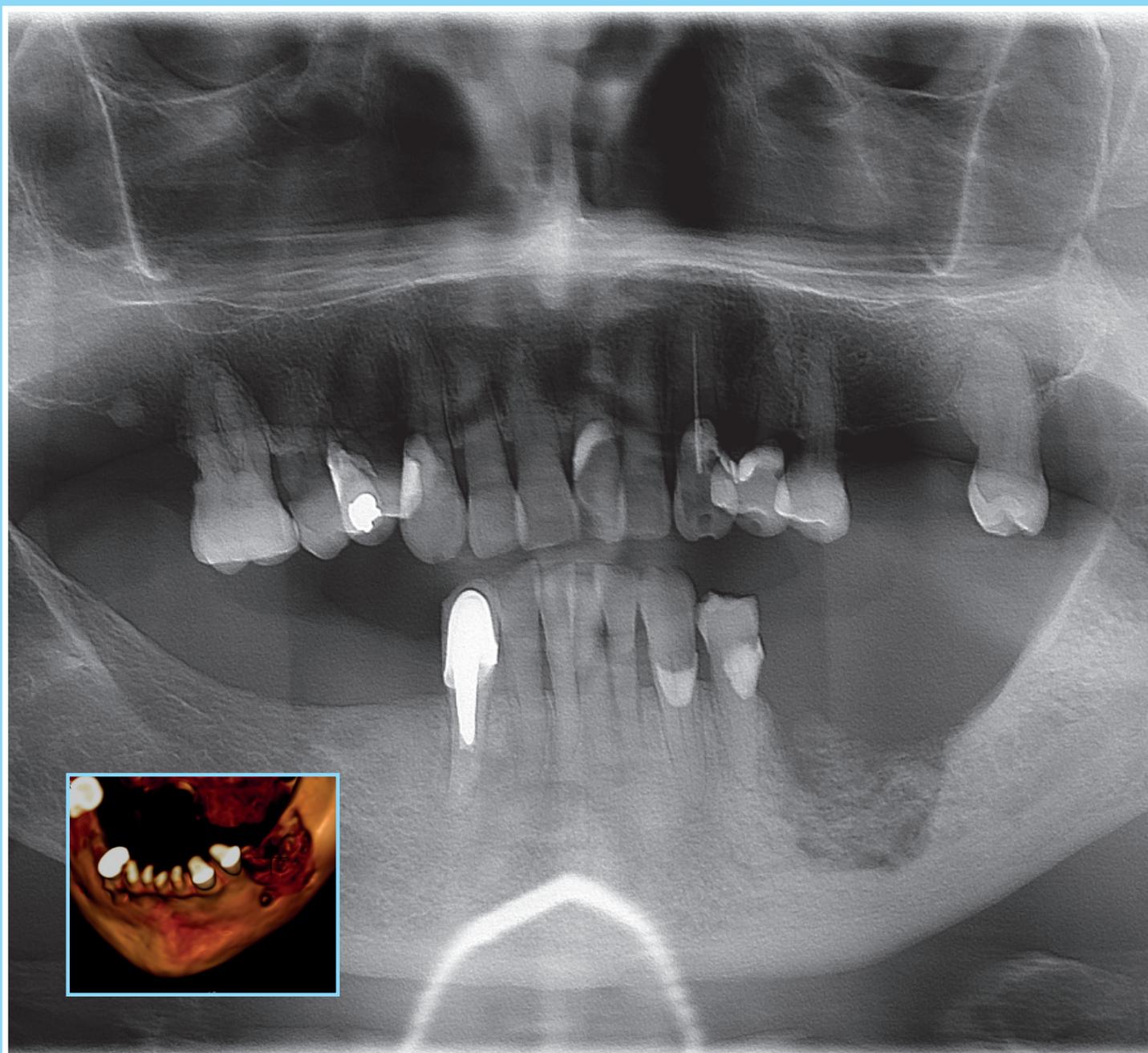




Revista de Osteoporosis
y Metabolismo Mineral

Órgano Oficial de Expresión Científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)
y de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral (SIBOMM)

www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com





Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

Órgano Oficial de Expresión Científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)
y de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral (SIBOMM)

© Copyright 2024. SEIOMM y © ARÁN EDICIONES, S.L.

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo fotocopias, grabaciones o cualquier sistema de recuperación de almacenaje de información, sin la autorización por escrito del titular del Copyright.

La editorial declina toda responsabilidad sobre el contenido de los artículos que aparezcan en esta publicación.
Publicación trimestral con 4 números al año

Esta publicación se encuentra incluida en Scopus, Web of Science, Scielo, DOAJ, ERIHPLUS, Redalyc, IBECs, Embase, Open J-Gate, Free Medical Journals, Sociedad Americana de Investigación Científica (SIIC), Google Academic, Medes, ÄZ3, e-revist@s, WorldCat, Latindex, EBSCO, Medic Latina, Dialnet, Safetylit, Mosby's, Emdcare, Academic Keys, CRUE, Hinari, REDIB, Emerging Sources Citation Index, British Library y ROAD.
Factor de impacto (JCR 2023): 0,8 / Q4

La *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* es una revista *open access*, lo que quiere decir que todo su contenido es accesible libremente sin cargo para el usuario individual y sin fines comerciales. Los usuarios individuales están autorizados a leer, descargar, copiar, distribuir, imprimir, buscar o enlazar a los textos completos de los artículos de esta revista sin permiso previo del editor o del autor, de acuerdo con la definición BOAI (Budapest Open Access Initiative) de *open access*.

Esta revista se publica bajo licencia CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).



La reutilización de los trabajos puede hacerse siempre y cuando el trabajo no se altere en su integridad y sus autores sean adecuadamente referenciados o citados en sucesivos usos, y sin derecho a la producción de obras derivadas.

ISSN (versión papel): 1889-836X. ISSN: (versión electrónica): 2173-2345
Depósito Legal: M-8158-2023

ARÁN EDICIONES, S.L.

C/ Orense, 11, 4.º - 28020 Madrid - Tel. 91 782 00 30 - Fax: 91 561 57 87
e-mail: osteoporosis@grupoaran.com
www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com
www.grupoaran.com



Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

Órgano Oficial de Expresión Científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)
y de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral (SIBOMM)

DIRECTORAS

Dra. Arancha Rodríguez de Gortázar
(Co-directora)

Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA). Facultad de Medicina. Universidad San Pablo CEU. Madrid (España)

Correo electrónico: argortazar@ceu.es

Dra. Marta Martín Millán
(Co-directora)

Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Departamento de Medicina y Psiquiatría. Universidad de Cantabria. Santander (España)

Correo electrónico: marta.martinm@scsalud.es

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Teresita Bellido

Directora del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas. Departamento de Medicina. División de Endocrinología y Metabolismo y Departamento de Ortopedia.

Investigadora en el Sistema de Atención Médica de Veteranos de Arkansas Central-John L. McClellan Memorial Hospital. Little Rock, Arkansas (Estados Unidos)

Correo electrónico: tmbellido@uams.edu

Dr. Jesús Delgado Calle

Department of Physiology and Cell Biology. University of Arkansas for Medical Sciences. Little Rock, Arkansas (EE. UU.)

Correo electrónico: JDelgadocalle@uams.edu

Dr. Manuel Díaz Curiel

Ex-Director de la Cátedra de Enfermedades Metabólicas Óseas. Universidad Autónoma Madrid. Consultor de Enfermedades Metabólicas Óseas. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. Presidente Honorífico de la Fundación Hispánica de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas (FHOEMO) (España)

Correo electrónico: mdcuriel@fjd.es

Dr. Adolfo Díez Pérez

Instituto Hospital del Mar de Investigación Médica (IMIM) y Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario del Mar. Universidad Autónoma de Barcelona.

CIBER en Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES). Instituto Carlos III. Barcelona (España)

Correo electrónico: Adiez@parcdesalutmar.cat

Dr. Luis Fernández de Castro

Skeletal Disorders and Mineral Homeostasis Section. National Institutes of Dental and Craniofacial Research. Bethesda, Maryland (EE. UU.)

Correo electrónico: luis.fernandezdecastro@nih.gov

Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero

Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla. Sevilla (España). Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (España)

Correo electrónico: mjgtr@us.es

Dr. Oswaldo Daniel Messina

Jefe de Reumatología. Hospital Argerich de Buenos Aires (Argentina). Profesor Asociado de Reumatología y Director de la carrera de postgrado en Reumatología.

Universidad de Buenos Aires (Argentina). Director Médico de Investigaciones Reumatológicas y Osteológicas de Buenos Aires (IRO SRL) (Argentina). Miembro del Board y del Comité de Asesores Científicos de la International Osteoporosis Foundation (IOF)

Correo electrónico: drosvaldodanielmessina@gmail.com

Dr. Manuel Naves Díaz

Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo óseo. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). REDinREN del ISCIII. Universidad de Oviedo. Oviedo (España)

Correo electrónico: mnaves.huca@gmail.com

Dra. Lilian I. Plotkin

Departamento de Anatomía y Biología Celular y Centro de Indiana para la Salud Musculoesquelética. Facultad de Medicina. Universidad de Indiana. Indianápolis, Indiana (Estados Unidos)

Correo electrónico: lplotkin@iupui.edu

Dr. José Antonio Riancho Moral

Departamento de Medicina y Psiquiatría. Universidad de Cantabria. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL). Santander (España)

Correo electrónico: rianchoj@unican.es

Dr. Manuel Sosa Henríquez

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS). Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral. Unidad Metabólica ósea. Hospital Universitario Insular. Las Palmas de Gran Canaria (España)

Correo electrónico: manuel.sosa@ulpgc.es



Revista de Osteoporosis
y Metabolismo Mineral



**JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE INVESTIGACIÓN ÓSEA Y DEL METABOLISMO MINERAL**

Presidente

Guillermo Martínez Díaz-Guerra

Vicepresidente

Mercedes Giner García

Secretaría

Marta Martín Millán

Tesorero

Manel Ciria Recasens

Vocales

Enric Duaso Magaña
María Pilar Aguado Acín

Sumario

Vol. 16 ■ Enero-Marzo ■ N.º 1

Originales

Osteocitos estimulados con PTHrP previenen la diferenciación de osteoclastos a través de la modulación de las citoquinas CXCL5 e IL-6
I. Tirado-Cabrera, J. Pizarro-Gómez, S. Heredero-Jiménez, E. Martín-Guerrero, J. A. Ardura, A. R. Gortázar 1

Limitations of immunodeficient mice as models for osteoporosis studies
Á. del Real, L. López-Delgado, C. Sañudo, B. García-Montesinos, C. Wert-Carvajal, E. Laguna, C. García-Ibarbia, J. A. Saiz-Aja, D. Ferreño, J. A. Casado, G. Menéndez, M. I. Pérez-Núñez, J. A. Riancho 10

Escenario Clínico y Toma de Decisiones

Osteonecrosis en el contexto de denosumab. Visión del médico especialista en metabolismo óseo y del médico especialista en maxilofacial
C. Gómez Alonso, J. L. Cebrián Carretero 16

Notas Clínicas

Nuevas formas de resistencia a la acción de los análogos de paratohormona humana
J. M. Morán López, M. Benítez Díaz, M. Piedra León, A. Cordero Pearson, F. J. Enciso Izquierdo, J. A. Amado Señaris 24

Síndrome de calcio-alcinos: ¿una causa rara de hipercalcemia?
S. Górriz Pintado, A. Vilchez Rodríguez, F. de la Fuente García, P. L. Estela Burriel 28

Imágenes de portada:

Ortopantomografía y reconstrucción 3D de una paciente con osteonecrosis mandibular tras extracción de dos piezas dentales, estando en tratamiento con denosumab desde hace 5 años. Lisis ósea y presencia de secuestro óseo.

Por cortesía de los Dres. Luis M. Junquera y Carlos Gómez de los Servicios de Cirugía Maxilofacial y Metabolismo Óseo del Hospital Universitario Central de Asturias.

Original

Osteocitos estimulados con PTHrP previenen la diferenciación de osteoclastos a través de la modulación de las citoquinas CXCL5 e IL-6

Irene Tirado-Cabrera, Joan Pizarro-Gómez, Sara Heredero-Jiménez, Eduardo Martín-Guerrero, Juan A. Ardura, Arancha R. Gortázar

Laboratorio de Fisiopatología Ósea. Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA)-Nemesio Díez. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina. Universidad San Pablo-CEU. CEU Universities. Campus Montepríncipe. Alcorcón, Madrid

Resumen

Los osteocitos responden a las fuerzas mecánicas controlando la función de osteoblastos y osteoclastos. La estimulación mecánica disminuye la apoptosis de los osteocitos y promueve la formación ósea. Sin embargo, la falta de carga mecánica induce a los osteocitos a favorecer la migración y la diferenciación osteoclástica, lo que en definitiva resulta en una pérdida de masa ósea. El cilio primario ha sido descrito como un importante mecanorreceptor en las células óseas. PTH1R, el receptor tipo 1 de la hormona paratiroidea (PTH) modula los efectos de los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos tras su activación por la PTH o la proteína relacionada con la PTH (PTHrP) en células osteoblásticas. Recientemente se ha descrito que la estimulación mecánica en osteocitos inhibe el reclutamiento y diferenciación de osteoclastos a través de un mecanismo dependiente de PTH1R y del cilio primario. El estímulo mecánico en osteocitos induce la traslocación de PTH1R al cilio primario en osteocitos MLO-Y4. En este trabajo planteamos estudiar si la PTHrP reproduce los efectos observados con el estímulo mecánico en cuanto a la relocalización del receptor al cilio primario y si es también capaz de inhibir la diferenciación de osteoclastos a través de la regulación de las citoquinas CXCL5 e IL-6. Nuestros resultados muestran que el estímulo con PTHrP (1-37) desencadena una movilización significativa de PTH1R a lo largo del cilio primario en las células osteocíticas MLO-Y4. Además, se observa que la PTHrP inhibe la diferenciación de osteoclastos a través de las citoquinas CXCL5 e IL-6.

Palabras clave:

Osteocitos.
Osteoclastos.
PTHrP. CXCL5.
IL-6.

Recibido: 18/01/2024 • Aceptado: 09/04/2024

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Tirado-Cabrera I, Pizarro-Gómez J, Heredero-Jiménez S, Martín-Guerrero E, Ardura JA, R. Gortázar A. Osteocitos estimulados con PTHrP previenen la diferenciación de osteoclastos a través de la modulación de las citoquinas CXCL5 e IL-6. Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(1):1-9

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00035

Correspondencia:

Irene Tirado-Cabrera. Laboratorio de Fisiopatología Ósea. Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA)-Nemesio Díez. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina. Universidad San Pablo-CEU. CEU Universities. Campus Montepríncipe. Pl. Montepríncipe, 1D. 28668 Alcorcón, Madrid
e-mail: irene.tiradocabrera@ceu.es

INTRODUCCIÓN

El cilio primario es un orgánulo apendicular, único e inmóvil, existente en numerosos tipos celulares, entre los que se encuentran las células óseas y donde ejerce funciones similares a una antena, recibiendo señales químicas y mecánicas (1). A pesar de estar presente en casi todas las células del ser humano, su presencia no es constante en ellas, sino que se ensambla y se reabsorbe en un proceso dependiente del ciclo celular: se forma durante la fase quiescente y desaparece antes de entrar en mitosis (1,2).

La carga mecánica es uno de los moduladores más relevantes para la formación y el mantenimiento de la masa y la arquitectura ósea (3). La presencia del cilio primario en los osteocitos es imprescindible para el desempeño de la función mecánica (4-6). Además de su papel como mecanorreceptor, el cilio primario acumula gran cantidad de receptores, entre los que se encuentra el receptor tipo 1 de la parathormona (PTH) y la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP), PTH1R (7-9).

