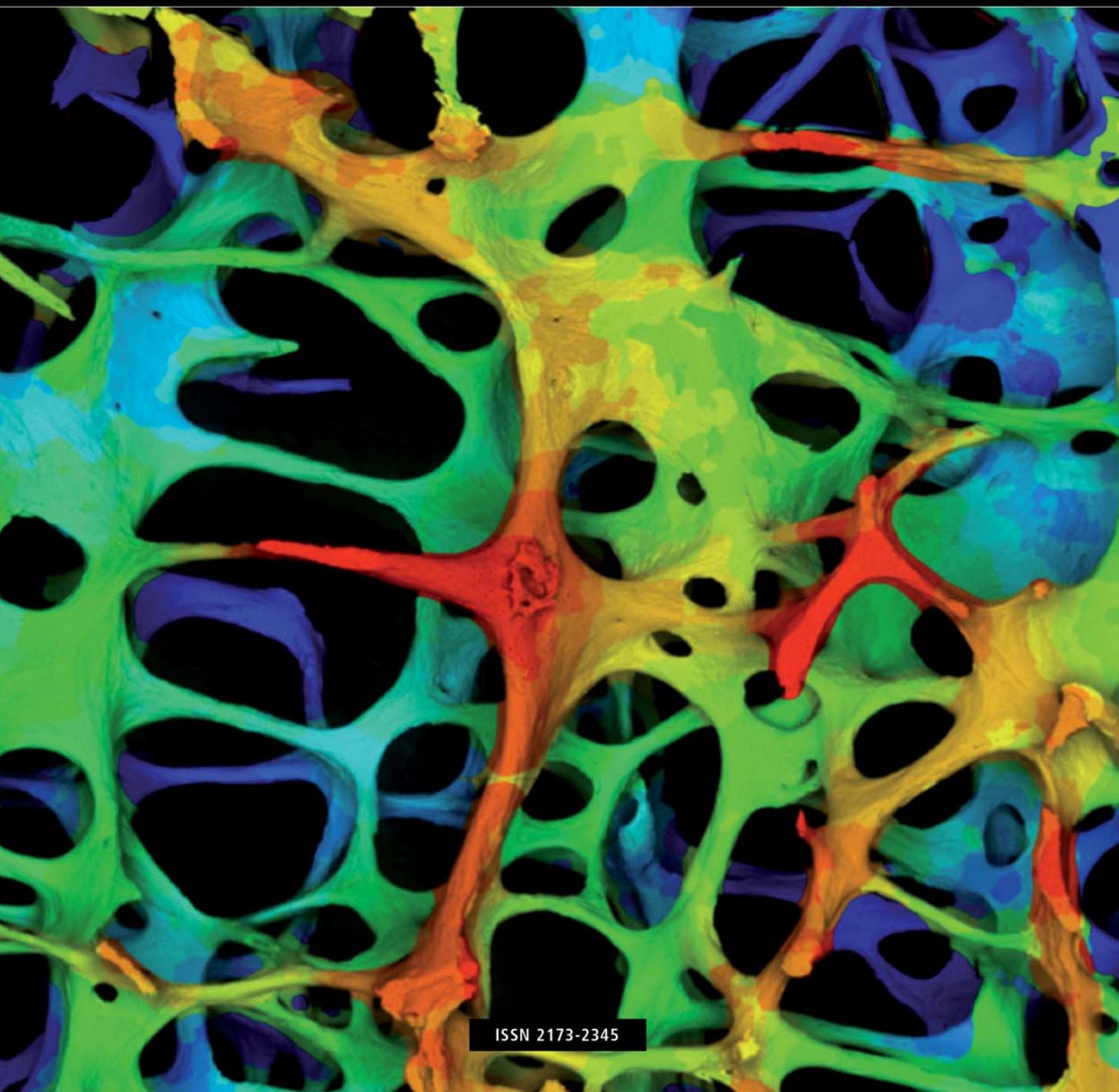


Volumen 8 · Número 1 · Enero-Marzo 2016

# Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

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

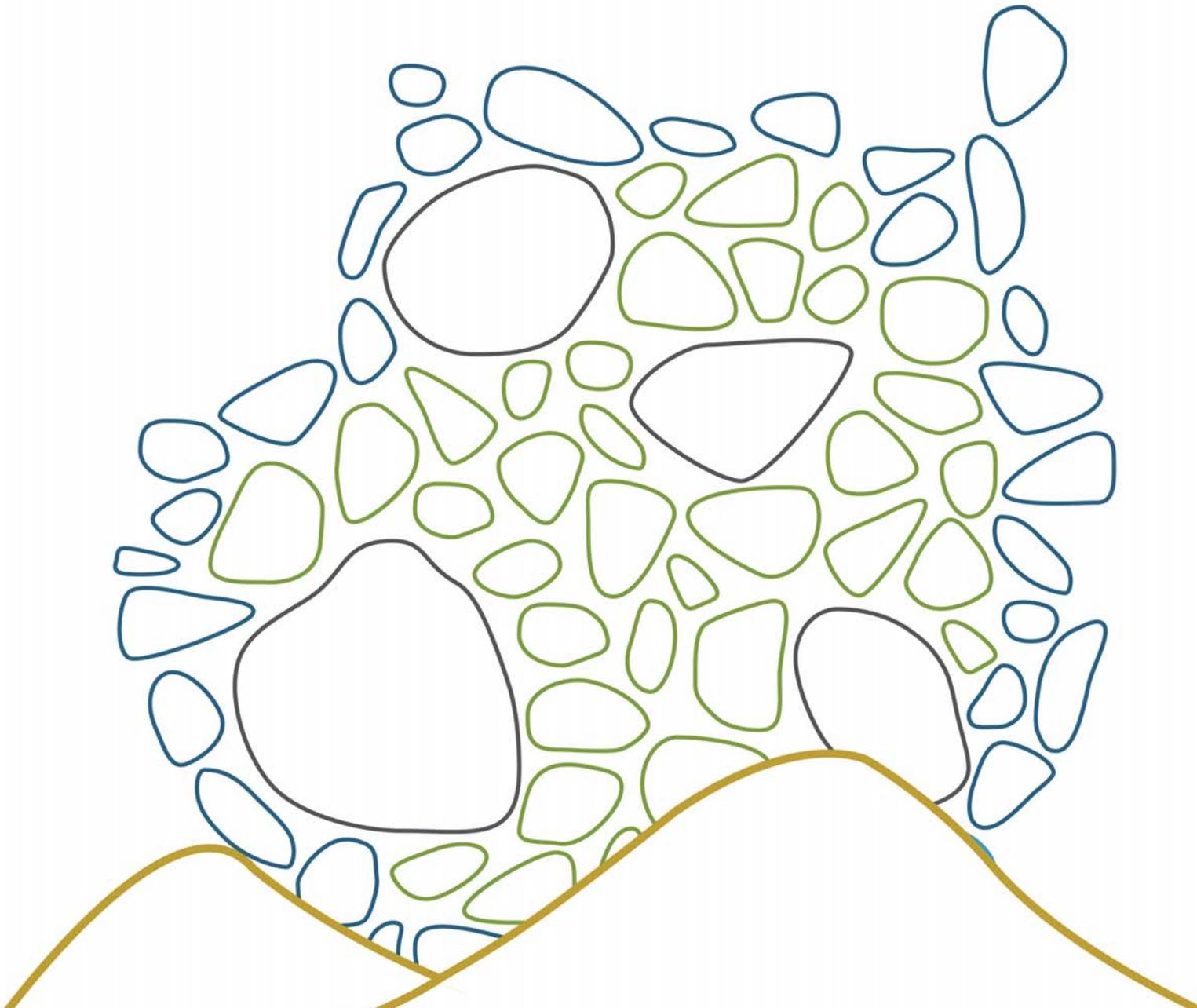


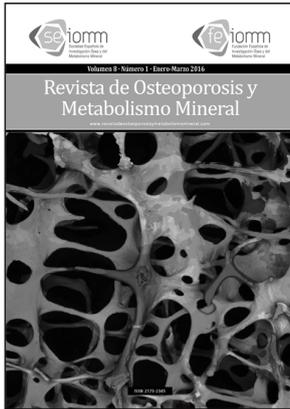
ISSN 2173-2345



**XXI** Congreso de la **SEIOMM** - 19, 20 y 21 de Octubre de **2016**

**GRAN CANARIA**





## Nuestra portada

### Hueso trabecular

#### Autor:

Cortesía del  
Profesor Alan  
Boyde. Londres.  
Reino Unido

#### Director

**Manuel Sosa Henríquez**

#### Redactora Jefe

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

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

#### Presidente

**Francesc Xavier Nogués Solán**

#### Vicepresidente

**José Manuel Olmos Martínez**

#### Secretaria

**Carmen Gómez Vaquero**

#### Tesorera

**Arancha Rodríguez de Cortazar**

#### Vocal 1

**Cristina Carbonell Abella**

#### Vocal 2

**Antonio Cano Sánchez**

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

Tel: +34-625 680 737

Fax: +34-917 817 020

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

<http://www.seiomm.org>

#### Editing



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

Tel. +34-915 538 297

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

<http://www.ibanezyplaza.com>

#### Maquetación

**Concha García García**

#### Traducción inglés

**David Shea**

ISSN: 2173-2345

Envío de originales:

[romm@ibanezyplaza.com](mailto:romm@ibanezyplaza.com)

## SUMARIO

Vol. 8 - Nº 1 - Enero-Marzo 2016

### 3 EDITORIAL

#### El correcto cumplimiento del tratamiento para la osteoporosis: aún nos queda mucho por hacer

Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ

### 5 ORIGINALES

#### Estudio del patrón de expresión de microRNAs en el hueso osteoporótico

García-Giralt N, De-Ugarte L, Yoskovitz G, Güerri R, Grinberg D, Nogués X, Mellibovsky L, Balcells S, Díez-Pérez S

### 15 Percepción de los profesionales médicos respecto a la adherencia terapéutica de los pacientes con osteoporosis

Blanch J, Casado E, González J, Valdés C, Ruiz-Baena J, Palomino R, Nogués X

### 24 Dickkopf1 (DKK1), metabolismo óseo y enfermedad aterosclerótica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2

Reyes-García R, Rozas-Moreno P, García-Martín A, García-Fontana B, Morales-Santana S, Muñoz-Torres M

### 30 Cambios inducidos en DKK1 en pacientes con artritis reumatoide que inician tratamiento con terapia biológica

Palma-Sánchez D, Haro-Martínez AC, Gallardo Muñoz I, Portero de la Torre M, Mayor González M, Peñas E, Reyes-García R

### 36 NOTA CLÍNICA

#### Osteogénesis imperfecta forma clásica no deformante. Comunicación de una nueva mutación en el gen COL1A1 en dos casos de la misma familia

Pavón de Paz I, Gil Fournier B, Navea Aguilera C, Ramiro León MS, Modroño Móstoles N, Guijarro de Armas G

### 40 REVISIÓN

#### ¿Qué son los microARNs? Posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica

Giner M, Montoya MJ, Vázquez MA, Miranda C, Miranda MJ, Pérez-Cano R

### 45 NORMAS DE PUBLICACIÓN

Indexada en las siguientes bases de datos: Scielo, IBECs, SIIC Data Bases, embase, Redalyc, Open J-Gate, DOAJ, Free Medical Journal, Google Academic, Medes, Electronic Journals Library AZB, e-revistas, WorldCat, Latindex, EBSCOhost, MedicLatina, Dialnet, SafetyLit, Mosby's, Encare, Academic Keys.

#### © Copyright SEIOMM

Reservados todos los derechos. El contenido de la revista no puede ser reproducido ni transmitido por ningún procedimiento sin la previa autorización por escrito del titular de los derechos de explotación de la misma.

## Comité Editorial

### Teresita Bellido. PhD

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

### Ernesto Canalis. MD, PhD

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

### Dr. Oswaldo Daniel Messina

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

### Patricia Clark Peralta. MD, PhD

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

### Dr. Carlos Mautalen

Profesor Consultor Titular de la Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Director de "Mautalen, Salud e Investigación". Buenos Aires. Argentina.

### Lilian I Plotkin. PhD

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

### 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 (FHOEMO). 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. Francesc Xavier Nogués Solán

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

### 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

### Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero (Redactora Jefe)

Universidad de Sevilla. Departamento de Medicina. Sevilla. España

## Comité de Expertos

Pilar Aguado Acín

María José Américo García

Miguel Arias Paciencia

Emilia Aznar Villacampa

Chesús Beltrán Audera

Pere Benito Ruiz

Santiago Benito Urbina

Miguel Bernard Pineda

Josep Blanch i Rubió

José Antonio Blázquez Cabrera

José Ramón Caeiro Rey

Javier Calvo Catalá

M<sup>º</sup> Jesús Cancelo Hidalgo

Jorge Cannata Andía

Antonio Cano Sánchez

Cristina Carbonell Abella

Jordi Carbonell Abelló

Pedro Carpintero Benítez

Enrique Casado Burgos

Santos Castañeda Sanz

Jesús Delgado Calle

Bernardino Díaz López

Casimira Domínguez Cabrera

Fernando Escobar Jiménez

José Filgueira Rubio

Jordi Fiter Areste

Juan José García Borrás

Juan Alberto García Vadillo

Eduardo Girona Quesada

Carlos Gómez Alonso

Milagros González Béjar

Jesús González Macías

Emilio González Reimers

Jenaro Graña Gil

Silvana di Gregorio

Daniel Grinberg Vaisman

Nuria Guañabens Gay

Roberto Güerri Fernández

Federico Hawkins Carranza

Diego Hernández Hernández

José Luis Hernández Hernández

Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Esteban Jódar Gimeno

Pau lluch Mezquida

M<sup>º</sup> Luisa Mariñoso Barba

Guillermo Martínez Díaz-Guerra

María Elena Martínez Rodríguez

Leonardo Mellivobsky Saldier

Manuel Mesa Ramos

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 Solán

Joan Miquel Nolla Solé

José Antonio Olmos Martínez

Norberto Ortego Centeno

Santiago Palacios Gil-Antuñano

Esteban Pérez Alonso

Ramón Pérez Cano

José Luis Pérez Castrillón

Pilar Peris Bernal

Concepción de la Piedra Gordo

José Manuel Quesada Gómez

Enrique Raya Álvarez

Rebeca Reyes García

José Antonio Riancho Moral

Luis de Río Barquero

Luis Rodríguez Arboleya

Arancha Rodríguez de Gortázar

Alonso-Villalobos

Minerva Rodríguez García

Antonia Rodríguez Hernández

Manuel Rodríguez Pérez

Inmaculada Ros Villamajó

Rafael Sánchez Borrego

Oscar Torregrosa Suau

Antonio Torrijos Eslava

Carmen Valdés y Llorca

Carmen Valero Díaz de Lamadrid

Ana Weruaga Rey

### METODOLOGÍA Y DISEÑO DE DATOS

Pedro Saavedra Santana

José María Limiñana Cañal

## SUMMARY Vol. 8 - Nº 1 - January-March 2016

### 3 EDITORIAL

#### Proper compliance of treatment for osteoporosis: we still have much to do

Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ

### 5 ORIGINAL ARTICLES

#### Study of miRNAs expression patterns in osteoporotic bone

García-Giralt N, De-Ugarte L, Yoskovitz G, Güerri R, Grinberg D, Nogués X, Mellibovsky L, Balcells S, Díez-Pérez S

#### 15 Medical professionals' perceptions regarding therapeutic adherence in patients with osteoporosis

Blanch J, Casado E, González J, Valdés C, Ruiz-Baena J, Palomino R, Nogués X

#### 24 Serum dickkopf1 (DKK1), bone metabolism and atherosclerotic disease in patients with type 2 diabetes

Reyes-García R, Rozas-Moreno P, García-Martín A, García-Fontana B, Morales-Santana S, Muñoz-Torres M

#### 30 Changes induced by DKK1 in rheumatoid arthritis patients who commence biologic therapy treatment

Palma-Sánchez D, Haro-Martínez AC, Gallardo Muñoz I, Portero de la Torre M, Mayor González M, Peñas E, Reyes-García R

### 36 CLINICAL NOTE

#### Classic non-deforming osteogenesis imperfecta. Report of a new mutation in the COL1A1 gene in two cases in the same family

Pavón de Paz I, Gil Fournier B, Navea Aguilera C, Ramiro León MS, Modroño Móstoles N, Guijarro de Armas G

### 40 REVIEW

#### What are microRNAs? Potential biomarkers and therapeutic targets in osteoporosis

Giner M, Montoya MJ, Vázquez MA, Miranda C, Miranda MJ, Pérez-Cano R

# El correcto cumplimiento del tratamiento para la osteoporosis: aún nos queda mucho por hacer

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000100001>

Sosa Henríquez M<sup>1,2</sup>, Gómez de Tejada Romero MJ<sup>3</sup>

1 Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias - Universidad de Las Palmas de Gran Canaria - Las Palmas de Gran Canaria (España)

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

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

Correo electrónico: msosah@hotmail.com

**L**a osteoporosis es una enfermedad muy prevalente cuya complicación clínica constituye las fracturas por fragilidad<sup>1</sup>. Se trata de un proceso crónico, habitualmente asintomático, que deteriora el hueso haciéndolo propenso a la fractura. El objetivo último en el tratamiento de la osteoporosis es minimizar el riesgo de sufrir nuevas fracturas<sup>1-4</sup>. No existe ningún fármaco que reduzca dicho riesgo hasta hacerlo nulo: la mayor parte de los fármacos disponibles hoy en día para el tratamiento de la osteoporosis obtienen reducciones entre el 40-65%<sup>2-4</sup>, y ello tomando la medicación de manera continua durante un período de tiempo que oscila entre 3 y 5 años, hecho que en realidad es utópico, pues la realidad es que los pacientes abandonan con mucha frecuencia el tratamiento para la osteoporosis, cuando llegan a iniciarlo. Varios estudios han puesto de manifiesto que la adherencia al tratamiento de la osteoporosis es, en general, baja, y que en el primer año el porcentaje de abandonos se encuentra entre el 30-50% en la mayor parte de los casos<sup>5</sup>. Una de las razones puede ser su condición de asintomática, lo cual no permite al paciente tener sensación de mejoría, y que en el mejor de los casos y si todo va bien, el paciente no se fractura, pero sin percibir nada subjetivamente. En este sentido la osteoporosis es diferente de otras enfermedades crónicas que se vuelven sintomáticas en cuanto el paciente abandona el tratamiento, como pueden ser la migraña, la isquemia coronaria o la diabetes *mellitus*.

La pauta de tratamiento parece ser otro factor relacionado con la correcta toma del mismo, y se ha visto en varios estudios realizados con bifosfonatos que el cumplimiento era mejor cuando las tomas eran más espaciadas. Así, Penning-van Best y cols. observaron que, al cabo de un año continuaban el tratamiento el 51,9% de las pacientes que tenían una administración semanal, y sólo el 30-42% de aquéllas con dosis diaria, siendo indiferente el tipo de bifosfonato administrado (etidronato, alendronato o risedronato)<sup>6</sup>. En otro estudio, Cramer y cols. valoraron el cumplimiento de 2.741 mujeres en tratamiento con bisfosfonatos y observaron que, al cabo de un año, la persistencia fue del 44,2% en aquéllas que tomaban el bifosfonato semanalmente, frente al 31,7% entre las que lo tomaban a diario<sup>7</sup>. En los Estados Unidos, Ettinger y cols. analizaron las ventas de prescripciones de alendronato y risedronato en más de 211.000 mujeres y

obtuvieron que, al cabo de un año, el 56,7% de las pacientes que tomaban el bifosfonato semanalmente continuaban recibiendo el fármaco, frente al 39% de las que lo tomaban diariamente. Sin embargo, estos autores destacaban que más del 40% de las pacientes no continuaban el tratamiento con bifosfonatos semanales<sup>8</sup>. En un estudio efectuado en 15.640 mujeres de varios países (Reino Unido, Francia y Estados Unidos), Cramer y cols. encontraron que, al cabo de un año, la persistencia de pacientes con bifosfonatos era superior en aquéllas que recibían la medicación semanalmente, comparadas con las que lo hacían diariamente (44% *vs.* 32%, respectivamente, en los Estados Unidos; 52% *vs.* 40% en el Reino Unido; y 51% *vs.* 44% en Francia), siendo en todos los casos el valor de  $p < 0,001$ <sup>9</sup>.

También se han publicado estudios que comparan la administración semanal con la mensual de los bifosfonatos. Así, en el estudio PERSIST se comparó la adherencia al tratamiento durante 6 meses en un grupo de mujeres que recibían ibandronato mensual frente a otro que tomaban alendronato semanal, observándose que de las que tomaban la medicación mensualmente persistían con el tratamiento un 56,6%, frente al 38,6% de las que tomaban el alendronato semanal<sup>10</sup>.

La introducción de fármacos como el zoledronato y el denosumab, con una vida media más prolongada que permite una administración anual y semestral respectivamente, ha cambiado notablemente el escenario del incumplimiento terapéutico así como las preferencias de los pacientes. Un estudio multicéntrico aleatorizado y a doble ciego, realizado por McClung y cols. para valorar la seguridad y eficacia de una única dosis intravenosa de 5 mg de ácido zoledrónico *vs.* 70 mg de alendronato semanal por vía oral, y realizado en 225 mujeres con osteoporosis postmenopáusica que previamente habían recibido tratamiento con alendronato semanal, obtuvo como resultado que el 78,7% de las pacientes expresaron su preferencia por el tratamiento anual intravenoso frente al semanal oral<sup>11</sup>, al igual que manifestaron la mayoría participantes en un estudio similar realizado por Saag y cols.<sup>12</sup>.

Resulta evidente que los pacientes que toman regularmente la medicación para la osteoporosis tienen mejores resultados, tanto en lo referente a los cambios en la densidad mineral ósea<sup>13</sup> como, más importante, en la reducción en la tasa de fracturas y en el

descenso de la mortalidad<sup>14,15</sup>. Un estudio realizado por Siris y cols. en una amplia población de mujeres postmenopáusicas de más de 45 años, a las que se le había indicado un bifosfonato como tratamiento de la osteoporosis, demostró que, tras 2 años de seguimiento, aquellas mujeres que tomaban el tratamiento correctamente (43%) tenían una reducción del riesgo de fractura, tanto vertebrales como no vertebrales, un 21% mayor que las pacientes que no seguían correctamente el tratamiento<sup>16</sup>. Con anterioridad, Caro y cols. habían obtenido resultados similares, encontrando una reducción en la aparición de nuevas fracturas superior (un 16%) entre aquellas pacientes que eran cumplidoras frente a las que no lo eran. En este estudio el período de seguimiento fue también de 2 años, y los fármacos evaluados calcitonina, terapia hormonal sustitutiva y bifosfonatos<sup>17</sup>. Los mismos autores repitieron el estudio utilizando una base de datos más amplia, con una cohorte de más de 38.000 mujeres afectas de osteoporosis, y obtuvieron cifras similares: la escasa adherencia al tratamiento se asociaba a un incremento en el riesgo de fractura del 17% tras un seguimiento de 1,7 años<sup>18</sup>. Estos resultados son corroborados por los obtenidos en otros estudios<sup>19-21</sup>.

En este número Blanch y cols. completan la perspectiva de la falta de cumplimiento y la escasa adherencia al tratamiento de la osteoporosis desde el punto de vista de los médicos<sup>22</sup>. Hasta ahora, la mayor parte de los estudios analizaban los puntos de vista de los pacientes, que grado de abandono existía, las razones y sus consecuencias, pero la opinión de los médicos al respecto había sido tenida pocas veces en cuenta y que ahora es recogida. Los autores entrevistaron a 235 médicos de toda España y entre otras conclusiones obtuvieron respuestas que hasta ahora no habían sido recogidas en otros estudios, lo cual le confiere un valor adicional por su originalidad. Así, entre los motivos que ocasionan la falta de adherencia terapéutica, se recogen la falta de coordinación entre niveles asistenciales, la polimedicación y los efectos secundarios.

El entendimiento de estos hechos puede ayudarnos a tratar de conseguir una mejor adherencia y cumplimiento por parte de los pacientes, además de una mejoría de los niveles de comunicación entre médicos y pacientes. El conocimiento de los efectos secundarios esperables (por su frecuencia) y la introducción cuando esté indicado de fármacos con una vida más larga y con una administración semestral o anual, podrían ser de utilidad

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no tiene ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

- Rosen CJ. Postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2005;353:595-603.
- Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet* 2006; 367:2010-8.
- Sosa Henríquez M, Hernández Hernández D. Tratamiento de la osteoporosis. En: Sosa Henríquez M, editor. *Medicine. Número extraordinario: Osteoporosis*. Madrid: Ed. Doyma; 2006.p.35-9.
- Seeman E, Eisman JA. Treatment of osteoporosis: why, whom, when and how to treat. *Med J Austral* 2004;180:298-303.
- Gómez de Tejada Romero MJ. LA adherencia en el tratamiento de la osteoporosis. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2010;2:10-4.
- Penning-van Beest FJ, Goettsch WG, Erkens JA, Herings RM. Determinants of persistence with bisphosphonates: a study in women with postmenopausal osteoporosis. *Clin Ther* 2006;28:236-42.
- Cramer JA, Amonkar MM, Hebborn A, Altman R. Compliance and persistence with bisphosphonate dosing regimens among women with postmenopausal osteoporosis. *Curr Med Res Opin* 2005;21:1453-60.
- Ettinger MP, Gallagher R, MacCosbe PE. Medication persistence with weekly versus daily doses of orally administered bisphosphonates. *Endocr Pract* 2006;12:522-8.
- Cramer JA, Lynch NO, Gaudin AF, Walker M, Cowell W. The effect of dosing frequency on compliance and persistence with bisphosphonate therapy in postmenopausal women: a comparison of studies in the United States, the United Kingdom, and France. *Clin Ther* 2006;28:1686-94.
- Cooper A, Drake J, Brankin E; the PERSIST Investigators. Treatment persistence with once-monthly ibandronate and patient support vs. once-weekly alendronate: results from the PERSIST study. *Int J Clin Pract* 2006;60:896-905.
- McClung M, Recker R, Miller P, Fiske D, Minkoff J, Kriegman A, et al. Intravenous zoledronic acid 5 mg in the treatment of postmenopausal women with low bone density previously treated with alendronate. *Bone* 2007;41:122-8.
- Saag K, Lindsay R, Kriegman A, Beamer E, Zhou W. A single zoledronic acid infusion reduces bone resorption markers more rapidly than weekly oral alendronate in postmenopausal women with low bone mineral density. *Bone* 2007;40:1238-43.
- Yood RA, Emani S, Reed JI, Edelman Lewis B, Charpentier M, Lydick E. Compliance with pharmacologic therapy for osteoporosis. *Osteoporos Int* 2003;14:965-8.
- Patrick AR, Brookhart MA, Losina E, Schousboe JT, Cadarette SM, Mogun H, et al. The complex relation between bisphosphonate adherence and fracture reduction. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3251-9.
- Lekkerkerker F, Kanis JA, Alsayed N, Bouvenot G, Burlet N, Cahall D, et al. Adherence to treatment of osteoporosis: a need for study. *Osteoporos Int* 2007;18:1311-7.
- Siris ES, Harris ST, Rosen CJ, Barr CE, Arvesen JN, Abbott TA, et al. Adherence to bisphosphonate therapy and fracture rates in osteoporotic women: relationship to vertebral and nonvertebral fractures from 2 US claims databases. *Mayo Clin Proc* 2006;81:1013-22.
- Caro JJ, Ishak KJ, Huybrechts KF, Raggio G, Naujoks C. The impact of compliance with osteoporosis therapy on fracture rates in actual practice. *Osteoporos Int* 2004;15:1003-8.
- Huybrechts KF, Ishak KJ, Caro JJ. Assessment of compliance with osteoporosis treatment and its consequences in a managed care population. *Bone* 2006;38:922-8.
- McCombs JS, Thiebaud P, McLaughlin-Miley C, Shi J. Compliance with drug therapies for the treatment and prevention of osteoporosis. *Maturitas* 2004;48:271-87.
- Adachi J, Lynch N, Middelhoven H, Hunjan M, Cowell W. The association between compliance and persistence with bisphosphonate therapy and fracture risk: A review. *BMC Musculoskelet Disord* 2007;8:97.
- Van den Boogaard CHA, Breekveldt-Postman NS, Borggreve SE, Goettsch WG, Herings RMC. Persistent bisphosphonate use and the risk of osteoporotic fracture in clinical practice: a database analysis study. *Curr Med Res Opin* 2006;22:1757-64.
- Blanch J, Casado E, González J, Valdés C, Ruiz-Baena J, Palomino R et al. Percepción de los profesionales médicos respecto la adherencia terapéutica de los pacientes con osteoporosis. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2016;8(1):15-23.

