos de malignidad, demostración morfológica o funcional del carácter normal de las glándulas restantes, y la regularización de las cifras de calcemia en el postoperatorio.

Declaración de intereses: Los autores declaran la ausencia de cualquier conflicto de intereses en la presente publicación.

Bibliografía

1. Fraser WD. Hyperparathyroidism. *Lancet* 2009;374:145-58.
2. Braccini F, Epron JP, Roux C, Gabert K, Richard-Vitton T, Korchia D, et al. Le kyste parathyroïdien essentiel: une affection trompeuse. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 2000;121:165-8.
3. Martí J, Martín Arregi FJ, Mutio L, Alonso A. Quiste paratiroideo. A propósito de un caso. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002;53:302-4.
4. Wirowski D, Wicke C, Böhner H, Lammers BJ, Pohl P, Schwarz K, et al. Presentation of 6 cases with parathyroid cysts and discussion of the literature. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008;116:501-6.
5. Serra Soler G, García Fernández H, Quevedo Juanals J, Argüelles Jiménez I, Carrillo García P. Crisis paratiroidea por adenoma quístico de paratiroides. *Endocrinol Nutr* 2011;58:148-50.
6. Chang YJ, Mittal V, Remine S, Manyam H, Sabir M, Richardson T, et al. Correlation between clinical and histological findings in parathyroid tumors suspicious for carcinoma. *Am Surg* 2006;72:419-26.
7. Laing VO, Frame B, Block MA. Associated primary hyperparathyroidism and thyroid lesions. Surgical considerations. *Arch Surg* 1969;98:709-12.
8. Gurbuz AT, Peetz ME. Giant mediastinal parathyroid cyst: an unusual cause of hypercalcemic crisis – case report and review of the literature. *Surgery* 1996;120:795-800.
9. Khan A, Khan Y, Raza S, Akbar G, Khan M, Diwan N, et al. Functional parathyroid cyst: a rare cause of malignant hypercalcemia with primary hyperparathyroidism – a case report and review of the literature. *Case Report Med* 2012;2012:851941, 5 pages.
10. Fortson JK, Patel VG, Henderson VJ. Parathyroid cysts: a case report and review of the literature. *Laryngoscope* 2001;111:1726-8.
11. Manouras A, Toutouzas KG, Markogiannakis H, Lagoudianakis E, Papadima A, Antonakis PT, et al. Intracystic hemorrhage in a mediastinal cystic adenoma causing parathyrotoxic crisis. *Head Neck* 2008;30:127-31.
12. Richards MK, Slavin ER, Tamarkin SW, McHenry CR. Technetium-99m sestamibi imaging: Are the results dependent on the reviewer? *J Surg Res* 2012;177:97-101.
13. Tublin ME, Pryma DA, Yim JH, Ogilvie JB, Mountz J, Bencherif B, et al. Localization of parathyroid adenomas by sonography and technetium Tc 99m sestamibi single-photon emission computed tomography before minimally invasive parathyroidectomy: are both studies really needed? *J Ultrasound Med* 2009;28:183-90.
14. Maze H, Sippel RS, Chen H. Three large, functioning cystic parathyroid adenomas. *Endocr Prat* 2012;18:14-6.

Normas de publicación: Información para los autores

1) Información general. Política editorial

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

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

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

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

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

2) Elaboración y envío de los manuscritos

Los manuscritos deben elaborarse siguiendo las recomendaciones del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas, disponibles en:

<http://www.icmje.org>, y enviarse por correo electrónico a la dirección revistadeosteoporosisymetabolismomineral@ibanezyplaza.com.

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

2.1. Carta de presentación

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

2.2. Manuscritos

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

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

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

2.3. Apartados de los manuscritos

2.3.1. Página del título y autores:

Constará de la siguiente información:

- El título, que debe describir adecuadamente el contenido del trabajo. Debe ser breve, claro e informativo. Se debe incluir el nombre completo y el primer apellido de los autores, o los dos apellidos separados o unidos mediante guión, dependiendo de cómo prefieran los autores que aparezcan en las publicaciones.
- El nombre del (los) departamento(s) o servicio(s) y la(s) institución(es) a los que el trabajo debe ser atribuido. No es necesario incluir el cargo académico o profesional de los autores. Constará el reconocimiento de cualquier beca o ayuda económica, así como la declaración de la existencia o no de conflictos de intereses de cada uno de los autores.

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

2.3.2. Resumen y palabras clave

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

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

A continuación del resumen se incluirán las palabras clave, de 3 a 10 en total, con el objetivo de complementar la información contenida en el título y ayudar a identificar el trabajo en las bases de datos bibliográficas. Para las palabras clave se deben emplear términos equivalentes a los obtenidos de la lista de descriptores en Ciencias de la Salud (Medical Subjects Headings, MeSH) del Index Medicus (disponibles en: www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html). Importante: No es necesario enviar el resumen ni las palabras clave en inglés. Esto será realizado por el traductor de la Revista.

2.3.3. Introducción

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

2.3.4. Material y métodos

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

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

No deben mostrarse los nombres de los pacientes ni incluir ningún dato que pueda conducir a su identificación. Con respecto a los fármacos, se utilizará el nombre genérico de los fármacos utilizados en el

estudio evitando sus nombres comerciales, y detallando al máximo la dosis prescrita, la vía de administración y el tiempo de administración.

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

2.3.5. Resultados

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

2.3.6. Discusión

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

2.3.7. Bibliografía

Se incluirán únicamente aquellas citas que se consideren importantes y hayan sido leídas por los autores. Todas las referencias deben estar citadas en el texto de forma consecutiva según el orden de aparición, e identificadas mediante llamada en números arábigos en superíndice. Las referencias que se citan solamente en las tablas o leyendas deben ser numeradas de acuerdo con la secuencia establecida por la primera identificación en el texto de las tablas o figuras.

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

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

nes no publicadas”, “comunicación personal” o similares. Los originales aceptados y no publicados en el momento de ser citados pueden incluirse como citas “En prensa”.

2.3.8. Tablas

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

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

2.3.9. Figuras

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

3. Normas específicas de cada sección

3.1. Originales

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

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

3.2. Notas clínicas

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

3.3. Cartas al Editor

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

3.4. Otras secciones

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

3.4.1. Revisiones

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

3.4.2. Editoriales

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

3.4.3. Documentos especiales

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

4. Transmisión de los derechos de autor

4.1. Garantías del autor y responsabilidad

Al enviar el trabajo por correo electrónico, el autor garantiza que todo el material que remite a la Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral para su publicación es original, y que el mismo no ha sido publicado con anterioridad ni remitido simultáneamente a ninguna otra Revista para su publicación.

Asimismo, el autor garantiza que el trabajo que remite cumple la Ley de Protección de Datos y que ha obtenido el consentimiento previo y escrito de los pacientes o sus familiares para su publicación.

4.2. Cesión de derechos de explotación

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

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