PTH1R se expresa en osteoblastos y osteocitos donde cumple funciones clave para la regulación del metabolismo óseo (10). La PTHrP es una citoquina que se expresa en numerosos tejidos. En el tejido óseo ejerce funciones locales, principalmente a través del receptor PTH1R, aunque se conocen otros efectos independientes de este receptor (11-14). PTH1R, además de ser activado tras la unión a sus agonistas, PTH y PTHrP, es sensible a los estímulos mecánicos. Se ha descrito que la estimulación mecánica puede activar directamente a PTH1R en ausencia de ligando, indicando la importancia del receptor de PTH como mecanosensor en osteocitos y osteoblastos (15,16). En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que PTH1R es un componente fundamental en el proceso de transducción de señales mecánicas en las células osteocíticas MLO-Y4 (16,17). En estas células, la activación de PTH1R en ausencia de ligando ocurre inmediatamente después de la estimulación mecánica con flujo de fluido, gracias a un aumento de la afluencia de calcio intracelular (18). Además, el flujo de fluido induce un incremento de PTH1R en la membrana plasmática de las células MLO-Y4 (19).

Recientemente hemos demostrado que la estimulación mecánica por flujo de fluido en las células MLO-Y4, induce la traslocación de PTH1R al cilio primario (20). En estas condiciones, los osteocitos inhiben la migración y la diferenciación de los precursores osteoclastos, a través de la alteración de la secreción de las citoquinas CXCL5 e IL-6 (21). A pesar de que la presencia del receptor PTH1R en el cilio primario es también relevante para las acciones de la PTHrP (22), se desconoce si la PTHrP (1-37) induce cambios en la traslocación del receptor al cilio primario de manera similar a los ejercidos por la estimulación mecánica.

En el presente trabajo nos planteamos estudiar los efectos de la estimulación con PTHrP (1-37) en la línea de osteocitos MLO-Y4 sobre la movilidad del receptor PTH1R en la membrana plasmática, analizando la posible colocalización del receptor en el cilio primario, así como la implicación de las citoquinas CXCL5 e IL-6, producidas por osteocitos tras el estímulo con PTHrP, en la diferenciación de los precursores osteoclastos.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

Las células osteocíticas de ratón MLO-Y4 (generosamente donadas por la Dra. Lynda Bonewald) se cultivaron en α -MEM suplementado con 2,5 % de suero fetal de ternera (SFT), 2,5 % de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (100 μ g/ml) en un incubador humidificado con un 5 % de CO₂ a 37 °C. Las células se sembraron a una densidad de 25 000 células/cm² en placas de cultivo convencionales o en portaobjetos de vidrio (FlexCell International Corp., Hillsborough, NC, EE. UU.), revestidas con una matriz de colágeno tipo I (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, EE. UU.). Las células se mantuvieron en cultivo hasta que estuvieron casi totalmente confluentes. Al día siguiente, se reemplazó el medio de cultivo por medio α -MEM sin rojo fenol con 1 % de SFB y las células se mantuvieron en esta condición durante 24 horas. Posteriormente, las células se estimularon con el péptido exógeno PTHrP (1-37) (Bachem, Bubendorf, Suiza) a una concentración de 100 nM durante 10 minutos. Las células que no fueron estimuladas serán los controles estáticos (CE). Después, las células se incubaron durante 18 horas con α -MEM sin rojo fenol, sin SFB y sin SFT. Transcurrido este tiempo se llevó a cabo la recogida de medios condicionados (MC). Además, se utilizó sangre obtenida del Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) para generar osteoclastos humanos *in vitro* se aislaron a partir de la capa leucocitaria. Estas células se cultivaron en medio α -MEM suplementado con un 10 % de SFT, 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina, en atmósfera húmeda de 5 % de CO₂ y a 37 °C. Los monocitos humanos se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 90 %.

INHIBICIÓN DEL CILIO PRIMARIO, PTH1R, GLI1, AMP CÍCLICO Y FOSFOLIPASA C

La formación del cilio primario y la actividad del PTH1R se inhibieron tratando a las células durante 1 h con hidrato de cloral acuoso 1 mM o con 100 nM de PTHrP (7-34), respectivamente. El factor de transcripción Gli se inhibió utilizando 10 μ M de Gli-1-Antagonist 61

(GANT61; Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h cuando fue apropiado. El AMPc y la fosfolipasa C se inhibieron durante 1 h con 100 μ M del inhibidor del adenilato ciclasa SQ22536 o con 1 μ M del inhibidor de la fosfolipasa C U73122, respectivamente.

TRANSFECCIÓN CELULAR

Las células MLO-Y4 se transfectaron de manera transitoria con un plásmido portador de ADN complementario (ADNc) codificante para PTH1R humano fusionado con el gen reportero proteína fluorescente verde (GFP) (*GFP*PTH1R) (generosamente donada por el Dr. Peter Friedman) utilizando lipofectamina 3000 (Life Technologies) durante 4 h a 37 °C, según las directrices del fabricante.

INMUNOFLUORESCENCIA

Las células se fijaron utilizando paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS, pH 7,4, durante 10 minutos y, posteriormente, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5 % en PBS, a pH 7,4 durante 5 minutos. Para el bloqueo de las uniones inespecíficas, las células se incubaron durante 1 hora con albúmina de suero bovino (BSA) al 10 % suplementado con un 5 % de suero de cabra. A continuación, se incubaron con el anticuerpo monoclonal producido en ratón antitubulina α -acetilada (Sigma Aldrich), diluido 1:1000 en BSA 1X (100 ml de BSA al 10 % diluido en 900 ml de PBS), durante toda la noche, a 4 °C y en agitación. Al día siguiente, se realizaron varios lavados con PBS 1X y se añadió el anticuerpo secundario antiinmunoglobulina G (IgG) de ratón conjugado con Alexa flúor 546 (Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.), diluido 1/1000 en BSA 1X, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron varios lavados con PBS 1X, y se llevó a cabo el montaje con el reactivo FluorSafe (Calbiochem, La Jolla, CA, EE. UU.). Las muestras se analizaron con el microscopio confocal Leica DMI8, evaluándose la colocalización entre el cilio primario y el receptor PTH1R en las células que había sido transfectadas con el plásmido *GFP*PTH1R, teniéndose en cuenta si la colocalización se había producido solo en la base o a lo largo de todo el cilio primario. También se analizó la longitud del cilio primario, gracias al *software* ImageJ.

GENERACIÓN DE OSTEOCLASTOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA OSTEOCLASTOGÉNESIS

Los monocitos humanos obtenidos del aislamiento de la capa leucocitaria fueron utilizados para el ensayo de diferenciación hacia osteoclastos. Una vez que al-

canzaron el 90 % de confluencia, se retiró el medio de cultivo, se lavó dos veces con PBS 1X y se llevó a cabo la tripsinización (en 0,25 % v/v de tripsina y 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]) durante 30 minutos, utilizando un rascador celular. Para el ensayo de diferenciación, se sembraron 20 000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con el medio de cultivo α -MEM suplementado con un 10 % de SFT, 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin, además de 20 ng/ml de M-CSF y 20 ng/ml de RANKL (ProSpec, Ness-Ziona, Israel). Los controles fueron cultivados con el mismo medio de cultivo, pero sin RANKL. Pasados tres días, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco sin rojo fenol, conteniendo M-CSF y RANKL, según correspondiera, y añadiéndose además un 20 % de los distintos MC de las células MLO-Y4. A los controles se le añadió un 20 % de medio α -MEM sin SFT. Además, se añadieron anticuerpos neutralizantes; 2 μ g/ml de anti-CXCL5 y 1 μ g/ml de anti-IL-6. Los monocitos humanos estuvieron en contacto con los MC de las MLO-Y4 durante 3 días. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X para eliminar las células no adherentes. Las células fueron fijadas con PFA al 4 % durante 10 minutos, permeabilizadas con metanol al 100 % durante 20 minutos, y teñidas con hematoxilina durante 5 minutos. La diferenciación de los monocitos humanos hacia osteoclastos se determinó por la morfología de las células obtenidas, observándose la formación de células gigantes con tres o más núcleos. Las imágenes fueron realizadas gracias al microscopio Leica DMI1, evaluándose el número de células osteoclasticas con tres o más núcleos mediante el *software* ImageJ.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos están expresados como las medias \pm desviaciones estándar (DE). El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism (*software* de GraphPad). Las diferencias entre condiciones se evaluaron mediante análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis) seguido de la prueba de Mann-Whitney. La $p < 0,05$ se consideró significativa.

RESULTADOS

LOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR PTH1R EN EL CILIO PRIMARIO DE OSTEOCITOS ESTIMULADOS CON PTHrP (1-37)

En primer lugar, se quiso comprobar cómo afecta el tratamiento con PTHrP a la movilidad del PTH1R hacia el cilio primario en células osteocíticas MLO-Y4. Mediante microscopía confocal se observó que PTH1R co-

localizaba con el cilio primario en las células MLO-Y4. En condiciones estáticas, el 52 % de las células osteocíticas ciliadas mostraban cierta colocalización entre PTH1R y el cilio primario. De estas, solo el 33 % de las células mostraban colocalización a lo largo de todo el cilio primario, mientras que el 19 % mostraba colocalización solo en la base del cilio. Sin embargo, tras la estimulación con PTHrP, observamos un aumento significativo en la presencia de PTH1R a lo largo de todo el cilio primario (el 79 % de las células osteocíticas ciliadas manifestaron colocalización entre PTH1R y el cilio primario; de este porcentaje, el 50 % de las células ciliadas mostraron localización de PTH1R en toda la extensión del cilio, mientras que el 29 % mostraron colocalización solo en la base del cilio) (Fig. 1 A y B). El pretratamiento con HC anuló la formación del cilio primario, así como la movilización de PTH1R hacia él, mientras que el tratamiento con el antagonista PTHrP (7-34) no afectó de manera significativa a la movilización del PTH1R (Fig. 1 A y B). En condiciones estáticas e inhibición con PTHrP (7-34), el 58 % de las células osteocíticas ciliadas mostraban cierta colocalización entre PTH1R y el cilio primario. De esta, solo el 36 % de las células mostraron colocalización a lo largo de todo el cilio primario, mientras que el 22 % presentaron colocalización solo en la base del cilio. Tras el tratamiento con PTHrP, el 40 % de las células osteocíticas ciliadas manifestaron colocalización entre PTH1R y el cilio primario. De este porcentaje el 23 % de las células ciliadas mostraron localización de PTH1R en toda la extensión del cilio, mientras que el 17 % presentaron colocalización solo en la base del cilio (Fig. 1 A y B).

También se quiso comprobar si la longitud del cilio experimentaba algún cambio cuando se estimulaba con PTHrP (1-37) en comparación con condiciones estáticas. En ambos casos el cilio primario presentaba una longitud similar (Fig. 1C). Con el pretratamiento con HC este efecto fue inhibido, pero no se vio afectado por el antagonista de PTH1R, la PTHrP (7-34) (Fig. 1C).

Estos resultados muestran que el estímulo con PTHrP desencadena una movilización significativa del receptor PTH1R al cilio primario en células osteocíticas MLO-Y4.

IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CXCL5 E IL-6 EN LA DIFERENCIACIÓN DE LOS OSTEOCLASTOS

La regulación, a través del estímulo mecánico, de la secreción de las citoquinas CXCL5 e IL-6 en osteocitos MLO-Y4, ha demostrado tener un papel en el reclutamiento y diferenciación de los precursores osteoclastos (21). Esta regulación asociada a la mecanotransducción es mediada por el cilio primario y la activación del PTH1R (21). En base a estos antecedentes y a los resultados obtenidos en cuanto a la traslocación del

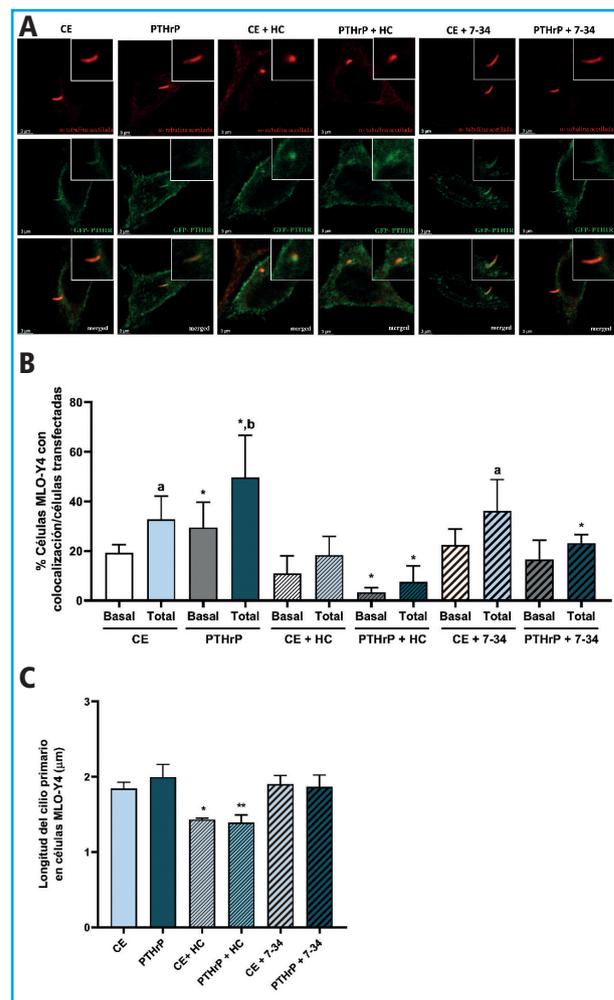


Figura 1. PTH1R colocaliza con el cilio primario en células MLO-Y4 estimuladas con PTHrP (1-37). Se transfectoron células MLO-Y4 con 1 μ g del plásmido *GFP-PTH1R* utilizando lipofectamina 3000 durante 4 h a 37 °C. Posteriormente, las células se privaron de suero durante 6 h, se trataron con hidrato de cloral 1 mM o con 100 nM de PTHrP (7-34) durante 1 h y se estimularon con 100 nM de PTHrP (7-34) durante 1 h. Después se estimularon con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 min. Para evaluar la colocalización de PTH1R con el cilio primario, las células se fijaron, permeabilizaron, bloquearon e incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo antitubulina α -acetilada de ratón. A continuación, las células se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario IgG antiratón conjugado con Alexa fluor 546. Se muestran imágenes representativas de cada condición (A). El porcentaje de células con colocalización de PTH1R justo en la base (basal) y en todo el cilio primario (total) se analizó en cada condición en células MLO-Y4 transfectadas con el plásmido *GFP-PTH1R* (B). Se representa la evaluación de la longitud del cilio primario en células MLO-Y4 utilizando el *software* ImageJ (C). Los resultados son la media \pm DE de triplicados. * $p < 0,05$ vs. control correspondiente; ** $p < 0,01$ vs. control correspondiente; ^a $p < 0,05$ vs. condición basal correspondiente; ^b $p < 0,001$ vs. condición basal correspondiente (CE: control estático; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; HC: hidrato de cloral; 7-34: PTHrP (7-34); *GFP-PTH1R*: proteína verde fluorescente-PTH1R; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; IgG: inmunoglobulina G; DE: desviación estándar).