**García-Giralt N<sup>1</sup>, De-Ugarte L<sup>1</sup>, Yoskovitz G<sup>1</sup>, Güerri R<sup>1,2</sup>, Grinberg D<sup>3</sup>, Nogués X<sup>1,2</sup>, Mellibovsky L<sup>1,2</sup>, Balcells S<sup>3</sup>, Díez-Pérez S<sup>1,2</sup>**

1 IMIM (Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas) - Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) - ISCIII - Barcelona (España)

2 Departamento de Medicina Interna - Parque de Salud Mar - Universidad Autónoma de Barcelona - Barcelona (España)

3 Departamento de Genética - Universidad de Barcelona - IBUB - Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) - ISCIII - Barcelona (España)

## Estudio del patrón de expresión de microRNAs en el hueso osteoporótico

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000100002>

Correspondencia: Natalia García Giralt - c/Dr. Aiguàder, 88 - 08003 Barcelona (España)

Correo electrónico: [ngarcia@imim.es](mailto:ngarcia@imim.es)

Fecha de recepción: 20/10/2015

Fecha de aceptación: 10/12/2015

*Trabajo becado por la FEIOMM para asistir al 36º Congreso de la ASBMR (Houston, 2014).*

### Resumen

**Objetivos:** Identificar microRNAs (miRNAs) diferencialmente expresados en muestras óseas con fractura osteoporótica respecto a huesos sanos.

**Material y métodos:** Se extrajo RNA total a partir de hueso trabecular fresco del cuello femoral de mujeres sometidas a reemplazo de cadera, ya sea debido a fractura osteoporótica (n=6) o por artrosis en ausencia de osteoporosis (según la DMO) (n=6). Las muestras se hibridaron en un *array* de miRNAs y se realizaron diagramas de PCA y de mapa de calor. Para la comparación de los niveles de expresión, se fijó como significativo un umbral de cambio de >1,5 veces y un valor  $p < 0,05$  en la t de Student (corregido para múltiples pruebas).

**Resultados:** Tanto los análisis de PCA como el mapa de calor mostraron una agrupación de las muestras según si eran de fractura o no. Se detectaron 790 miRNAs en las muestras de hueso, 82 de los cuales estaban alterados en las muestras osteoporóticas. Tras la validación en otro panel de 6 muestras osteoporóticas y 6 no osteoporóticas mediante PCR a tiempo real de los miRNAs más significativos, y para los que existía un ensayo disponible, se confirmaron los miRNAs miR-320a y miR-22-3p.

Estos dos miRNAs se detectaron en cultivos de osteoblastos primarios, aunque no mantenían el mismo patrón de expresión que en las muestras de hueso total.

**Conclusiones:** Hemos demostrado que existen diferencias en la expresión de miRNAs en muestras con fractura osteoporótica, lo que abre nuevas perspectivas para la investigación y diseño de nuevas terapias.

**Palabras clave:** *microRNA, fractura ósea, osteoporosis, osteoblastos, hueso.*

## Study of miRNAs expression patterns in osteoporotic bone

### Summary

**Objectives:** To identify microRNAs (miRNAs) differentially expressed in bone samples with osteoporotic fracture compared with healthy bones.

**Methods:** Total RNA was extracted from fresh trabecular bone of the femoral neck of women undergoing hip replacement surgery, either because to osteoporotic fracture (n=6) or in the absence of osteoarthritis osteoporosis (based on BMD) (n=6). The samples were hybridized on an array of miRNAs and PCA diagrams and heat map were made. To compare expression levels, >1.5 times and a value  $p < 0.05$  Student's T test (corrected for multiple testing) was set as a threshold of significant change.

**Results:** Both PCA analysis and the heat map showed a samples grouping whether there was fracture or not. 790 were detected miRNAs in bone samples, 82 of which were altered in the osteoporotic samples. After validation in another panel of 6 samples 6 osteoporotic and non-osteoporotic by PCR real time of the most significant miRNAs, and for which there was a test available, the miRNAs, miR-320a and miR-22-3p were confirmed. These two miRNAs were detected in cultures of primary osteoblasts, although they did not maintain the same pattern of expression in total bone samples.

**Conclusions:** We have shown that there are differences in the expression of miRNAs in samples with osteoporotic fracture. This opens prospects for research and design of new therapies.

**Key words:** *microRNA, bone fracture, osteoporosis, osteoblasts, bone.*

### Introducción

Los microRNAs (miRNAs) han sido relacionados con una variedad de procesos, tales como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular. Una desregulación de cualquiera de estos procesos podría conducir a procesos patológicos, algunos de ellos tan graves como el cáncer<sup>1</sup>.

Los microRNAs son pequeños RNAs (18-24nt), no codificantes, que regulan negativamente la expresión génica mediante la unión a las secuencias 3'-UTRs de mRNAs diana. En el tejido óseo, los miRNAs han sido descritos como factores clave para la regulación de la formación, remodelación, y la homeostasis del hueso<sup>2,3</sup>. Además, varios estudios han demostrado que los miRNAs están involucrados en el control de la diferenciación y de la función de las células óseas<sup>4</sup>, y por ello la identificación de dichos miRNAs podría ser una herramienta para desarrollar terapias para promover la formación ósea o inhibir la resorción y así actuar sobre las enfermedades óseas.

En el campo de la osteoporosis hay muy pocos estudios sobre la implicación de los miRNAs en su fisiopatología. Li *et al.*<sup>5</sup> describieron una mutación en el pre-miR-2861 que bloqueaba la expresión del miR-2861, causando osteoporosis primaria en dos adolescentes emparentados. En otro estudio, tres polimorfismos en las secuencias diana para el miR-146a y el miR-146b en el gen FGF2 se asociaron genéticamente con la densidad mineral ósea (DMO) del cuello femoral<sup>6</sup>. Se han realizado también varios estudios intentando identificar miRNAs con un patrón de expresión alterado asociado a la fractura osteoporótica con el fin de encontrar biomarcadores de la patología<sup>7-9</sup>. Cabe destacar que todos estos estudios detectaron diferentes miRNAs demostrando una vez más la complejidad de la osteoporosis de la fractura.

De todas maneras, el tipo de muestra, las condiciones de recogida y el proceso de manipulación, así como las características de la población de estudio pueden influenciar al resultado final. De hecho, se ha encontrado una variedad de perfiles de expresión de miRNAs en función del tipo de célula estudiada dentro del linaje osteoblástico (proliferación, diferenciación, mineralización), de si está sometida a algún tratamiento (hormonas, citoquinas) o de la especie de procedencia<sup>10,11</sup>. De esta manera, se hace difícil hacer comparaciones entre estudios, aunque cualquier aportación en el campo es un paso más para entender la fisiopatología de la fractura.

El objetivo de este estudio fue identificar miRNAs con expresión alterada en el hueso osteoporótico, utilizando una metodología experimental lo más cercana posible a las condiciones fisiológicas. Para este propósito se analizó el hueso trabecular obtenido de pacientes con una fractura reciente por osteoporosis en comparación con muestras de hueso no osteoporóticas. Se realizó un estudio de hibridación de *microarray* a partir de tejido óseo total fresco para detectar todos los miRNAs expresados en estas muestras.

### Material y métodos

#### Obtención de las muestras óseas

El hueso trabecular del cuello femoral se obtuvo de mujeres post-menopáusicas sometidas a reemplazo de cadera, ya sea por fractura osteoporótica (OP) (n=6) o por artrosis (n=6). En las muestras de artrosis se determinó la ausencia de osteoporosis mediante la medición de la DMO y se consideraron como el grupo control. Para la validación de los resultados del *array* se obtuvieron 6 muestras adicionales de hueso trabecular del cuello femoral con fractura y 6 muestras sin osteoporosis. De

estas últimas muestras también se obtuvieron osteoblastos primarios (HOB). Ningún paciente tenía antecedentes de enfermedad metabólica o endocrina, insuficiencia renal crónica, enfermedad hepática crónica, cáncer, enfermedad ósea de Paget, síndrome de mala absorción, tratamientos de terapia de reemplazo hormonal, agentes anti-resortivos o anabólicos o esteroides orales, fármacos anti-epilépticos, litio, heparina o warfarina. Se obtuvieron los consentimientos informados por escrito de acuerdo con los reglamentos del Comité Ético de Investigación Clínica del Parque de Salud MAR, que aprobó el estudio.

### Cultivo de osteoblastos primarios

Para el cultivo de osteoblastos procedentes de las muestras óseas de la fase de validación, se obtuvieron fragmentos pequeños de hueso trabecular y se colocaron en placas de cultivo de 140 mm. Se incubaron con medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con FBS (*Fetal Bovine Serum*) al 10%, penicilina/streptomycin al 1%, fungisone al 0,4% y 100 µg/ml de ácido ascórbico. Las placas se tripsinizaron aproximadamente al cabo de tres semanas justo antes de llegar a la confluencia para la extracción de RNA.

### Extracción de RNA

Para la extracción de RNA de tejido óseo total, las muestras frescas de hueso trabecular se cortaron en pequeños fragmentos, se lavaron tres veces en solución tamponada con fosfato (PBS), y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

La extracción de RNA tanto de hueso total como de los HOB se realizó utilizando el kit *miRNeasy Mini* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de los osteoblastos primarios también se utilizó el *RNeasy MinElute Cleanup* (Qiagen) para obtener la fracción enriquecida en miRNAs. La concentración del RNA purificado se analizó en un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific Inc).

### Microarray de microRNAs de las muestras de hueso total y análisis de datos

El *microarray* y el análisis de datos se realizaron en la plataforma de Exiqon, Dinamarca. La calidad del RNA total se verificó mediante el Agilent 2100 Bioanalyzer y 250 ng de RNA, tanto de las muestras como el de referencia, se marcaron con señales fluorescentes HY3™ y HY5™, respectivamente, utilizando el miRCURY LNA™ microRNA Hi-Power Labeling Kit, HY3™/HY5™ (Exiqon, Dinamarca) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. El RNA de las muestras, marcado con HY3™, y el de la muestra de referencia marcado con HY5™, se mezclaron por igual y se hibridaron al *array* de microRNA miRCURY LNA™ (Exiqon, Dinamarca), que contiene sondas de captura dirigidas a todos los miRNAs humanos, de ratón o de rata entrados en el miRBase 18.0. La hibridación se realizó siguiendo el manual de instrucciones del *array* utilizando una estación de

hibridación Tecan HS4800™ (Tecan, Austria). Después de la hibridación, los resultados fueron escaneados y almacenados en un ambiente libre de ozono (<2,0 ppb de ozono) con el fin de evitar la extinción de los marcadores fluorescentes. EL escaneado se hizo utilizando el Sistema *Agilent Microarray Scanner G2565BA* (Agilent Technologies, Inc., EE.UU.) y el análisis de las imágenes se realizó utilizando el ImaGene® 9 (Análisis de Software microARN miRCURY LNA™, Exiqon, Dinamarca). Las señales fueron cuantificadas (*Normexp with offset value* 10, ver Ritchie *et al.*<sup>12</sup>) y normalizadas utilizando el algoritmo de regresión global Lowess (Diagrama de dispersión suavizado localmente ponderado). Después de la normalización, se realizó el análisis de datos no supervisado y supervisado. Se realizaron diagramas de análisis de componentes principales (PCA) y de mapa de calor mostrando el agrupamiento jerárquico no supervisado. Los niveles de expresión se compararon mediante la *t* de Student. El umbral de significación se estableció en el logaritmo del cambio (logC) >1,5 veces y un valor de *p*<0,05.

### Validación de los miRNAs expresados diferencialmente entre el grupo OP y el grupo control

La cuantificación de la expresión de miRNAs en las muestras de hueso total se realizó mediante PCR a tiempo real (qPCR) en la plataforma Exiqon (Dinamarca). Se transcribieron 10 ng de RNA a cDNA utilizando el *kit miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis* según las instrucciones de uso. El cDNA se diluyó 100 veces y se cuantificó la expresión de cada uno de los miRNAs mediante qPCR utilizando un panel personalizado de *primers* específicos (*custom pick&mix panel*, Exiqon) y la *mastermix* ExiLent SYBR® Green. Los controles negativos se procesaron en paralelo a las muestras. La amplificación se realizó en un LightCycler® 480 *Real-Time PCR System* (Roche) en placas de 384 pocillos. Las curvas de amplificación fueron analizadas utilizando el software Roche LC para la determinación del valor *Cq* (por método de la segunda derivada). Las diferencias en los niveles de expresión entre los dos grupos se calculó como  $2^{\Delta\Delta Cq}$ . La eficiencia de amplificación se calculó usando algoritmos similares al software LinReg. Sólo se incluyeron en el análisis de datos los ensayos detectados con 3 Ct por debajo del control negativo y Ct <37. La normalización se realizó en base a la media de los ensayos detectados en todas las muestras, ya que está demostrado que es el mejor método para la normalización en estudios de qPCR que involucran numerosos ensayos<sup>13</sup>. Para el presente estudio, esto incluía 11 ensayos. La estabilidad de la media de 11 miRNAs era más alta que cualquier miRNA por sí solo en el conjunto de datos medidos por el software NormFinder<sup>14</sup>.

La fórmula utilizada para calcular los valores *Cq* normalizados (*dCq*) es:

$$\text{Normalizado } Cq = \text{Media } Cq - \text{ensayo } Cq \text{ (muestra)}$$

Finalmente se realizó el control de calidad de los datos, el análisis de datos sin supervisión, y la prueba t de Student y el test de Wilcoxon para la comparación entre grupos (una  $p < 0,05$  se aceptó como significativo).

### Validación en osteoblastos primarios

Para la obtención de cDNA, se retrotranscribió 1  $\mu$ g de RNA de cada muestra utilizando el *kit* miScript II RT (Qiagen).

La expresión de los miRNAs se cuantificó por qPCR, utilizando el *kit* MiScript Syber Green PCR (Qiagen) utilizando la secuencia del miRNA maduro como *primer*. El cDNA se diluyó a una razón de 1/5 y se utilizó 0,5  $\mu$ l de muestra por pocillo, siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. La amplificación se realizó en el sistema "QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR" en placas de 384 pocillos, y se analizaron los datos con el software "expression suite". La expresión se analizó mediante cuantificación relativa RQ utilizando el método de la segunda derivada (*ddCt*). Se utilizó el snRNA U6 como control endógeno para normalizar las muestras. Cada experimento se hizo por triplicado. Para comparar las diferencias estadísticas entre los grupos con osteoporosis y sin osteoporosis se utilizó el test estadístico no paramétrico U de Mann-Whitney, utilizando el programa SPSS versión 12.0 para Windows.

### Análisis bioinformático de los miRNAs validados

Para el estudio de los genes diana de los miRNAs expresados diferencialmente se utilizó los siguientes programas: PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de>), TargetScan Human (<http://www.targetscan.org>), miRDB (<http://mirdb.org>), Miranda (<http://www.microrna.org>), DIANA-TarBase (<http://diana.imis.athena-innovation.gr>) y miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.ntu.edu.tw>). Se utilizó la herramienta DIANA-mirPath basada en la web computacional (11) para identificar las vías moleculares potencialmente alteradas y la intersección de los miRNAs expresados diferencialmente en el hueso fracturado. La información sobre la función proteica se obtuvo de la base de datos UniProtKB (<http://www.uniprot.org>).

## Resultados

### Descripción de las pacientes del estudio

Las características antropométricas, tanto de las pacientes cuyas muestras óseas se utilizaron para el *array* de expresión, como de las pacientes para llevar a cabo las validaciones de los resultados del *array*, se muestran en la tabla 1. No había diferencias en la edad e índice de masa corporal entre los dos grupos de pacientes (prueba de Mann-Whitney).

### Análisis no supervisado del *array* de expresión

Cada muestra de hueso trabecular de cada una de las pacientes del estudio se analizó de forma individual en el *microarray* de miRNAs, y se realizó un análisis no supervisado de los resultados basado en el perfil de expresión con el fin de identi-

car los patrones de variación relacionados con factores biológicos o técnicos. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) incluyendo los 50 miRNAs con mayor variación de la expresión entre muestras para obtener una visión general de la agrupación de las muestras según su varianza (Figura 1). La agrupación de muestras no osteoporóticas (grupo control) mostró un perfil mucho más homogéneo que las muestras osteoporóticas. La muestra O-500, obtenida de una paciente con osteoporosis, se consideró un valor atípico y se excluyó de los análisis. El diagrama de mapa de calor corrobora los resultados del PCA con una clara agrupación de las muestras control y una agrupación más dispersa de las muestras osteoporóticas (Figura 2).

### Comparación de la expresión de microRNAs entre OP y controles en las muestras de hueso total

La media de los niveles de expresión de los miRNAs se comparó entre los grupos con y sin osteoporosis, con exclusión de la muestra O-500. Este análisis identificó un subgrupo de 82 miRNAs (sobre los 1.932 miRNAs analizados) cuyo valor absoluto del logaritmo de la *ratio* era mayor que 1,5 y con un p valor ajustado inferior a 0,05. Siete de estos miRNAs correspondieron a RNAs pequeños nucleolares con motivos C/D (SNORDs), tres a virus y uno era una secuencia miRPlus™ propiedad de Exiqon que no está anotada en la base de datos miRBase, y que fueron excluidos de la fase de validación.

De los restantes (Tabla 2), se escogieron 15 hsa-miRNAs con los mejores valores de significación y para los que Exiqon disponía de sondas para su validación por qPCR: let-7a-5p, miR-126-5p, miR-30c-1-3p, miR-22-3p, miR-25-3p, miR-26b-5p, miR-339-5p, miR-423-3p, miR-320a, miR-483-5p, miR-491-3p, miR-574-5p, miR-631, miR-99a-5p y miR-99b-5p. El diagrama PCA de los resultados de la qPCR individuales mostró una agrupación de las muestras muy similar a los resultados del *array* de expresión, lo que corrobora la diferente fuente biológica de los dos grupos de muestras (Figura 3). Una muestra osteoporótica (O-567) se localizó en el grupo control y fue excluida del análisis. Después del análisis estadístico, cuatro miRNAs; miR-320a, miR-99a-5p, miR-339-5p y miR-22-3p mostraron diferencias significativas entre los grupos con osteoporosis y control (Tabla 3). Sin embargo, los miRNAs miR-99a-5p y miR-339-5p se encontraron sobreexpresados en las muestras OP en los resultados del *array* de expresión, mientras que estaban subexpresados en las muestras OP de la fase de validación. Estos resultados contradictorios sugieren un papel de estos miRNAs no relacionado con la patología osteoporótica y fueron descartados para el estudio *in silico*.

### Comparación de la expresión de microRNAs entre OP y controles en los cultivos de HO

De cada una de las muestras de hueso total se obtuvieron osteoblastos primarios en los cuales se analizó mediante qPCR la expresión de los

Tabla 1. Características de los pacientes

	n	Edad (media ± DE)	IMC (kg/m <sup>2</sup> ) (media ± DE)	DMO (g/cm <sup>2</sup> ) (media ± DE)
<b>Muestras del array</b>				
Fractura osteoporótica (OP)	6	75,2±3,5	24,4±2,8	Fractura
Control	6	72,5±7,4	26,1±3,2	0,794±0,074
<b>Muestras de validación</b>				
Fractura osteoporótica (OP)	6	76,3±7,1	27,9±2,6	Fractura
Control	6	73±6,6	27,7±3	0,882±0,158

DE: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal; DMO: densidad mineral ósea.

miRNAs que previamente se habían validado en las muestras de tejido óseo. Los miRNAs miR-99a-5p y miR-339-5p no se detectaron en las células osteoblásticas, mientras que los miRNAs miR-320a y miR-22-3p sí que se expresaban en los HObs, aunque ninguno de los dos mostró diferencias significativas entre los dos grupos biológicos.

Predicción de genes diana y análisis de las vías de señalización de los miRNAs validados

Un análisis bioinformático exhaustivo mediante seis programas diferentes nos permitió predecir posibles genes diana para los miRNAs validados. El miR-320a puede regular genes involucrados en la proliferación celular (*KRAS*, *PDGFD*), la inhibición de la apoptosis (*MCL1*), transducción de señal (*MAPK1*, *SOS2*, *PTEN*), regulación de la expresión génica (*RUNX2*, *PPARGC1A*, *SP1*, *CAMTA1*, *ESRRG*), receptores de factores de crecimiento, hormonas y citoquinas (*NPR1*, *BMPRI1A*, *AR*, *IGFIR*, *ESR1*), etc. Además, como dianas validadas se encuentran los genes *CTNNB1*, *TFRC* y *POLR3D*. Este miRNA participa en 44 de las vías de la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG) según predicciones del programa DIANA-mirPath, donde la vía del cáncer de próstata es la más significativa (1,105e-12), seguida de la vía del cáncer endometrial (2,261e-10), la vía de señalización de mTOR (7,132e-08), y la vía de señalización de PI3K-Akt (3,914e-07).

El miR-22-3p tiene muchos genes diana validados, algunos de ellos muy importantes en la regulación del metabolismo óseo. Entre ellos encontramos el *ESR1*, el *PRKACA* (necesario para la diferenciación adipogénica y la inhibición de la diferenciación osteoblástica), *HDAC4*, *SP1*, *BMP7* y *CDK6* (antagonista de la señalización BMP2). La principal vía de señalización KEGG de este miRNA es la endocitosis (4,21e-05) aunque también actúa en vías tan importantes como la señalización P53 (p=0,003) y MAPK (p=0,003).

El software *Diana tools* utilizando los genes validados (según la base de datos Tarbase) muestra la vía de la endocitosis como la vía de intersección de los dos miRNAs, ya que comparten el gen diana *TFRC* (receptor de la transferrina). Por otro

lado, si evaluamos la intersección teniendo en cuenta los genes diana predichos según la base de datos MicroT\_CDS, las vías de señalización más significativas son la del cáncer de próstata y la de mTOR donde los dos miRNAs comparten los genes diana *AKT3*, *PTEN* y *IGFR1*.

**Discusión**

El presente estudio se centra en la identificación de miRNAs con expresión alterada en el hueso osteoporótico. Para ello se recogió hueso trabecular fresco de pacientes con o sin fractura osteoporótica, con parámetros antropométricos homogéneos, tales como la edad, índice de masa corporal, y género. Se excluyeron del estudio pacientes con trastornos que afectan la remodelación ósea. Las muestras procedentes de fractura osteoporótica mostraron una clara afectación en el patrón de expresión de miRNAs, demostrando que la regulación epigenética está alterada en el hueso patológico. Estos resultados pueden ayudar a una mejor comprensión de la biología del hueso que ha sufrido una fractura osteoporótica. Además, nos permitirían identificar moléculas susceptibles de ser utilizadas como dianas terapéuticas.

El análisis no supervisado de los resultados del array de expresión de miRNAs a partir de muestras óseas totales mostró que las muestras no osteoporóticas (control) se agrupaban generando un clúster biológico. Por otro lado, el hueso osteoporótico claramente difería de las muestras control, mostrando una distribución más dispersa, sugiriendo que la fisiopatología de la enfermedad osteoporótica y, en última instancia, la fractura del hueso, tienen una etiología heterogénea. El hecho de trabajar con muestras humanas frescas genera mayor variabilidad que trabajar con líneas celulares establecidas o modelos animales, haciendo difícil ver diferencias significativas entre grupos, pero ofrece un escenario más cercano a la situación fisiopatológica. En este sentido, nuestro estudio se ha basado en muestras de huesos humanos obtenidos con una mínima manipulación de laboratorio, lo que nos permite acercarnos a una situación lo más similar a las condiciones *in vivo*.

Figura 1. (A) Gráfico del PCA y (B) Diagrama de la matriz del PCA. Se realizó un análisis de componentes principales con los 50 microRNAs con mayor desviación estándar. La muestra O-500 se eliminó del estudio y no se tuvo en cuenta para posteriores análisis

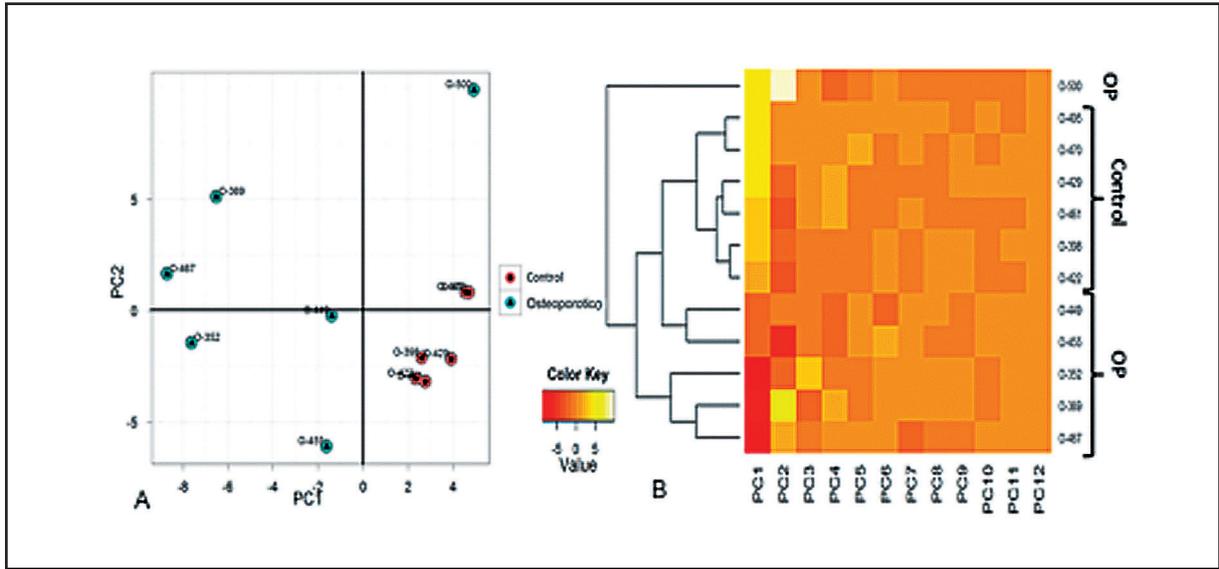


Figura 2. Diagrama de mapa de calor: El diagrama muestra el resultado de la agrupación jerárquica de microRNAs y muestras. Cada fila representa un microRNA y cada columna, una muestra. La escala de color ilustra el nivel relativo de expresión de los microRNAs: rojo, por debajo del canal de referencia; verde, superior a la de referencia