PTH1R al cilio (Fig. 1) quisimos comprobar si las citoquinas CXCL5 e IL-6 median también las acciones desempeñadas por la PTHrP en la comunicación entre osteocitos y osteoclastos utilizando anticuerpos neutralizantes específicos (Figs. 2 y 3). Los resultados mostraron que los medios condicionados (MC) de osteocitos en condiciones estáticas provocaron un aumento de la diferenciación de osteoclastos; un efecto que fue inhibido por el pretratamiento de los MC de los osteocitos con el anticuerpo neutralizante CXCL5 o el anti-

cuerpo neutralizante IL-6. Además, el MC de osteocitos tratados con PTHrP (1-37) disminuyó la diferenciación hacia osteoclastos con o sin neutralización de CXCL5 o IL-6 (Figs. 2 y 3). La neutralización de CXCL5 no causó ningún efecto sobre la diferenciación de osteoclastos cuando se inhibió el cilio primario o PTH1R de los osteocitos con HC o PTHrP (7-34), respectivamente (Fig. 2 A y B). Así mismo, la neutralización de CXCL5 tampoco causó ningún efecto en la osteoclastogénesis cuando las vías GLI, PKA y PKC fueron inhibidas con GANT61,

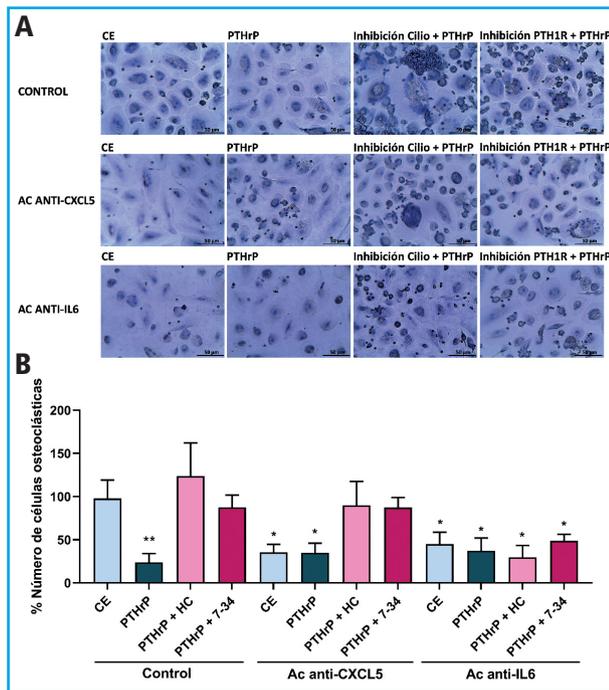


Figura 2. El estímulo con PTHrP (1-37) inhibe la diferenciación de los osteoclastos mediante un mecanismo dependiente de CXCL5 e IL-6. Las células osteocíticas MLO-Y4 se privaron de suero durante 24 h y, posteriormente se trataron con hidrato de cloral 1 mM o con 100 nM de PTHrP (7-34) durante 1 h. Luego, las células se estimularon con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 minutos. El MC se recogió al cabo de 18 h y se añadió 2 µg/mL de anticuerpo neutralizante anti-mCXCL5 o 1 µg/mL de anti-mIL-6. Para evaluar la diferenciación de las células monocíticas a osteoclastos, los monocitos humanos se trataron con 20 ng/ml de M-CSF y 20 ng/ml de RANKL más los correspondientes MC de las células MLO-Y4 al 20 % con el anticuerpo neutralizante correspondiente. A continuación, se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron con hematoxilina. Se muestran imágenes representativas de cada condición (A). Se representa el porcentaje de células con tres o más núcleos evaluado con el *software* ImageJ (B). Los resultados representan la media ± DE de 2 experimentos por triplicado de cada condición experimental. * $p < 0,05$ vs. CE o vs. correspondiente inhibición del cilio o PTH1R; ** $p < 0,01$ vs. CE (MC: medio condicionado; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B; CXCL5: quimioquina 5 con motivo C-X-C; IL-6: interleuquina-6; Ac: anticuerpo; CE: control estático; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; HC: hidrato de cloral; 7-34: PTHrP (7-34); DE: desviación estándar).

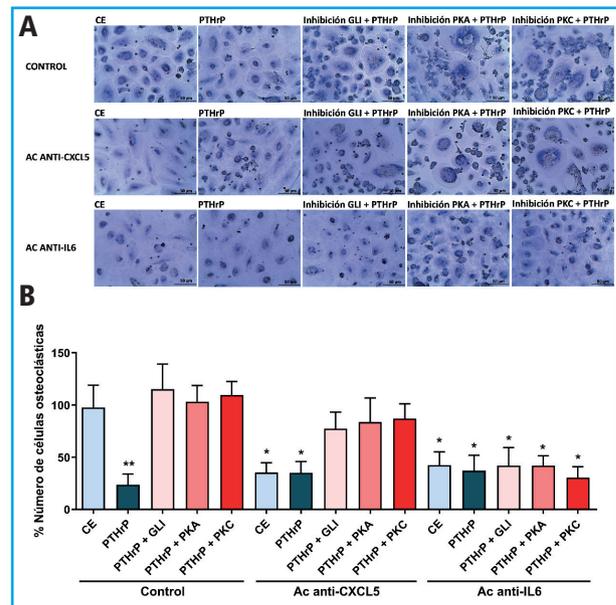


Figura 3. El estímulo con PTHrP (1-37) inhibe la diferenciación de los osteoclastos mediante un mecanismo dependiente de CXCL5 e IL-6. Las células osteocíticas MLO-Y4 se privaron de suero durante 24 h y, posteriormente se trataron con 10 µM de GANT61, 100 µM del inhibidor del adenilato ciclasa SQ22536 o con 1 µM del inhibidor de la fosfolipasa C U73122 durante 1 h. Luego, las células se estimularon con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 minutos. El MC se recogió al cabo de 18 h y se añadió 2 µg/mL de anticuerpo neutralizante anti-mCXCL5 o 1 µg/mL de anti-mIL-6. Para evaluar la diferenciación de las células monocíticas a osteoclastos, los monocitos humanos se trataron con 20 ng/ml de M-CSF y 20 ng/ml de RANKL más los correspondientes MC de las células MLO-Y4 al 20 % con el anticuerpo neutralizante correspondiente. A continuación, se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron con hematoxilina. Se muestran imágenes representativas de cada condición (A). Se representa el porcentaje de células con tres o más núcleos evaluado con el *software* ImageJ (B). Los resultados representan la media ± DE de 2 experimentos por triplicado de cada condición experimental. * $p < 0,05$ vs. CE o vs. correspondiente inhibición de GLI, PKA o PKC; ** $p < 0,01$ vs. CE (MC: medio condicionado; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B; CXCL5: quimioquina 5 con motivo C-X-C; IL-6: interleuquina-6; Ac: anticuerpo; CE: control estático; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; GANT61: GLI1-antagonista 61; GLI: factor de transcripción de glioma 1; PKA: proteína quinasa A; PKC: proteína quinasa C; DE: desviación estándar).

SQ22536 y U73122, respectivamente (Fig. 3 A y B). Por el contrario, el anticuerpo anti-IL-6 no solo revirtió la osteoclastogénesis en condiciones estáticas, sino también en presencia de HC o PTHrP (7-34) (Fig. 2 A y B). De igual forma, la inhibición de las vías GLI, PKA y PKC también revierte la osteoclastogénesis (Fig. 3 A y B).

Estos hallazgos indican que es necesaria la presencia tanto de un cilio primario funcional como del receptor PTH1R en los osteocitos para una correcta comunicación con los osteoclastos, y sugieren que la estimulación con PTHrP en osteocitos inhibe la diferenciación de los osteoclastos a través de CXCL5, mientras que la activación de PTH1R y del cilio primario en osteocitos regulan a los osteoclastos a través de IL-6.

DISCUSIÓN

El cilio primario es un conocido mecanosensor presente en los osteocitos entre otras células. Sin embargo, sus funciones en las células óseas parecen no limitarse únicamente a favorecer la mecanotransducción. En este trabajo, nuestros resultados indican que el cilio primario expone a lo largo de toda su extensión el receptor tipo 1 de la PTH y la PTHrP, PTH1R, tras la estimulación con el péptido PTHrP (1-37). Además, observamos que las citoquinas CXCL5 e IL-6 parecen regular los efectos que ejerce la PTHrP en la comunicación de los osteocitos con los osteoclastos, concretamente afectando a la diferenciación de estos últimos.

El PTH1R se expresa en osteoblastos y osteocitos, y es clave para la formación del tejido y el mantenimiento de la homeostasis ósea (23). La señalización de PTHrP a través del PTH1R en osteocitos promueve la inhibición de la síntesis de esclerostina, lo que se traduce en un aumento de la formación ósea, pero también activa el remodelado óseo, a través de la regulación de RANKL (24). El PTH1R puede ser activado por sus dos agonistas, la PTH secretada por las glándulas paratiroides, o bien por la PTHrP, secretada por una gran variedad de tejidos, como el hueso, donde actúa de forma local (10). Varios trabajos indican que este receptor puede actuar como mecanorreceptor, siendo activado directamente por estímulos mecánicos, en ausencia de sus agonistas (25). También se ha descrito que la carga mecánica como el ejercicio físico y los péptidos PTH/PTHrP pueden potenciar sinérgicamente sus acciones entre sí (13,26). De hecho, la actividad física como correr o nadar induce la secreción transitoria de PTH (27), y la estimulación mecánica aumenta la producción de PTHrP en los osteocitos, lo que podría inducir la activación de PTH1R (18,28).

El cilio primario también actúa como mecanorreceptor en células óseas, recibiendo señales mecánicas. El cilio primario presenta numerosos receptores y canales capaces de activarse ante diferentes estímulos. En este

trabajo, nuestros resultados muestran que tras la estimulación con el péptido de la PTHrP (1-37) existe una migración del PTH1R hacia el cilio primario, aumentando la presencia del receptor dispuesto a lo largo de toda la proyección ciliar (Fig. 1). Un efecto muy similar al aquí descrito se observa al estimular estas mismas células MLO-Y4 con un estímulo mecánico por flujo de fluido (21). Además, otro estudio ha demostrado que el estímulo mecánico promueve el transporte de PTH1R al cilio primario, aumentando la señalización de PTH en células del núcleo pulposo del disco intervertebral (9).

Los experimentos de neutralización apuntan a CXCL5 como una citocina regulada por los osteocitos que, cuando es secretada, controla la diferenciación de los osteoclastos. CXCL5 es una quimioquina implicada en el reclutamiento de leucocitos (29,30). Esta quimioquina se une al receptor CXCR1 y al receptor CXCR2, ambos expresados en los precursores de osteoclastos (31,32). Además, se ha descrito que CXCL5 modula la expresión de CXCR1 y puede tener un papel funcional en el aumento de los niveles de expresión de RANKL en las células estromales/preosteoblásticas de médula ósea humana (33). Sundaram y cols. mostraron que CXCL5 podría tener un papel funcional en el aumento de los niveles de expresión de RANKL asociados a la enfermedad ósea de Paget en humanos, la cual presenta zonas muy localizadas de recambio óseo con una mayor actividad de los osteoclastos (33).

Con respecto a IL-6, es bien conocido su papel como inductor de la osteoclastogénesis mediada por osteocitos mediante la actividad de JAK2 y RANKL (34). Un estudio ha demostrado que el aumento en la secreción de IL-6 por células osteocíticas apoptóticas promueve el reclutamiento de precursores osteoclasticos. Esto es debido a que la secreción de IL-6 promueve la expresión endotelial de ICAM-1 y la adhesión de los precursores osteoclasticos (35). El estudio de Kazuhiro demostró que la combinación de TNF e IL-6 puede inducir la reabsorción ósea en células similares a los osteoclastos (36). De hecho, IL-6 desempeña un papel importante como regulador durante la osteoclastogénesis, resorción y regeneración óseas (35). De forma similar a este estudio, la formación de osteoclastos se vio potenciada tras la secreción tanto de IL-6 como del receptor soluble de IL-6 (37). En concordancia, nuestros resultados (Fig. 2 y 3) muestran que el anticuerpo neutralizante de IL-6 disminuyó la diferenciación celular cuando se inhibió el cilio y el receptor PTH1R. De igual forma ocurre cuando se inhibe las vías *Hedgehog*, adenilato ciclasa y fosfolipasa C. Sin embargo, el anticuerpo neutralizante de CXCL5 no tuvo ningún efecto a este respecto.

Datos previos de nuestro grupo de investigación muestran que el silenciamiento de *Pth1r* se asocia a un aumento de la migración de monocitos y de la osteoclastogénesis, así como a un aumento de la secreción de IL-6 por parte de los osteocitos, a pesar de que las cé-

lulas fueron estimuladas por FF. Dado que la neutralización de IL-6 en estas condiciones disminuye tanto la migración como la diferenciación de osteoclastos, estos datos sugieren que la secreción de altos niveles de IL-6 puede superar la baja secreción de CXCL5 dependiente de FF y mantener la migración de monocitos y la osteoclastogénesis (20). De igual forma, ocurriría cuando se produce la estimulación con PTHrP en el proceso de osteoclastogénesis (Fig. 2).

Además, demostramos que la inhibición del cilio primario también se asoció con un aumento de la función osteoclástica, incluso en condiciones de estimulación con PTHrP (1-37), y la neutralización de la IL-6 revirtió este efecto. Colectivamente, estos datos sugieren que la inhibición del cilio primario podría inducir una elevada secreción de IL-6 que supere la baja secreción

de CXCL5, como ocurre cuando se inhibe el receptor PTH1R (Fig. 4). Sin embargo, también es posible que el cilio primario en condiciones de estimulación con PTHrP (1-37) module otras citoquinas alternativas implicadas en la comunicación osteoclástica. Aun así, la neutralización de IL-6 fue suficiente para prevenir la diferenciación de los precursores de osteoclastos.

Nuestros hallazgos apoyan que el cilio primario funcional y PTH1R son necesarios en los osteocitos para regular el secretoma de estas células y su comunicación con los osteoclastos. Así, los osteocitos estimulados con PTHrP (1-37) inhiben la diferenciación de osteoclastos mediante la disminución de la secreción de CXCL5, mientras que la activación de PTH1R y del cilio primario en los osteocitos regulan a los osteoclastos a través de la modulación de la secreción de IL-6.

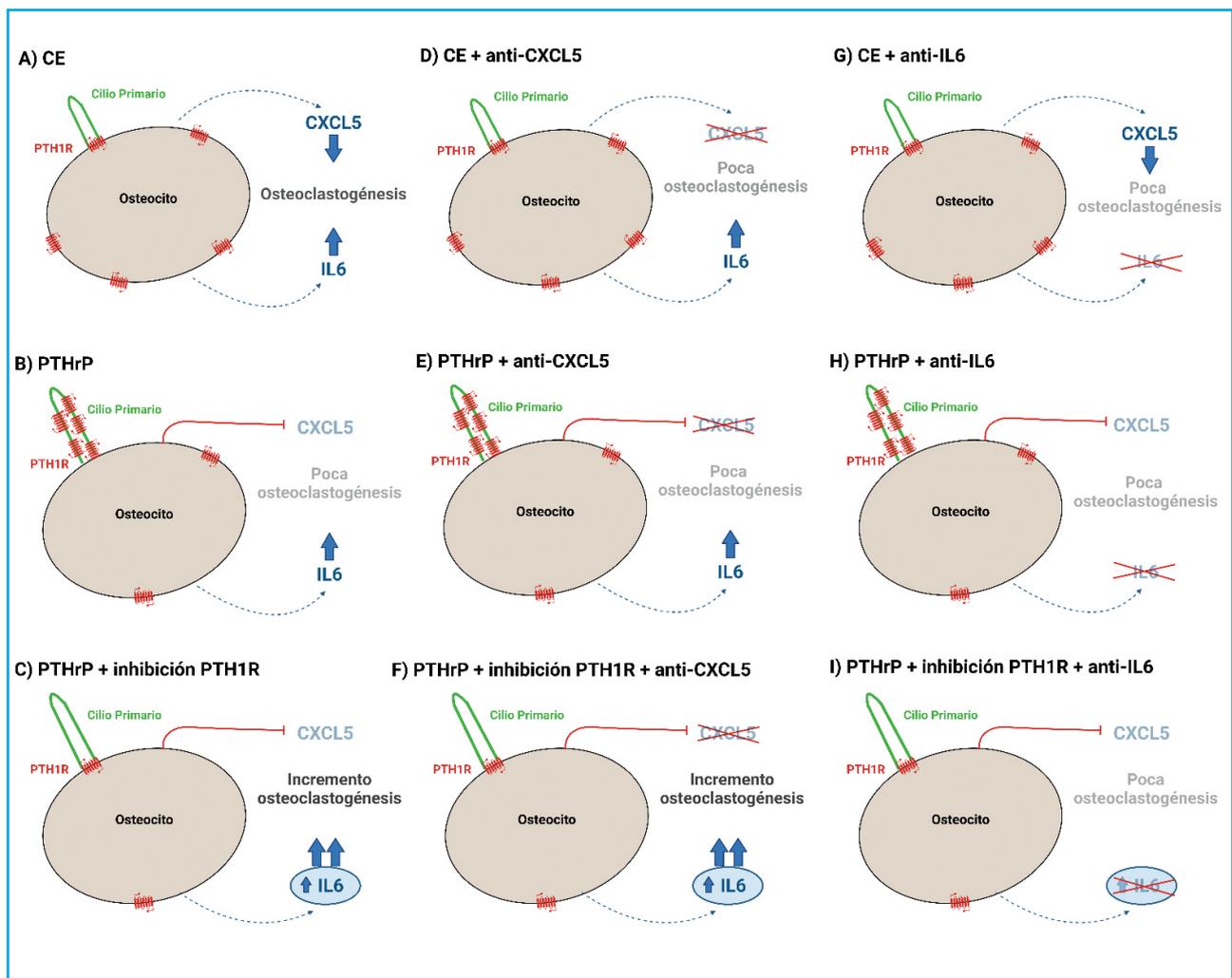


Figura 4. Mecanismo propuesto para la regulación de la diferenciación de osteoclastos por el cilio primario y PTH1R en osteocitos. La presencia tanto de un cilio primario funcional como de PTH1R en los osteocitos es necesaria para una correcta comunicación con los osteoclastos. La estimulación con PTHrP (1-37) inhibe la diferenciación de los osteoclastos a través de CXCL5, mientras que la activación de PTH1R regula a los osteoclastos a través de IL-6 (CE: control estático; PTHrP: proteína relacionada con la hormona paratiroidea; CXCL5: ligando de quimioquinas con motivo C-X-C 5; IL-6, interleuquina-6; PTH1R: receptor de tipo I de la hormona paratiroidea).

BIBLIOGRAFÍA

- Malicki JJ, Johnson CA. The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends Cell Biol* 2017;27:126-40. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.08.002
- Ishikawa H, Marshall WF. Ciliogenesis: Building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12(4):222-34. DOI: 10.1038/nrm3085
- Robling AG, Turner CH. Mechanical Signaling for Bone Modeling and Remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009;19(4):319-38. DOI: 10.1615/critrevukargeneexpr.v19.i4.50
- Christensen ST, Morthorst SK, Mogensen JB, Pedersen LB. Primary cilia and coordination of receptor tyrosine kinase (RTK) and transforming growth factor β (TGF- β) signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;9(6):a028167. DOI: 10.1101/cshperspect.a028167
- Hoey DA, Tormey S, Ramcharan S, O'Brien FJ, Jacobs CR. Primary Cilia-Mediated Mechanotransduction in Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2012;30(11):2561-70. DOI: 10.1002/stem.1235
- Malone AMD, Anderson CT, Tummala P, Kwon RY, Johnston T, Stearns T, et al. Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(33):13325-30. DOI: 10.1073/pnas.0700636104
- Schou KB, Pedersen LB, Christensen ST. Ins and outs of GPCR signaling in primary cilia. *EMBO Rep* 2015;16(9):1099-113. DOI: 10.15252/embr.201540530
- Rais Y, Reich A, Simsa-Maziol S, Moshe M, Idelevich A, Kfir T, et al. The growth plate's response to load is partially mediated by mechano-sensing via the chondrocytic primary cilium. *Cell Mol Life Sci* 2015;72(3):597-615. DOI: 10.1007/s00018-014-1690-4
- Zheng L, Cao Y, Ni S, Qi H, Ling Z, Xu X, et al. Ciliary parathyroid hormone signaling activates transforming growth factor- β to maintain intervertebral disc homeostasis during aging. *Bone Res* 2018;6(1):21. DOI: 10.1038/s41413-018-0022-y
- Ardura JA, Portal-Núñez S, Alonso V, Bravo B, Gortazar AR. Handling Parathormone Receptor Type 1 in Skeletal Diseases: Realities and Expectations of Abaloparatide. *Trends Endocrinol Metab* 2019;30(10):756-66. DOI: 10.1016/j.tem.2019.07.014
- Gardinier JD, Daly-Seiler C, Rostami N, Kundal S, Zhang C. Loss of the PTH/PTHrP receptor along the osteoblast lineage limits the anabolic response to exercise. *Genetos DC, editor. PLoS One* 2019;14(1):e0211076. DOI: 10.1371/journal.pone.0211076
- De Gortázar AR, Alonso V, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Transient exposure to PTHrP (107-139) exerts anabolic effects through vascular endothelial growth factor receptor 2 in human osteoblastic cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 2006;79(5):360-9. DOI: 10.1007/s00223-006-0099-y
- Maycas M, McAndrews KA, Sato AY, Pellegrini GG, Brown DM, Allen MR, et al. PTHrP-Derived Peptides Restore Bone Mass and Strength in Diabetic Mice: Additive Effect of Mechanical Loading. *J Bone Miner Res* 2017;32(3):486-97. DOI: 10.1002/jbmr.3007
- Ardura JA, Portal-Núñez S, Alonso V, Bravo B, Gortazar AR. Handling Parathormone Receptor Type 1 in Skeletal Diseases: Realities and Expectations of Abaloparatide. *Trends Endocrinol Metab* 2019;30(10):756-66. DOI: 10.1016/j.tem.2019.07.014
- Zhang YL, Frangos JA CM. Mechanical stimulus alters conformation of type 1 parathyroid hormone receptor in bone cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296(6):C1391-9. DOI: 10.1152/ajpcell.00549.2008
- Maycas M, Ardura JA, De Castro LF, Bravo B, Gortázar AR, Esbrit P. Role of the Parathyroid Hormone Type 1 Receptor (PTH1R) as a Mechanosensor in Osteocyte Survival. *J Bone Miner Res* 2015;30(7):1231-44. DOI: 10.1002/jbmr.2439
- Maycas M, Esbrit P, Gortázar AR. Molecular mechanisms in bone mechanotransduction. *Histol Histopathol* 2017;32(8):751-60. DOI: 10.14670/HH-11-858
- Maycas M, Ardura JA, De Castro LF, Bravo B, Gortázar AR, Esbrit P. Role of the Parathyroid Hormone Type 1 Receptor (PTH1R) as a Mechanosensor in Osteocyte Survival. *J Bone Miner Res* 2015;30(7):1231-44. DOI: 10.1002/jbmr.2439
- Maycas M, Fernández de Castro L, Bravo B, García de Durango C, Forriol F, R. Gortázar A, et al. El receptor 2 de VEGF (VEGFR2) y el receptor 1 de la PTH (PTH1R) actúan como mediadores de la respuesta anti-apoptótica al estímulo mecánico en las células osteocíticas MLO-Y4. *Rev Osteoporos y Metab Miner* 2015;7(4):91-7. DOI: 10.4321/S1889-836X2015000400003
- Tirado-Cabrera I, Martín-Guerrero E, Heredero-Jimenez S, Ardura JA, Gortázar AR. PTH1R translocation to primary cilia in mechanically-stimulated osteocytes prevents osteoclast formation via regulation of CXCL5 and IL-6 secretion. *J Cell Physiol* 2022;237(10):3927-43. DOI: 10.1002/jcp.30849
- Tirado-Cabrera I, Martín-Guerrero E, Heredero-Jimenez S, Ardura JA, Gortázar AR. PTH1R translocation to primary cilia in mechanically-stimulated osteocytes prevents osteoclast formation via regulation of CXCL5 and IL-6 secretion. *J Cell Physiol* 2022;237(10):3927-43. DOI: 10.1002/jcp.30849
- Martín-Guerrero E, Tirado-Cabrera I, Buendía I, Alonso V, Gortázar AR, Ardura JA. Primary cilia mediate parathyroid hormone receptor type 1 osteogenic actions in osteocytes and osteoblasts via Gli activation. *J Cell Physiol* 2020;235(10):7356-69. DOI: 10.1002/jcp.29636
- Delgado-Calle J, Tu X, Pacheco-Costa R, McAndrews K, Edwards R, Pellegrini GG, et al. Control of Bone Anabolism in Response to Mechanical Loading and PTH by Distinct Mechanisms Downstream of the PTH Receptor. *J Bone Miner Res* 2017;32(3):522-35. DOI: 10.1002/jbmr.3011
- Tu X, Delgado-Calle J, Condon KW, Maycas M, Zhang H, Carlesso N, et al. Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/ β -catenin signaling in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112(5):478-86. DOI: 10.1073/pnas.1409857112
- Zhang YL, Frangos JA, Chachivili M. Mechanical stimulus alters conformation of type 1 parathyroid hormone receptor in bone cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296(6):1391-9. DOI: 10.1152/ajpcell.00549.2008
- Sugiyama T, Saxon LK, Zaman G, Moustafa A, Sunter A, Price JS, et al. Mechanical loading enhances the anabolic effects of intermittent parathyroid hormone (1-34) on trabecular and cortical bone in mice. *Bone* 2008;43(2):238-48. DOI: 10.1016/j.bone.2008.04.012
- Gardinier JD, Al-Omaishi S, Morris MD, Kohn DH. PTH signaling mediates perilacunar remodeling during exercise. *Matrix Biol* 2016;52-54:162-75. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.02.010
- Chen X, Macica CM, Ng KW, Broadus AE. Stretch-induced PTH-related protein gene expression in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2005;20(8):1454-61. DOI: 10.1359/jbmr.2005.20.8.1454
- Nouailles G, Dorhoi A, Koch M, Zerrahn J, Weiner J, Faé K, et al. CXCL5-secreting pulmonary epithelial cells drive destruc-

- tive neutrophilic inflammation in tuberculosis. *J Clin Invest* 2014;124(3):1268-82. DOI: 10.1172/JCI72030
30. Yoshida K, Korchynskyi O, Tak PP, Isozaki T, Ruth JH, Campbell PL, et al. Citrullination of Epithelial Neutrophil-Activating Peptide 78/CXCL5 Results in Conversion from a Non-Monocyte-Recruiting Chemokine to a Monocyte-Recruiting Chemokine. *Arthritis Rheumatol* 2014;66(10):2716-27. DOI: 10.1002/art.38750
 31. Grassi F, Piacentini A, Cristino S, Toneguzzi S, Cavallo C, Facchini A, et al. Human osteoclasts express different CXC chemokines depending on cell culture substrate: Molecular and immunocytochemical evidence of high levels of CXCL10 and CXCL12. *Histochem Cell Biol* 2003;120(5):391-400. DOI: 10.1007/s00418-003-0587-3
 32. Li A, King J, Moro A, Sugi MD, Dawson DW, Kaplan J, et al. Overexpression of CXCL5 is associated with poor survival in patients with pancreatic cancer. *Am J Pathol* 2011;178(3):1340-9. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.11.058
 33. Sundaram K, Rao DS, Ries WL, Reddy S V. CXCL5 stimulation of RANK ligand expression in Paget's disease of bone. *Lab Invest* 2013;93(4):472-9. DOI: 10.1038/labinvest.2013.5
 34. Wu Q, Zhou X, Huang D, Ji Y, Kang F. IL-6 enhances osteocyte-mediated osteoclastogenesis by promoting JAK2 and RANKL activity in vitro. *Cell Physiol Biochem* 2017;41(4):1360-9. DOI: 10.1159/000465455
 35. Cheung WY, Simmons CA, You L. Osteocyte apoptosis regulates osteoclast precursor adhesion via osteocytic IL-6 secretion and endothelial ICAM-1 expression. *Bone* 2012;50(1):104-10. DOI: 10.1016/j.bone.2011.09.052
 36. Yokota K, Sato K, Miyazaki T, Kitaura H, Kayama H, Miyoshi F, et al. Combination of tumor necrosis factor α and interleukin-6 induces mouse osteoclast-like cells with bone resorption activity both in vitro and in vivo. *Arthritis Rheumatol* 2014;66(1):121-9. DOI: 10.1002/art.38218
 37. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol* 2002;169(6):3353-62. DOI: 10.4049/jimmunol.169.6.3353

Original

Limitations of immunodeficient mice as models for osteoporosis studies

Álvaro del Real¹, Laura López-Delgado², Carolina Sañudo², Belén García-Montesinos³, Carlos Wert-Carvajal⁴, Esther Laguna⁵, Carmen García-Ibarbia², José A. Saiz-Aja⁶, Diego Ferreño⁶, José A. Casado⁶, Guillermo Menéndez⁵, M. Isabel Pérez-Núñez⁵, José A. Riancho^{1,2}

¹Department of Medicine and Psychiatry. Universidad de Cantabria. Santander, Spain. ²Departments of ²Internal Medicine, and ³Maxillofacial Surgery. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL. Universidad de Cantabria. Santander, Spain. ⁴Institute of Experimental Epileptology and Cognition Research. Medical Faculty. University of Bonn. Bonn, Germany. ⁵Department of Traumatology and Orthopedic Surgery. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Universidad de Cantabria-IDIVAL. Santander, Spain. ⁶Department of Material Science. LADICIM. Universidad de Cantabria. Santander, Spain

Abstract

We aimed to establish a murine model to investigate the potential therapeutic role of human mesenchymal stem cells (MSCs) in skeletal disorders *in vivo*. Therefore, we specifically focused on 2 experimental models: the bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (ONJ) and ovariectomy (OVX)-induced bone loss to simulate postmenopausal osteoporosis. Utilizing NOD.CB17-Prkdcscid/J (NOD-SCID) mice, known for their compromised immune systems, we examined the development of ONJ following varying dosages and routes of administration of zoledronic acid, with and without adjunctive dexamethasone treatment. Surprisingly, we found a very low incidence of ONJ compared to the results reported in immunocompetent mice, suggesting that factors intrinsic to the NOD-SCID mice, such as immune deficiency and possibly altered microbiota due to sterile housing conditions, may influence the development of this condition. On the other hand, these mice did not show the anticipated bone loss following bilateral OVX, challenging conventional wisdom and emphasizing the multifaceted nature of osteoporosis involving both the immune system and microbiota. This study reveals the limitations of immunodeficient mice as experimental models in bone research. On the other hand, it is consistent with experimental data suggesting a role of osteoimmunology and osteomicrobiology mechanisms in the pathogenesis of some skeletal disorders.

Keywords:

Immunodeficient mice. Osteonecrosis. Ovariectomy. Bisphosphonates.

Received: 04/29/2024 • Accepted: 05/20/2024

Funding: supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III (PI16/915), which can be co-funded by European Union FEDER funds. Alvaro del Real received support by the postdoctoral grant Margarita Salas in the University of Cantabria, Santander, Spain.

Conflicts of interest: the authors declare no conflict of interest.

Artificial intelligence: the authors declare that they did not use any artificial intelligence (AI) or AI-assisted technologies to write this the article.