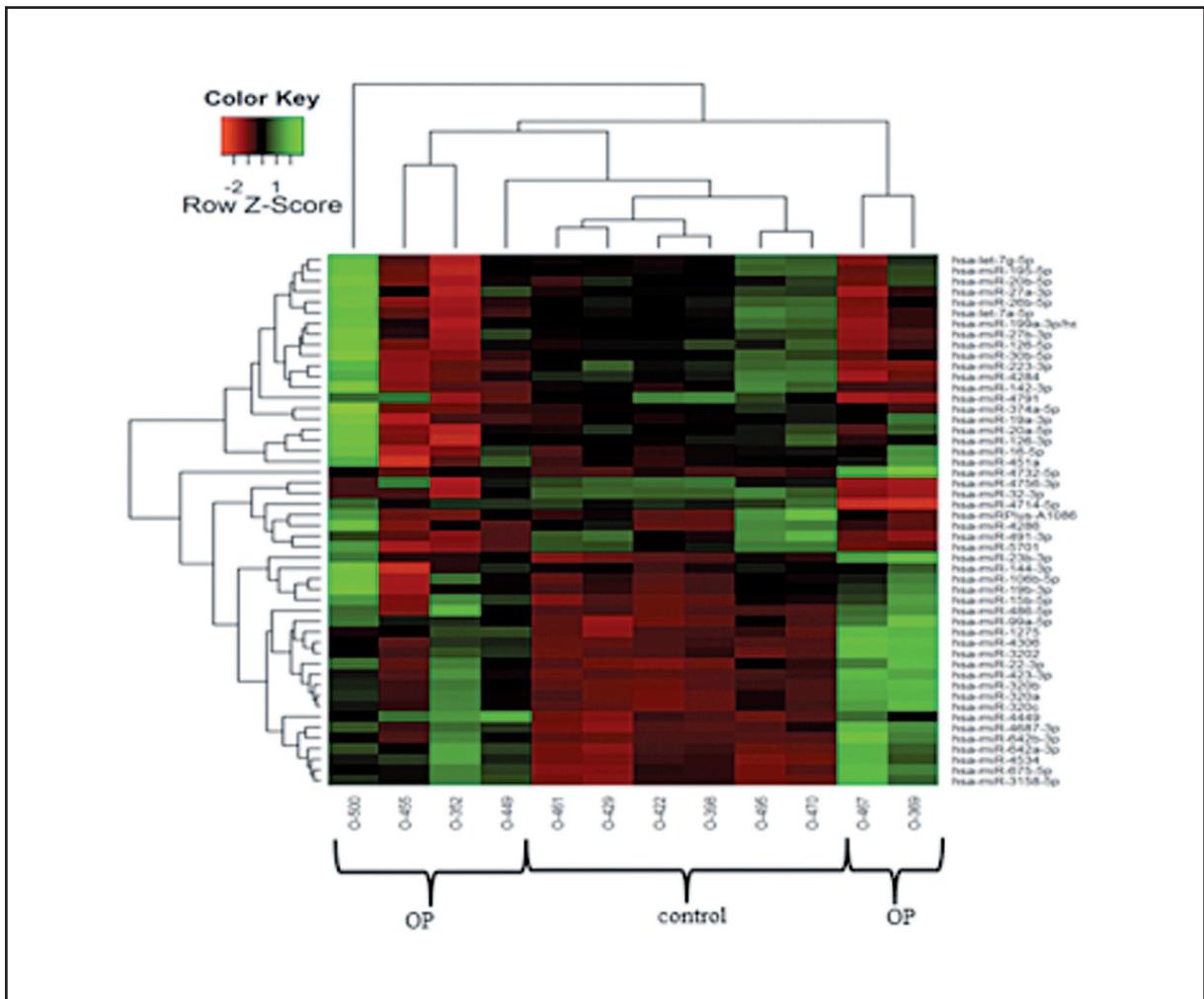


Tabla 2. MicroRNAs significativamente alterados en las muestras de hueso osteoporóticas según resultados del *microarray*

miRNA	logC	P val ajust	Control		OP	
			media	DE	media	DE
<b>hsa-let-7a-5p</b>	<b>-1,819</b>	<b>6,99e-03</b>	<b>2,94</b>	<b>0,78</b>	<b>1,12</b>	<b>0,64</b>
hsa-miR-1185-2-3p	1,685	2,37e-02	-1,56	0,15	0,13	1,27
<b>hsa-miR-126-5p</b>	<b>-1,540</b>	<b>2,11e-02</b>	<b>2,42</b>	<b>0,55</b>	<b>0,88</b>	<b>0,95</b>
hsa-miR-1275	2,259	4,90e-03	-1,64	0,41	0,62	1,16
hsa-miR-1307-5p	1,552	4,81e-02	-1,40	0,13	0,15	1,37
hsa-miR-142-3p	-1,850	2,77e-02	2,14	1,22	0,29	0,52
hsa-miR-1470	1,690	5,85e-04	-0,58	0,15	1,10	0,60
hsa-miR-1915-3p	1,583	1,04e-03	-0,82	0,44	0,76	0,44
hsa-miR-204-3p	1,640	9,09e-03	-1,49	0,44	0,15	0,90
hsa-miR-223-3p	-2,777	3,06e-04	2,91	0,67	0,13	0,53
<b>hsa-miR-22-3p</b>	<b>2,269</b>	<b>3,96e-02</b>	<b>-1,73</b>	<b>0,63</b>	<b>0,54</b>	<b>1,81</b>
<b>hsa-miR-25-3p</b>	<b>1,557</b>	<b>1,73e-02</b>	<b>-0,90</b>	<b>0,24</b>	<b>0,65</b>	<b>1,06</b>
<b>hsa-miR-26b-5p</b>	<b>-2,001</b>	<b>6,56e-03</b>	<b>3,26</b>	<b>0,62</b>	<b>1,26</b>	<b>0,95</b>
<b>hsa-miR-30c-1-3p</b>	<b>2,151</b>	<b>3,06e-04</b>	<b>-1,65</b>	<b>0,38</b>	<b>0,51</b>	<b>0,57</b>
hsa-miR-3149	-1,871	2,53e-04	0,59	0,19	-1,29	0,54
hsa-miR-3158-5p	2,513	1,00e-03	-2,00	0,49	0,51	0,91
hsa-miR-3162-3p	1,984	1,64e-03	-1,21	0,22	0,78	0,87
hsa-miR-3178	2,004	7,96e-03	-1,97	0,65	0,04	0,98
hsa-miR-3182	-1,855	3,42e-03	1,73	0,42	-0,12	0,83
hsa-miR-3195	1,795	3,68e-04	-1,50	0,18	0,30	0,57
hsa-miR-3202	2,255	1,42e-02	-1,47	0,24	0,78	1,52
<b>hsa-miR-320a</b>	<b>1,895</b>	<b>2,07e-02</b>	<b>-1,39</b>	<b>0,33</b>	<b>0,51</b>	<b>1,35</b>
hsa-miR-320b	2,085	1,57e-02	-1,61	0,25	0,48	1,42
hsa-miR-320c	1,985	1,98e-02	-1,44	0,34	0,55	1,39
hsa-miR-320d	1,757	2,69e-02	-1,11	0,34	0,65	1,32
hsa-miR-320e	1,687	2,34e-02	-1,21	0,17	0,48	1,26
hsa-miR-32-3p	-2,213	9,00e-04	0,65	0,21	-1,56	0,87
<b>hsa-miR-339-5p</b>	<b>1,687</b>	<b>1,86e-02</b>	<b>-1,30</b>	<b>0,29</b>	<b>0,39</b>	<b>1,16</b>
hsa-miR-3591-5p	-1,511	1,42e-05	0,65	0,11	-0,86	0,20
hsa-miR-3607-3p	-1,853	4,67e-04	0,63	0,31	-1,22	0,55
hsa-miR-3607-5p	-1,508	3,06e-04	1,25	0,33	-0,26	0,30
hsa-miR-3609	-1,542	1,43e-04	1,36	0,34	-0,18	0,19
hsa-miR-361-3p	1,565	2,49e-03	-0,56	0,23	1,00	0,71
hsa-miR-3621	1,806	8,42e-04	-1,96	0,43	-0,16	0,54
hsa-miR-3654	-1,939	2,37e-05	0,39	0,12	-1,55	0,37
<b>hsa-miR-423-3p</b>	<b>2,081</b>	<b>2,90e-02</b>	<b>-1,64</b>	<b>0,21</b>	<b>0,44</b>	<b>1,64</b>

Tabla 2. MicroRNAs significativamente alterados en las muestras de hueso osteoporóticas según resultados del *microarray* (cont.)

miRNA	logC	P val ajust	Control		OP	
			media	DE	media	DE
hsa-miR-4258	2,034	8,19e-04	-0,56	0,29	1,47	0,74
hsa-miR-4284	-2,957	1,04e-03	2,98	0,81	0,02	0,88
hsa-miR-4306	2,273	2,74e-02	-1,42	0,20	0,85	1,78
hsa-miR-4317	2,177	5,45e-04	-0,81	0,18	1,36	0,78
hsa-miR-4449	2,358	1,32e-03	-2,12	0,33	0,24	0,97
hsa-miR-4455	-1,674	1,51e-03	0,47	0,17	-1,21	0,72
hsa-miR-4458	-1,541	6,59e-04	0,36	0,18	-1,18	0,54
hsa-miR-4463	1,610	4,13e-03	-1,26	0,16	0,35	0,83
hsa-miR-4484	2,002	6,17e-03	-2,00	0,52	0,00	1,01
hsa-miR-4497	1,741	1,57e-02	-1,77	0,48	-0,03	1,08
hsa-miR-4516	1,632	6,14e-03	-0,97	0,36	0,66	0,85
hsa-miR-4532	1,836	1,78e-02	-1,81	0,48	0,03	1,19
hsa-miR-4534	2,278	1,00e-03	-1,80	0,38	0,48	0,86
hsa-miR-4540	-1,547	1,01e-02	0,58	0,14	-0,97	0,97
hsa-miR-4640-3p	1,668	3,06e-04	-1,05	0,21	0,62	0,49
hsa-miR-4687-3p	2,421	7,48e-03	-2,05	0,53	0,38	1,33
hsa-miR-4732-3p	-1,772	5,61e-03	0,36	0,59	-1,41	0,75
hsa-miR-4741	1,666	4,41e-03	-1,44	0,36	0,23	0,79
hsa-miR-4792	1,624	2,11e-02	-1,59	0,31	0,04	1,15
<b>hsa-miR-483-5p</b>	<b>1,846</b>	<b>8,76e-03</b>	<b>-1,37</b>	<b>0,39</b>	<b>0,47</b>	<b>1,06</b>
<b>hsa-miR-491-3p</b>	<b>-2,889</b>	<b>5,68e-03</b>	<b>0,79</b>	<b>1,43</b>	<b>-2,09</b>	<b>0,45</b>
hsa-miR-519e-5p	1,674	6,33e-03	-1,53	0,23	0,14	0,93
hsa-miR-542-5p	2,211	8,30e-04	-1,84	0,42	0,37	0,75
hsa-miR-5681b	-1,513	1,39e-02	0,33	0,54	-1,19	0,82
hsa-miR-5684	-1,710	2,07e-02	0,79	0,18	-0,92	1,24
hsa-miR-5701	-3,127	3,06e-04	0,52	0,76	-2,61	0,63
<b>hsa-miR-574-5p</b>	<b>-1,552</b>	<b>1,31e-04</b>	<b>0,52</b>	<b>0,16</b>	<b>-1,03</b>	<b>0,37</b>
<b>hsa-miR-631</b>	<b>1,625</b>	<b>8,98e-04</b>	<b>-1,74</b>	<b>0,19</b>	<b>-0,11</b>	<b>0,61</b>
hsa-miR-642a-3p	2,530	2,30e-03	-2,13	0,40	0,40	1,15
hsa-miR-642b-3p	2,087	1,67e-02	-1,97	0,15	0,11	1,46
hsa-miR-664b-5p	-1,702	9,09e-03	0,75	0,25	-0,95	1,03
hsa-miR-675-5p	2,323	1,04e-03	-1,85	0,46	0,48	0,84
hsa-miR-711	1,826	2,10e-03	-1,72	0,38	0,10	0,76
<b>hsa-miR-99a-5p</b>	<b>1,964</b>	<b>8,70e-03</b>	<b>-1,24</b>	<b>0,50</b>	<b>0,73</b>	<b>1,09</b>
<b>hsa-miR-99b-5p</b>	<b>1,706</b>	<b>8,81e-03</b>	<b>-1,06</b>	<b>0,28</b>	<b>0,65</b>	<b>1,01</b>

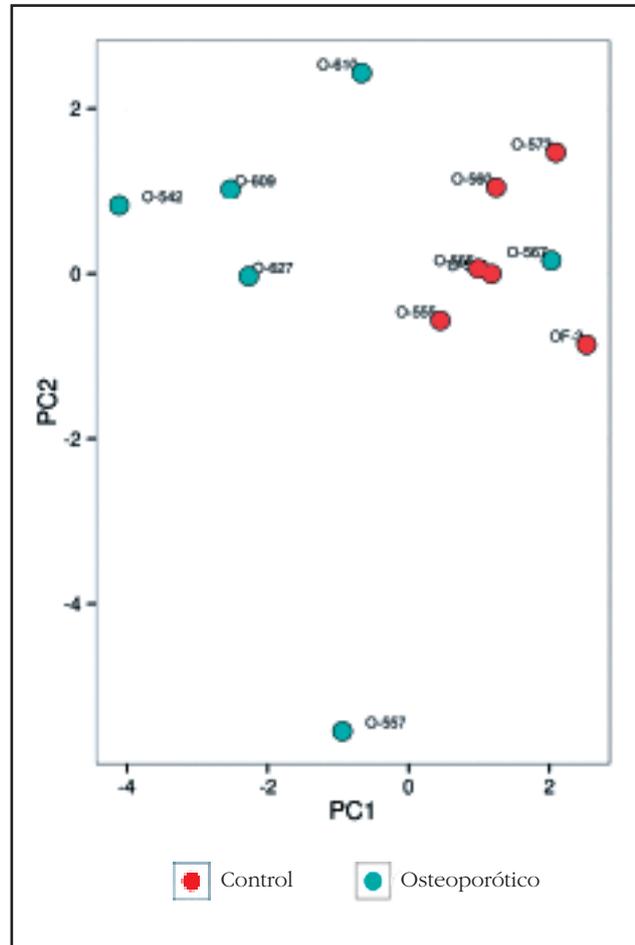
En negrita se marcan los miRNAs que se escogieron para su validación por qPCR.

En el análisis de la expresión diferencial entre las muestras osteoporóticas y control, se encontraron 82 miRNAs que alcanzaron niveles de significación con un valor absoluto del logaritmo de la *ratio* mayor que 1,5 veces. De estos, 15 se testaron por qPCR en un nuevo conjunto de muestras, y los miRNAs miR-99a-5p, miR-339-5p, miR-320a y miR-22-3p fueron finalmente validados. Estos miRNAs se evaluaron en osteoblastos primarios (HOb) en cultivo, comparando células procedentes de muestras osteoporóticas *versus* células procedentes de muestras no osteoporóticas. Los miRNAs miR-99a-5p y miR-339-5p no se detectaron en los HOb, sugiriendo otro tipo celular como la fuente de estos dos miRNAs. Además, estos miRNAs se encontraron sobreexpresados en las muestras osteoporóticas del *array* mientras que estaban subexpresados en las muestras osteoporóticas de la fase de validación, descartando una relación de estos miRNAs con la osteoporosis. Los miRNAs, miR-320a y miR-22-3p sí se expresaban en los HOb, aunque no se observaron diferencias en sus niveles de expresión entre grupos de muestras. Esto podría ser debido a las condiciones artificiales de los cultivos celulares *in vitro* que afectarían la expresión de los microRNAs, sobre todo aquéllos implicados en la regulación de funciones celulares tan importantes como la proliferación y diferenciación.

Esto nos demuestra una vez más que, aunque el uso de cultivos de células, tanto de líneas establecidas como cultivos primarios, pueden ayudar a entender ciertos procesos celulares, los resultados obtenidos pueden diferir de las condiciones reales que se darían en el tejido original dentro del ambiente fisiológico.

Además, el uso del tejido fresco no manipulado para obtener datos más próximos a las condiciones fisiológicas también puede dar resultados dispares tal y como se demuestra en los estudios realizados por Seeliger *et al.*<sup>7</sup> y Garmilla-Ezquerria *et al.*<sup>8</sup>. Estos estudios también realizaron un *microarray* de expresión a partir de tejido óseo total comparando muestras osteoporóticas *versus* no osteoporóticas de manera muy similar al nuestro, pero con hallazgos diferentes. Cabe destacar que estos dos estudios anteriores tienen varias características que pueden explicar estas discrepancias. Entre ellas se encuentran los diversos *arrays* comerciales utilizados y el tamaño muestral. Además, estos estudios comparaban grupos biológicos con características antropométricas o clínicas no homogéneas, como la edad, género, índice de masa corporal y trastornos endocrinos (por ejemplo: diabetes *mellitus*), que son esenciales para la regulación del metabolismo óseo. Por lo tanto, los miRNAs identificados en estos estudios podrían estar también relacionados con otros parámetros externos, mientras que, en nuestro estudio, la ausencia de enfermedades concomitantes, así como

Figura 3. Análisis de componentes principales (PCA) de todas las muestras de la fase de validación (OP: n=6; control: n=6). Se utilizaron los valores normalizados (dCq) para el análisis. Las muestras se agrupan en función de su grupo biológico; sin embargo, la muestra O-567 parece ser un caso atípico



las características similares entre los dos grupos, nos permite acercarnos de una manera más fiable a lo que sucede en la fractura osteoporótica.

Por esto, un esfuerzo importante realizado en nuestro trabajo es el control extremadamente cuidadoso de las potenciales características de confusión entre casos y controles en cuanto a edad, sexo, índice de masa corporal y las enfermedades metabólicas relacionadas con el envejecimiento. Estos estrictos criterios de inclusión restringen mucho nuestro tamaño de muestra en comparación con trabajos similares, donde las muestras son de pacientes con características más heterogéneas. Otra limitación de nuestro estudio es que las muestras no osteoporóticas utilizadas como controles procedían de pacientes con artrosis y, por lo tanto, no se puede descartar la presencia de otras anomalías óseas. Debido a razones éticas obvias no se permite la recogida de hueso a partir de individuos sanos. Sin embargo, en un intento de minimizar este potencial inconveniente, la muestra se obtuvo de hueso ubicado lo más distante posible de la lesión artrósica.

Tabla 3. MicroRNAs alterados en las muestras con fractura osteoporótica

miRNA	dCq OP	SD OP	dCq control	SD control	2 <sup>-ΔΔCq</sup>	Valor p	
						Prueba T	Wilcoxon
miR-99a-5p	-1,25	0,53	-0,08	0,21	-2,24	0,01	0,00
miR-339-5p	-1,52	0,23	-1,06	0,22	-1,38	0,01	0,01
miR-320a	2,08	0,98	0,67	0,44	2,65	0,03	0,02
miR-22-3p	1,46	0,37	0,94	0,34	1,44	0,04	0,05

El miR-320a se encuentra conservado en humanos, ratón, rata y vaca. La secuencia de este miRNA está localizada dentro del promotor basal del gen *POLR3D*, que a su vez es uno de sus genes diana, silenciando así su expresión<sup>15</sup>. Además, se ha observado que el miR-320a está implicado en la regulación de la función osteoblástica, ya que tiene como genes diana el *CTNFB1* (que codifica para la B-catenina)<sup>16</sup> y el *RUNX2*<sup>17</sup>.

Por otro lado, el miR-22-3p es un miRNA sérico que se ha asociado previamente a la fractura osteoporótica<sup>9</sup>, así como ha sido implicado en la diferenciación osteogénica<sup>18</sup>.

Los resultados de nuestro estudio, junto con los otros estudios, ofrecen un avance importante para la comprensión de la biología del hueso y de la implicación de los miRNA en la patología de la osteoporosis.

## Conclusiones

Hemos identificado dos miRNAs que se sobreexpresan en muestras de hueso trabecular de pacientes con osteoporosis. La expresión de ambos miRNAs se ha detectado en osteoblastos primarios, aunque no se ha observado esta sobreexpresión en los cultivos procedentes de muestras osteoporóticas. No se conoce si la alteración de estos miRNAs es causa o efecto de la enfermedad y su relación con la fractura osteoporótica. No obstante, estos miRNAs podrían ofrecer un prometedor potencial para el diseño de nuevos fármacos para la osteoporosis.

**Financiación:** Este trabajo ha sido financiado por la Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF; RD12/0043/0022), y la ayuda FIS PI13/00116 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación) y los fondos FEDER.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses en relación a este trabajo.

## Bibliografía

- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007;302:1-12.
- Taipaleenmaki H, Bjerre Hokland L, Chen L, Kauppinen S, Kassem M. Mechanisms in endocrinology: micro-RNAs targets for enhancing osteoblast differentiation and bone formation. *Eur J Endocrinol* 2012;166:359-71.
- Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:212-27.
- van Wijnen AJ, van de Peppel J, van Leeuwen JP, Lian JB, Stein GS, Westendorf JJ, et al. MicroRNA Functions in Osteogenesis and Dysfunctions in Osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2013;11:72-82.
- Li H, Xie H, Liu W, Hu R, Huang B, Tan YF, et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest* 2009;119:3666-77.
- Lei SF, Pappasian CJ, Deng HW. Polymorphisms in predicted miRNA binding sites and osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2011;26:72-8.
- Seeliger C, Karpinski K, Haug A, Vester H, Schmitt A, Bauer J, et al. Five Freely Circulating miRNAs and Bone Tissue miRNAs are Associated with Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res* 2014;29:1718-28.
- Garmilla-Ezquerro P, Sanudo C, Delgado-Calle J, Perez-Nunez MI, Sumillera M, Riancho JA. Analysis of the Bone MicroRNome in Osteoporotic Fractures. *Calcif Tissue Int* 2015;96:30-7.
- Weilner S, Skalicky S, Salzer B, Keider V, Wagner M, Hildner F, et al. Differentially circulating miRNAs after recent osteoporotic fractures can influence osteogenic differentiation. *Bone* 2015;79:43-51.
- Guo L, Zhao RC, Wu Y. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2011;39:608-16.
- Kapinas K, Delany AM. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res Ther* 2011;13:220.
- Ritchie ME, Silver J, Oshlack A, Holmes M, Diyagama D, Holloway A, et al. A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 2007;23:2700-7.
- Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 2009;10:R64.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64:5245-50.
- Kim DH, Saetrom P, Snove O Jr., Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16230-5.
- Sun JY, Huang Y, Li JP, Zhang X, Wang L, Meng YL, et al. MicroRNA-320a suppresses human colon cancer cell proliferation by directly targeting beta-catenin. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;420:787-92.
- Yu F, Cui Y, Zhou X, Zhang X, Han J. Osteogenic differentiation of human ligament fibroblasts induced by conditioned medium of osteoclast-like cells. *Biosci Trends* 2011;5:46-51.
- Trompeter HI, Dreesen J, Hermann E, Iwaniuk KM, Hafner M, Renwick N, et al. MicroRNAs miR-26a, miR-26b, and miR-29b accelerate osteogenic differentiation of unrestricted somatic stem cells from human cord blood. *BMC Genomics* 2013;14:111.

**Blanch J<sup>1</sup>, Casado E<sup>2</sup>, González J<sup>3</sup>, Valdés C<sup>4</sup>, Ruiz-Baena J<sup>5</sup>, Palomino R<sup>5</sup>, Nogués X<sup>6</sup>**

1 Servicio de Reumatología - Parque de Salud Mar - Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM) - Barcelona (España)

2 Servicio de Reumatología - Hospital Universitario Parque Taulí - Sabadell - Barcelona (España)

3 Unidad de Gestión Clínica Reumatología - Complejo Hospitalario Universitario de Granada - Granada (España)

4 Medicina Familiar y Comunitaria - Centro de Salud Fuencarral - Dirección Asistencial Norte - Servicio Madrileño de Salud (SERMAS) - Madrid (España)

5 GOC Networking - Barcelona (España)

6 Departamento de Medicina Interna - Parque de Salud Mar - Universidad Autónoma de Barcelona - Barcelona (España). Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM) - Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) - Instituto de Salud Carlos III FEDER - Barcelona (España)

## Percepción de los profesionales médicos respecto la adherencia terapéutica de los pacientes con osteoporosis

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000100003>

Correspondencia: Josep Blanch - Hospital del Mar - Paseo Marítimo, 25-29 - 08003 Barcelona (España)

Correo electrónico: 20143@parcdesalutmar.cat

Fecha de recepción: 08/10/2015

Fecha de aceptación: 27/11/2015

### Resumen

**Introducción:** La adherencia al tratamiento oral del paciente con osteoporosis es baja, con un alto porcentaje de abandonos durante el primer año. La consecuencia más notable es la falta de respuesta terapéutica. **Objetivo:** Conocer la percepción de los facultativos involucrados en el abordaje del paciente osteoporótico en relación a la adherencia terapéutica de estos pacientes.

**Material y métodos:** Estudio descriptivo transversal realizado mediante una encuesta de opinión dirigida a médicos de Atención Primaria y Atención Especializada involucrados en el tratamiento de la osteoporosis. Los participantes fueron seleccionados mediante muestreo intencionado.

**Resultados:** El cuestionario fue contestado por 235 especialistas de Reumatología (54,5%), Traumatología (10,6%) y Atención Primaria (18,7%). En opinión del 43,8% de los encuestados, más de un 25% de los pacientes olvida alguna vez tomar el tratamiento. Según el 34,9%, más de 75% de los pacientes están concienciados con el tratamiento. Los efectos secundarios y la complejidad de la administración son las razones mayoritarias que propician un cambio de medicación, con una importancia media de  $7,94 \pm 2,06$  y  $6 \pm 2,01$  puntos respectivamente en una escala 0-10.

**Conclusiones:** Los facultativos percibieron baja adherencia terapéutica asociada fundamentalmente a los efectos secundarios, a la polimedición y a la falta de comunicación entre profesionales. Espaciar la dosificación y el uso de formas galénicas solubles podrían ser opciones para facilitar la adherencia del paciente al tratamiento con bisfosfonatos orales. Mejorar la educación sobre la importancia de la enfermedad o aumentar el seguimiento del paciente serían algunos de los aspectos que podrían favorecer la adherencia terapéutica.

**Palabras clave:** osteoporosis, encuesta, bisfosfonatos, adherencia terapéutica, opinión.

# Medical professionals' perceptions regarding therapeutic adherence in patients with osteoporosis

## Summary

**Introduction:** Adherence to oral treatment of patients with osteoporosis is low, with a high dropout rate in the first year. The most noteworthy result is the lack of therapeutic response.

**Objective:** To ascertain the perception of physicians working with osteoporotic patients regarding adherence of these patients.

**Methods:** Cross-sectional study conducted by opinion survey aimed at primary care physicians and specialists involved in osteoporosis treatment. Participants were selected by purposive sampling.

**Results:** The questionnaire was answered by 235 specialists encompassing rheumatology (54.5%), orthopedics (10.6%) and primary care (18.7%). In 43.8% of participants, more than 25% of patients sometimes forget to take their treatment. According to 34.9%, more than 75% of patients are aware of treatment. Side effects and management complexity are the majority reasons that lead to a change in medication, mean value of  $7.94 \pm 2.06$   $6 \pm 2.01$  points respectively on a 0-10 scale.

**Conclusions:** Overall, medical specialists attributed low adherence to side effects, polypharmacy and lack of communication between professionals. Dosage and space use of soluble dosage forms may be options to facilitate patient adherence to treatment with oral bisphosphonates. Improved education concerning the importance of the disease or increased patient monitoring could foster adherence.

**Key words:** *osteoporosis, surveys, bisphosphonates, therapeutic adherence, opinion.*

## Introducción

La osteoporosis es una enfermedad sistémica del esqueleto caracterizada por una baja masa ósea y alteraciones en la microarquitectura del tejido óseo que ocasionan un incremento de la fragilidad y, en consecuencia, un aumento de la susceptibilidad a las fracturas<sup>1</sup>. Según los criterios diagnósticos de la OMS, aproximadamente el 6% de los hombres y el 21% de las mujeres de entre 50-84 años padecen osteoporosis<sup>2</sup>. A nivel europeo, unos 27,6 millones de hombres y mujeres padecían osteoporosis en el año 2010, de los cuales el 9% eran españoles. La osteoporosis es un importante problema de salud pública debido a la alta predisposición que genera a padecer fracturas óseas<sup>3,4</sup>. La osteoporosis causa más de 8,9 millones de fracturas anuales<sup>5</sup>, con un alto coste socio-sanitario<sup>3,6</sup> y un deterioro importante de la calidad de vida del paciente<sup>2</sup>.

El objetivo principal en el tratamiento de la osteoporosis es evitar la aparición de fracturas, tratar de mejorar la calidad de vida del paciente, y aliviar el dolor cuando aparezca. La mayor parte de los fármacos disponibles hoy en día obtienen reducciones del riesgo de fractura de un 50-70% para las fracturas vertebrales y de un 15-25% para el resto de fracturas no vertebrales<sup>2</sup>; siempre que el paciente tome la medicación de manera continuada durante el período de tiempo en que la mayoría de los estudios de referencia han demostrado su eficacia, y que oscila entre 3 y 5 años. Los bisfosfonatos son la alternativa terapéutica más utilizada en el abordaje de la osteoporosis, y son considerados la primera elección en nuestro medio<sup>7,8</sup>.

El término adherencia engloba los conceptos de cumplimiento y persistencia. Cumplimiento implica cuándo y cómo se toma la medicación prescrita, mientras que persistencia se refiere a durante cuánto tiempo se toma dicha medicación. Por otro lado, la tolerabilidad a un fármaco se refiere a la aceptación por parte del paciente de la medicación, basada fundamentalmente en la percepción y repercusión de los efectos no deseados del fármaco<sup>9</sup>.

La osteoporosis, al tratarse de una enfermedad silenciosa, sin síntomas, incluso con fracturas vertebrales asintomáticas, comporta que los pacientes tiendan a pensar que el tratamiento farmacológico no es necesario. Por otro lado, la falta de adherencia y el mal cumplimiento vienen determinados por otros factores, como los efectos secundarios de los fármacos, la edad avanzada de los pacientes, la polimedición o, incluso, el cansancio del paciente a tomar una medicación de forma crónica<sup>10</sup>.

La adherencia al tratamiento del paciente con osteoporosis es baja, con un alto porcentaje de abandonos durante el primer año<sup>11-15</sup>. La consecuencia más notable es la falta de respuesta terapéutica y el consiguiente aumento de fracturas; así pues, una adecuada adherencia al tratamiento no sólo es beneficiosa para la salud de los pacientes, sino que también lo resulta en términos de coste-efectividad<sup>16-20</sup>.

El objetivo de este estudio es conocer la percepción de los profesionales médicos involucrados en el tratamiento de la osteoporosis acerca de la adherencia de los pacientes al tratamiento en general, y a los bisfosfonatos en particular, así como analizar las posibles causas y soluciones.

## Material y métodos

Estudio descriptivo transversal realizado mediante una encuesta dirigida a médicos de Atención Primaria (AP) y Atención Especializada involucrados en el tratamiento de la osteoporosis. La encuesta constaba de 13 preguntas sobre la percepción de los profesionales sanitarios en relación a la adherencia terapéutica del paciente osteoporótico (Anexo 1), y fue cumplimentada a través de una página web. Los participantes fueron seleccionados mediante muestreo intencionado e invitados por la Sociedad Española de Investigación Ósea y Metabolismo Mineral (SEIOMM) a la cual estaban asociados. Para la estimación del número de especialistas que debían participar en la encuesta, se tomó como referencia una población a nivel nacional de unos 20.000 médicos de AP y 5.000 médicos especialistas. Según el cálculo del tamaño muestral, realizado tomando el escenario de proporción de participación más desfavorable, para una precisión esperada del 10% y para un nivel de confianza del 95%, se precisó que debían participar un mínimo de 200 facultativos.

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 23.0. (SPSS Inc. Chicago, Illinois, EE.UU.). Para la descripción de las variables categóricas se utilizó el número y porcentaje de respuesta. Para la descripción de las variables continuas se utilizó la media, la desviación estándar, la mediana, el mínimo y máximo.

## Resultados

El cuestionario fue contestado por 235 facultativos (63,4% hombres) con una edad media de  $48,77 \pm 9,13$  años. Las especialidades más representadas fueron Reumatología (54,5%), Traumatología (10,6%) y AP (18,7%). Los consultados pertenecían a 15 Comunidades Autónomas diferentes, siendo Andalucía (17,4%), Comunidad Valenciana (14,5%), Cataluña (14,5%) y Madrid (11,9%) las que contaron con un mayor número de participantes. El 79,6% refirió visitar mensualmente hasta 100 pacientes por osteoporosis; del resto, un 64,3% visitaba de 25 a 100 y un 15,4% menos de 25 pacientes.

En relación a la percepción de los facultativos consultados respecto a la adherencia de los pacientes al tratamiento oral para la osteoporosis, el 43,8% contestó que más de un 25% de los pacientes olvida alguna vez tomar el tratamiento, aunque el 80,4% refirió que casi la mitad de los pacientes no lo toma en las horas recomendadas. El 34,9% contestó que más del 75% de los pacientes están concienciados con la necesidad de tomar el tratamiento; sin embargo, más de la mitad de los pacientes dejan de tomarlo si les sienta mal, según el 57,5% de los médicos consultados (Figura 1).

Entre los motivos que ocasionan la falta de adherencia terapéutica, el 83,0% de los consultados opinó que la falta de coordinación entre niveles asistenciales es un factor importante, debido principalmente a la falta de comunicación (41,3%),

a los impedimentos de la administración (15,3%), a la falta de formación (14,0%) y a la aplicación de protocolos diferentes (12,3%).

En relación a las causas que motivan un cambio de tratamiento, los facultativos consultados refirieron que los efectos secundarios y la complejidad de la administración son las razones mayoritarias, con una importancia media de  $7,94 \pm 2,06$  y  $6 \pm 2,01$  puntos, respectivamente (escala ascendente de 1: no motiva cambios, a 10: motiva grandes cambios) (Figura 2). Por otro lado, indicaron que algo más de la mitad de los pacientes (57%) participa habitualmente en la elección del tratamiento.

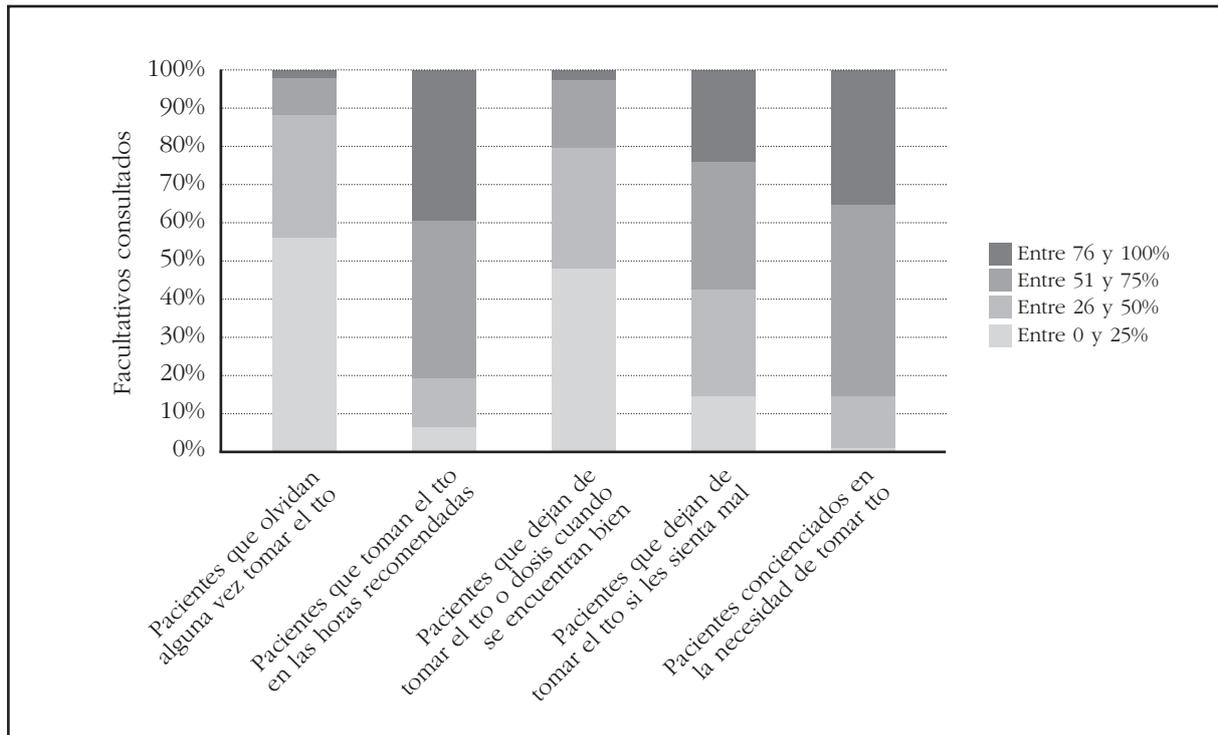
En relación a los métodos más utilizados para evaluar el cumplimiento terapéutico, el 77,9% de los consultados refirió consultar directamente al paciente, mientras que el 10,2% contestó que la técnica más habitual es el recuento entre el desajuste del número de envases dispensados o solicitados por el paciente y los prescritos. Otros métodos, como los marcadores bioquímicos de remodelado (4,7%), el test de Test de Morisky-Green (3,0%), el juicio clínico (2,6%) o el test de Haynes-Sackett (0,9%), resultaron menos frecuentes. Únicamente el 0,9% de los consultados contestó que no suele preguntar por el cumplimiento terapéutico.

Respecto al tratamiento con bisfosfonatos, un 51-75% de los pacientes están tratados y cumplen con dicho tratamiento en opinión del 63% y del 60,9% de los consultados, respectivamente. Por otro lado, entre los pacientes que abandonan el tratamiento, el 40% lo hace antes de los seis meses, el 29,4% entre los seis y doce meses, y el 30,6% lo hace después del primer año.

Según los facultativos consultados, las principales causas de incumplimiento terapéutico a bisfosfonatos son: la polimedicación ( $7,37 \pm 1,9$  puntos), los efectos secundarios ( $7,34 \pm 1,93$  puntos) y la escasa sintomatología de la enfermedad ( $6,58 \pm 2,24$  puntos) (escala ascendente de 1: muy poco frecuente, a 10: muy frecuente) (Figura 3). Por otro lado, la restricción de comer y beber antes y después de la toma del fármaco es la instrucción de administración más difícil de seguir por parte de los pacientes ( $5,26 \pm 2,04$  puntos) (escala ascendente de 1: muy fácil de cumplir, a 10: muy difícil de cumplir) (Figura 4).

En cuanto al impacto que tienen distintas actuaciones para facilitar el cumplimiento del tratamiento a bisfosfonatos, las más valoradas (escala ascendente de 1: ningún impacto, a 10: impacto máximo) fueron: la reducción del número de dosis ( $7,57 \pm 1,88$  puntos), la entrega al paciente de material formativo sobre la enfermedad y los tratamientos ( $7,25 \pm 1,89$  puntos) y el control del cumplimiento terapéutico a las pocas semanas de su inicio por parte de enfermería ( $7,12 \pm 2,21$  puntos) (Figura 5). Finalmente, el 88,9% de los facultativos consultados consideró que la adherencia terapéutica a los tratamientos orales con bisfosfonatos mejoraría bastante o mucho con una forma galénica soluble.

Figura 1. Actitud de los pacientes respecto al tratamiento oral para la osteoporosis



## Discusión

Sobre una atención mensual de hasta 100 pacientes osteoporóticos (79,6% de los consultados), y teniendo en cuenta que el 54,5% de los consultados eran especialistas en Reumatología, los resultados de este estudio muestran que en general, los facultativos perciben una baja adherencia del paciente al tratamiento oral para la osteoporosis. Las cifras sobre cumplimiento y adherencia terapéutica de los pacientes osteoporóticos varían entre las diferentes publicaciones debido a los métodos de cálculo utilizados en cada una de ellas; sin embargo, todas ellas coinciden en que son mejorables<sup>21-23</sup>.

La percepción de una parte de los encuestados (43,8%) es que la adherencia al tratamiento es baja, pues consideran que más del 25% de sus pacientes olvidan tomar su medicación. Estos datos coinciden con un estudio reciente realizado en centros de AP de las Islas Canarias (España), en el que un 24,1% de las pacientes con fracturas no tomaban la medicación<sup>24</sup>. Otro estudio retrospectivo de características similares realizado en España demostró que un 29,5% de las pacientes no eran buenas cumplidoras de los tratamientos antirresortivos<sup>25</sup>.

La eficacia de los fármacos anti-osteoporóticos implica prolongados y continuos periodos de medicación, lo que hace que sea muy habitual el abandono del fármaco por parte del enfermo, reduciendo así su eficacia<sup>26</sup>. Es evidente que una apropiada adherencia al tratamiento es beneficiosa para la salud de los pacientes<sup>13,16,17,20</sup>.

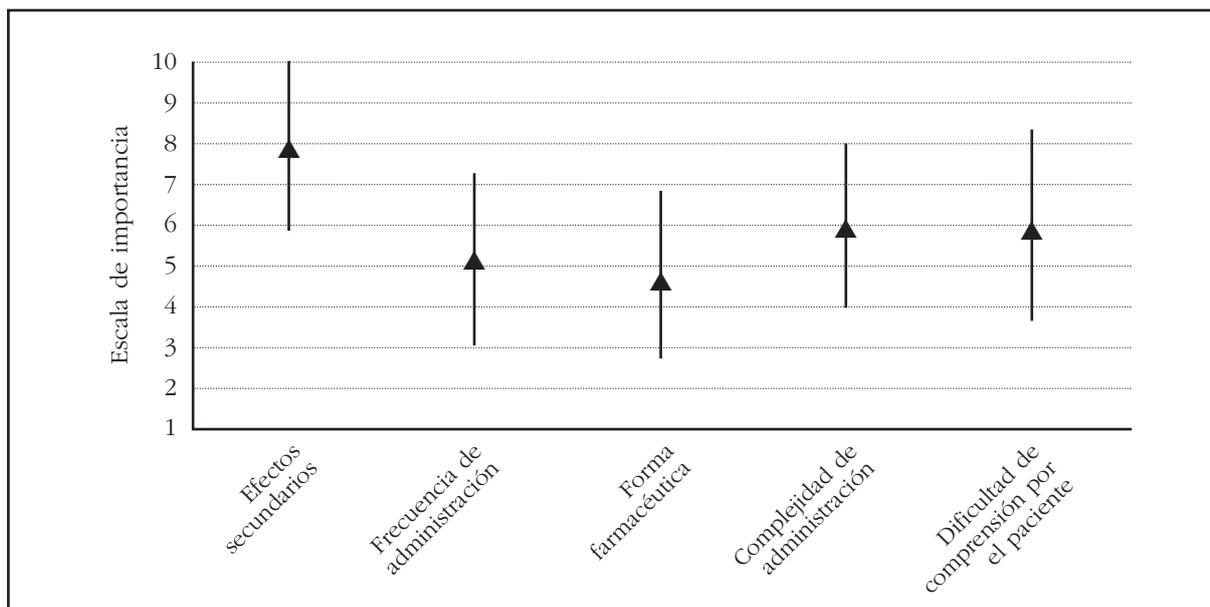
En nuestro estudio, uno de los aspectos interesantes en las respuestas de los encuestados es que entre los motivos que ocasionan la falta de adhe-

rencia terapéutica, se encuentran la falta de coordinación entre niveles asistenciales y la falta de comunicación. Es realmente cierto que falta comunicación entre Atención Especializada y Primaria, sobre todo en el momento de la prescripción farmacológica, porque en muchas ocasiones el médico de Atención Primaria se encuentra con una medicación prescrita por otro facultativo sin un informe que lo especifique. Algunos estudios ya han demostrado que mejorar la comunicación permite resolver mejor los problemas y es más eficiente para el sistema<sup>27</sup>.

Otros de los motivos que ocasionan esta falta de adherencia terapéutica del paciente según los consultados, y en línea con otras publicaciones, son los efectos secundarios y la polimedición; que, además, son percibidos como los motivos más frecuentes que motivan un cambio de tratamiento con bisfosfonatos<sup>26,28-32</sup>.

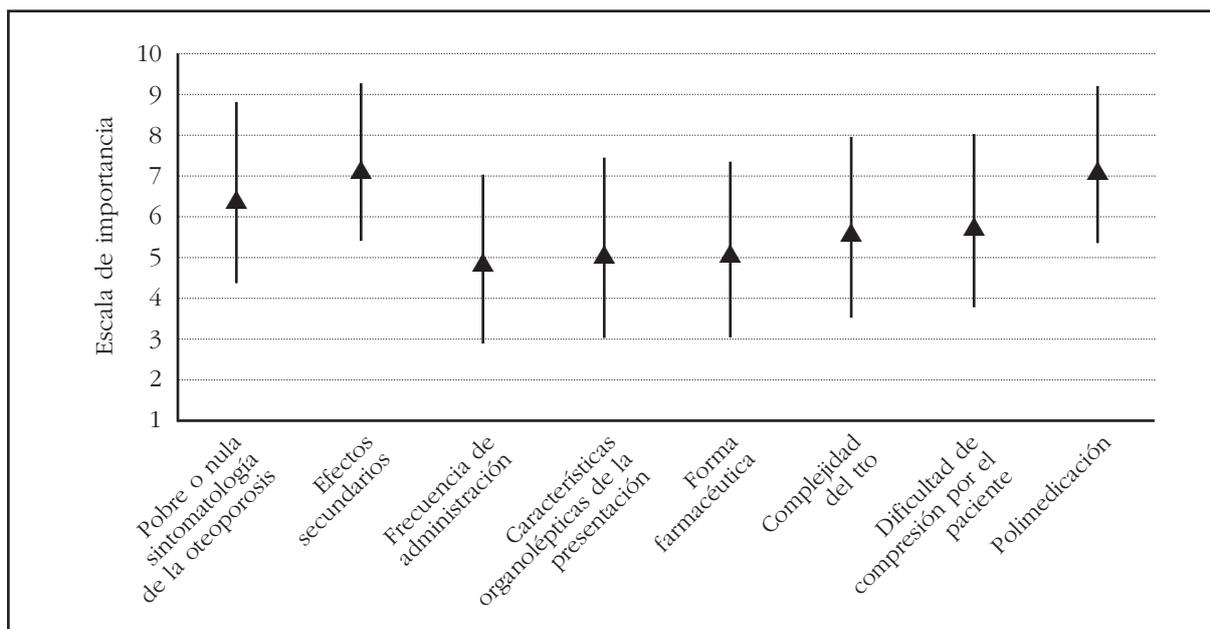
Los bisfosfonatos por vía oral se han convertido en el principal tratamiento farmacológico para la osteoporosis<sup>7</sup>; lo que coincide con la percepción de los facultativos consultados, ya que, en su opinión, entre 2 ó 3 pacientes de cada 4 reciben este tratamiento con un grado medio de cumplimiento. Sin embargo, un alto porcentaje (69,4%) de pacientes abandona el tratamiento en el primer año, cifra algo mayor que las referidas en otras publicaciones<sup>33,34</sup>. De hecho, estos datos reflejarían la realidad de diversos estudios en los que claramente el abandono de los tratamientos antirresortivos y específicamente de los bisfosfonatos se produce en un 53,9% de los casos debido a los efectos secundarios<sup>10</sup>.

Figura 2. Causas que motivan un cambio en el tratamiento oral de la osteoporosis



Escala ascendente de 1: no motiva cambios, a 10: motiva grandes cambios.

Figura 3. Factores que ocasionan incumplimiento terapéutico a bisfosfonatos

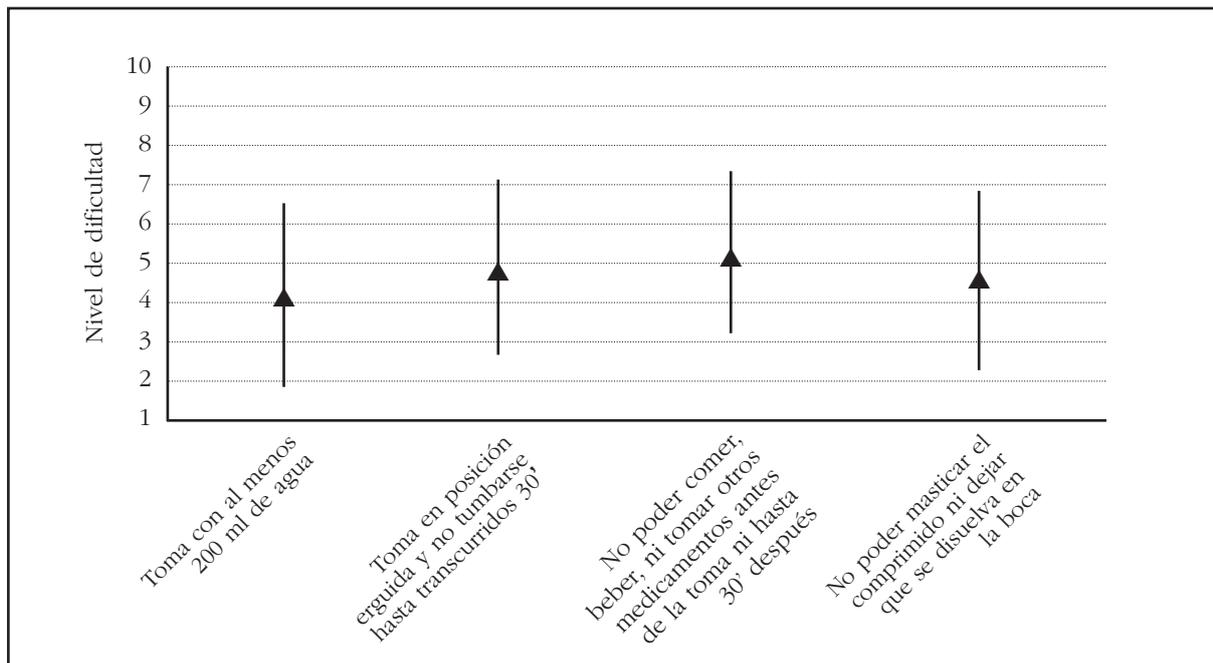


Escala ascendente de 1: muy poco frecuente, a 10: muy frecuente.

En este estudio, la polimedición y los efectos adversos parecen las principales causas de abandono de los bisfosfonatos orales. De hecho, los pacientes con osteoporosis son en general de edad avanzada, y debido a la comorbilidad que muchos de ellos presentan reciben múltiples tratamientos, lo que complica el buen cumplimiento y la adherencia a los mismos. Por otro lado, el principal efecto adverso descrito con los bisfosfonatos orales es la mala tolerancia gastrointestinal, principalmente en forma de epigastria o pirosis retroesofágica, que, como ya se ha descrito en la literatura, es uno de los principales motivos de abandono.

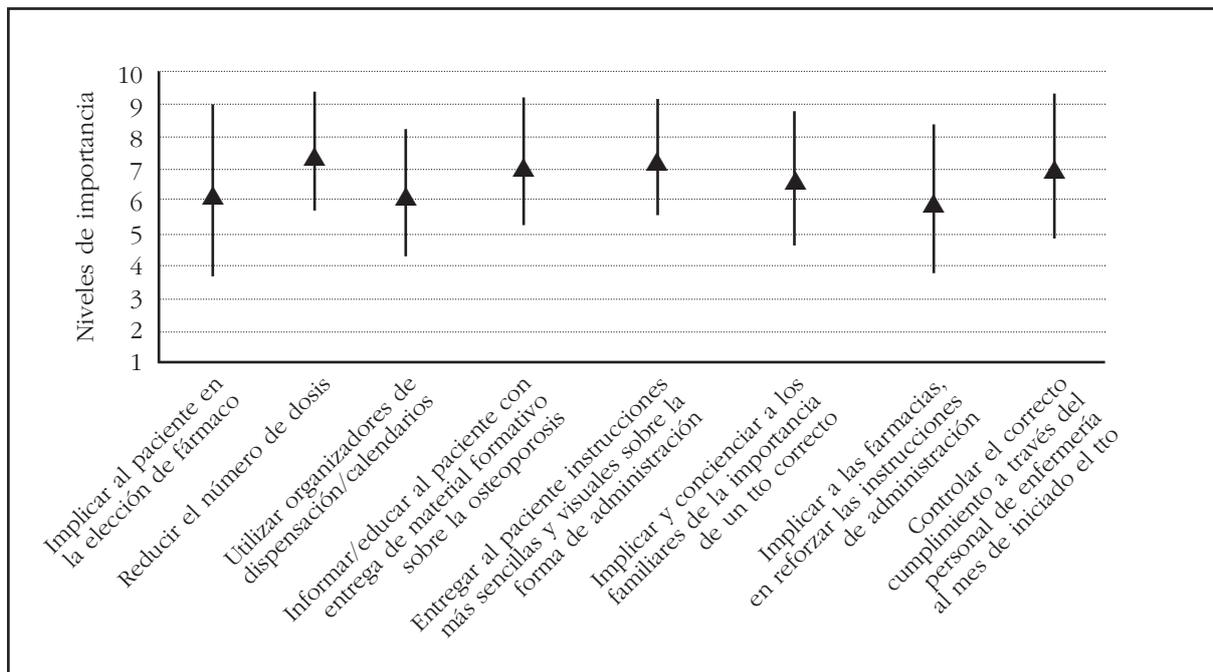
Valorar la adherencia y el cumplimiento terapéutico requiere de herramientas específicas para ser metodológicamente objetivos como los cuestionarios de autocumplimiento Haynes-Sackett o el test Morisky-Green<sup>9,26</sup>. A pesar de ello, en nuestro estudio el método más frecuentemente utilizado en la práctica clínica por la mayoría de los consultados es la consulta directa al paciente. Este dato refleja la necesidad de mejorar el tiempo de consulta en los centros, tanto en Atención Primaria como en Especializada, para que los facultativos puedan utilizar métodos más contrastados en su práctica habitual que la simple observación.

Figura 4. Valoración de la dificultad para seguir las instrucciones de administración de bisfosfonatos



Escala ascendente de 1: muy fácil de cumplir, a 10: muy difícil de cumplir.

Figura 5. Actuaciones que mejorarían el cumplimiento terapéutico y la correcta toma de bisfosfonatos



Escala ascendente de 1: ningún impacto, a 10: impacto máximo.

En coincidencia con los resultados de este estudio, la disminución de la frecuencia de la toma de medicación, la educación al paciente y el seguimiento del cumplimiento terapéutico se han propuesto entre las actuaciones consideradas que podrían mejorar la toma de bisfosfonatos<sup>29,30,35-39</sup>.

Probablemente la combinación de todas ellas sería la mejor estrategia para favorecer el cumpli-

miento y la adherencia terapéutica. Por otro lado, si consideramos que la mayoría de los pacientes con osteoporosis tienen una edad avanzada, y muchos de ellos pueden tener dificultades de deglución, una forma galénica soluble mejoraría la tolerabilidad gástrica de los bisfosfonatos, lo que favorecería el cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes<sup>40</sup>, tal y como opinó el 88,9% de los facultativos consultados.

En conclusión, esta encuesta pone de manifiesto que los especialistas que manejan la osteoporosis perciben una baja adherencia del paciente al tratamiento oral de la enfermedad. La baja adherencia se materializa principalmente por el abandono de la medicación durante el primer año de terapia, y se asocia fundamentalmente a los efectos secundarios, a la polimedición y a la falta de comunicación entre profesionales. Mejorar la comodidad disminuyendo el número de tomas y empleando formas galénicas solubles, mejorar la educación sobre la importancia de la enfermedad,

y aumentar el seguimiento del paciente, serían algunos de los aspectos que podrían favorecer la adherencia terapéutica

**Financiación:** El estudio ha sido dotado con una beca de LACER, S.A, quien no ha intervenido en ningún momento en el diseño, análisis, interpretación de los datos, redacción del informe final ni manuscrito de publicación.

**Conflicto de interés:** Declaración de no conflicto de intereses por los autores.

#### Anexo 1. Material adicional: Cuestionario del estudio

### 1. Respecto a sus pacientes que reciben tratamientos orales para la osteoporosis, indique el porcentaje que:

- a) Olvidan alguna vez tomar los tratamientos
  - > 0 - 25%
  - > 26 - 50%
  - > 51 - 75%
  - > 76 - 100%
- b) Toman los tratamientos en las horas recomendadas
  - > 0 - 25%
  - > 26 - 50%
  - > 51 - 75%
  - > 76 - 100%
- c) Dejan de tomar los tratamientos o alguna dosis, cuando se encuentran bien
  - > 0 - 25%
  - > 26 - 50%
  - > 51 - 75%
  - > 76 - 100%
- d) Dejan de tomar los tratamientos si alguna vez les sientan mal
  - > 0 - 25%
  - > 26 - 50%
  - > 51 - 75%
  - > 76 - 100%

### 2. Valore si los siguientes motivos generan un cambio en el tratamiento oral de la osteoporosis (puntué del 1 al 10, con un 10 cuando motive grandes cambios y con un 1 cuando no ocasione ningún cambio):

- a) Efectos secundarios
- b) Frecuencia de administración (diaria, semanal, mensual...)
- c) Forma farmacéutica (sobres, comprimidos...)
- d) Complejidad de administración (ayunas, posición erguida...)
- e) Dificultad de comprensión por el paciente

### 3. ¿Qué porcentaje de sus pacientes cree usted que está concienciado de la necesidad de tomar los fármacos prescritos?

- > 0 - 25%
- > 26 - 50%
- > 51 - 75%
- > 76 - 100%

### 4. ¿Cree Ud. que una de las causas de falta de adherencia es la falta de coordinación entre diferentes niveles asistenciales?

- > Sí, por impedimentos de la administración
- > Sí, por la aplicación de protocolos diferentes
- > Sí, por la falta de comunicación
- > Sí, por la falta de formación
- > No

### 5. ¿Sus pacientes participan en la elección de su tratamiento?

- > Sí
- > No, porque no tengo tiempo
- > No, porque tienen un nivel cultural bajo
- > No, porque lo dejan a mi criterio

Anexo 1. Material adicional: Cuestionario del estudio (cont.)