Del Real A, López-Delgado L, Sañudo C, García-Montesinos B, Wert-Carvajal C, Laguna E, García-Ibarbia C, Saiz-Aja JA, Ferreño D, Casado JA, Menéndez G, Pérez-Núñez MI, Riancho JA. Limitations of immunodeficient mice as models for osteoporosis studies. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2024;16(1):10-15

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00041

Correspondence:

José A. Riancho. Department of Internal Medicine. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL. Universidad de Cantabria. Av. de Valdecilla, s/n. 39008 Santander, Spain
e-mail: rianchoj@unican.es

INTRODUCTION

NOD.CB17-Prkdcscid/J mice, commonly known as NOD-SCID mice, are a genetically engineered strain of mice frequently used in biomedical research (1). These mice are characterized by a severely compromised immune system, due to a specific mutation in the *Prkdc* gene, which encodes a protein kinase vital for DNA repair during immune cell development, and by their background strain, the nonobese diabetic (NOD) mouse, which provides additional unique immune system characteristics. Due to the mutation in the *Prkdc* gene, these mice lack functional T cells and B cells, which makes them unable to mount effective adaptive immune responses (2). This deficiency prevents them from rejecting materials from foreign species, such as human cells. The NOD background contributes to defects in the natural killer (NK) cell function, which is typically less compromised in other SCID strains (2,3). This makes NOD-SCID mice particularly useful for xenograft experiments, in which human cells or tissues are grafted into mice. Therefore, they are extensively used in research involving the transplantation of human cells (1-4).

In the early 2000s, physicians started observing osteonecrosis of the jaw (ONJ) in patients without a history of radiation exposure and realized that most of these patients had breast cancer metastatic to bone or myelomatous disease and were on bisphosphonate (BP) therapy. This led investigators to propose an association between BP use and ONJ (5). The estimated incidence is 1-90 cases per 100 000 patients on BPs per year (6). Most of these cases occur in patients on high doses of BPs (especially zoledronate and pamidronate) due to cancer. Treating ONJ may be rather difficult. In recent years, mesenchymal stem cells (MSCs) have been proposed as candidates for cellular therapies in different conditions including ONJ. MSCs are adult multipotent stromal cells that can differentiate into a variety of cell types, such as osteoblasts, chondrocytes and adipocytes (7,8). Given their ability to differentiate into osteoblasts, they are attractive candidates for bone regeneration therapies. Recent research underscores the multifaceted role of MSCs, mediated not only by differentiation into osteoblasts, but also by the modulation of the bone-healing environment through paracrine effects, involving the secretion of growth factors and cytokines (9-11). Therefore, some studies in animal models have obtained promising results with MSCs applied by either systemic or local routes (12-15). To explore the potentially beneficial effect of a systemic administration of human MSCs *in vivo*, we tried to develop a murine model of ONJ and ovariectomy (OVX)-induced osteoporosis. To prevent rejection, we used immunodeficient mice and protocols previously applied to induce ONJ and osteoporosis in immunocompetent mice.

MATERIAL AND METHODS

NOD.CB17-Prkdcscid/J called NOD-SCID mice were used. Founders were obtained from Jackson Laboratories (Bar, Harbor, Maine, United States) and the colony was housed at the animal facility of University of Cantabria, Santander, Spain under aseptic conditions and veterinary control.

For the ONJ models, 8 week-old mice were anesthetised and the maxillary right first molar was extracted, as published using immunocompetent mice (16). Mice were treated with several intraperitoneal (IP) or intravenous (IV) (retro-orbital plexus) doses of 540 µg/kg of zoledronic acid. The first dose was always given 1 week before the dental extraction, with subsequent doses at weekly intervals. Some mice additionally received subcutaneous dexamethasone (10 mg/kg, 3 times a week). Mice were euthanized 1 week after the last zoledronic acid dose. The maxillary bones were dissected, fixed in formaldehyde and preserved in ethanol prior to study by micro-CT (Bruker). In some experimental mice, as well as in control mice of the same age which did not undergo any experimental procedures, the femur and the tibia were dissected and the trabecular bone volume was determined as previously described (17). After micro-CT analysis, bones were decalcified, paraffin-embedded, and stained with hematoxylin-eosin. Regions of denuded mucosa and bone necrosis (defined as 5 adjacent empty osteocytic lacunae [18]) were evaluated by 2 independent observers.

For the osteoporosis model, female 8-week old NOD-SCID mice were used. Under general anesthesia, both ovaries were exposed and removed. Mice receive opioid analgesia for pain management right after the intervention. A sham-operated group was also included. Eight weeks later, the animals were euthanized, and both the femora and the tibiae were removed and analyzed by micro-CT. T-test was assessed as statistical analysis to compare the differences between mice groups (*p*-values indicated).

Protocol approval was obtained from University of Cantabria Research Ethics Committee and Consejería de Sanidad de Cantabria, as established by current regulations (code 2016-27930).

RESULTS

OSTEONECROSIS OF THE JAW MODEL

In this study, 27 mice were used to establish an osteonecrosis of the jaw (ONJ) model, receiving varying doses of zoledronic acid administered via IV or IP access. Table I illustrates the different treatment regimens, including the number of doses, administration route, duration

Table I. Drug treatment and responses in the ONJ group

Treatment	Doses of zoledronic acid (n)	Administration route	Time of study (weeks after molar removal)	Mice (n)	Osteonecrosis cases (n)
Zoledronic acid	5	IP	5	11	0
Zoledronic acid	3	IP	3	3	0
Zoledronic acid, dexamethasone	3	IP	3	2	0
Zoledronic acid	2	IV	2	6	0
Zoledronic acid, dexamethasone	2	IV	2	5	1

IP: intraperitoneal administration group; IV: intravenous administration group.

of the study following molar extraction, and the incidence of osteonecrosis observed among the mice.

Micro-CT analysis confirmed the absence of the first molar, without abnormalities in the maxillary bone (Figs. 1 A and B). Only 1 out of the 27 mice studied showed some evidence of mild ONJ, with a small area of bone with several empty osteocytic lacunae. This mouse had been treated with 2 IV injections of zoledronic acid and dexamethasone (Figs. 1 C and D).

In some representative mice, we measured bone mass to confirm the bioactivity of zoledronic acid. As expected, trabecular bone volume was increased by zoledronic acid via IV or IP access (from a mean 30 ± 8 % to 48 ± 10 % at the femur, and 32 ± 6 % to 48 ± 12 % at the tibia).

OSTEOPOROSIS MODEL

In the evaluation of an osteoporosis model, 24 ovariectomized (OVX) mice and 11 controls (COVX) were successfully included for micro-CT analyses. Unexpectedly, bone mineral density (BMD), bone volume versus tissue volume (BV/TV) parameter, and cortical thickness were similar between the 2 groups (Fig. 2). Specifically, the mean BMD for the femur was 0.20 g/cm^2 in the OVX group, identical to the COVX group. The BV/TV mean values were 20.3 ± 4.7 % for OVX and 21.8 ± 3.2 for COVX. Hence, no significant differences were found in the bone measured parameters (BMD; $p = 0.932$; BV/TV $p = 0.1507$). Dissimilarities were not found either in the femur cortical thickness ($p = 0.4242$).

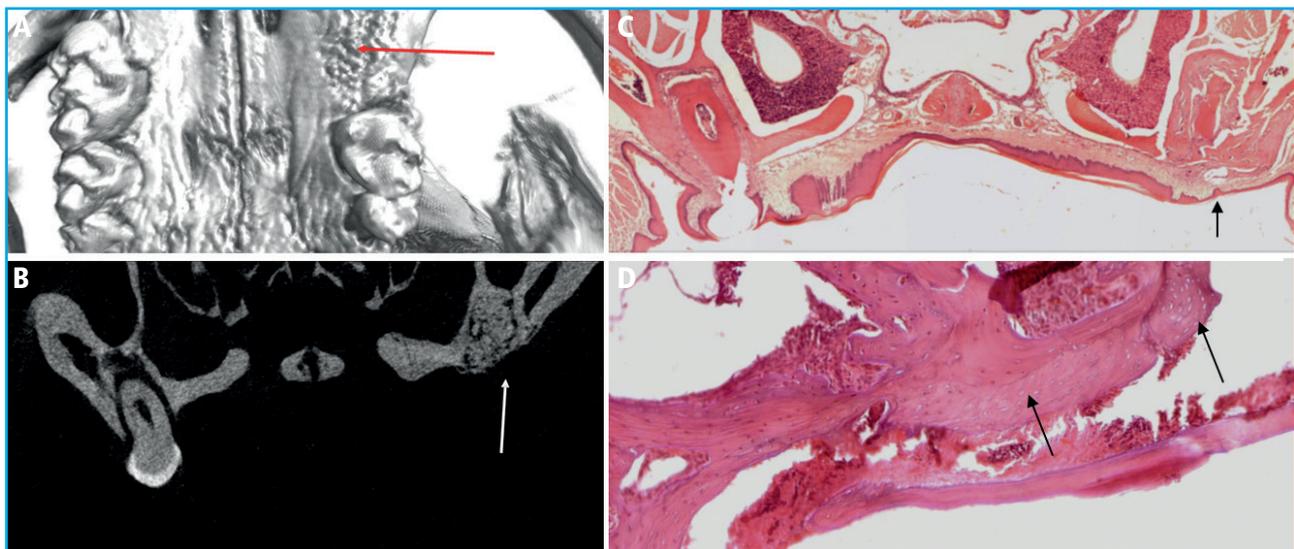


Figure 1. A. 3D reconstruction of the micro-CT analysis showing absence of first molar and cavity filled with new bone (red arrow). B. Coronal image, micro-CT analysis showing the absence of the first molar and the cavity filled with new bone (white arrow). C. Normal healing after tooth removal. HE staining showing complete regeneration of oral mucosa and filling of the cavity (black arrow). Image captured at 4 \times magnification. D. Mild bone necrosis. HE staining of the only mice showing an area of bone necrosis adjacent to the removed molar cavity (black arrows). Image captured at 10 \times magnification.

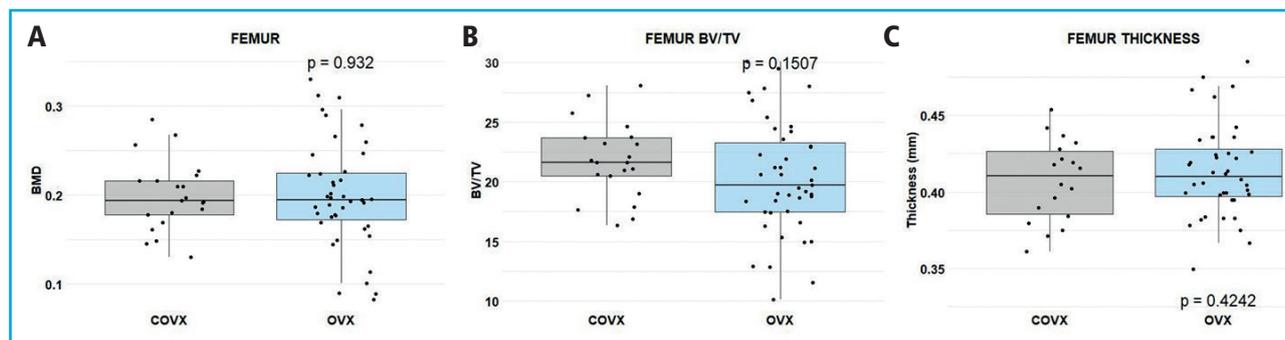


Figure 2. Comparative BMD and cortical thickness analyses with micro-CT. A. Femoral BMD of control (COVX, gray) and ovariectomized (OVX, blue) groups. B. Femoral BV/TV of COVX (gray) vs OVX (blue). C. Femoral cortical thickness of COVX (gray) and OVX (blue) groups. Statistical significance assessed via t-test (p -values indicated). Both lower limbs are represented for each mice as an individual point.

DISCUSSION

BPs are the most widely used antiresorptives in the treatment of OP and certain tumors. ONJ is a rare but serious side effect that can arise in patients on antiresorptives. As in other many complex disorders, ONJ seems to be the result of a combination of genetic and environmental factors. There are several well-established acquired risk factors associated with ONJ, such as previous dental extraction, periodontal disease, and the administration of BP (with differences depending on the type and administration route). Local infections and the immune response are also considered part of the ONJ pathogenesis. Different studies have proposed a potential role of $T\gamma\delta$ lymphocytes (18), neutrophils, and macrophages, as well as interleukins and proteins produced by cells involved in the immune system (19).

Despite molar extraction and the injection of high doses of zoledronic acid, only 1 out of the 27 studied mice developed histological findings consistent with mild ONJ. These results widely differ from the 45%-50% of ONJ cases described in studies in immunocompetent mice using a similar methodology (20,21).

Unlike immunocompetent mice, it seems that immunosuppressed mice tend not to develop ONJ even after an insult to the oral mucosa and having received high doses of BP and steroids. Although the mechanisms involved await further studies, we can speculate that it could be due to the immune deficiency *per se* or the sterile conditions in which those mice were maintained, which likely modified oral microbiota. These failed experiments reinforce the concept that factors apart from medication, such as the immune system and the microbiota, play an important role in the occurrence of ONJ after BP therapy.

In line with the ONJ model, the absence of a functional immune system in NOD.CB17-Prkdcscid/J mice, and/or the maintenance of the mice under sterile conditions seemed to prevent them from developing the expected bone loss after OVX. Studies using immu-

nocompetent mice typically report a significant decrease in BMD and changes to bone architecture after 3 weeks following ovariectomy. For example, Smith et al. (2020) observed a significant reduction in BMD and BV/TV and significant increases in trabecular separation in C57BL/6 mice 8 weeks after ovariectomy, highlighting the accelerated bone loss in this model due to normal immune function (22). These differences underscore the critical role of the immune system in post-ovariectomy bone remodeling and the potential for unique disease progression pathways in immunocompromised conditions.

The immune system plays a pivotal role in bone homeostasis, with T cells, B cells, and cytokines influencing both bone resorption and formation. In particular, T cells have been involved in osteoclastogenesis through the production of RANKL, a key osteoclast-activating factor (23). Additionally, classic studies from the Pacifici and Manolagas groups confirmed the role played by cytokines, such as IL-1, IL-6, and tumor necrosis factor, produced by immune and other cells, in OVX-induced osteoporosis (24-26). The lack of an adaptive immune response in these immunodeficient mice could therefore significantly ameliorate the osteoclast-mediated bone resorption expected to occur after ovariectomy.

Moreover, gut microbiota has been increasingly recognized for its influence on bone density and health (27). Microbiota dysbiosis has been associated with inflammatory responses capable of promoting osteoclast activity, eventually leading to bone loss (28-30). The sterile conditions under which NOD.CB17-Prkdcscid/J mice are kept could impact their microbiota, potentially affecting the incidence and progression of bone loss. This concept would be consistent with reports showing that estrogen deficiency causes a gut microbiome-dependent expansion of Th17 cells and TNF- α -producing T cells. This may be of pathophysiological importance, because the blockade of Th17 cell and TNF+ T cell egress from the gut prevented OVX-induced bone loss (31).

In conclusion, the blunted ability to induce BP-related ONJ and OVX-related decrease in bone mass is a limitation for using immunodeficient mice as experimental models in osteoporosis research. On the other hand, they highlight the role of osteoimmunological mechanisms, and perhaps body microbiota, in bone pathophysiology. The correlation between these mechanisms and their collective impact on bone health requires a broader perspective when investigating osteoporosis and should be taken into account when conducting studies with animal models.