**A partir de ahora nos centraremos en el tratamiento con bisfosfonatos orales:**

**6. ¿Qué porcentaje de sus pacientes con osteoporosis están tratados con bisfosfonatos orales?**

- > 0 - 25%
- > 26 - 50%
- > 51 - 75%
- > 76 - 100%

**7. De los pacientes tratados con bisfosfonatos orales, ¿qué porcentaje cumple el tratamiento?**

- > 0 - 25%
- > 26 - 50%
- > 51 - 75%
- > 76 - 100%

**8. Valore del 1 al 10 la dificultad en el cumplimiento para los pacientes de las siguientes instrucciones para la administración de bisfosfonatos orales (1: muy fácil de cumplir, 10: muy difícil de cumplir):**

- > Toma con al menos 200 ml de agua
- > Toma del fármaco en posición erguida y no tumbarse hasta transcurridos 30 minutos
- > No poder comer, beber (a excepción de agua no mineral), ni tomar otros medicamentos antes de la toma del fármaco ni hasta al menos 30 minutos después
- > No poder masticar el comprimido ni dejar que se disuelva en la boca

**9. Los pacientes que usted controla y abandonan el tratamiento con bisfosfonatos orales para la osteoporosis ¿al cabo de cuánto tiempo de haber iniciado el tratamiento lo hacen, de promedio?**

- > Antes de los 3 meses
- > A los 3-6 meses
- > A los 6-12 meses
- > Después del primer año

**10. Valore el impacto potencial de las acciones que se podrían realizar para mejorar el cumplimiento terapéutico y la toma correcta de los bisfosfonatos orales. (1: ningún impacto, 10: impacto máximo):**

- a) Implicar al paciente en la elección del fármaco
- b) Reducir el número de dosis
- c) Utilizar organizadores de dispensación/calendarios
- d) Informar/educar al paciente con entrega de material formativo sobre la enfermedad y la importancia de la osteoporosis
- e) Entregar al paciente instrucciones más sencillas y visuales sobre la forma de administración
- f) Implicar y concienciar a los familiares de la importancia de un tratamiento correcto
- g) Implicar a las farmacias, en reforzar las instrucciones de administración
- h) Controlar el correcto cumplimiento a través del personal de Enfermería al mes de iniciado el tratamiento

**11. Valore las causas por las que los pacientes con osteoporosis tratados con bisfosfonatos orales no cumplen o abandonan el tratamiento. (1: muy poco frecuente, 10: muy frecuente):**

- a) Pobre o nula sintomatología de la osteoporosis
- b) Efectos secundarios
- c) Frecuencia de administración
- d) Características organolépticas de la presentación (forma, tamaño, dureza, sabor, textura...)
- e) Forma farmacéutica (sobres, comprimidos...)
- f) Complejidad del tratamiento
- g) Dificultad de comprensión por el paciente
- h) Polimedición (toma concomitante de 6 o más principios activos diferentes)

**12. ¿Qué método/s utiliza más frecuentemente para evaluar la adherencia a los tratamientos orales para la osteoporosis?**

- > Método indirecto de comunicación de autocumplimiento/Haynes-Sackett
- > Test de Morisky-Green
- > Desajuste en el número de envases dispensados/solicitados por el paciente y los prescritos
- > Consulta directa al paciente
- > Juicio clínico
- > Marcadores bioquímicos de remodelado
- > No suelo preguntar por el cumplimiento del tratamiento

**13. ¿Cree que una forma galénica soluble mejorará la adherencia a los tratamientos orales con bisfosfonatos?**

- > Nada
- > Poco
- > Bastante
- > Mucho

## Bibliografía

1. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *South Med J* 2001;94:569-73.
2. Hernlund E, Svedbom A, Ivergard M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos* 2013;8:136.
3. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res* 2007;22:465-75.
4. Johnell O, Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2005;16(Suppl 2):S3-7.
5. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2006;17:1726-33.
6. Nogués Solán X, Guerri R, Solé E, Díez-Pérez A. Impacto socioeconómico de la osteoporosis. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2010;2:S8-S11.
7. González-Macías J, Del Pino-Montes J, Olmos JM, Nogués X; en nombre de la Comisión de Redacción de las Guías de Osteoporosis de la SEIOMM. Guías de práctica clínica en la osteoporosis posmenopáusicas, glucocorticoidea y del varón. Sociedad Española de Investigación ósea y Metabolismo Mineral (3ª versión actualizada 2014). *Rev Clin Esp* 2015;215:515-26.
8. Sosa Henríquez M, Filgueira Rubio J, Lopez-Harce Cid JA, Diaz Curiel M, Lozano Tonkin C, del Castillo Rueda A, et al. What is the opinion of Spanish internists on osteoporosis?. *Rev Clin Esp* 2005;205:379-82.
9. Nogués Solán X, Sorli Redó ML, Villar García J. Instrumentos de medida de adherencia al tratamiento. *An Med Interna* 2007;24:138-41.
10. Clark EM, Gould VC, Tobias JH, Horne R. Natural history, reasons for, and impact of low/non-adherence to medications for osteoporosis in a cohort of community-dwelling older women already established on medication: a 2-year follow-up study. *Osteoporos Int* 2015 Aug 19. [Epub ahead of print].
11. Rabenda V, Hilgismann M, Reginster JY. Poor adherence to oral bisphosphonate treatment and its consequences: a review of the evidence. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10:2303-15.
12. Rossini M, Bianchi G, Di Munno O, Giannini S, Minisola S, Sinigaglia L, et al. Determinants of adherence to osteoporosis treatment in clinical practice. *Osteoporos Int* 2006;17:914-21.
13. Papaioannou A, Kennedy CC, Dolovich L, Lau E, Adachi JD. Patient adherence to osteoporosis medications: problems, consequences and management strategies. *Drugs Aging* 2007;24:37-55.
14. Gómez de Tejada Romero M. La adherencia en el tratamiento de la osteoporosis. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2010;2:S10-S4.
15. Tosteson AN, Grove MR, Hammond CS, Moncur MM, Ray GT, Hebert GM, et al. Early discontinuation of treatment for osteoporosis. *Am J Med* 2003;115:209-16.
16. Imaz I, Zegarra P, Gonzalez-Enriquez J, Rubio B, Alcazar R, Amate JM. Poor bisphosphonate adherence for treatment of osteoporosis increases fracture risk: systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 2010;21:1943-51.
17. Danese MD, Badamgarav E, Bauer DC. Effect of adherence on lifetime fractures in osteoporotic women treated with daily and weekly bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 2009;24:1819-26.
18. Fleurence RL, Iglesias CP, Johnson JM. The cost effectiveness of bisphosphonates for the prevention and treatment of osteoporosis: a structured review of the literature. *Pharmacoeconomics* 2007;25:913-33.
19. Cotte FE, Fautrel B, De Pouvourville G. A Markov model simulation of the impact of treatment persistence in postmenopausal osteoporosis. *Med Decis Making* 2009;29:125-39.
20. Siris ES, Selby PL, Saag KG, Borgstrom F, Herings RM, Silverman SL. Impact of osteoporosis treatment adherence on fracture rates in North America and Europe. *Am J Med* 2009;122(Suppl 2):S3-13.
21. Turbi C, Herrero-Beaumont G, Acebes JC, Torrijos A, Grana J, Miguelez R, et al. Compliance and satisfaction with raloxifene versus alendronate for the treatment of postmenopausal osteoporosis in clinical practice: An open-label, prospective, nonrandomized, observational study. *Clin Ther* 2004;26:245-56.
22. Ringe JD, Christodoulakos GE, Mellstrom D, Petto H, Nickelsen T, Marin F, et al. Patient compliance with alendronate, risedronate and raloxifene for the treatment of osteoporosis in postmenopausal women. *Curr Med Res Opin* 2007;23:2677-87.
23. Hazel-Fernandez L, Louder AM, Foster SA, Uribe CL, Burge RT. Association of teriparatide adherence and persistence with clinical and economic outcomes in Medicare Part D recipients: a retrospective cohort study. *BMC Musculoskelet Disord* 2013;14:4.
24. Sosa Henríquez M. Grupo de Trabajo en Osteoporosis Canario. Las mujeres osteoporóticas con fracturas muestran mayor cumplimiento terapéutico que las no fracturadas. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2014;6:8-13.
25. Díez A, Carbonell C, Calaf J, Caloto MT, Nocera G. Observational study of treatment compliance in women initiating antiresorptive therapy with or without calcium and vitamin D supplements in Spain. *Menopause* 2012;19:89-95.
26. Cadarette SM, Burden AM. Measuring and improving adherence to osteoporosis pharmacotherapy. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:397-403.
27. Biagetti B, Aulinas A, Dalama B, Nogues R, Zafon C, Mesa J. Communication between primary care and physician specialist: is it improving? *Rev Calid Asist* 2015;30:175-81.
28. Carr AJ, Thompson PW, Cooper C. Factors associated with adherence and persistence to bisphosphonate therapy in osteoporosis: a cross-sectional survey. *Osteoporos Int* 2006;17:1638-44.
29. Schousboe JT, Dowd BE, Davison ML, Kane RL. Association of medication attitudes with non-persistence and non-compliance with medication to prevent fractures. *Osteoporos Int* 2010;21:1899-909.
30. Lau E, Papaioannou A, Dolovich L, Adachi J, Sawka AM, Burns S, et al. Patients' adherence to osteoporosis therapy: exploring the perceptions of postmenopausal women. *Can Fam Physician* 2008;54:394-402.
31. Kamatai M, Koto S, Ozawa N, Urao C, Suzuki Y, Akasaka E, et al. Factors affecting long-term compliance of osteoporotic patients with bisphosphonate treatment and QOL assessment in actual practice: alendronate and risedronate. *J Bone Miner Metabol* 2007;25:302-9.
32. McHorney CA, Schousboe JT, Cline RR, Weiss TW. The impact of osteoporosis medication beliefs and side-effect experiences on non-adherence to oral bisphosphonates. *Curr Med Res Opin* 2007;23:3137-52.
33. McCombs JS, Thiebaud P, McLaughlin-Miley C, Shi J. Compliance with drug therapies for the treatment and prevention of osteoporosis. *Maturitas* 2004;48:271-87.
34. Rabenda V, Mertens R, Fabri V, Vanoverloop J, Sumkay F, Vannecke C, et al. Adherence to bisphosphonates therapy and hip fracture risk in osteoporotic women. *Osteoporos Int* 2008;19:811-8.
35. Cramer JA, Gold DT, Silverman SL, Lewiecki EM. A systematic review of persistence and compliance with bisphosphonates for osteoporosis. *Osteoporos Int* 2007;18:1023-31.
36. Costa i Pagès J. Descanso en el tratamiento con bifosfonatos: quién, cuándo y por cuánto tiempo. *Bulleti d'Informació Terapèutica* 2014;25:29.
37. Zolnieriek KB, Dimatteo MR. Physician communication and patient adherence to treatment: a meta-analysis. *Med Care* 2009;47:826-34.
38. Gleeson T, Iversen MD, Avorn J, Brookhart AM, Katz JN, Losina E, et al. Interventions to improve adherence and persistence with osteoporosis medications: a systematic literature review. *Osteoporos Int* 2009;20:2127-34.
39. Schlenk EA, Bernardo LM, Organist LA, Klem ML, Engberg S. Optimizing medication adherence in older patients: a systematic review. *J Clin Outcomes Manag* 2008;15:595-606.
40. Hodges LA, Connolly SM, Winter J, Schmidt T, Stevens HN, Hayward M, et al. Modulation of gastric pH by a buffered soluble effervescent formulation: A possible means of improving gastric tolerability of alendronate. *Int J Pharm* 2012;432:57-62.

**Reyes-García R<sup>12</sup>, Rozas-Moreno P<sup>13</sup>, García-Martín A<sup>14</sup>, García-Fontana B<sup>15</sup>, Morales-Santana S<sup>15</sup>, Muñoz-Torres M<sup>16</sup>**

1 Unidad Metabolismo Óseo, Endocrinología y Nutrición - Hospital Universitario San Cecilio - Granada (España)

2 Sección de Endocrinología - Hospital General Rafael Méndez - Lorca - Murcia (España)

3 Servicio de Endocrinología - Hospital General de Ciudad Real - Ciudad Real (España)

4 Sección de Endocrinología - Hospital Comarcal del Noroeste - Caravaca de la Cruz - Murcia (España)

5 Servicio de Proteómica - Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental -Alejandro Otero- (FIBAO) - Granada (España)

6 Plataforma Metabolismo Mineral y Óseo (RETICEF) (España)

## Dickkopf1 (DKK1), metabolismo óseo y enfermedad aterosclerótica en pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000100004>

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

Correo electrónico: [garciamartin\\_t@hotmail.com](mailto:garciamartin_t@hotmail.com)

Fecha de recepción: 05/10/2015

Fecha de aceptación: 28/12/2015

*Trabajo becado por la FEIOMM para asistir al 35º Congreso de la ASBMR (Baltimore, 2013).*

### Resumen

**Objetivos:** La diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) se asocia a un incremento del riesgo de fracturas y de enfermedades cardiovasculares. Los objetivos de nuestro estudio fueron evaluar los niveles séricos de Dickkopf-1 (DKK1) en una cohorte de pacientes con DM2 y analizar su relación con el metabolismo óseo y la enfermedad aterosclerótica (EA).

**Pacientes y métodos:** Se estudiaron 126 sujetos: 72 pacientes con DM2 (edad media de 58,2±6 años) y 54 sujetos no diabéticos (edad media de 55,4±7 años). Se midió DKK1 mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, Biomedica Gruppe), se determinó la densidad mineral ósea (DMO) mediante absorciometría dual de rayos X (DXA), se registró la presencia de EA (enfermedad cerebrovascular, enfermedad arterial periférica, cardiopatía isquémica) y se evaluó el grosor de la íntima-media (GIM, ultrasonografía doppler) y la calcificación aórtica (radiología simple).

**Resultados:** No se encontraron diferencias significativas en DKK1 entre diabéticos y no diabéticos. Las concentraciones séricas de DKK1 fueron significativamente mayores en las mujeres de la muestra total (24,3±15,2 vs. 19,6±10,2 pmol/L, p=0,046) y del grupo DM2 (27,5±17,2 vs. 19,8±8,9 pmol/L, p=0,025). Hubo una correlación positiva entre DKK1 y DMO lumbar en la muestra total (r=0,183, p=0,048). Sin embargo, no se encontraron diferencias en función del diagnóstico de osteoporosis o presencia de fracturas vertebrales morfométricas. Los valores de DKK1 fueron significativamente mayores en los pacientes con DM2 y EA (26,4±14,5 pmol/L vs. 19,1±11,6 pmol/L, p=0,026) y también en pacientes con GIM anormal (26,4±15,1 pmol/L vs. 19,8±11,3 pmol/L, p=0,038). En el análisis de la curva ROC para evaluar la utilidad de DKK1 como un marcador de alto riesgo de EA, el área bajo la curva fue de 0,667 (intervalo de confianza -IC- del 95%: 0,538-0,795; p=0,016). Una concentración de 17,3 pmol/L o superior mostró una sensibilidad del 71,4% y una especificidad del 60% para identificar un mayor riesgo de EA.

**Conclusiones:** Los niveles circulantes DKK1 son más altos en los diabéticos con EA y se asocian con un GIM patológico. Por tanto, consideramos que DKK1 puede estar implicado en la enfermedad vascular de los pacientes con DM2.

**Palabras clave:** *Dickkopf1, metabolismo óseo, enfermedad aterosclerótica, diabetes mellitus tipo 2.*

## Serum dickkopf1 (DKK1), bone metabolism and atherosclerotic disease in patients with type 2 diabetes

### Summary

**Background and objectives:** Type 2 diabetes (T2DM) is a risk factor for osteoporotic fractures and cardiovascular disease. The aims of our study were to evaluate serum Dickkopf-1 (DKK1) levels in a cohort of T2DM patients and to analyze its relationships with bone metabolism and atherosclerotic disease (AD).

**Patients and methods:** We studied 126 subjects: T2DM patients (n: 72, mean age 58,2±6 years) and non-diabetic subjects (n: 54, mean age 55,4±7 years). DKK-1 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Biomedica Gruppe). Bone mineral density (BMD) was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). The presence of AD (cerebrovascular disease, peripheral arterial disease, ischemic heart disease) was recorded. Intima-media thickness (IMT) was determined by doppler ultra-sonography and aortic calcification by evaluation of lateral view conventional X-rays.

**Results:** We did not find significant differences in DKK1 between groups. Serum DKK1 concentrations were significantly higher in females in total sample (24,3±15,2 vs 19,6±10,2 pmol/L, p=0,046) and in T2DM group (27,5±17,2 vs 19,8±8,9 pmol/L, p=0,025). There was a positive correlation between serum DKK1 and LS BMD in total sample (r=0,183, p=0,048). However, we did not find a significant relationship with osteoporosis diagnosis or morphometric vertebral fractures. Serum DKK1 was significantly higher in T2DM patients with AD (26,4±14,5 pmol/L vs 19,1±11,6 pmol/L, p=0,026) and also in patients with abnormal IMT (26,4±15,1 pmol/L vs 19,8±11,3 pmol/L, p=0,038). In the ROC curve analysis to evaluate the usefulness of DKK-1 as a marker for high risk of AD, the area under the curve was 0,667 (95% confidence interval: 0,538-0,795; p=0,016). A concentration of 17,3 pmol/L or higher showed a sensitivity of 71,4% and a specificity of 60% to identify an increased risk of AD.

**Conclusions:** Circulating DKK1 levels are higher in T2DM with AD and are associated with an abnormal IMT in this cross-sectional study. DKK1 may be involved in vascular disease of T2DM patients.

**Key words:** serum Dickkopf1, bone metabolism, atherosclerotic disease, type 2 diabetes mellitus.

### Introducción

La diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) se asocia con un mayor riesgo de fracturas en cualquier localización pese a una mayor densidad mineral ósea (DMO)<sup>1,2</sup>. Por otro lado, la aterosclerosis es el principal mecanismo patogénico en la enfermedad macrovascular del paciente diabético en relación con un engrosamiento de la pared arterial, el desarrollo de la placa de ateroma y la calcificación vascular<sup>3</sup>. La enfermedad vascular aterosclerótica es más frecuente en los pacientes con osteoporosis, y se han sugerido diversas vías fisiopatológicas comunes<sup>4</sup>. Además, los datos epidemiológicos apoyan una relación entre la baja densidad mineral ósea (DMO) y la presencia de enfermedad aterosclerótica avanzada en la DM2<sup>5,6</sup>.

Las vías de señalización Wnt están implicadas en diversos procesos fisiológicos incluyendo la diferenciación celular y tisular junto a la morfogénesis de órganos<sup>7</sup>. El descubrimiento de la vía de señalización de Wnt y su relevancia en la homeostasis ósea ha contribuido a un mejor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la biología del hueso<sup>8</sup>. La activación de esta vía da como resultado una expansión de las células osteoprogenitoras, así como una reducción de la apoptosis de los osteoblastos, lo que conlleva efectos anabólicos sobre el hueso<sup>8</sup>. La vía canónica de Wnt está regulada por múltiples familias de antagonistas, tales como Dickkopf-1 (DKK1). DKK1 regula la señalización de Wnt mediante su unión a un co-receptor, el receptor relacionado con la lipoproteína de baja densidad (LRP) 5/6. Además DKK1 se une a otras moléculas, como las proteínas transmembrana Kremen, para aumentar su actividad inhibidora de la vía Wnt<sup>9</sup>. La relación entre las concen-

traciones séricas de DKK1 y la masa ósea se ha analizado con datos contradictorios<sup>10-12</sup>.

Teniendo en cuenta la relación inversa entre la fragilidad ósea y la aterosclerosis, se está investigando el papel de la vía de señalización Wnt en el proceso de aterosclerosis. En estudios preclínicos las vías de señalización de Wnt están involucradas en los procesos de calcificación vascular<sup>13</sup>, inflamación<sup>14</sup>, la adhesión de monocitos y la migración trans-endotelial<sup>15</sup>. También hay datos recientes que muestran una relación entre los niveles séricos de DKK1 y la aterosclerosis en los seres humanos<sup>16,17</sup>.

En este contexto, los objetivos de nuestro estudio fueron evaluar los niveles séricos de DKK1 en una cohorte de pacientes con DM2 y analizar su relación con el metabolismo óseo y la enfermedad aterosclerótica. Además, se compararon las concentraciones séricas DKK1 entre DM2 y los sujetos no diabéticos.

### Pacientes y métodos

#### Población de estudio

Nuestro estudio de carácter transversal incluyó a 126 sujetos: un grupo de DM2 con 72 pacientes diagnosticados de diabetes según los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA, 2005) y un grupo de control con 54 sujetos no diabéticos reclutados consecutivamente entre la población general de forma aleatoria en el mismo período de tiempo.

Todos los sujetos del estudio 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 y

tratamiento con fármacos que afectan el metabolismo óseo. También se excluyeron los pacientes diabéticos tratados con tiazolidinedionas.

Los pacientes con DM2 se clasificaron en dos grupos de acuerdo a la presencia o no de la enfermedad aterosclerótica (EA): grupo EA y el grupo no-EA, respectivamente. Los criterios de inclusión para los pacientes con enfermedad aterosclerótica fueron: enfermedad cerebrovascular (ictus isquémico o accidente isquémico transitorio); enfermedad coronaria (infarto de miocardio previo, diagnóstico de angina estable o inestable o cirugía de revascularización coronaria) o enfermedad arterial periférica.

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.

### Evaluación clínica

En todos los pacientes se midieron altura, peso y circunferencia de cintura al inicio del estudio de acuerdo a los procedimientos estándares. El índice de masa corporal (IMC) se calculó dividiendo el peso por el cuadrado de la altura ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).

Se midió la presión arterial de una manera estandarizada. Tras 5 minutos de reposo se midió la presión arterial dos veces utilizando un esfigmomanómetro de mercurio estándar (12 centímetros de largo, 35 cm de ancho). La media de los dos valores se utilizó para el análisis. Se definió la hipertensión ante valores  $\geq 140/90$  mmHg y/o el tratamiento antihipertensivo.

Los participantes informaron sobre su consumo de alcohol, tabaco y el nivel de actividad física según un cuestionario de salud específico.

### Determinaciones analíticas

La glucemia basal plasmática (GBP), la hemoglobina glicosilada (HbA1c), el calcio, el fósforo y la creatinina séricos fueron medidos usando las técnicas automatizadas del laboratorio. La lipoproteína de alta densidad (HDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y los triglicéridos se midieron por métodos bioquímicos estándares. La dislipidemia se definió según el 3º Informe del Grupo de Expertos en la Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos (ATP-III) o si había tratamiento con estatinas.

Se determinaron los niveles séricos de parathormona (PTH; inmunoensayo: Roche Diagnostics SL, Barcelona, España) y 25-hydroxivitamina 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; ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas - ELISA-, Tandem-R Ostase TM, Hybritech Europe, Liège, Bélgica). Los marcadores de resorción incluidos fueron fosfatasa ácida tartrato resistente 5 $\beta$  (TRAP5 $\beta$ ; colorimetría, Hitachi 704 Boehringer Mannheim GmbH) y telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo 1 (CTX; inmunoensayo enzimático, analizador Elecsys CrossLaps, Roche Diagnostics SL, Barcelona, España).

Los niveles séricos de DKK1 se midieron mediante el ELISA (Biomedica Medizinprodukte GmbH y Co. KG, Viena, Austria) según las instrucciones del fabricante. El Biomedica DKK-1 ELISA (BI-20412) detecta DKK-1 libre. La variabilidad intraensayo e interensayo fueron del 7% y 9%, respectivamente. La medida de DKK1 se expresa en picomoles por litro (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 fueron hechas por el mismo operador. Usamos los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico de osteoporosis. También se realizó radiología simple de rayos X de columna dorsal y lumbar para el análisis de fracturas vertebrales (FV) morfométricas, y se interpretó de acuerdo al algoritmo desarrollado por McCloskey y cols.<sup>18</sup>.

### Mediciones del grosor de la íntima media y de la calcificación aórtica

El grosor de la íntima media carotídea (GIM) se midió mediante eco-doppler (TOSHIBA Vision 6000) en ambas carótidas a unos 10 mm proximales de la bifurcación carotídea (BIF) mediante sonda de 7,5 MHz en modo B. La determinación se realizó por el mismo observador en todos los sujetos. Se realizaron 10 mediciones en cada carótida calculando la media para cada arteria y a su vez la media de las dos. Se expresa en milímetros, y se definió GIM patológico si  $\geq 0,9$  mm, y la presencia de placa de aterosclerosis si GIM  $\geq 1,2$  mm o superior al 50% del GIM adyacente<sup>19</sup>.

La presencia de calcificación aórtica se evaluó mediante radiología simple lateral de columna torácica y lumbar (T4-L5)<sup>20</sup>.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el programa SPSS (versión 18.0, 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 -SD-, 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. La utilidad de DKK1 suero como un marcador de alto riesgo de enfermedad aterosclerótica en la DM2 se analizó utilizando una curva ROC (característica operativa del receptor). Todos los test estadísticos se realizaron a doble cola. Una  $p < 0,05$  fue considerada estadísticamente significativa.

## Resultados

Las características clínicas de la población de estudio se resumen en la tabla 1.

No se encontraron diferencias significativas en DKK1 entre ambos grupos: DM2,  $23,35 \pm 13,78$  pmol/L *vs.* no diabéticos,  $20,1 \pm 11,86$  pmol/L,  $p=0,163$ . Las concentraciones séricas de DKK1 fueron significativamente mayores en las mujeres en la muestra total ( $24,3 \pm 15,2$  *vs.*  $19,6 \pm 10,2$  pmol/L,  $p=0,046$ ) y en el grupo DM2 ( $27,5 \pm 17,2$  *vs.*  $19,8 \pm 8,9$  pmol/L,  $p=0,025$ ).

En cuanto al metabolismo óseo, hubo una correlación positiva entre DKK1 y DMO lumbar en la muestra total ( $r=0,183$ ;  $p=0,048$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias en función del diagnóstico de osteoporosis o presencia de fracturas vertebrales morfométricas. Tampoco existió relación con las hormonas calcitropas ni los marcadores de remodelado óseo.

En la tabla 2 se muestran los datos de EA según los grupos de estudio.

Los valores de DKK1 fueron significativamente mayores en los pacientes con DM2 y EA ( $26,4 \pm 14,5$  pmol/L *vs.*  $19,1 \pm 11,6$  pmol/L,  $p=0,026$ ) y también en pacientes con GIM anormal ( $26,4 \pm 15,1$  pmol/L *vs.*  $19,8 \pm 11,3$  pmol/L,  $p=0,038$ ).

En el análisis de la curva ROC para evaluar la utilidad de DKK1 como un marcador de alto riesgo de EA, el área bajo la curva fue de 0,667 (intervalo de confianza - IC- del 95%: 0,538-0,795;  $p=0,016$ ). Una concentración de 17,3 pmol/L o superior mostró una sensibilidad del 71,4% y una especificidad del 60% para identificar un mayor riesgo de EA.

## Discusión

Existen escasos estudios sobre la relación entre DKK1 y el metabolismo óseo en la DM2. Nuestros resultados mostraron niveles más altos de DKK1 en pacientes diabéticos con EA y GIM patológico. Estos hallazgos sugieren que las concentraciones séricas de DKK1 pueden constituir un predictor de la presencia de enfermedad aterosclerótica en esta población. Sin embargo, nuestros datos no mostraron diferencias en DKK1 entre los pacientes diabéticos y los sujetos no diabéticos. En cuanto al metabolismo óseo, se encontró una relación significativa de DKK1 sérico con la densidad mineral ósea, mientras que no la hubo con los marcadores de remodelado óseo, el diagnóstico de osteoporosis o la presencia de fracturas vertebrales morfométricas.

No existen trabajos previos centrados en evaluar las diferencias en las concentraciones séricas de DKK1 de acuerdo con la presencia de diabetes. Por nuestra parte, no encontramos diferencias en DKK1 entre los pacientes con DM2 y los sujetos sin diabetes. Estos resultados contrastan con nuestros datos anteriores, que muestran altas concentraciones de esclerostina en este mismo grupo de pacientes diabéticos<sup>21</sup>. Sin embargo, la relación establecida entre DKK1 y esclerostina no ha sido claramente establecida<sup>22</sup>. A diferencia de nuestros resultados previos sobre esclerostina, las mujeres tenían concentraciones de DKK1 superiores, tanto en la muestra total como en el grupo de DM2. El estradiol y la progesterona regulan las vías de Wnt en el tejido endometrial<sup>23</sup> y el cerebro<sup>24</sup>, por lo que los efectos

inducidos por los esteroides sexuales podrían explicar las diferencias de género en DKK1.

En cuanto a la relación entre el metabolismo óseo y DKK1 sólo encontramos una correlación débil con DMO en columna lumbar en la muestra total, y ninguna relación con los marcadores de remodelado óseo, osteoporosis o fracturas vertebrales morfométricas. Además, la DMO lumbar puede verse afectada por la calcificación aórtica. Nuestros hallazgos confirman los datos anteriores que muestran la inexistencia de relación entre DKK1 y los marcadores de recambio óseo en osteoporosis postmenopáusicas<sup>11</sup> y pacientes en hemodiálisis<sup>12</sup>. La asociación entre DKK1 y la DMO no está totalmente asentada. No se ha encontrado relación con la DMO de pacientes diabéticos afroamericanos<sup>17</sup>. Sin embargo, por otro lado se ha descrito una relación inversa entre DKK1 y DMO y mayores concentraciones de DKK1 en pacientes con osteoporosis<sup>10</sup> y en la enfermedad renal crónica<sup>22</sup>. Por lo tanto, los datos sobre DKK1 sérico y el metabolismo óseo son controvertidos, e impiden extraer conclusiones claras al respecto.

En nuestro estudio, los niveles más altos de DKK1 se relacionaron positivamente con la enfermedad aterosclerótica en pacientes con DM2 independientemente de la presencia de otros factores de riesgo vasculares, y concentraciones más altas de DKK1 estaban relacionadas con un GIM patológico en diabéticos. Estos resultados están en consonancia con los datos previos que muestran la relación entre la enfermedad vascular y DKK1. Los pacientes con enfermedad cerebrovascular tienen niveles séricos DKK1 mayores respecto a los controles<sup>25</sup>, y las concentraciones séricas de DKK1 se correlacionaron con la calcificación de las arterias coronarias y las placas ateroscleróticas coronarias<sup>16</sup>. Previamente, Ueland y cols.<sup>26</sup> demostraron la expresión génica de DKK1 en las placas ateroscleróticas carotídeas, y que DKK1 constituye un nuevo mediador en la activación de células endoteliales mediada por las plaquetas. En contraposición a nuestros resultados, las concentraciones DKK1 se asociaron negativamente con la placa aterosclerótica en pacientes afroamericanos con DM2<sup>17</sup>. Como señalan los autores, los afroamericanos tienen una menor prevalencia de calcificación vascular, y muestran relaciones opuestas entre la calcificación arterial y las concentraciones séricas de vitamina D en comparación con los europeos<sup>27</sup>, lo que podría explicar la discordancia de los resultados.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones como el diseño transversal que no permite establecer una relación causa-efecto, y el tamaño de la muestra que es relativamente pequeño y podría afectar para encontrar otros resultados interesantes.

En resumen, las concentraciones plasmáticas de DKK1 no mostraron diferencias según la presencia de diabetes, y no encontramos relación con los marcadores de remodelado óseo, el diagnóstico de osteoporosis o la presencia de fracturas vertebrales morfométricas. Sin embargo, los niveles circulantes de DKK1 son más altos en los diabéticos con enfermedad aterosclerótica y están relacionados con un GIM patológico. Estos hallazgos sugieren que DKK1 podría estar involucrado en el desarrollo de enfermedad aterosclerótica de los pacientes con DM2.

Tabla 1. Características de la muestra de estudio

	Muestra total (n=126)	Grupo DM2 (n=72)	Grupo no DM2 (n=54)	Valor p
Edad (años)	57±6	58±6	55±7	0,018
Varones/mujeres (n)	62/64	39/33	25/29	0,472
<b>Historia clínica</b>				
Duración diabetes (años)	-	13,7±7,6	-	
Hipertensión (%)	53,2	80,6	46,3	<0,001
Dislipemia (%)	65,9	94,4	70,4	<0,001
Tabaco (%)	15,1	16,7	13	0,623
Alcohol (%)	8,7	6,9	11,1	0,104
Sedentarismo (%)	47,6	55,6	37	0,048
<b>Evaluación clínica</b>				
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30,5±5,9	31,4±5,7	29,3±5,9	0,043
Cintura (cm)	102,6±12,4	106,4±11,4	97,4±11,9	<0,001
PAS (mm Hg)	130±20	134±97	124±17	0,002
PAD (mm Hg)	80±13	80±12	79±15	0,705
<b>Datos analíticos</b>				
GBP (mg/dL)	137,2±61,9	173±60,1	89,4±10,4	<0,001
HbA1c (%)	6,7±2,2	8±1,9	4,8±0,4	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,88±0,18	0,89±0,19	0,86±0,16	0,266
Calcio (mg/dL)	9,5±0,5	9,6±0,5	9,3±0,4	0,001
Fósforo (mg/dL)	3,6±0,5	3,7±0,5	3,5±0,5	0,01
PTH (pg/mL)	43,6±19,5	38,5±18,4	50,4±19,1	<0,001
25(OH)D (ng/mL)	19,5±11,3	17,8±11,5	21,6±10,9	0,06
OC (ng/mL)	1,5±1,3	1,5±1,3	1,5±1,2	0,939
FAo (µg/L)	14±6,5	14,7±6,2	13±6,8	0,162
CTX (ng/mL)	0,266±0,155	0,209±0,132	0,338±0,153	<0,001
TRAP5b (UI/L)	1,6±0,9	1,4±1	1,8±0,8	0,02
Triglicéridos (mg/dl)	142±121	169,9±149,8	104,9±47,7	<0,001
HDL (mg/dl)	53,5±15,5	49±16	59,5±12,5	<0,001
LDL (mg/dl)	111,7±35,5	96,9±34,1	130,8±27,4	<0,001
DKK1 (pg/ml)	<b>21,95±13,1</b>	<b>23,35±13,78</b>	<b>20,1±11,86</b>	0,163
<b>Parámetros DXA y fracturas</b>				
DMO CL (g/cm <sup>2</sup> )	0,977±0,148	0,954±0,146	1±0,148	0,068
DMO CF (g/cm <sup>2</sup> )	0,820±0,124	0,817±0,132	0,823±0,117	0,792
DMO CT (g/cm <sup>2</sup> )	0,906±0,135	0,903±0,145	0,911±0,125	0,772
T-score CL	-1,08±1,36	-1,3±1,3	0,82±1,3	0,058
T-score CF	-0,55±1,01	-0,6±1,04	-0,49±0,99	0,565
T-score CT	-0,55±0,98	-0,62±1	-0,51±0,92	0,557
Osteoporosis (%)	15,9	24,6	9,4	0,047
Fracturas (%)	23	30,3	20	0,274

IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; GBP: glucemia basal plasmática; HbA1c: hemoglobina glicada; PTH: parathormona; 25(OH)D: 25-hidroxivitamina D; OC: osteocalcina; FAo: fostatasa alcalina ósea; CTX: telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1; TRAP5b: fosfatasa ácida tartrato resistente 5β; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; DMO: densidad mineral ósea; CL: columna lumbar; CF: cuello femoral; CT: cadera total; GIM: grosor íntima-media.

Tabla 2. Enfermedad aterosclerótica según grupos de estudio

	Muestra total (n=126)	Grupo DM2 (n=72)	Grupo no DM2 (n=54)	Valor p
Enfermedad aterosclerótica	35,7	58,3	5,6	<0,001
Enfermedad cerebrovascular (%)	11,9	19,4	1,9	0,002
Cardiopatía (%)	23,8	38,9	3,7	<0,001
Enfermedad arterial periférica (%)	7,9	13,9	0	0,005
GIM patológico (%)	35,7	54,2	11,1	<0,001
Placa carotídea (%)	15,9	29,4	0	<0,001
Calcificación aórtica (%)	19	34,8	2,2	<0,001

GIM: grosor íntima-media.

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

### Bibliografía

- Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, Dognig H. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J Bone Miner Res* 2007;22:1317-28.
- Epstein S, Leroith D. Diabetes and fragility fractures - A burgeoning epidemic? *Bone* 2008;43:3-6.
- Madonna R, De Caterina R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes-part I: Pathways of vascular disease in diabetes. *Vascul Pharmacol* 2011;54:68-74.
- Magnus JH, Brussard DL. Relationship between bone mineral density and myocardial infarction in US adults. *Osteoporos Int* 2005;16:2053-62.
- Carr JJ, Register TC, Hsu FC, Lohman K, Lenchik L, Bowden DW, et al. Calcified atherosclerotic plaque and bone mineral density in type 2 diabetes: the diabetes heart study. *Bone* 2008;42:43-52.
- Divers J, Register TC, Langefeld CD, Wagenknecht LE, Bowden DW, Carr JJ, et al. Relationships between calcified atherosclerotic plaque and bone mineral density in African Americans with type 2 diabetes. *J Bone Miner Res* 2011;26:1554-60.
- Gordon MD, Nusse R. Wnt signalling: multiple pathways, multiple receptors and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006;281:22429-33.
- Huang H, He X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insight. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:119-25.
- Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/\_-catenin signalling. *Nature* 2002;417:664-7.
- Butler JS, Murray DW, Hurson CJ, O'Brien J, Doran PP, O'Byrne JM. The role of Dkk1 in bone mass regulation: correlating serum Dkk1 expression with bone mineral density. *J Orthop Res* 2011;29:414-8.
- 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.
- 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 micro-architecture in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:226-30.
- Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 2005;115:1210-20.
- Sen M, Ghosh G. Transcriptional outcome of Wnt-Frizzled signal transduction in inflammation: evolving concepts. *J Immunol* 2008;181:4441-5.
- Christman MA 2nd, Goetz DJ, Dickerson E, McCall KD, Lewis CJ, Benencia F, et al. Wnt5a is expressed in murine and human atherosclerotic lesions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H2864-70.
- Kim KI, Park KU, Chun EJ, Choi SI, Cho YS, Youn TJ, et al. A novel biomarker of coronary atherosclerosis: serum DKK1 concentration correlates with coronary artery calcification and atherosclerotic plaques. *J Korean Med Sci* 2011;26:1178-84.
- Register TC, Hruska KA, Divers J, Bowden DW, Palmer ND, Carr JJ, et al. Plasma Dickkopf (DKK1) concentrations negatively associate with atherosclerotic calcified plaque in african-americans with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:60-5.
- McCloskey EV, Spector TD, Eyres KS, Fem ED, O'Rourke N, Vasikaran S, et al. The assessment of vertebral deformity: a method for use in population studies and clinical trials. *Osteoporos Int* 1993;138-47.
- Junyent M, Gilabert R, Nuñez I, Corbella E, Vela M, Zambon D, et al. Carotid ultrasound in the assessment of preclinical atherosclerosis. Distribution of intima-media thickness values and plaque frequency in a Spanish community cohort. *Med Clin* 2005;125:770-4.
- Kaupilla IJ, Polak JF, Cupples LA, Hannan MT, Kiel DP, Wilson PW. New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. *Atherosclerosis* 1997;132:245-50.
- 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.
- Thambiah S, Roplekar R, Manghat P, Fogelman I, Fraser WD, Goldsmith D, et al. Circulating sclerostin and Dickkopf-1 (DKK1) in predialysis chronic kidney disease (CKD): relationship with bone density and arterial stiffness. *Calcif Tissue Int* 2012;90:473-80.
- Wang Y, Hanifi-Moghaddam P, Hanekamp EE, Kloosterboer HJ, Franken P, Veldscholte J, et al. Progesterone inhibition of Wnt/beta-catenin signaling in normal endometrium and endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:5784-93.
- Scott EL, Brann DW. Estrogen regulation of Dkk1 and Wnt/β-Catenin signaling in neurodegenerative disease. *Brain Res* 2013;1514:63-74.
- Seifert-Held T, Pekar T, Gattringer T, Simmet NE, Scharnagl H, Stojakovic T, et al. Circulating Dickkopf-1 in acute ischemic stroke and clinically stable cerebrovascular disease. *Atherosclerosis* 2011;218:233-37.
- Ueland T, Otterdal K, Lekva T, Halvorsen B, Gabrielsen A, Sandberg WJ, et al. Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1228-34.
- Freedman BI, Register TC. Effect of race and genetics on vitamin D metabolism, bone and vascular health. *Nat Rev Nephrol* 2012;8:459-66.

Palma-Sánchez D<sup>1</sup>, Haro-Martínez AC<sup>1</sup>, Gallardo Muñoz I<sup>2</sup>, Portero de la Torre M<sup>2</sup>, Mayor González M<sup>1</sup>, Peñas E<sup>1</sup>, Reyes-García R<sup>3</sup>

1 Unidad de Reumatología

2 Servicio de Radiología

3 Unidad de Endocrinología

Hospital General Universitario Rafael Méndez - Lorca - Murcia (España)

## Cambios inducidos en DKK1 en pacientes con artritis reumatoide que inician tratamiento con terapia biológica

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000100005>

Correspondencia: Rebeca Reyes García - Ctra. Nacional 340, Km 589 - 30800 Lorca - Murcia (España)

Correo electrónico: [rebeca.reyes.garcia@gmail.com](mailto:rebeca.reyes.garcia@gmail.com)

Fecha de recepción: 08/10/2015

Fecha de aceptación: 06/02/2016

*Trabajo premiado con la beca de Investigación Clínica FEIOMM 2013.*

### Resumen

**Introducción:** El objetivo del estudio es evaluar la relación entre la carga inflamatoria, el riesgo cardiovascular y el metabolismo óseo en pacientes con artritis reumatoide que inician tratamiento con terapia biológica.

**Pacientes y métodos:** Se trata de un estudio de cohortes prospectivo realizado en pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide (AR) activa evaluados en la Unidad de Reumatología y que inician terapia biológica. Los pacientes serán seleccionados de forma consecutiva. Presentamos los datos preliminares de 14 pacientes.

**Resultados:** Encontramos una reducción en las concentraciones de Dickkopf-1 (DKK1) tras el inicio de la terapia biológica (basal:  $53,12 \pm 60,43$  pg/ml vs. 6 meses  $23,2 \pm 13,5$  pg/ml,  $p=0,307$ ) pero no se alcanzó la significación estadística. Se encontraron cambios en los marcadores de remodelado con aumento en los niveles de osteocalcina y CTX que no alcanzó la significación estadística.

**Conclusiones:** En pacientes con AR activa tratados con terapia biológica hemos observado un descenso no significativo de las concentraciones séricas de DKK1. La ampliación tanto de los sujetos de estudio como de las determinaciones bioquímicas pendientes nos permitirán en un futuro próximo establecer de forma más precisa esta asociación, así como la relación entre DKK1, remodelado óseo, terapia biológica y enfermedad cardiovascular en pacientes con AR.

**Palabras clave:** *artritis reumatoide, DKK1, terapia biológica.*

## Changes induced by DKK1 in rheumatoid arthritis patients who commence biologic therapy treatment

### Summary

**Introduction:** The aim of this study is to assess the relationship among inflammatory charge, cardiovascular risk and bone metabolism in patients with rheumatoid arthritis initiating biological therapy treatment.

**Patients and methods:** This is a prospective cohort study conducted in patients diagnosed with active rheumatoid arthritis (RA) assessed in the Rheumatology Unit and initiating biological therapy.

Patients will be selected consecutively, with preliminary data on 14 patients. We present preliminary data from 14 patients.

**Results:** Reduced Dickkopf-1 (DKK1) concentrations after commencing biological therapy were detected (baseline:  $53.12 \pm 60.43$  pg/ml vs 6 months  $13.5 \pm 23.2$  pg/ml,  $p=0.307$ ) but without statistical significance. Changes were found in markers for bone remodeling with increased osteocalcin levels and CTX which were not statistically significant either.

**Conclusions:** We observed a nonsignificant decrease in DKK1 serum in patients with active RA treated with biologic therapy. Expanding the scope of study subjects and pending biochemical determinations will allow us, in the near future, to establish more precisely this link and the relationship of DKK1, bone remodeling, biological therapy and cardiovascular disease in RA patients.

**Key words:** *rheumatoid arthritis, DKK1, biological therapy.*

### Introducción

La artritis reumatoide (AR) y otras enfermedades reumáticas inflamatorias, como la espondilitis anquilosante y la artritis psoriásica, presentan una mayor mortalidad cardiovascular debida al desarrollo de aterosclerosis acelerada<sup>1</sup>. La inflamación crónica persistente así como factores genéticos se han implicado en el desarrollo de la aterosclerosis acelerada y, consecuentemente, de episodios cardiovasculares<sup>2</sup>.

La vía Wnt se ha involucrado no sólo en la alteración del metabolismo óseo<sup>3</sup> sino también en la patología cardiovascular<sup>4,5</sup>, por lo que podría ser el nexo común entre estas enfermedades. La implicación de la artritis reumatoide en esta vía se ha explicado a través de las citoquinas proinflamatorias involucradas en su patogénesis, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ), que tiene un papel relevante en el proceso de diferenciación osteoclástica aumentando el ligando del receptor activador del factor nuclear kB (RANKL) así como Dickkopf-1 (DKK1) y esclerostina, ambos inhibidores de la vía Wnt<sup>6</sup>. Por tanto, el control de la actividad en pacientes con AR debería suponer no solo un aumento de la densidad mineral ósea sino también una reducción del riesgo cardiovascular.

El objetivo del estudio es evaluar la relación entre la carga inflamatoria, el riesgo cardiovascular y el metabolismo óseo en pacientes con artritis reumatoide que inician tratamiento con terapia biológica. Para ello se ha analizado la relación entre la actividad inflamatoria, las concentraciones séricas de antagonistas de la vía Wnt (DKK1), la enfermedad cardiovascular determinada por el método SCORE modificado para AR, el grosor íntima-media carotídea y la enfermedad ósea en pacientes con AR, al inicio de tratamiento con

terapia biológica y a los 6 y 12 meses de tratamiento. En el presente trabajo se presentan los datos preliminares del estudio.

### Pacientes y métodos

Se trata de un estudio cohortes prospectivo de pacientes con diagnóstico de AR activa evaluados en la Unidad de Reumatología, y que inician terapia biológica. Para el diagnóstico de AR se aplicarán los criterios ACR 1987. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: diagnóstico de AR, edad mayor de 18 años, presencia de actividad de la enfermedad (DAS >2,4) a pesar de tratamiento con fármacos modificadores sintéticos de la enfermedad, y firma de consentimiento informado. Se excluyeron pacientes con eventos cardiovasculares previos, fracturas osteoporóticas previas, enfermedad metabólica ósea distinta a osteoporosis, enfermedad renal crónica, hepatopatía crónica, diabetes *mellitus* tipo 1 y 2, enfermedad neoplásica, embarazo y lactancia.

El estudio fue presentado y aceptado por el Comité de Ética para la Investigación Clínica del Hospital General Universitario Rafael Méndez. Todos los participantes fueron informados del tipo de estudio y de sus procedimientos, y proporcionaron su consentimiento informado antes de realizar cualquier procedimiento del estudio. El estudio se diseñó y se realizó de acuerdo a las normas éticas de la declaración de Helsinki.

Se recogieron las siguientes variables: niveles séricos de DKK-1, características sociodemográficas, tensión arterial (TA), DAS-28 con VSG, Escala analógica visual (EVA) de la enfermedad por el paciente medida de 0 a 10, duración de la enfermedad determinada en años, respuesta de la enfermedad al tratamiento valorada mediante respuesta EULAR, valores de

Tabla 1. Características sociodemográficas y clínicas

N	14
Edad, media $\pm$ DE	47,14 $\pm$ 14,06
Mujer, n (%)	9 (64,3)
IMC, media $\pm$ DE	29,89 $\pm$ 7,41
HTA, n (%)	3 (21,4)
DLP, n (%)	3 (21,4)
Toma de alcohol, n (%)	2 (14,3)
Hábito tabáquico, n (%)	9 (64,3)

DE: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal; HTA: hipertensión arterial; DLP: dislipemia.

factor reumatoide y anticuerpos antipéptido citrulinado, hemograma, bioquímica general con función hepatorenal, perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos), proteína C reactiva (PCR), calcio y fosforo sérico, parathormona (PTH), 25-hidroxivitamina D3 (25-OH vitamina D3), marcadores del remodelado óseo (fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina, telopéptido C-terminal del colágeno tipo I -CTX-), grosor de la íntima-media carotídea (c-IMT), modelo SCORE (*Systematic Coronary Risk Evaluation*, Evaluación sistemática del riesgo coronario), modelo SCORE modificado para AR, y densidad mineral ósea en columna lumbar y cadera medida mediante absorciometría dual de rayos X (DXA).

#### Determinaciones bioquímicas

El análisis de parámetros bioquímicos habituales se realizó a través de técnicas estandarizadas.

Las concentraciones de hormonas calciotropas se determinaron por HPLC para 25-OH vitamina D3 y ELECSYS para PTH intacta. Los marcadores bioquímicos de remodelado se determinaron de forma automatizada (Roche Elecsys 2010).

Las concentraciones de DKK1 se evaluaron a través de ELISA (Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co. KG, Viena, Austria) según las instrucciones del fabricante. Para el resto de determinaciones bioquímicas pendientes disponemos de muestras congeladas a -80 °C.

#### Evaluación de densidad mineral ósea

La densidad mineral ósea en columna lumbar y cuello femoral se evaluó a través de densitometría dual de rayos X (DXA) (Norland XR-800).

Para pacientes postmenopáusicas y varones >50 años se utilizó el T-score para clasificar la DXA central en normal, osteopenia y osteoporosis. En el resto de los casos se utilizó la Z-score, considerándose baja masa ósea una Z-score <-2.

#### Evaluación de c-IMT

La evaluación ultrasonográfica de las arterias carótidas se realizó a través de eco-doppler (Philips iU22) con una sonda lineal de 9-3 MHz. Se valoró el c-IMT y la existencia de placas. El c-IMT se midió en el ter-

cio distal de ambas arterias carótidas primitivas, 1 cm antes del bulbo. La placa se definió como un engrosamiento focal mayor de 0,5 mm dentro de la luz arterial o un engrosamiento >50% del espesor de la íntima adyacente o un grosor de la íntima >1,5 mm.

#### Evaluación de riesgo cardiovascular

El riesgo cardiovascular de los pacientes se determinó mediante el modelo SCORE y SCORE modificado para AR. Aquellos pacientes que en la ecografía carotídea presentaban placas y/o c-IMT >0,9 se clasifican como pacientes de muy alto riesgo cardiovascular independientemente del SCORE obtenido.

#### Análisis estadístico

Los datos de variables continuas se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Los datos para las variables categóricas se presentan como porcentajes. Los cambios en las variables cuantitativas antes y después del tratamiento se han comparado con el test de Student para muestras apareadas. Las variables categóricas se han comparado a través del test  $\chi^2$ .

Los análisis de correlación se han realizado mediante la correlación de Pearson (distribución normal) o de Spearman (distribución no normal). Los valores de P<0,05 se han considerado significativos. Para el análisis estadístico se ha utilizado el programa SPSS, versión 18.0, software (SPSS, Chicago, IL).

## Resultados

Hasta septiembre de 2015 se han incluido 14 pacientes *naives* a terapia biológica. En este artículo presentamos los resultados a 6 meses.

#### Variables demográficas-clínicas

La edad media de los 14 pacientes fue de 47 $\pm$ 14 años. El 64,3% fueron mujeres. El 21,4% de los pacientes incluidos eran hipertensos y el 64,3% eran fumadores. Los valores del resto de variables se muestran en la tabla 1.

#### Variables relacionadas con la enfermedad

La duración media de la enfermedad fue de 68 $\pm$ 71 meses (IC 10-240). El DAS 28-VSG basal medio fue de 4,41 $\pm$ 1, el número de articulaciones tumefactas medio de 3 $\pm$ 2, el número de articulaciones dolorosas medio de 4 $\pm$ 3 y la escala visual analógica (EVA) de la enfermedad determinada por el paciente de 7 $\pm$ 2.

El 71,5% presentaron factor reumatoide positivo y anticuerpos antipéptido citrulinado. El 64,3% de los pacientes incluidos en el estudio tomaban fármacos modificadores de la enfermedad (FAMES) asociados a la terapia biológica. La dosis media de prednisona fue de 3,7 $\pm$ 2,5 mg.

Sólo el 44,4% de los pacientes presentaron respuesta EULAR al tratamiento a los 6 meses.

#### Variables analíticas y relacionadas con el metabolismo óseo

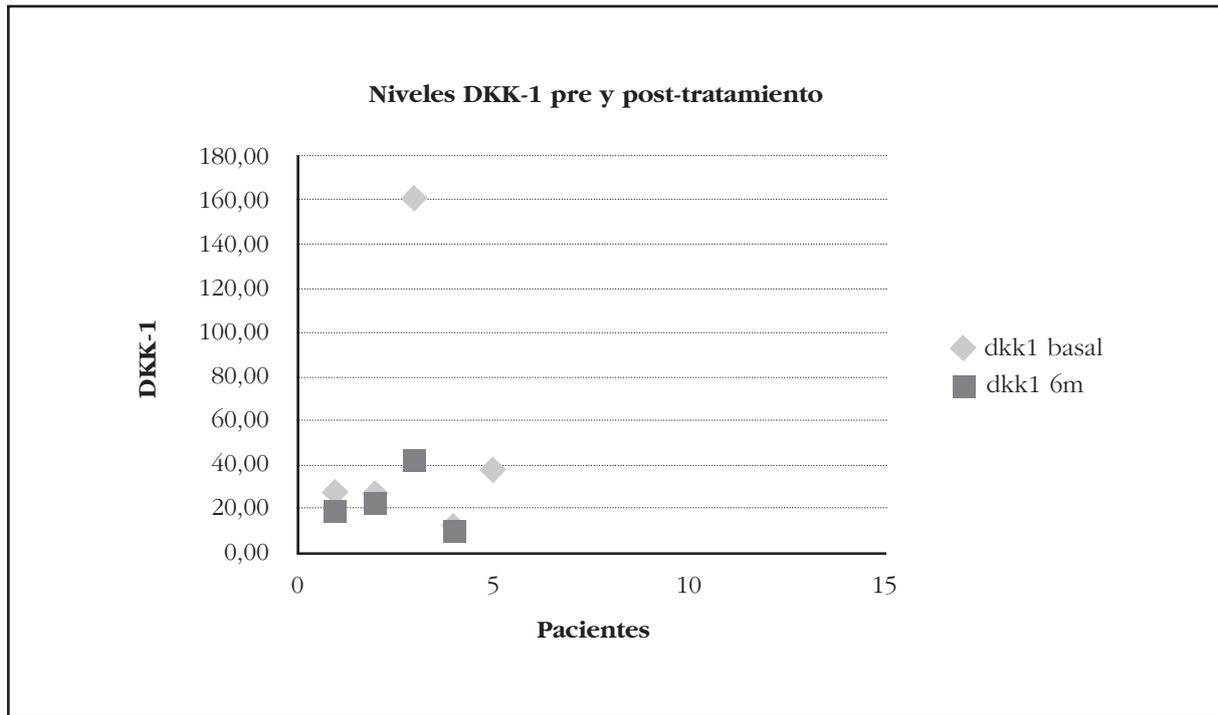
Los valores de estas variables se representan en la tabla 2.

Tabla 2. Variables bioquímicas y relacionadas con el metabolismo óseo, actividad de la enfermedad y riesgo cardiovascular basal y a los 6 meses

	<b>Basal (N=14)</b>	<b>6 meses (N= 9)</b>
Colesterol total (mg/dl), media $\pm$ DE	198,85 $\pm$ 37,09	195 $\pm$ 55,91
HDL-colesterol (mg/dl), media $\pm$ DE	62,71 $\pm$ 24,32	52 $\pm$ 24,06
LDL- colesterol (mg/dl), media $\pm$ DE	129,57 $\pm$ 34,24	138 $\pm$ 59,07
Triglicéridos (mg/dl), media $\pm$ DE	117,85 $\pm$ 43,95	154 $\pm$ 76,80
PCR (mg/L), media $\pm$ DE	8,62 $\pm$ 10,50	6,66 $\pm$ 9,34
PTH-i (pg/ml), media $\pm$ DE	37,85 $\pm$ 12,76	52,01 $\pm$ 14,88
25-OH vitamina D (ng/dl), media $\pm$ DE	18,70 $\pm$ 6,89	28,40 $\pm$ 19,51
FAO ( $\mu$ g/dl), media $\pm$ DE	11,82 $\pm$ 4,20	11,50 $\pm$ 4,13
Osteocalcina (ng/ml), media $\pm$ DE	13,73 $\pm$ 6,75	19,27 $\pm$ 11,54
CTX (ng/ml), media $\pm$ DE	0,26 $\pm$ 0,11	0,37 $\pm$ 0,21
<b>DXA central</b>		
- Normal, n (%)	11 (78,6)	
- Osteopenia, n (%)	0 (0)	
- Osteoporosis, n (%)	1 (7,1)	
DAS 28-VSG, media $\pm$ DE	4,41 $\pm$ 0,99	3,38 $\pm$ 1,51
EVA-enfermedad, media $\pm$ DE	7 $\pm$ 2	3,66 $\pm$ 2,82
<b>SCORE</b>		
- Bajo, n (%)	6 (42,9)	5 (55,6)
- Moderado, n (%)	8 (57,1)	3 (33,3)
- Alto, n (%)	0 (0)	1 (11,1)
- Muy alto, n (%)	0 (0)	0 (0)
<b>SCORE modificado</b>		
- Bajo, n (%)	6 (42,9)	5 (55,6)
- Moderado, n (%)	6 (42,9)	2 (22,2)
- Alto, n (%)	2 (14,3)	1 (11,1)
- Muy alto, n (%)	0 (0)	1 (11,1)
<b>SCORE-ecografía</b>		
- Bajo, n (%)	5 (35,7)	5 (55,6)
- Moderado, n (%)	1 (7,1)	2 (22,2)
- Alto, n (%)	1 (7,1)	1 (11,1)
- Muy alto, n (%)	7 (50)	1 (11,1)
c-IMT derecha (mm), media $\pm$ DE	0,54 $\pm$ 0,18	0,51 $\pm$ 0,10
c-IMT izquierda (mm), media $\pm$ DE	0,64 $\pm$ 0,20	0,49 $\pm$ 0,08
Placas carotideas, n (%)	7 (50)	2 (25)

DE: desviación estándar; PCR: proteína C reactiva; FAO: fosfatasa alcalina ósea; CTX: telopéptido C-terminal del colágeno tipo I; c-IMT: grosor íntima-media carotídea.