REFERENCES

- Pearson T, Greiner DL, Shultz LD. Humanized SCID mouse models for biomedical research. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;324:25-51. DOI: 10.1007/978-3-540-75647-7_2
- Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 2005;174(10):6477-89. DOI: 10.4049/jimmunol.174.10.6477
- Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hio-ki K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002;100(9):3175-82. DOI: 10.1182/blood-2001-12-0207
- Ito M, Kobayashi K, Nakahata T. NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;324:53-76. DOI: 10.1007/978-3-540-75647-7_3
- Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the Jaws Associated with the Use of Bisphosphonates: A Review of 63 Cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62(5):527-34. DOI: 10.1016/j.joms.2004.02.004
- Khan A, Morrison A, Cheung A, Hashem W, Compston J. Osteonecrosis of the jaw (ONJ): diagnosis and management in 2015. *Osteoporos Int* 2016;27(3):853-9. DOI: 10.1007/s00198-015-3335-3
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;3(4):393-403. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 1999;284(5411):143-7. DOI: 10.1126/science.284.5411.143
- Torrecillas-Baena B, Pulido-Escribano V, Dorado G, Gálvez-Moreno MÁ, Camacho-Cardenosa M, Casado-Díaz A. Clinical Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Bone Regeneration. *J Clin Med* 2023;12(13):4385. DOI: 10.3390/jcm12134385
- Zou J, Yang W, Cui W, Li C, Ma C, Ji X, et al. Therapeutic potential and mechanisms of mesenchymal stem cell-derived exosomes as bioactive materials in tendon-bone healing. *J Nanobiotechnology* 2023;21(1):14. DOI: 10.1186/s12951-023-01778-6
- Fan S, Sun X, Su C, Xue Y, Song X, Deng R. Macrophages — bone marrow mesenchymal stem cells crosstalk in bone healing. *Front Cell Dev Biol* 2023;11:1193765. DOI: 10.3389/fcell.2023.1193765
- Kikuri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, et al. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res* 2010;25(7):1668-79. DOI: 10.1002/jbmr.37
- Rodríguez-Lozano FJ, Oñate-Sánchez R, González-García M, Vallés-Bergadá M, Martínez CM, Revilla-Nuin B, et al. Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Tooth Extractions Sites Ameliorates the Incidence of Osteonecrotic Jaw-Like Lesions in Zoledronic Acid-Treated Rats. *J Clin Med* 2020;9(6):1649. DOI: 10.3390/jcm9061649
- Ogata K, Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Sugimura Y, Hibi H, et al. Evaluation of the therapeutic effects of conditioned media from mesenchymal stem cells in a rat bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like model. *Bone* 2015;74:95-105. DOI: 10.1016/j.bone.2015.01.011
- Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo De Vera JL, Georgiev-Hristov T, Ruiz Bravo-Burguillos E, Abarrategi A, Burgueño M, et al. Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model. *J Craniomaxillofac Surg* 2015;43(7):1161-8. DOI: 10.1016/j.jcms.2015.04.026
- Park S, Kanayama K, Kaur K, Tseng HCH, Banankhah S, Quje DT, et al. Osteonecrosis of the jaw developed in mice: Disease variants regulated by $\gamma\delta$ T cells in oral mucosal barrier immunity. *J Biol Chem* 2015;290(28):17349-66. DOI: 10.1074/jbc.M115.652305
- Boussein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010;25(7):1468-86. DOI: 10.1002/jbmr.141
- Park S, Kanayama K, Kaur K, Tseng HCH, Banankhah S, Quje DT, et al. Osteonecrosis of the jaw developed in mice: Disease variants regulated by $\gamma\delta$ T cells in oral mucosal barrier immunity. *J Biol Chem* 2015;290(28):17349-66. doi: 10.1074/jbc.M115.652305
- Kim S, Williams DW, Lee C, Kim T, Arai A, Shi S, et al. IL-36 Induces Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw-Like Lesions in Mice by Inhibiting TGF- β -Mediated Collagen Expression. *J Bone Miner Res* 2017;32(2):309-18. DOI: 10.1002/jbmr.2985
- Kikuri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, et al. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res* 2010;25(7):1668-79. DOI: 10.1002/jbmr.37
- Zhao Y, Wang L, Liu Y, Akiyama K, Chen C, Atsuta I, et al. Technetium-99 conjugated with methylene diphosphonate ameliorates ovariectomy-induced osteoporotic phenotype without causing osteonecrosis in the jaw. *Calcif Tissue Int* 2012;91(6):400-8. DOI: 10.1007/s00223-012-9649-7
- Cline-Smith A, Axelbaum A, Shashkova E, Chakraborty M, Sanford J, Panesar P, et al. Ovariectomy Activates Chronic Low-Grade Inflammation Mediated by Memory T Cells, Which Promotes Osteoporosis in Mice. *J Bone Miner Res* 2020;35(6):1174-87. DOI: 10.1002/jbmr.3966
- Yu M, Pal S, Paterson CW, Li JY, Tyagi AM, Adams J, et al. Ovariectomy induces bone loss via microbial-dependent trafficking of intestinal TNF+ T cells and Th17 cells. *J Clin Invest* 2021;131(4):e143137. DOI: 10.1172/JCI143137

24. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 1992;257(5066):88-91. DOI: 10.1126/science.1621100
25. Kimble RB, Bain S, Pacifici R. The functional block of TNF but not of IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 1997;12(6):935-41. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.6.935
26. Manolagas SC. Role of cytokines in bone resorption. *Bone* 1995;17(2 Suppl):63S-67S. DOI: 10.1016/8756-3282(95)00180-I
27. Pacifici R. Bone Remodeling and the Microbiome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018;8(4):a031203. DOI: 10.1101/cshperspect.a031203
28. Hsu E, Pacifici R. From Osteoimmunology to Osteomicrobiology: How the Microbiota and the Immune System Regulate Bone. *Calcif Tissue Int* 2018;102(5):512-21. DOI: 10.1007/s00223-017-0321-0.
29. Lyu Z, Hu Y, Guo Y, Liu D. Modulation of bone remodeling by the gut microbiota: a new therapy for osteoporosis. *Bone Res* 2023;11(1):31. DOI: 10.1038/s41413-023-00264-x
30. Wang Y, Zhang X, Tang G, Deng P, Qin Y, Han J, et al. The causal relationship between gut microbiota and bone mineral density: a Mendelian randomization study. *Front Microbiol* 2023;14:1268935. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1268935
31. Yu M, Pal S, Paterson CW, Li JY, Tyagi AM, Adams J, et al. Ovariectomy induces bone loss via microbial-dependent trafficking of intestinal TNF+ T cells and Th17 cells. *J Clin Invest* 2021;131(4):e143137. DOI: 10.1172/JCI143137

Escenario Clínico y Toma de Decisiones

Osteonecrosis en el contexto de denosumab. Visión del médico especialista en metabolismo óseo y del médico especialista en maxilofacial

Caso clínico:

Se remite desde atención primaria a una paciente de 77 años, posmenopáusica desde los 53, que fue diagnosticada de osteoporosis en otra comunidad hace 6 años. La T score de la densitometría en aquel momento era de T-2.8 en columna vertebral, T-3.5 en cuello femoral y T-3.3 en cadera total. Inicialmente recibió risedronato, que hubo que suspender por mala tolerancia digestiva al año de tratamiento y por ello se cambió a denosumab semestral.

Entre sus antecedentes personales y familiares la paciente es hipertensa con buen control y su madre sufrió una fractura la cadera a los 86 años.

La enferma comenta que, a raíz de una manipulación dental, *consistente en una extracción y colocación de dos implantes* realizada hace 7 meses, comenzó con dolor y falta de cicatrización de la zona mandibular. Su dentista le dijo que desarrolló una osteonecrosis y, desde entonces, no se ha vuelto a inyectar denosumab. Tras la retirada de los implantes y el tratamiento local con plasma rico en plaquetas ha ido mejorando la sintomatología.

La T score en la densitometría actual es de -2.5 en columna vertebral, -3 en cuello femoral y -2.8 en cadera total.

Recibido: 06/05/2024 • Aceptado: 06/05/2024

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflictos de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Gómez Alonso C, Cebrián Carretero JL. Osteonecrosis en el contexto de denosumab. Visión del médico especialista en metabolismo óseo y del médico especialista en maxilofacial. Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(1):16-23

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.0042

Correspondencia:

Carlos Gómez Alonso. Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Oviedo
e-mail: gomezcarlos@uniovi.es

VISIÓN DEL MÉDICO ESPECIALISTA EN METABOLISMO ÓSEO

Dr. Carlos Gómez Alonso

Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Oviedo

El caso planteado es el arquetipo de una paciente con osteoporosis, con alto riesgo de fractura, tratada con una secuencia de antirresortivos durante un periodo de 6 años, con cierta eficacia en términos de masa ósea y sin haber sufrido fracturas en este periodo, pero que ha tenido una complicación rara, pero característica del tratamiento: osteonecrosis de maxilar, aunque no se precisa la temporalidad de la extracción dental respecto a la dosis de denosumab.

Una visión holística del caso nos plantea el abordaje de la interconexión local, ya abordado por su odontólogo y, lo que es más relevante, el manejo clínico posterior de su osteoporosis.

Puede ser de utilidad una visión global del problema, más allá de las particularidades del caso expuesto, que pueda aportar una perspectiva en la mayoría de los casos que se nos puedan plantear.

ENFERMEDAD METABÓLICA ÓSEA Y SALUD DENTAL

Las repercusiones odontológicas en las enfermedades metabólicas óseas son frecuentes: desde la pérdida de piezas dentales, que forma parte de las primeras descripciones clínicas de la osteoporosis, es una manifestación cardinal en la hipofosfatasa, la asociación con dientes hipoplásicos y la alta frecuencia de caries y destrucción de piezas dentales en la osteogénesis imperfecta, las alteraciones en la oclusión de la enfermedad de Paget o en la osteopetrosis, y diversas complicaciones en el hiperparatiroidismo primario y en la osteodistrofia renal (1).

Con todo, lo que más ha trascendido en la práctica clínica en los últimos años es una complicación muy poco frecuente como es la osteonecrosis de maxilares (ONM), asociada al tratamiento con antirresortivos en pacientes con osteoporosis, fundamentalmente bisfosfonatos (BP) y denosumab. Importante es la discriminación con respecto a los pacientes oncológicos en los que los mismos fármacos se usan en dosis muy superiores y la incidencia es notablemente mayor (2).

OSTEONECROSIS Y OSTEONECROSIS DE MAXILARES (ONM)

Puede resultar paradójico el hecho de que es posible que aparezca una osteonecrosis en cualquier hueso, los infartos o secuestros óseos, asintomáticos cuando se sitúan en áreas centrales del hueso, o tener una repercusión articular si se producen en la proximidad de la articulación, como ocurre en la necrosis avascular de la cadera o de los húmeros, pero que ni son más frecuentes con el tratamiento antirresortivo e incluso se utilizan para frenar la progresión (3,4), y en nada se parecen a la ONM asociada a antirresortivos.

Posiblemente el factor cardinal de esta diferencia venga condicionado porque los maxilares están situados en una fosa séptica, de la que les separa únicamente la mucosa oral. La inflamación crónica de la mucosa gingival va a hacer que se pierda hueso alveolar, como ocurre en pacientes con artritis inflamatoria, va a debilitar la barrera epitelial y, quizás también altere la vascularización (5,6). De ahí que sean factores de riesgo adicionales para la ONM asociada a fármacos, además de los antirresortivos, la diabetes, el consumo de alcohol, el uso de corticoides, inmunosupresores, inhibidores de la vascularización, tabaquismo y la mala higiene dental (7).

La primera descripción de ONM se realizó como enfermedad profesional en trabajadores con fósforo blanco en 1906, como por ejemplo en decoradores de cerámica que “afinaban” la punta de sus pinceles con la boca: fosfocrosis (formalmente fósforo necrosis de la mandíbula) (8). Posteriormente se describe la osteonecrosis asociada a radioterapia local en tumores de cabeza/cuello: osteonecrosis rádica (9). El común denominador de ambas era la enorme extensión de la necrosis, la abscesificación y fistulización hacia la piel, con deformidades severas y muy mal pronóstico. Esta consideración es relevante dado que todavía hoy se utilizan imágenes de dichos procesos para “ilustrar” a los pacientes de lo que puede ser una osteonecrosis de maxilares. En el capítulo de anécdotas históricas señalar que, en las aproximaciones al tratamiento médico, en estos casos se incluían la terapia PENTO —pentoxifilina, tocoferol (para mitigar el componente vascular) y clodronato (para mejorar el componente óseo)— (10), prescindiendo posteriormente de asociar el bisfosfonato (11).

No fue hasta 2003 cuando se describe como ONM asociada a BP (BRONJ, en la literatura internacional), en un paciente con mieloma múltiple tratado con pamidronato a dosis altas, la persistencia durante más de 8 semanas de exposición ósea en la cara gingival (12). Posteriormente el término evoluciona a osteonecrosis asociada a antirresortivos, al constatar que también un potente antirresortivo, como el denosumab, podría condicionar la enfermedad y, finalmente, osteonecrosis asociada a fármacos (MRONJ), al constatar aumento

de riesgo asociado con otros fármacos no relacionados con el tratamiento de la osteoporosis (13). Es relevante destacar el diagnóstico diferencial de la lesión maxilar, más allá de la medicación concomitante, que incluye sinusitis maxilar, caries dental profunda, osteítis alveolar, gingivitis y periodontitis, absceso periapical, sarcoma y osteomielitis esclerosante crónica (7).

OSTEONECROSIS DE MAXILARES ASOCIADA A FÁRMACOS ANTIOSTEOPORÓTICOS

El aluvión de publicaciones al respecto, más de 4 700 entradas en PubMed, no se ha visto acompañada de una razonable mejora en la prevención y el tratamiento de la ONM. La causa es la escasa incidencia, también motivo de discrepancia entre odontoestomatólogos/maxilofaciales y osteólogos el componente estocástico de su aparición (pese a que se reconozcan factores de riesgo, quizás el más relevante sean las intervenciones dentales), que condiciona la práctica ausencia de ensayos clínicos controlados respecto a su prevención y/o tratamiento. Baste como ejemplo que en la magnífica revisión crítica de la European Calcified Tissues Society, publicada en 2022, pese a utilizar 254 citas bibliográficas, en sus algoritmos de manejo aparece con demasiada frecuencia el verbo considerar, discutir... y medidas muy generales tanto en pacientes con osteoporosis como en pacientes oncológicos, antes o durante el tratamiento con antirresortivos (2).

En nuestra práctica clínica habitual padecemos la clasificación de la ONM asociada a fármacos más extendida de la American Association of Oral and Maxilofacial Surgeons (2) que, sin ánimo de ser extensiva, incluye:

1. "En riesgo": todos los pacientes asintomáticos en tratamiento con medicamentos con efectos óseos (razonable para antirresortivos potentes, como los bifosfonatos, denosumab, dudoso para romosozumab, pero no aceptable para los estrógenos, los SERMS [raloxifeno/bazedoxifeno] o incluso teriparatide).
2. Estadio 0: no hay evidencia clínica de hueso necrótico, pero sí síntomas o hallazgos clínicos/radiológicos inespecíficos (cualquier síntoma oral en pacientes en tratamiento).
3. Estadios 1 (hueso expuesto o fistula sin síntomas), 2 (hueso expuesto o fistula y signos de inflamación) y 3 (en el que se añade extensión más allá de hueso alveolar o fractura patológica o fistulización extraoral) que no serían discutibles.
4. Variante no expuesta (no ampliamente aceptada y excluida en las últimas actualizaciones): presencia inexplicable de dolor en los maxilares, fístula, hinchazón, dientes móviles o fractura mandibular

diagnosticada después de excluir enfermedades comunes de la mandíbula que se sabe que causan manifestaciones similares (14).

Posiblemente esta propia clasificación sea responsable de las diferentes percepciones en incidencia entre los profesionales odontológicos y los médicos relacionados con el metabolismo óseo.

¿CUÁL ES EL RIESGO DE LOS PACIENTES CON OSTEOPOROSIS Y LOS DIFERENTES FÁRMACOS?

Existe una notable dispersión en los datos de incidencia en función de su origen, e incluso con variaciones geográficas, y en el modo de expresarlos.

Para los BP orales, se estima una incidencia de entre 1/10 000 a 1/100 000 pacientes/año de tratamiento (15), del 0,01 % al 0,06 % para BP orales (2) y con un incremento a partir del cuarto año de exposición del 0,23 % (16), sin que esté claro un incremento de riesgo para BP intravenosos (zoledrónico 0,9/10 000 paciente año) (13,17), pese a que algunas guías de práctica clínica le consideran de mayor riesgo (18), posiblemente por la influencia de los incrementos de riesgo observados en indicación oncológica (19).

En el caso de denosumab, la incidencia en el estudio pivotal fue de 5,2/10 000 pacientes-año, y a 10 años, 35/100 000 pacientes-año, o del 0,30 % (12).

Comparativamente, un estudio atribuye un riesgo de 4,5/10 000 pacientes-año con BP orales frente a 28,3 /10 000 pacientes-año con denosumab, si bien dos tercios de los pacientes de este estudio habían estado en tratamiento con BP orales antes de introducir el denosumab (16,20).

En el caso de romosozumab, pese a su modesto efecto antirresortivo, los datos iniciales estiman una incidencia de entre 0,02 y 0,03 % (13), derivados de la presencia de un caso en el ensayo clínico frente a placebo (21) y de un caso en el grupo de tratamiento secuencial con alendrónico (22).

MEDIDAS PREVENTIVAS EN ONM ASOCIADAS A FÁRMACOS EN PACIENTES CON OSTEOPOROSIS

Es universal la recomendación de explorar la cavidad oral para promover el mejor estado dental posible antes de iniciar el tratamiento con antirresortivos potentes (2,23,24), aunque esta consideración debería tener:

- Asesoramiento al profesional dental sobre el riesgo de fractura del paciente a corto plazo para evitar que el saneamiento dental se prolongue un tiempo excesivo, sobre todo en pacientes con fracturas recientes y un altísimo riesgo de fractura en los que, por la razón que sea, no es posible un tratamiento anabólico.
- Asesoramiento al paciente sobre posibles opciones del tratamiento dental, más allá del posible efecto adverso al poner un tratamiento antirresortivo. No es infrecuente que se planteen tratamientos dentales teóricamente muy eficientes (implantes dentales) en pacientes que, por su osteoporosis, no tienen un hueso alveolar suficiente como para soportar los implantes y pueden “perderlos” sin que medie el tratamiento antirresortivo (Fig. 1), valorando alternativas como puentes, prótesis removibles, etc. (Fig. 2).

Si el paciente ya está en tratamiento antirresortivo debemos asesorar a ambos de que no está contraindicada la realización de extracciones o de implantes por dicha condición, el 50 % de los odontólogos así lo cree (25). La inoperancia de determinar CTX para predecir el riesgo de osteonecrosis (2,23,24) y, respecto a la conveniencia de suspender o no temporalmente el tratamiento antirresortivo, el dato fundamental es el riesgo de fractura del paciente, así como la no vinculación del riesgo de ONM al estado cualitativo/cuantitativo de la masa ósea (26).

La interrupción temporalmente del tratamiento de los bisfosfonatos no se ha demostrado que sea útil para prevenir la aparición de ONM (27) debido a su propia farmacocinética y a su persistencia en el tejido óseo. No obstante, algunas pautas, como suspender 4-8 semanas el BP oral antes de la extracción y reintroducirlo una vez cicatrizada la mucosa oral, puede tener un efecto ansiolítico en el odontólogo y en el paciente y no confiere a este último un incremento relevante de su riesgo de fractura (28,29).

En el polo opuesto se encuentra el denosumab: su suspensión entraña un notable efecto rebote, con incremento del riesgo de fractura, incluso a muy corto plazo (hasta un mes después de la dosis prevista puesta), incluso de fracturas vertebrales múltiples si el paciente tiene fracturas prevalentes (30,31). En este caso, se aconseja realizar la intervención (exodoncia/implante) en el periodo intermedio entre dos dosis (28) o al finalizar el periodo interdosis (32).

Ni que decir tiene que, ante un problema dental agudo, sin respuesta al tratamiento médico, con persistencia clínica y sufrimiento del paciente, es a este al que le corresponde tomar la decisión, previa información veraz del riesgo personalizado, incluso firmando un consentimiento informado. No es de recibo “esperar unas semanas o meses” para mayor sosiego del odontólogo/estomatólogo.

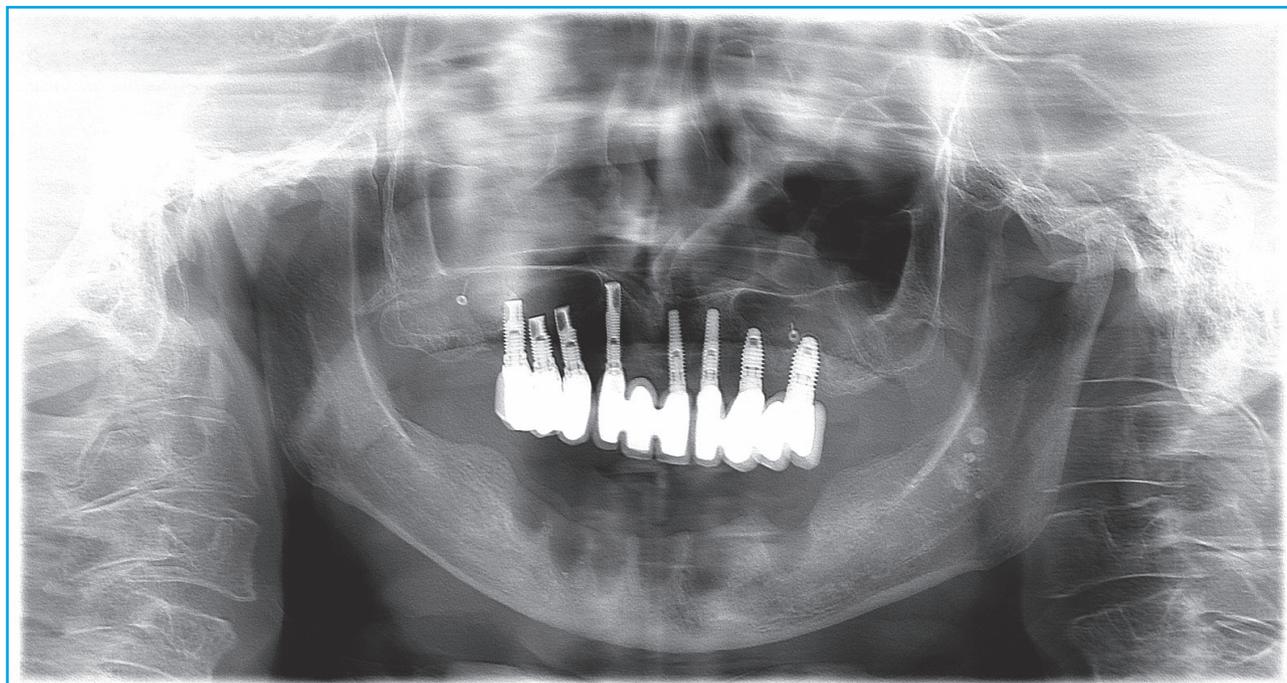


Figura 1. Paciente de 69 años de edad, osteoporosis grave (lumbar: -5; cuello de fémur: -3,2; cadera total: -3,6 T), cifosis dorsal con dos fracturas vertebrales de grado II. Remitida por pérdida de 6 implantes dentales en la mandíbula, movilidad de dos implantes en el maxilar superior. La paciente, sin tratamiento de su osteoporosis, llevaba 14 meses en el proceso de implantes, incluyendo trasplante de hueso para elevar el seno maxilar. ¿Está justificado este tratamiento?

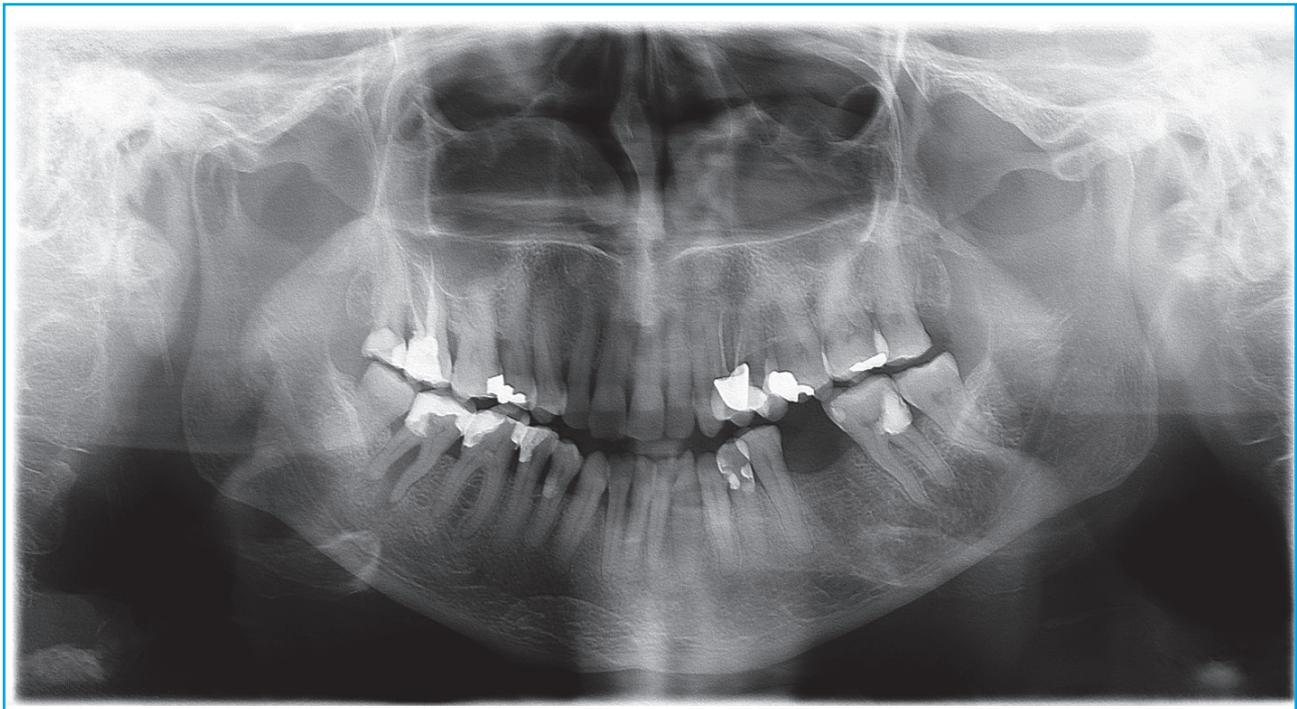


Figura 2. Paciente de 66 años de edad, tres fracturas vertebrales, 6 años en tratamiento con denosumab. DMO basal de $-3,4$ T en columna lumbar y de $-2,3$ T en cuello femoral (actual de $-2,4$ y $-1,9$ T). Extracción dental sin problemas. Le plantean implante con interrupción del denosumab. ¿Y si nos quedamos con un puente?

En cualquier caso, siempre es aconsejable extremar las medidas antisépticas en el momento quirúrgico, incluso profilaxis antibiótica (amoxicilina clavulánico desde el día anterior hasta completar 8 días en los pacientes que acumulen factores múltiples de riesgo) y enjuagues periódicos con clorhexidina, evitar extracciones múltiples en un acto quirúrgico e incluso suturar la mucosa gingival tras la extracción (28,29).

TRATAMIENTO DE ONM ESTABLECIDA

Aunque el tratamiento específico de la ONM es un ámbito de competencia del profesional especialista en patología oral, existen varias alternativas e incluso metaanálisis sobre el tema (2,28,29,33). Sin embargo, es conveniente resaltar que, si se plantea utilizar teriparatida, hay que respetar las contraindicaciones absolutas o relativas de dicho tratamiento: hipercalcemia, litiasis activa, gammapatía monoclonal de significado incierto, antecedentes de neoplasias malignas o antecedentes de radiación del esqueleto (24).

En casos graves el manejo quirúrgico sigue siendo la piedra angular de la terapia. Los antibióticos son el único complemento médico con evidencia convincente de beneficio en MRONJ en la actualidad (13).

MANEJO DEL TRATAMIENTO DEL PACIENTE CON OSTEOPOROSIS DESPUÉS DE UNA ONM

Es, sin duda, el nudo gordiano del caso clínico planteado y de nuestra práctica clínica habitual y, como en el caso de la leyenda, no cabe otra solución que la de Alejandro Magno: cortar el nudo con la espada.

En términos de morbilidad y de mortalidad no son comparables el riesgo de ONM y el riesgo que supone la fractura osteoporótica. *Ergo*, los pacientes con osteoporosis y alto riesgo de fractura deben continuar siendo tratados, pese a que hayan tenido una ONM.

La pregunta clave sería: ¿cuál es la probabilidad de recurrencia de ONM en un paciente que ya ha tenido un episodio de ONM?

No existe bibliografía relevante, más allá de algunos casos clínicos puntuales (34), respecto a la posibilidad de recurrencia de la ONM cuando persiste el tratamiento antirresortivo. Sí con el zoledrónico en indicación y a dosis oncológica (35).

En el caso de denosumab, hay alguna publicación que establece alguna recurrencia en enfermedad neoplásica (36), pero en el estudio Freedom y extensión, de

los 11 pacientes que tuvieron ONM, 8 continuaron con denosumab, en 7 casos se produjo la curación de la ONJ y en ningún caso hubo recurrencia (37).

En el caso de pacientes tratados con BP, si, como es habitual, llevan 4 años o más de tratamiento, momento en el que aumenta la incidencia de ONM (15) por el efecto residual de los BP acumulados en el hueso, podemos tener cierta calma y espaciar la reintroducción del fármaco (18 meses en el caso del risedronato y algo más con otros BP [38] por el efecto residual protector de nuevas fracturas. Incluso en pacientes con DMO muy baja o coexistencia con otros factores de riesgo notables de fractura (vg corticoides, fracturas múltiples, etc.) e intercalar previamente un ciclo de tratamiento con teriparatida (24).

En el caso de denosumab, la interrupción produce un efecto notable de aumento de remodelado, pérdida de masa ósea e incremento del riesgo de fractura, especialmente si el paciente tenía fracturas vertebrales prevalentes (30,31). En este caso se conoce que secuenciar el tratamiento con teriparatida no es eficiente en el medio plazo para contener el aumento de remodelado y la pérdida de masa ósea, sin datos respecto a si este hecho incrementa el riesgo de fractura (39). Se sabe que la transición a un BP oral no es suficiente si el paciente lleva más de dos años con denosumab e, incluso, en términos de masa ósea, no sería suficiente la transición a zoledrónico intravenoso (por otra parte, con mayor riesgo teórico de ONM) (40). La transición a romosozumab por el modesto impacto en el remodelado y la atenuación de su efecto osteoformador (además de estar descrito algún caso de ONM con romosozumab) tampoco parece la alternativa más eficiente. Por lo tanto, el mejor tratamiento posible para atenuar el efecto rebote de las interrupciones de denosumab sería su reintroducción. Cabría la opción de, en casos especiales de muy alto riesgo de fractura o de crisis de pánico tras plantearlo al paciente, hacer un periodo de tratamiento combinado (denosumab-teriparatida) y, posteriormente, con el paciente "estabilizado", plantear dejar solo denosumab o hacer una transición a BP.

Puestos a agotar los supuestos, si la ONM se produce en un paciente en tratamiento con romosozumab, pese a que no existen datos certeros sobre la conducta a seguir, asumiendo que posiblemente sea un paciente con altísimo riesgo de fractura, quizás pudiera continuarse con el mismo tratamiento o, si no existe contraindicación, teriparatida para 18-24 meses después pasar a un antirresortivo.

Ni que decir tiene que, si la ONM aparece en un paciente en tratamiento con teriparatida o SERMS, no hay que considerar su interrupción, dado que no hay ningún dato de aumento de riesgo de ONM y, pese a la extrema rareza, hay casos de aparición de ONM sin ningún tratamiento (41).

En resumen, en el caso que nos ocupa, la mejor opción de tratamiento sería continuar el tratamiento con denosumab, además del tratamiento local de su ONM.