Figura 1. Cambios en las concentraciones de DKK1 tras el tratamiento biológico



#### *Correlación entre remodelado óseo, DKK1, actividad de la enfermedad y c-IMT*

No se encontró correlación significativa entre la actividad de la enfermedad medida mediante DAS 28-VSG y los niveles de fosfatasa alcalina, osteocalcina, CTX o DKK1. Tampoco observamos ninguna relación entre los marcadores de remodelado o las concentraciones de DKK1 y el grosor de la íntima media.

No encontramos asociación entre la actividad de la enfermedad medida por DAS 28-VSG y el riesgo cardiovascular evaluado mediante SCORE y SCORE modificado.

#### *Cambios en DKK1 tras el tratamiento y relación con parámetros de la enfermedad*

Encontramos disminución en los niveles de DKK1 tras el inicio de la terapia biológica (basal:  $53,12 \pm 60,43$  pg/ml vs. 6 meses  $23,2 \pm 13,5$  pg/ml,  $p=0,307$ ) que no alcanzó significación estadística (Figura 1). No encontramos asociación estadísticamente significativa entre la disminución de los niveles de DKK-1 y respuesta EULAR de la enfermedad al tratamiento. En cuanto a los marcadores de remodelado óseo, se detectó un aumento en los niveles de osteocalcina y CTX que no alcanzó la significación estadística.

### **Discusión**

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre la pérdida de densidad mineral ósea, la calcificación vascular y la morbimortalidad cardiovascular<sup>7-9</sup>. La vía Wnt está implicada en la regulación de la calcificación vascular y en la diferenciación de las células musculares lisas a osteoblastos<sup>10</sup>. Se ha demostrado un aumento en

la expresión de DKK1 en placas ateroscleróticas carotídeas<sup>11,12</sup> así como un aumento de las concentraciones séricas de esclerostina en pacientes con enfermedad aterosclerótica y diabetes tipo 2<sup>15</sup>.

Por otra parte, en pacientes con AR se han demostrado niveles circulantes de DKK1 elevados que se han relacionado con daño radiológico<sup>14-18</sup>, y la expresión de esclerostina parece correlacionarse de manera positiva con los niveles de DKK1<sup>19</sup>.

Nuestro estudio mostró una disminución en los niveles de DKK-1 a los 6 meses de tratamiento, lo que está en concordancia con lo publicado recientemente por Briot y cols.<sup>20</sup>. En este artículo, los pacientes con AR activa tratados con tocilizumab experimentaron un descenso de las concentraciones de DKK1 así como un descenso de los marcadores de formación. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos un aumento en los marcadores de formación y de resorción post-tratamiento, aunque no alcanzó significación estadística. Nuestro limitado tamaño muestral sin duda ha influido en nuestros resultados.

Como conclusión, podemos decir que en pacientes con AR activa tratados con terapia biológica hemos observado un descenso no significativo de las concentraciones séricas de DKK1 y un aumento significativo de la resorción. La ampliación tanto de los sujetos de estudio como de las determinaciones bioquímicas pendientes nos permitirán en un futuro próximo establecer de forma más precisa esta asociación, así como la relación entre DKK1, remodelado óseo, terapia biológica y enfermedad cardiovascular en pacientes con AR.

**Conflicto de intereses:** los autores declaran no tener conflictos de intereses en relación con este artículo.

## Bibliografía

1. González-Gay M, González-Juanatey C, Martín J. Rheumatoid arthritis: A disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35:8-17.
2. González-Gay M, González-Juanatey C, López-Díaz MJ, Piñeiro A, García-Porrua C, Miranda-Fillooy JA, et al. HLA-DRB1 and persistent chronic inflammation contribute to cardiovascular events and cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;57:125-32.
3. Baron R, Rawadi G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 2007;148:2635-43.
4. Towler DA, Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Loewy OP. Osteogenic regulation of vascular calcification. *Ann NY Acad Sci* 2006;1068:327-33.
5. Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy OP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 2005;115:1210-20.
6. Walsh C, Gravallese EM. Bone loss in inflammatory arthritis: mechanisms and treatment strategies. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:419-27.
7. Tanko LB, Christiansen C, Cox DA, Geiger MJ, Mc Nabb MA, Cummings SR. Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2005;20:1912-20.
8. Hyder JA, Allison MA, Wong N, Papa A, Lang TF, Sirlin C, et al. Association of coronary artery and aortic calcium with lumbar bone density: the MESA Abdominal Aortic Calcium Study. *Am J Epidemiol* 2009;169:186-94.
9. Naves M, Rodriguez-Garcia M, Diaz-Lopez JB, Gomez-Alonso C, Cannata-Andia JB. Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteopor Int* 2008;19:1161-6.
10. Tsaousi A, Mill C, George SJ. The Wnt pathways in vascular disease: lesson from vascular development. *Curr Opin Lipidol* 2011;22(5):350-7.
11. Towler DA, Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Loewy AP. Osteogenic regulation of vascular calcification. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:327-33.
12. Ueland T, Otterdal K, Lekva T, et al. Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1228-34.
13. Morales-Santana S, García-Fontana B, García-Martín A, Rozas-Moreno P, García-Salcedo JA, Reyes-García R, Muñoz-Torres M. Atherosclerotic disease in type 2 diabetes is associated with an increase in sclerostin levels. *Diabetes Care* 2013;36:1667-74.
14. Voorzanger-Rousselot N, Ben-Tabassi NC, Garnero P. Opposite relationships between circulating DKK1 and cartilage breakdown in patients with rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1513-4.
15. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007;13:156-63.
16. Wang SY, Liu YY, Ye H, Guo JP, Li R, Liu X, et al. Circulation Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011;38:821-7.
17. Liu YY, Long L, Wang SY, Guo JP, Ye H, Cui LF, et al. Circulation Dickkopf-1 and osteoprotegerin in patients with early and longstanding rheumatoid arthritis. *Chin Med J (Eng)* 2010;123:1407-12.
18. Garnero P, Tabassi NC, Voorzanger-Rousselot N. Circulating dickkopf-1 and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis treated with etanercept. *J Rheumatol* 2008;35:2313-15.
19. Heiland GR, Zwerina K, Baum W, Kireva T, Distler JH, Grisanti M, et al. Neutralisation of DKK1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Ann Rheum Dis* 2010;69:2152-9.
20. Briot K, Rouanet S, Schaefferbeke T, Etchepare F, Gaudin P, Perdriger A, et al. The effect of tocilizumab on bone mineral density, serum levels of Dickkopf-1 and bone remodeling markers in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2015;82:109-15.

**Pavón de Paz I<sup>1</sup>, Gil Fournier B<sup>2</sup>, Navea Aguilera C<sup>1</sup>, Ramiro León MS<sup>2</sup>, Modroño Móstoles N<sup>1</sup>, Guijarro de Armas G<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Servicio de Endocrinología y Nutrición

<sup>2</sup> Servicio de Genética

Hospital Universitario de Getafe - Madrid (España)

## Osteogénesis imperfecta forma clásica no deformante. Comunicación de una nueva mutación en el gen COL1A1 en dos casos de la misma familia

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000100006>

Correspondencia: Isabel Pavón de Paz - Servicio de Endocrinología - Hospital Universitario de Getafe - Ctra. de Toledo, Km 12,5 - 28905 Getafe - Madrid (España)

Correo electrónico: pavonisa@yahoo.es

Fecha de recepción: 26/01/2016

Fecha de aceptación: 16/03/2016

### Resumen

La osteogénesis imperfecta (OI), es una patología poco frecuente y muy heterogénea desde el punto de vista clínico y genético. Su característica principal es la fragilidad ósea, habiéndose descrito varios tipos. Generalmente es causada por mutaciones en los genes que codifican para las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del procolágeno tipo 1 (COL1A1 y COL1A2) con herencia autosómica dominante.

Comunicamos los casos de dos pacientes (padre e hija) con OI cuyo estudio genético muestra una mutación en COL1A1 no conocida previamente: la delección de una Guanina, G(c.3524delG). Se repasan aspectos clínicos, de herencia y opciones reproductivas de los pacientes afectados.

**Palabras clave:** *osteogénesis imperfecta, estudio genético, gen COL1A1.*

# Classic non-deforming osteogenesis imperfecta. Report of a new mutation in the COL1A1 gene in two cases in the same family

## Summary

Osteogenesis imperfecta (OI), is a rare condition which is heterogeneous in clinical and genetic terms. Several types have been described and its main feature is bone fragility. It is generally caused by gene mutations in those genes which codify for the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  of the type 1 collagen (COL1A1 and COL1A2) with dominant autosomal heredity.

We report the case of two relatives (father and daughter) with OI whose genetic study shows a mutation in COL1A1 previously undetected: the deletion of a Guanine, G(c.3524delG). Clinical aspects, heredity and reproductive options of the patients affected are considered.

**Key words:** *osteogenesis imperfecta, genetic research, COL1A1 gene.*

## Introducción

La osteogénesis imperfecta (OI), también conocida como “la enfermedad de los huesos de cristal”, es una patología poco frecuente y muy heterogénea desde el punto de vista clínico y genético. Es debida a la mutación de genes que intervienen en la formación del colágeno tipo 1. Afecta a uno de cada 15.000-20.000 nacidos vivos. Aunque su característica principal y común es la fragilidad ósea, se han descrito varios tipos en función de sus características clínicas, radiológicas y genéticas<sup>1-3</sup>.

Generalmente la OI es causada por mutaciones heterocigotas en los genes que codifican para las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del pro-colágeno tipo 1 (genes COL1A1 y COL1A2) aunque también se han identificado otros genes implicados. Las mutaciones en los genes COL1A1 y COL1A2 se heredan con un patrón autosómico dominante<sup>1-4</sup>.

Comunicamos dos casos de sendos pacientes (padre e hija) afectados por una forma no deformante de OI (probablemente tipo 1 de Sillence) en los que el estudio genético muestra una mutación en el gen COL1A1 no conocida previamente. Se trata de una delección en heterocigosis de una Guanina, G(c.3524delG), no descrita en la bibliografía ni en las bases consultadas.

## Caso 1

Paciente varón de 65 años diagnosticado de OI a raíz de estudio de una hija también afectada. No presentaba antecedentes familiares previos de la enfermedad (Figura 1).

Refería antecedente de varias fracturas (en número aproximado de 6-7) durante la infancia y la adolescencia tras traumatismos mínimos, la primera del húmero a los 2 años de edad. Durante la edad adulta había tenido dos nuevas fracturas en codo y hombro. Todas habían sido tratadas de forma conservadora. Recibió tratamiento con calcio durante la infancia. También había presentado a lo largo de su vida múltiples esguinces y varias roturas musculares. Diagnosticado de otoesclerosis, había sido intervenido quirúrgicamente para estapedectomía de ambos oídos.

Fue remitido a nuestra consulta por osteoporosis detectada en densitometría ósea (DXA), que mostraba unas T-scores de -3,4 en columna lumbar (L1-L4), -3 en cuello femoral y -2,8 en fémur total. Se encontraba asintomático.

En la exploración física llamaba la atención una talla de 162 cm, escleras azules y presencia de dentinogénesis imperfecta. No presentaba deformidades torácicas, ni en columna dorsolumbar ni en miembros, salvo en codo derecho (postfractura). No se apreciaba hiperlaxitud.

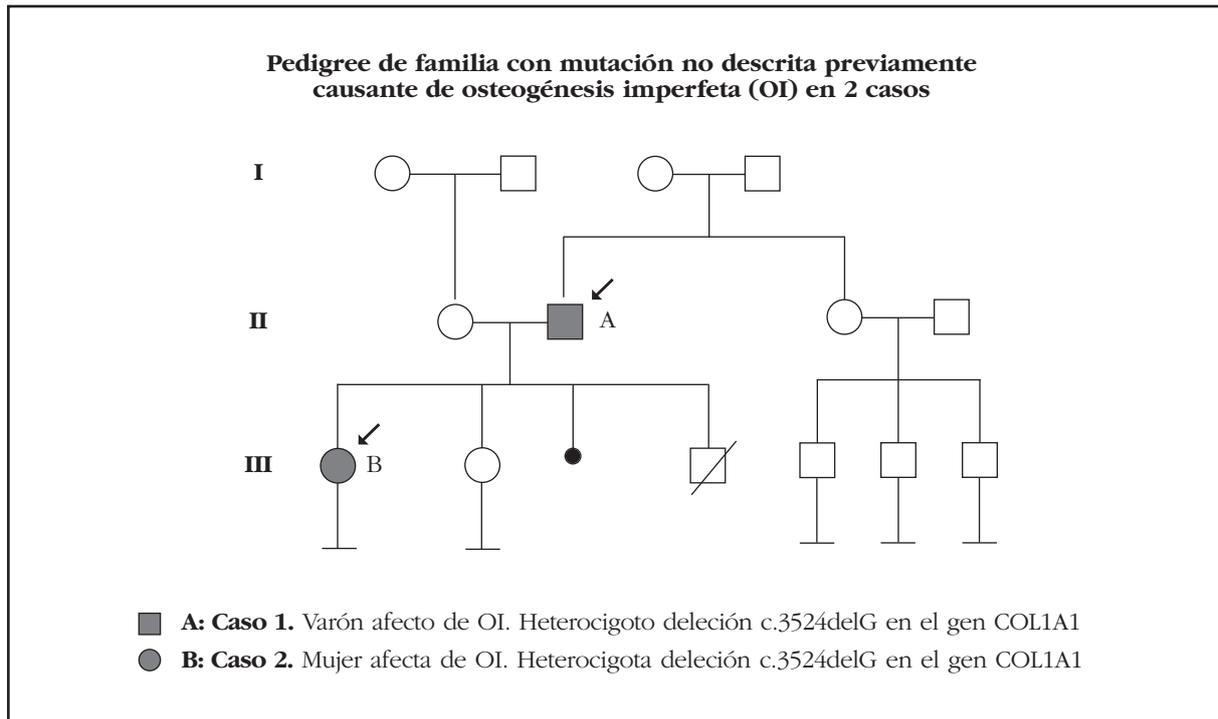
El estudio del metabolismo calcio-fósforo mostró niveles normales de calcio, fósforo, calciuria, y parathormona (PTHi). Los niveles de 25 hidroxivitamina D (25OHCC) estaban en rango de insuficiencia: 22 ng/ml (valores deseables >30 ng/ml). Los marcadores de remodelado óseo se encontraban en rango normal. Se descartaron otras causas endocrinas de osteoporosis.

Como parte de nuestro protocolo de estudio de pacientes afectados de OI, se realizó una radiografía de columna cervical que descartó impresión basilar, y una radiografía de tórax en la que se evidenciaron cambios degenerativos en columna; el ecocardiograma mostró una mínima dilatación de la aorta ascendente; las pruebas de función respiratoria resultaron normales, y en la ecografía de abdomen se descartó litiasis renal.

Se realizó estudio genético mediante secuenciación masiva por NGS (*Next-Generation Sequencing*) de los genes COL1A1, COL1A2, CRTAP y LEPRE1, detectándose en el gen COL1A1 una delección en heterocigosis de una Guanina (c.3524delG). Esta mutación da lugar a un cambio en la pauta de lectura, lo cual, a nivel de la proteína del colágeno, origina un codón de parada prematuro (p.Gly1175Valfs\*64) por lo que es probable que se trate de un cambio patógeno. Se detectaron otros cambios que fueron considerados polimorfismos.

Se recomendó tratamiento con alendronato semanal asociado a suplementos diarios de calcio y vitamina D, evidenciándose una discreta mejoría densitométrica tras 1 año de tratamiento (T-scores de -3,2 en columna lumbar, -2,9 en cuello femoral y -2,4 en fémur total).

Figura 1



## Caso 2

Paciente de 30 años, hija del paciente anterior (Figura 1), diagnosticada en la infancia de OI a raíz de una fractura de tibia desplazada seguida de fractura de clavícula tras traumatismos leves. Posteriormente presentó tres nuevas fracturas, la última a los 12 años, precisando una de ellas tratamiento quirúrgico (olécranon). Entre otros antecedentes de interés destacaban múltiples esguinces de tobillo y estapedectomía de oído derecho. Nunca había recibido tratamiento para su enfermedad y se encontraba asintomática.

La paciente deseaba conocer sus opciones reproductivas para tener un hijo libre de enfermedad.

En la exploración física destacaba una talla de 153 cm, escleras azules y dientes normales. No se apreciaron deformidades a ningún nivel.

Las pruebas de laboratorio resultaron normales, salvo los niveles de 25OHCC: 23 ng/ml, y también el resto del estudio realizado (radiografía de columna cervical, ecocardiograma, espirometría, ecografía abdominal). Los resultados de la densitometría mostraron una densidad mineral ósea normal: T-scores de -0,9 en columna lumbar (L1-L4), 0,0 en cuello femoral y -0,1 en fémur total. Se recomendó suplementación con vitamina D.

Se realizó estudio genético dirigido para la búsqueda de la mutación identificada en su padre, confirmando que la hija es portadora de la misma deleción en heterocigosis en el gen COL1A1 que presentaba su padre. Se realizó asesoramiento genético para informar sobre las posibles consecuencias para el afecto a su descendencia, de los resultados de un estudio genético y sus ventajas y riesgos, además de informarle de las posibles alternativas derivadas del análisis.

## Discusión

El colágeno tipo 1 es una proteína estructural que forma parte del hueso, la piel, los dientes, tendones, ligamentos y escleróticas. En general, la OI es causada por mutaciones heterocigotas en los genes que codifican las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del pro-colágeno tipo 1 (genes COL1A1 y COL1A2) aunque también se han identificado otros genes implicados en el procesamiento del colágeno tipo 1, como CRTAP y LEPRE. El gen COL1A1 está localizado en el cromosoma 17 en la región q21-q22, y el gen COL1A2 en el cromosoma 7 en la región q22. Las mutaciones en los genes COL1A1 y COL1A2 se heredan con un patrón autosómico dominante<sup>1-4</sup>, es decir, cada vez que un parental afecto concibe un hijo, existe en cada embarazo un 50% de posibilidades de transmitirle la enfermedad, independientemente del sexo.

Las alteraciones clínicas de la OI relacionada con los genes COL1A1 y COL1A2 son fundamentalmente fracturas en ausencia de traumatismo o tras traumas mínimos, dentinogénesis imperfecta variable y pérdida de audición en la edad adulta. La severidad de la presentación clínica depende del efecto de la mutación. Las mutaciones que inducen una disminución en la cantidad del colágeno sintetizado dan lugar a formas de enfermedad más leve que las que afectan a la estructura proteica<sup>5</sup>.

Existe un *continuum* desde la forma más grave, la perinatal-letal (tipo 2 de la clasificación de Sillence), individuos con deformidades muy severas, talla baja y alteración de la movilidad (tipos III y IV de Sillence), hasta pacientes prácticamente asintomáticos de estatura normal con dentinogénesis imperfecta y predisposición a fracturas, pero con expectativa de vida normal (tipo I de Sillence)<sup>5</sup>.

El diagnóstico de OI debe hacerse basándose en la historia familiar, la historia de fracturas, generalmente espontáneas o con traumatismos mínimos, la talla baja, a veces asociada a deformidades más o menos graves, y la presencia de otros datos clínicos como escleras azules o grises, dentinogénesis imperfecta, laxitud ligamentosa y pérdida de audición progresiva tras la pubertad. Los hallazgos radiológicos incluyen osteopenia u osteoporosis, presencia de huesos wormianos, deformidades óseas y fracturas o sus secuelas. Para confirmar el diagnóstico se recomienda realizar estudio genético molecular<sup>6,7</sup>.

Los dos casos descritos muestran una forma leve de OI, la más frecuente, con características comunes como la predisposición a las fracturas con traumatismos mínimos, la talla baja, las escleróticas azules, la hiperlaxitud ligamentosa con tendencia a esguinces y luxaciones y la hipoacusia de transmisión precoz, pero no comparten otros datos clínicos como la dentinogénesis imperfecta. En las formas leves es posible encontrar una densidad mineral ósea dentro de límites normales debido a que la DXA mide contenido mineral óseo y no de colágeno<sup>9</sup>. Está descrito que puede no existir una clara correlación genotipo-fenotipo incluso dentro de la misma familia<sup>6</sup>.

Los estudios genéticos de los genes COL1A1 y COL1A2 detectan anomalías en más del 90% de los individuos con OI de los tipos I, II, III y IV de Sillence. Su sensibilidad es similar a la del análisis cuantitativo y estructural del colágeno tipo 1 en cultivos de fibroblastos obtenidos de una biopsia de piel<sup>8</sup>.

Las mutaciones se encuentran con más frecuencia en el gen COL1A1 (hasta en un 70% de los casos) que en el gen COL1A2 y en ambos casos se heredan con patrón autosómico dominante o bien se comportan como mutaciones de *novo*. En total se han descrito más de 1.500 mutaciones diferentes. En nuestros pacientes el estudio detectó una delección en heterocigosis de una Guanina (c.3524delG) en el gen COL1A1. Esta mutación, no descrita previamente en la bibliografía hasta ahora, da lugar a un cambio en la pauta de lectura, lo cual a nivel de la proteína del colágeno, origina un codón de parada prematuro (p.Gly1175Valfs\*64), por lo que es muy probable que se trate de un cambio patógeno. Otros cambios detectados fueron considerados polimorfismos sin asociación clínica.

Las mutaciones de *novo* constituyen el 100% de los casos con forma perinatal-letal (tipo II de Sillence), casi el 100% en las formas progresivamente deformantes y aproximadamente el 60% de las formas clásicas no deformantes<sup>6</sup>. Por la historia familiar de nuestros pacientes, el padre sufrió una mutación de *novo* que fue transmitida a su hija con patrón autosómico dominante. Conociendo la forma de herencia se procedió a informar a la paciente y a hacer consejo genético, incluyendo discusión sobre potenciales riesgos y sobre posibles opciones reproductivas.

La hija (Caso 2) consulta acerca de la manera de poder tener un hijo libre de esta enfermedad. Gracias a que se ha identificado la mutación que

causa su OI se puede hablar de 3 opciones reproductivas: el Diagnóstico Genético Preimplantacional, tras un tratamiento de fertilización *in vitro*, que permite testar genéticamente los embriones y seleccionar los no afectados de OI para ser transferidos al útero; otra opción sería un tratamiento de fertilización *in vitro* con óvulos de donante. Esta técnica evita la gestación de un niño con OI, porque sustituye el gameto del progenitor afecto por la enfermedad por un gameto sano anónimo. Otra opción sería concebir un hijo y realizar un Diagnóstico Prenatal tras la obtención de células fetales, mediante biopsia de corion o amniocentesis genética, sobre las cuales se pueden dirigir estudios genéticos de OI (sólo cuando ya se conoce la mutación responsable de la enfermedad en esa familia, que será la que se buscará en el feto)<sup>10</sup>.

No está claramente establecido el tratamiento de elección en pacientes adultos con OI, pero varios trabajos han demostrado la eficacia de los bifosfonatos tanto orales como intravenosos<sup>11,12</sup>. Está por establecer la utilidad de otros fármacos como denosumab<sup>13</sup> y parathormona<sup>14</sup>.

## Bibliografía

1. Marini JC. Osteogenesis imperfecta: comprehensive management. *Adv Pediatr* 1988;35:391-6.
2. Plotkin H. Syndromes with congenital brittle bones. *BMC Pediatr* 2004;4:16-21.
3. Prockop DJ, Kivirikko KI. Heritable diseases of collagen. *N Engl J Med* 1984;31:376-86.
4. Gajko-Galicka A. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Acta Biochim Pol* 2002;49:433-41.
5. Van Dijk F, Sillence D. Osteogenesis imperfecta: Clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *Am J Med Genet A* 2014;164:1470-81.
6. Steiner RD, Adsit J, Basel D. COL1A1/2-Related Osteogenesis Imperfecta. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015.
7. Van Dijk FS, Byers PH, Dalgleish R, Malfait F, Maugeri A, Rohrbach M, et al. EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of osteogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet* 2012;20:11-9.
8. Van Dijk FS, Cobben JM, Kariminejad A, Maugeri A, Nikkels PGJ, van Rijn RR, et al. Osteogenesis imperfecta: a review with clinical examples. *Mol Syndromol* 2011;2:1-20.
9. Paterson CR, Mole PA. Bone density in osteogenesis imperfecta may well be normal. *Postgrad Med J* 1994;70:104-7.
10. Gil Fournier, B. Importancia del diagnóstico genético en la Osteogénesis Imperfecta. *Voces de cristal* 2009:30-2.
11. Shapiro JR, Thompson CB, Wu Y, Nunes M, Gillen C. Bone Mineral Density and Fracture Rate in Response to Intravenous and Oral Bisphosphonates in Adult Osteogenesis Imperfecta. *Calc Tissue Int* 2010;87:120-9.
12. Dwan K, Phillipi CA, Steiner RD, Basel D. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;7:CD005088.
13. Hoyer-Kuhn H, Netzer C, Koerber F, Schoenau E, Semler O. Two years' experience with denosumab for children with osteogenesis imperfecta type VI. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:145.
14. Orwoll ES, Shapiro J, Veith S, Wang Y, Lapidus J, Vanek C, et al. Evaluation of teriparatide treatment in adults with osteogenesis imperfecta. *J Clin Invest* 2014;124:491-8.

**Giner M<sup>1,2</sup>, Montoya MJ<sup>3</sup>, Vázquez MA<sup>3</sup>, Miranda C<sup>1</sup>, Miranda MJ<sup>1</sup>, Pérez-Cano R<sup>1,3</sup>**

1 Unidad de Metabolismo Óseo - UGC Medicina Interna - Hospital Universitario Virgen Macarena - Sevilla (España)

2 Departamento Citología e Histología Normal y Patológica - Facultad Medicina - Universidad de Sevilla (España)

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

## ¿Qué son los microARNs? Posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000100007>

Correspondencia: Mercè Giner - Departamento Citología e Histología Normal y Patológica - Facultad Medicina - Universidad de Sevilla - Avda. Dr. Fedriani, s/n - 41009 Sevilla (España)

Correo electrónico: [mginer@us.es](mailto:mginer@us.es)

Fecha de recepción: 17/07/2015

Fecha de aceptación: 17/11/2015

### Resumen

Los micro-ARN (miRs) son pequeñas moléculas de ARN no codificantes que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. Generalmente actúan sobre la expresión genética mediante el silenciamiento o degradación de los ARNm, y están implicados en la regulación de varios procesos biológicos, como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y en el desarrollo embrionario y tisular. Actualmente son un importante foco de interés para el estudio de diversas enfermedades como el cáncer o la diabetes *mellitus* tipo 2. A nivel del metabolismo óseo, están surgiendo diversos miRs implicados en su regulación, abriendo un campo de investigación importante para identificar nuevos biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad osteoporótica, de su evolución, así como para diseñar nuevas terapias farmacológicas.

**Palabras clave:** *epigenética, micro-ARN, biomarcadores y osteoporosis.*

## What are microRNAs? Potential biomarkers and therapeutic targets in osteoporosis

### Summary

Micro-RNAs (miRs) are small non-coding RNA molecules that regulate gene expression at post-transcriptional level. Generally, they act on gene expression by silencing or degrading mRNAs, and are involved in regulating various biological processes, such as cell differentiation, proliferation, apoptosis and in embryonic and tissue development. They are currently a major focus of interest in the study of various diseases such as cancer or type 2 diabetes mellitus. At level of bone metabolism, various miRs are emerging that are involved in their regulation, opening an important research field to identify new biomarkers for diagnosis of osteoporosis and its development, and to design new drug therapies.

**Key words:** *epigenetics, micro-RNA, biomarkers and osteoporosis.*

## Introducción

Los miRs fueron descubiertos en 1993 al estudiar la regulación del desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*<sup>1</sup>. Son pequeñas moléculas de ARN (21-23 nucleótidos), no codificantes para proteínas que constituyen una extensa familia de genes reguladores postranscripcionales. Están implicados en la regulación de varios procesos biológicos, como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y en el desarrollo embrionario y tisular<sup>2</sup>. Funcionan como un gen epigenético endógeno y, aunque generalmente silencian genes diferentes de aquellos de los cuales se han transcrito, existen también miRs con función promotora y/o coactivadora para otros genes<sup>3</sup>.

Desde su descubrimiento se han convertido en uno de los temas más estudiados en el campo de la regulación epigenética de las células, y actualmente se encuentra disponible gran cantidad de información que nos ha llevado a conocer mejor los procesos biológicos en los que están implicados. Todo ello ha hecho que recientemente sean un foco de interés para la medicina como dianas terapéuticas en multitud de enfermedades. Hasta el momento actual, han sido descritas más de 2.000 secuencias distintas de miRs en humanos, recogidas en la base de datos de miRBase (<http://www.mirbase.org>).

Los miRs representan solo un 2-3% del genoma humano, y se calcula que pueden regular la expresión de aproximadamente un 60% de los genes<sup>4</sup>. Un solo miR puede regular alrededor de 200 transcritos diferentes, pudiendo actuar cada uno en una vía celular distinta, así como un mismo ARNm puede ser regulado por múltiples miRs<sup>5,6</sup>.

La génesis de los miRs ha sido bien estudiada y caracterizada por varios autores<sup>7-9</sup>. En primer lugar, en el interior del núcleo los genes que codifican para miRs se transcriben en forma de precursores largos, dando lugar a los llamados miRs primarios, cuya longitud varía entre cientos de pares de nucleótidos. Este precursor es cortado por las ribonucleasas Drosha y Pasha/DGCR8 en una o más moléculas de ARN con forma de horquilla, transformándolo en premiRs de 60-70 nucleótidos. Los premiRs salen del núcleo hacia el citoplasma ayudados por la Exportina-5, donde tendrá lugar el proceso de maduración del miR. En el citoplasma, el premiR es transportado por el complejo RLC (RISC loading complex) formado por la ARNasa Dicer, TRBP (proteína de unión a ARN en respuesta a transactivación), PRKRA (proteína quinasa activadora dependiente de ARN) y Ago2. Este complejo produce el clivaje del premiR generando un dúplex con una cadena madura de miR y su complementaria. La cadena madura junto con Ago2 formarán el complejo RISC (complejo silenciador inducido por ARN) y la cadena complementaria será eliminada. RISC se une con una molécula de ARNm (generalmente en la región 3' no traducida) que posee una secuencia complementaria a su componente miR y corta el ARNm, lo que lleva a la degradación del ARNm o a modificar su traducción. Algunos miRs también sirven como guías para la metilación de secuencias complementarias;

ambos procesos afectan a la transcripción. La biogénesis y el mecanismo por el cual los miRs regulan la expresión se ilustra en la figura 1.

La secuencia complementaria entre el ARNm y el miR es de tan solo 7 nucleótidos, con lo que se cree que cada miR podría potencialmente aparearse con cientos de ARNm diferentes. Del mismo modo, una única molécula de ARN podría tener múltiples sitios de unión a miRs. La inhibición de la traducción debe requerir la unión de varios complejos RISC a la misma molécula de ARNm<sup>10</sup>.

## MicroARNs como biomarcadores

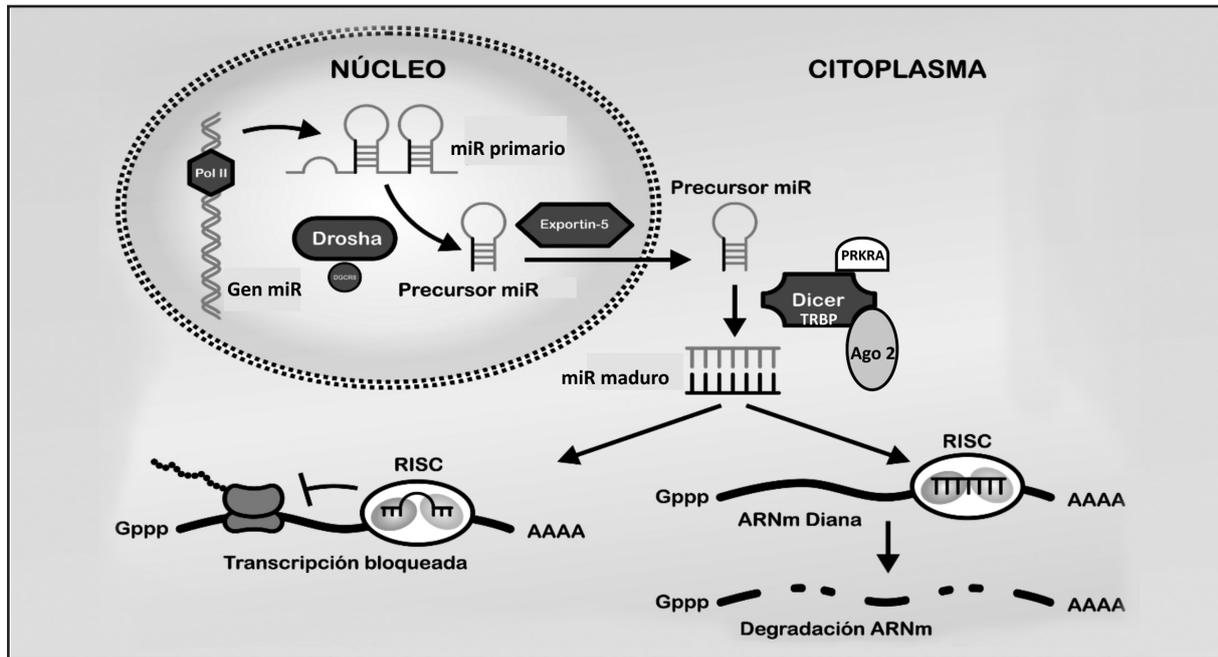
La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por una disminución de la masa ósea y una alteración de su calidad, con deterioro de la microarquitectura, que lleva al aumento del riesgo de fracturas con traumatismos mínimos. A pesar de que actualmente disponemos de varias herramientas para evaluar el riesgo de fracturas osteoporóticas, muchos pacientes con bajo riesgo sufren fracturas y a la inversa. Los miRs podrían añadir información para mejorar la predicción de este riesgo. Uno de los desafíos en el campo de la osteoporosis es la detección precoz de la enfermedad osteoporótica, lo que permitiría una actuación temprana y la obtención de mejores resultados en los tratamientos. Para ello es necesario desarrollar métodos no invasivos más eficaces que sean predictores de la pérdida de masa ósea, del riesgo de fractura y/o de la respuesta terapéutica, y que nos permitan monitorizar y valorar la eficacia del tratamiento farmacológico.

En este sentido, los miRs pueden ser unos nuevos biomarcadores de gran interés, ya que se ha demostrado que son resistentes a la actividad ARNasa en sangre periférica, lo que les confiere una elevada estabilidad en suero y plasma. Por otro lado, son reproducibles y tienen una elevada especificidad tisular entre individuos<sup>11,12</sup>. Conocemos que los niveles de expresión de varios miRs varían con el envejecimiento, y que un miR específico puede tener un efecto positivo y negativo en una misma célula dependiendo de su estado de diferenciación<sup>13</sup>. Además, ya están descritas distintas alteraciones en la expresión de los miRs fuertemente relacionadas con la aparición y desarrollo de enfermedades como el cáncer, diabetes *mellitus* tipo 2, Alzheimer, osteoartritis, etc.<sup>14,15</sup>, y su cuantificación ya está siendo utilizada como biomarcadores en el diagnóstico y progresión de dichas enfermedades<sup>16-18</sup>.

En estos últimos años han empezado a describirse distintos miRs relacionados con la enfermedad osteoporótica y/o el riesgo de fractura<sup>14,19-20</sup>, aunque todavía los datos son escasos.

El miR-2861 ha sido el primer miR al que se le ha atribuido una implicación clínica en la osteoporosis humana<sup>21</sup>. El miR-2861 tiene como molécula diana una histona deacetilasa (HDAC5) la cual regula de manera negativa RunX2. Mutaciones en el *locus* que lo codifica inducen osteoporosis, y animales tratados con inhibidores de miR-286 presentan un fenotipo de baja masa ósea. Posteriormente se han descrito otros miRs que pueden desempeñar un papel importante en la regulación del metabo-

Figura 1. Biogénesis del micro-ARN



lismo óseo teniendo como diana a varios genes que codifican factores de transcripción cruciales en el remodelado óseo; sin embargo, aún se desconoce cuáles de ellos están relacionados con una mayor o menor tasa de recambio óseo y baja masa ósea. En las figuras 2a y 2b podemos observar los distintos miRs que actúan tanto a nivel de células de estirpe osteoblástica como osteoclastica<sup>22-28</sup>.

Entre los diversos miRs descritos hasta el momento actual cabe destacar el papel de algunos de ellos como posibles biomarcadores del riesgo de fractura osteoporótica en nuestra población. En concreto, encontramos que miR-21, miR-23a, miR-24, miR-25, miR-100, miR-125b, miR-518f y miR-328-3p se encuentran sobre-expresados en el suero de mujeres con fractura osteoporótica, mientras que la expresión de miR-187 se ve disminuida<sup>1,13,29</sup>. Otros estudios apuntan a miR-194-5p y miR-133a como posibles biomarcadores asociados a la enfermedad osteoporótica, demostrando que en el suero de mujeres postmenopáusicas existen niveles más elevados de dichos miRs y, además, se correlacionan negativamente con la DMO de columna y de cuello de fémur<sup>20,30</sup>.

A pesar de que cada vez conocemos un mayor número de miRs implicados en el metabolismo óseo y que conocemos mejor la función biológica y su mecanismo de acción, todavía desconocemos el mecanismo previo por el cual el miR llega a la circulación sanguínea, y su función en sangre tampoco es del todo bien conocida. Futuros estudios que aclaren ambos aspectos nos podrán ayudar a buscar nuevos y mejores biomarcadores y seleccionar con más criterio los ya propuestos.

También tenemos que tener en cuenta que, para el uso correcto de los miRs como biomarcadores en la práctica clínica, es necesario establecer previamente una estandarización metodológi-

ca en el proceso de recogida de la muestra y en las técnicas de normalización de la PCR *real-time*.

### Los miRs como dianas terapéuticas

Los miRs juegan un papel fundamental en la regulación del metabolismo óseo. Variaciones en sus expresiones génicas pueden producir alteraciones en el remodelado óseo y tener consecuencias negativas en el esqueleto. Todo ello abre una nueva ventana de posibilidades para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de diversas patologías óseas como la osteoporosis.

Actualmente la industria farmacéutica está investigando dianas farmacológicas dirigidas a normalizar los niveles tisulares de miRs específicos, silenciando aquellos que se sobre-expresan o aumentando sus niveles en aquellos que presentan un déficit. Los miRs pueden ser silenciados mediante las moléculas llamadas anti-miARNs (AMOs). Éstas son oligonucleótidos no codificantes sintéticos que inhiben competitivamente la interacción entre los miRs y su ARNm diana. Los AMOs más ampliamente utilizados son: 2'-O-methyl AMO, 2'-O-methoxyethyl AMO y el Locked Nucleic Acids (LNAs)<sup>31</sup>. Por otro lado, estamos observando a menudo que los miRs trabajan en grupo para regular los procesos patológicos, de manera que en lugar de diseñar distintos anti-miRs para un mismo tratamiento, se están desarrollando los llamados miRs "esponja", los cuales son capaces de fijar numerosos miRs a la vez.

Contrariamente, si lo que queremos es restaurar los niveles disminuidos de un miR, la estrategia es administrar miRs miméticos (miRmímics), que son moléculas de ARN de doble cadena alterados químicamente que imitan a los miRs endógenos. Al ser introducidos en las células, los miRmímics son reconocidos por la maquinaria de la biogénesis de los miRs y procesados como tal.

Figura 2a. Dianas y función de los micro-ARN sobre la diferenciación y proliferación de los osteoblastos

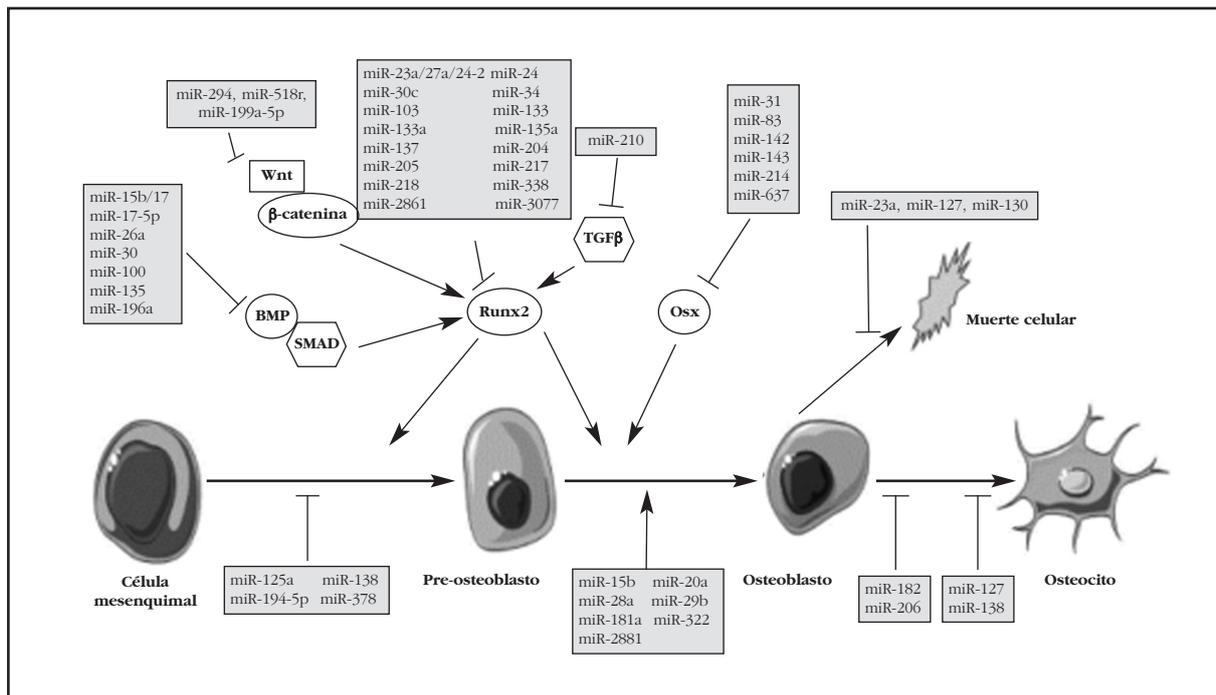
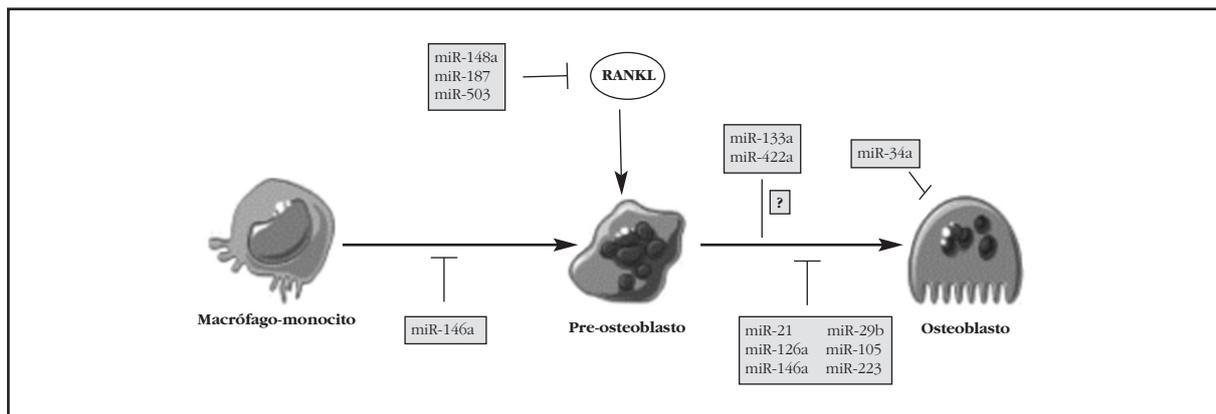


Figura 2b. Dianas y función de los micro-ARN sobre la diferenciación y proliferación de los osteoclastos



El uso de miRs como agentes farmacológicas ya está siendo habitual en algunas patologías tumorales y víricas<sup>31</sup>. En el momento actual, existen distintas moléculas farmacológicas con acción inhibitoria de miRs que están siendo utilizadas en fase II y III para el tratamiento de la hepatitis C, miR-1 (miravirsin)<sup>32</sup> y RG-101<sup>33</sup>.

En cuanto al campo del metabolismo óseo, los avances en terapia son menores. Únicamente podemos encontrar algunos estudios aislados que trabajan en modelos celulares o de animales. Cabe destacar un estudio reciente publicado en Nature en el que se señala al miR-34a como un nuevo supresor de la formación de osteoclastos y reabsorción ósea, lo que conlleva importantes implicaciones para el tratamiento de la osteoporosis o metástasis óseas. En este estudio se muestra cómo ratones con niveles aumentados de miR-34a tienen una mayor densidad ósea y menor tasa de fracturas óseas. Tras la inyección de nanopartículas que contienen el microARN,

se reduce tanto la pérdida de masa ósea en los ratones con osteoporosis postmenopáusia como la metástasis ósea en modelos de ratón de cáncer de mama o piel<sup>19</sup>. Wang *et al.* inyectaron anti-miR-214 en ratones y también observaron una menor pérdida de la masa ósea en los animales tratados<sup>15</sup>. Actualmente existen dos grandes limitaciones para el uso de los miRs como agentes farmacológicos. La primera es que un mismo miR suele tener diferentes genes diana a la vez y, además, puede comportarse como inhibidor o promotor, dependiendo del gen diana y del estadio de diferenciación celular del momento. Esta complejidad explica las dificultades en la predicción del espectro de acción y de los perfiles de toxicidad asociados a la terapia con miRs. Para evitar este aspecto, recientes investigaciones se centran en comprobar la estabilidad de los miRs y dirigir su acción a los tejidos o células diana. La segunda limitación es que los miRs no modificados pueden desencadenar reacciones inespecíficas del

interferón en los tejidos; la presencia de anti-miR o miRmímics modula la expresión de genes estimuladores del interferón, provocando alteraciones en la respuesta inmunológica.

### Conclusiones

1. El papel de los miRs en la regulación génica es fundamental. Están implicados en la regulación de varios procesos biológicos como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y en el desarrollo embrionario y tisular.

2. La expresión diferencial de los miRs induce cambios en la mayoría de las etapas del desarrollo del esqueleto, de manera que el proceso de remodelado óseo también se ve regulado por distintos miRs.

3. El estudio de los distintos perfiles diferenciales de la expresión de los miRs en las patologías del metabolismo óseo nos conducen a identificar nuevos biomarcadores de la enfermedad osteoporótica y de su evolución.

4. Teniendo en cuenta que los miRs tienen un papel crucial en el tejido óseo, su mejor conocimiento nos puede llevar a tener nuevas dianas terapéuticas.

5. La mejor comprensión de la biogénesis de los miRs y su papel en los procesos patogénicos nos ayudará a tener nuevas herramientas en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad osteoporótica, así como nuevas dianas terapéuticas.

### Bibliografía

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;3;75:843-54.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;16;431:350-5.
- Garnero P. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. *Bone* 2014;66:46-55.
- Cho WC. MicroRNAs as therapeutic targets and their potential applications in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16:747-59.
- Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005;37:495-500.
- Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2009;7:147-54.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004;432:235-40.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004;118:57-68.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20.
- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008;3:e3148.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10513-8.
- Wang X, Guo B, Li Q, Peng J, Yang Z, Wang A, et al. miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat Med* 2013;19:93-100.
- Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, et al. Five freely circulating miRNAs and bone tissue miRNAs are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2014;29:1718-28.
- Borgonio Cuadra VM, González-Huerta NC, Romero-Córdoba S, Hidalgo-Miranda A, Miranda-Duarte A. Altered expression of circulating microRNA in plasma of patients with primary osteoarthritis and in silico analysis of their pathways. *PLoS One*. 2014 Jun 5;9:e97690.
- Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 2010;101:2087-92.
- Chien HY, Lee TP, Chen CY, Chiu YH, Lin YC, Lee LS, et al. Circulating microRNA as a diagnostic marker in populations with type 2 diabetes mellitus and diabetic complications. *J Chin Med Assoc* 2015;78:204-11.
- Jingsheng S, Yibing W, Jun X, Siqun W, Jianguo W, Feiyan C, et al. MicroRNAs are potential prognostic and therapeutic targets in diabetic osteoarthritis. *J Bone Miner Metab* 2015;33:1-8.
- Krzyszinski JY, Wei W, Huynh H, Jin Z, Wang X, Chang TC, et al. miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature* 2014;512:431-5.
- Li H, Wang Z, Fu Q, Zhang J. Plasma miRNA levels correlate with sensitivity to bone mineral density in postmenopausal osteoporosis patients. *Biomarkers* 2014;18:1-4.
- Li H, Xie H, Liu W, Hu R, Huang B, Tan YF, et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest* 2009;119:3666-77.
- Kim KM, Lim SK. Role of miRNAs in bone and their potential as therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol* 2014;16:133-41.
- Eskildsen T, Taipaleenmäki H, Stenvang J, Abdallah BM, Ditzel N, Nossent AY, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:6139-44.
- Cao Z, Moore BT, Wang Y, Peng XH, Lappe JM, Recker RR, et al. MiR-422a as a potential cellular microRNA biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PLoS One* 2014;9:e97098. doi:10.1371/journal.pone.0097098. eCollection 2014.
- Zuo B, Zhu J, Li J, Wang C, Zhao X, Cai G, et al. MicroRNA-103a functions as a mechanosensitive microRNA to inhibit bone formation through targeting Runx2. *J Bone Miner Res* 2015;30:330-45.
- Wang Y, Li L, Moore BT, Peng XH, Fang X, Lappe JM, et al. MiR-133a in human circulating monocytes: a potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis. *PLoS One* 2012;7:e34641.
- Tang P, Xiong Q, Ge W, Zhang L. The role of microRNAs in osteoclasts and osteoporosis. *RNA Biol* 2014;11:1355-63.
- Ell B, Kang Y. MicroRNAs as regulators of bone homeostasis and bone metastasis. *Bonekey Rep* 2014;3:549.
- Garmilla-Ezquerria P, Sañudo C, Delgado-Calle J, Pérez-Núñez MI, Sumillera M, Riancho JA. Analysis of the bone microRNome in osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* 2015;96:30-7.
- Meng J, Zhang D, Pan N, Sun N, Wang Q, Fan J, et al. Identification of miR-194-5p as a potential biomarker for postmenopausal osteoporosis. *Peer J* 2015 May 21;3:e971. doi: 10.7717/peerj.971. eCollection 2015.
- van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. Developing microRNA therapeutics. *Circ Res* 2012;110:496-507.
- Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 2013;368:1685-94.
- Regulus Therapeutics: RG-101 Targeting miR-122 for HCV [Internet]. A leading microRNA Therapeutics Company; [actualizado en 2015; acceso 1 julio 2015]. Disponible en <http://www.regulurx.com/therapeutic-areas/rg-101/>.

## Normas de publicación: Información para los autores

### 1. INFORMACIÓN GENERAL. POLÍTICA EDITORIAL

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

La Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral publica trabajos en español, que serán traducidos al inglés, 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.

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

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

Los autores, si lo desean, podrán proponer al menos 3 posibles revisores externos, de quienes, además del nombre y apellidos, se deberá incluir su correo electrónico y las razones por la que consideran que pueden evaluar objetivamente el artículo. También podrán indicar aquellos revisores que no desean que evalúen el manuscrito, debiendo justificar también este dato, si bien su manejo será absolutamente confidencial por parte del equipo directivo de la Revista.

Los juicios y opiniones expresados en los artículos publicados en la Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral son del autor o autores, y no necesariamente del Comité de Dirección. Tanto el Comité de Dirección como la SEIOMM declinan cualquier responsabilidad al respecto. Ni el Comité de Dirección ni la SEIOMM garantizan o apoyan ningún producto que se anuncie en la Revista, ni garantizan las afirmaciones realizadas por el fabricante sobre dicho producto o servicio.

### 2. ELABORACIÓN Y ENVÍO DE LOS MANUSCRITOS

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

dos 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](http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html)).

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

### 2.3.3. Introducción

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

### 2.3.4. Material y métodos

En este apartado se ha de especificar el lugar, el tiempo y la población del estudio. Los autores deben incluir información sobre cómo se realizó el diseño,

cómo fueron los sujetos seleccionados; sobre todas las técnicas, determinaciones analíticas y otras pruebas o mediciones realizadas. Todo ello con suficiente detalle como para que otros investigadores puedan reproducir el estudio sin dificultades.

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

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

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

### 2.3.5. Resultados

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

### 2.3.6. Discusión

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

### 2.3.7. Bibliografía

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

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

Pueden consultarse las abreviaturas de las revistas más utilizadas en el siguiente enlace de la Caltech Library:

<http://library.caltech.edu/reference/abbreviations>. Deben evitarse las referencias del estilo: "observaciones no publicadas", "comunicación personal" o similares. Los originales aceptados y no publicados en el momento de ser citados pueden incluirse como citas "En prensa".

Deben incluirse los nombres de los primeros 6 autores. De haber más, se incluirán los 6 primeros y a continuación "et al".

Como orientación acerca de las palabras clave, ver "Descriptorios en Ciencias de la Salud": <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/>

### 2.3.8. Tablas

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

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

### 2.3.9. Figuras

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

## 3. PROCESO DE REVISIÓN DE LOS MANUSCRITOS

### 3.1. Recepción de manuscritos

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

### 3.2. Primera evaluación

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

### 3.3. Revisión por pares

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

### 3.4. Duración del proceso de revisión

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

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

### **3.5. Avance on line**

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

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

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

## **4. NORMAS ESPECÍFICAS DE CADA SECCIÓN**

### **4.1. Originales**

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

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

### **4.2. Notas clínicas**

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

### **4.3. Originales breves**

Se considerarán originales breves a aquellos trabajos clínicos o experimentales que por sus características especiales (número reducido de observaciones, trabajos de investigación con objetivo y resultados muy concretos, estudios epidemiológicos descriptivos, entre otros) no puedan ser publicados como originales propiamente dicho, pero sí

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

### **4.4. Imágenes de Osteología**

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

### **4.5. Cartas al Editor**

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

### **4.6. Otras secciones**

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

#### **4.6.1. Revisiones**

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

#### **4.6.2. Editoriales**

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

#### **4.6.3. Documentos especiales**

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

## **5. TRANSMISIÓN DE LOS DERECHOS DE AUTOR**

### **5.1. Garantías del autor y responsabilidad**

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

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

### **5.2. Cesión de derechos de explotación**

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

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

## **6. LA ÉTICA EN LAS PUBLICACIONES**

Los potenciales conflictos de intereses de los autores deben ser discutidos en un documento separado. Es suficiente una carta remitida por correo electrónico del autor responsable de la correspondencia.

Los autores de artículos de investigación deben revelar cualquier afiliación con cualquier organización con un interés financiero, directo o indirecto,

en la materia o materiales relacionados con el manuscrito que pudieran influir sobre el trabajo publicado. En caso de duda sobre lo que podría ser considerado un conflicto de interés potencial, los autores deberían informar sobre todos los potenciales conflictos. Como las revisiones y editoriales están basados en la selección y la interpretación de la literatura, la revista espera que los autores de tales artículos no tengan ningún interés financiero en una compañía (o en la competencia) en la elaboración y discusión del artículo. La Información sobre potenciales conflicto de intereses será facilitada a los revisores y será publicada el manuscrito a discreción de los redactores.

## **7. CONFLICTO DE INTERESES**

Todos los autores deben revelar cualquier relación financiera y personal con otras personas, empresas u organizaciones que de manera poco apropiada podrían influir en su trabajo. Los ejemplos de conflictos de interés potenciales incluyen el empleo, consultas, la propiedad de acción, honorarios, pagos como experto, usos/registros evidentes, y subvenciones de cualquier tipo. Si no hay ningún conflicto de interés, los autores deben indicar: "no hay conflicto de intereses".

La remisión de un artículo implica que el trabajo descrito no ha sido publicado antes (excepto en forma de un resumen o como la parte de una conferencia publicada o la tesis académica o como una preimpresión electrónica, que ello no está en la consideración para la publicación en otra parte, que su publicación es aprobada por todos los autores y tácitamente o explícitamente por las autoridades responsables donde el trabajo fue realizado, y que, de ser aceptado, no será publicado en otra parte incluyendo electrónicamente en la misma forma, en inglés o en ninguna otra lengua, sin el consentimiento escrito del editor.