VISIÓN DEL MÉDICO ESPECIALISTA EN MAXILOFACIAL

Dr. José Luis Cebrián Carretero

Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial. Hospital Universitario La Paz. Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid

La osteonecrosis por fármacos antirresortivos (MRONJ) es una condición poco frecuente que se produce fundamentalmente en pacientes con tratamiento con bifosfonatos intravenosos.

No obstante, en un hospital como el nuestro (Hospital Universitario La Paz) recibimos algunos pacientes que presentan osteonecrosis tras un tratamiento prolongado con bifosfonatos orales o denosumab. Habitualmente el desarrollo de la enfermedad sintomática viene acompañado de una manipulación quirúrgica en la que se actúa sobre el hueso de los maxilares, y más si esto supone dejar hueso expuesto a la cavidad oral, como ocurre tras las exodoncias. El caso aquí presentado es muy representativo de esta situación. Por un lado, se ha realizado una exodoncia y también se han colocado dos implantes dentales. Como he comentado, la exodoncia pone en contacto al hueso con una cavidad oral poblada de microorganismos potencialmente patógenos y la colocación de implantes exige que el hueso esté bien vascularizado para que se produzca el proceso de osteointegración. Así nos encontramos con las dos situaciones implicadas en la patogenia de la osteonecrosis, la infección y la alteración de la vascularización, que en este caso han resultado en la osteonecrosis mandibular. Afortunadamente parece que el proceso ha sido limitado y ha afectado solo al hueso en la zona de los implantes, lo que ha causado un secuestro óseo que se ha retirado al mismo tiempo que los implantes no integrados. En este momento lo más importante es legrar bien el hueso subyacente y asegurar una buena cobertura de partes blandas. El empleo del plasma rico en plaquetas o en factores de crecimiento puede ayudar a la cicatrización.

En nuestra experiencia, el tratamiento con denosumab no contraindica la colocación de implantes dentales. Normalmente preferimos realizar primero la extracción, asegurar una buena cobertura mucosa del alveolo y diferir la colocación de los implantes unas 10-12 semanas tras la exodoncia. Siempre emplearemos profilaxis antibiótica preoperatoria y tratamiento

antibiótico posoperatorio si lo consideramos indicado. En cuanto al mejor momento para realizarlo, y teniendo en cuenta que la administración del denosumab es semestral, recomendamos hacer los procedimientos 4 o 5 meses tras la administración del fármaco.

Finalmente, en lo que se refiere a la continuación del tratamiento farmacológico, habrá que poner en una balanza el beneficio que le produce el fármaco y el riesgo de osteonecrosis. Si ha sido un proceso localizado con un secuestro óseo que se ha retirado y el hueso ha curado bien, sin evidencia de progresión de la enfermedad, creemos que podría continuarse el tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Scheller EL, Hildebolt C, Civitelli R. Oral Manifestations of Metabolic Bone Diseases. In: Bilezikian JP (editor). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Ninth edition. Hoboken (Nueva Jersey, USA): John Wiley & Sons, Inc; 2019.
- Anastasilakis AD, Pepe J, Napoli N, Palermo A, Magopoulos C, Khan AA, et al. Osteonecrosis of the Jaw and Antiresorptive Agents in Benign and Malignant Diseases: A Critical Review Organized by the ECTS. *J Clin Endocrinol Metab* 2022;107:1441-60.
- Hong YC, Luo RB, Lin T, Zhong HM, Shi JB. Efficacy of alendronate for preventing collapse of femoral head in adult patients with nontraumatic osteonecrosis. *Biomed Res Int* 2014;716538.
- Liu B, Gao F, Xiu X, Wu T, Liu Z, Zhang B, et al. Denosumab Can Prevent Collapse in Patients with Early-Stage Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head by Inhibiting Osteoclasts and Autophagy. *Orthop Surg*. 2023;15:256-65.
- Tetradis S, McCauley L, Aghaloo T. Osteonecrosis of the Jaw. In: Bilezikian JP. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Ninth Edition. Hoboken (Nueva Jersey, USA): John Wiley & Sons, Inc; 2019.
- Tetradis S, Allen MR, Ruggiero SL. Pathophysiology of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. A Minireview. *JBMR Plus* 2023;7:e10785.
- Sharma S, Shankar R, Ravi Kiran BS, Breh R, Sarangi S, Kumar Upadhyay A. A Narrative Review of Osteonecrosis of the Jaw: What a Clinician Should Know. *Cureus* 2023;15:e51183.
- Hughes JP, Baron R, Buckland DH, Cooke MA, Craig JD, Duffield DP, et al. Phosphorus necrosis of the jaw: a present-day study. *Br J Ind Med* 1962;19:83-99.
- Chronopoulos A, Zarra T, Ehrenfeld M, Otto S. Osteoradionecrosis of the jaws: definition, epidemiology, staging and clinical and radiological findings. A concise review. *Int Dent J* 2018;68:22-30.
- Martos-Fernández M, Sáez-Barba M, López-López J, Estrugo-Devesa A, Balibrea-del-Castillo JM, Bescos-Atin C. Pentoxifylline, tocopherol, and clodronate for the treatment of mandibular osteoradionecrosis: a systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018;125:431-9.
- Cavalcante RC, Tomasetti G. Pentoxifylline and tocopherol protocol to treat medication-related osteonecrosis of the jaw: A systematic literature review. *J Craniomaxillofac Surg* 2020;48:1080-6.
- Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1115-7.
- Bennet B, Hasan Tahir H, Solanki K, Ali N. An Update on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw in Patients with Osteoporosis. *EMJ Rheumatol* 2023. DOI: 10.33590/emjrheumatol/10300262
- Ruggiero SL, Dodson TB, Aghaloo T, Carlson ER, Ward BB, Kademani D. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022 Update. *J Oral Maxillofac Surg* 2022;80:920-43.
- Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 2007;22:1479-91.
- Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2014;72:1938-56.
- Grbic JT, Black DM, Lyles KW, Reid DM, Orwoll E, McClung M, et al. The incidence of osteonecrosis of the jaw in patients receiving 5 milligrams of zoledronic acid: data from the health outcomes and reduced incidence with zoledronic acid once yearly clinical trials program. *J Am Dent Assoc*. 2010;141:1365-70.
- Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY; Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis (ESCEO) and the Committees of Scientific Advisors and National Societies of the International Osteoporosis Foundation (IOF). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2019;30:3-44.
- Peng J, Wang H, Liu Z, Xu ZL, Wang MX, Chen QM, et al. Real-world study of antiresorptive-related osteonecrosis of jaw based on the US food and drug administration adverse event reporting system database. *Front Pharmacol* 2022;13:1017391.
- Everts-Graber J, Lehmann D, Burkard JP, Schaller B, Gahl B, Häuselmann H, et al. Risk of Osteonecrosis of the Jaw Under Denosumab Compared to Bisphosphonates in Patients with Osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2022;37:340-8.
- Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, et al. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 2016;375:1532-43.
- Saag KG, Petersen J, Brandt ML, Karaplis AC, Lorentzon M, Thomas T, et al. Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 2017;377:1417-27.
- Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ, Bagán Sebastián JV, Díaz Curiel M, Díez Pérez A, Jódar Gimeno E, et al. Osteonecrosis de los maxilares: documento de consenso. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2009;1:41-51.
- Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, et al; International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res* 2015;30:3-23.
- Fernández-Ávila DG, Ávila V, Muñoz O, Moreno I, Ballén D, Vellozo J, et al. Conocimientos y decisiones clínicas de los odontólogos colombianos acerca del riesgo de las osteonecrosis de los maxilares en pacientes que reciben tratamiento para la osteoporosis. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2022;14:55-63.

26. Quintana-González M, Quintana-Montesdeoca P, Gómez de Tejada-Romero MJ, Saavedra-Santana P, Vicente-Barrero M, Bocanegra-Pérez S, et al. Estado cualitativo y cuantitativo óseo generalizado en la osteonecrosis de maxilares. Efecto de los bifosfonatos. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2019;11:55-63.
27. Ottesen C, Schiodt M, Gotfredsen K. Efficacy of a high-dose antiresorptive drug holiday to reduce the risk of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): A systematic review. *Heliyon* 2020;6:e03795.
28. Romero-Ruiz MM, Romero-Serrano M, Serrano-González A, Serrera-Figallo MÁ, Gutiérrez-Pérez JL, Torres-Lagares D. Proposal for a preventive protocol for medication-related osteonecrosis of the jaw. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2021;26:314-26.
29. Ruggiero SL, Dodson TB, Aghaloo T, Carlson ER, Ward BB, Kademani D. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022 Update. *J Oral Maxillofac Surg* 2022;80:920-43.
30. Felicia Cosman F, Huang S, McDermott M, Cummings SR. Multiple Vertebral Fractures After Denosumab Discontinuation: FREEDOM and FREEDOM Extension Trials Additional Post Hoc Analyses. *J Bone Miner Res* 2022;37:2112-20.
31. Flórez H, Ramírez J, Monegal A, Guañabens N, Peris P. Spontaneous vertebral fractures after denosumab discontinuation: A case collection and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum* 2019;49:197-203.
32. Colella A, Yu E, Sambrook P, Hughes T, Goss A. What is the Risk of Developing Osteonecrosis Following Dental Extractions for Patients on Denosumab for Osteoporosis? *J Oral Maxillofac Surg* 2023;81:232-7.
33. Bermúdez-Bejarano EB, Serrera-Figallo MÁ, Gutiérrez-Corrales A, Romero-Ruiz MM, Castillo-de-Oyagüe R, Gutiérrez-Pérez JL, et al. Analysis of different therapeutic protocols for osteonecrosis of the jaw associated with oral and intravenous bisphosphonates. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2017;22:43-57.
34. Pispati A, Pandey V, Patel R. Oral Bisphosphonate Induced Recurrent Osteonecrosis of Jaw with Atypical Femoral Fracture and Subsequent Mandible Fracture in the Same Patient: A Case Report. *J Orthop Case Rep* 2018;8:85-8.
35. Chen S, Ren H, He Y, An J, Zhang Y. Recurrence-Related Factors of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Five-Year Experience. *J Oral Maxillofac Surg* 2021;79:2472-81.
36. Raimondi A, Simeone N, Guzzo M, Maniezzo M, Collini P, Morosi C, et al. Rechallenge of denosumab in jaw osteonecrosis of patients with unresectable giant cell tumour of bone: a case series analysis and literature review. *ESMO Open* 2020;5:e000663.
37. Kendler DL, Cosman F, Stad RK, Ferrari S. Denosumab in the Treatment of Osteoporosis: 10 Years Later: A Narrative Review. *Adv Ther* 2022;39:58-74.
38. Peris P, Torra M, Olivares V, Reyes R, Monegal A, Martínez-Ferrer A, et al. Prolonged bisphosphonate release after treatment in women with osteoporosis. Relationship with bone turnover. *Bone* 2011;49:706-9.
39. Leder BZ, Tsai JN, Uihlein AV, Wallace PM, Lee H, Neer RM, et al. Denosumab and teriparatide transitions in postmenopausal osteoporosis (the DATA-Switch study): extension of a randomised controlled trial. *Lancet* 2015;386:1147-55.
40. Tsourdi E, Langdahl B, Cohen-Solal M, Aubry-Rozier B, Eriksen EF, Guañabens N, et al. Discontinuation of Denosumab therapy for osteoporosis: A systematic review and position statement by ECTS. *Bone* 2017;105:11-7.
41. Reid IR, Cundy T. Osteonecrosis of the jaw. *Skeletal Radiol* 2009;38:5-9.

Nota Clínica

Nuevas formas de resistencia a la acción de los análogos de paratohormona humana

Jesús Manuel Morán López¹, Mónica Benítez Díaz², María Piedra León³, Andrea Cordero Pearson⁴, Fidel Jesús Enciso Izquierdo⁴, José Antonio Amado Señaris³

Servicios de ¹Endocrinología y Nutrición, y ²Medicina Familiar y Comunitaria. Hospital Virgen del Puerto. Plasencia, Cáceres.

³Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. ⁴Servicio de Endocrinología y Nutrición. Complejo Hospitalario de Cáceres. Cáceres

Resumen

Introducción: comunicar la aparición de resistencia a la acción de teriparatida en un paciente afecto de hipoparatiroidismo posquirúrgico bajo tratamiento sustitutivo con dicha molécula que inicialmente presentó una respuesta óptima.

Caso clínico: descripción de un caso clínico en el que un paciente con hipoparatiroidismo posquirúrgico tratado con teriparatida presenta disminución progresiva de la eficacia del mismo y se prueba la aparición de resistencia a la teriparatida biosimilar con la que estaba tratado. Se usa el test de Ellsworth-Howard para evaluar la resistencia de teriparatida.

Discusión: el paciente presentó una respuesta al test de Ellsworth-Howard compatible con resistencia a la teriparatida. Se comparó con una paciente con hipoparatiroidismo crónico a la que se sometió al mismo test con la misma molécula, obteniendo una respuesta funcional adecuada. Se presenta la aparición de un fallo primario a un tratamiento sustitutivo con teriparatida en contexto de un hipoparatiroidismo crónico. La etiología autoinmune por desarrollo de autoanticuerpos bloqueantes es la hipótesis más probable.

Palabras clave:

Teriparatida.
Hipoparatiroidismo crónico posquirúrgico.
Resistencia.

Recibido: 11/12/2023 • Aceptado: 15/03/2024

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Morán López JM, Benítez Díaz M, Piedra León M, Cordero Pearson A, Enciso Izquierdo FJ, Amado Señaris JA. Nuevas formas de resistencia a la acción de los análogos de paratohormona humana. Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(1):24-27

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00031

Correspondencia:

Mónica Benítez Díaz. Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Virgen del Puerto. Paraje Valcorchero, s/n. 10600 Plasencia, Cáceres
e-mail: monica.benitez@salud-juntaex.es

CASO CLÍNICO

Presentamos el caso de un varón de 28 años, con antecedentes de tiroidectomía total por carcinoma papilar de tiroides estadio II a la edad de 17 años. Tras la cirugía desarrolló un hipoparatiroidismo de difícil control, motivo por el cual se inició tratamiento sustitutivo con teriparatida 20 mcg s.c. cada 12 horas en febrero 2022, con normalización del metabolismo fosfocálcico que permaneció estable durante 18 meses desde el inicio del mismo (1). Desde agosto del año 2021, volvió a presentar alteraciones analíticas compatibles con hipoparatiroidismo, con correcciones parciales precisando en ocasiones asociar de nuevo calcitriol y carbonato de calcio o ajustar la dosis de teriparatida hasta los 0,8 mcg/kg/día en 3 dosis (20-20-20 mcg s.c.) siguiendo lo descrito por el estudio de K.K. Winer en los que la dosis de teriparatida para conseguir normocalcemia sin necesidad de utilizar calcitriol ni sales de calcio oscilaba entre 0,47 + 0,33 mcg/kg/día (2). Las evoluciones analíticas y los cambios terapéuticos se presentan en la figura 1. Dadas las dosis alcanzadas bajo tratamiento sustitutivo con teriparatida (iguales a las dosis máximas presentadas en las series de casos conocidas hasta la fecha), nos planteamos la posibilidad de fallo primario del tratamiento sustitutivo una vez descartada la posibilidad de falta de adherencia terapéutica, dado el patrón de resistencia al mismo.

DISCUSIÓN

Sabemos que la PTH es una hormona peptídica de 84 aminoácidos producida en las glándulas paratiroides. Su extremo amino terminal 1-34 constituye la fracción activa. Su receptor membrana PTH-PTHrp está acoplado a una proteína G estimuladora de adenilato-ciclasa que genera AMPc como segundo mensajero. A nivel renal, inhibe la expresión de los cotransportadores Na-P 2A y 2C, induciendo una respuesta fosfática. Ambas respuestas (fosfática y aumento de la excreción de AMPc en orina) han sido la base del estudio de funcionalidad de la PTH. En los años 70, Broadus (3) delimitó aún más la respuesta renal a la PTH con la determinación del AMPc nefrogénico (NAMPC) eliminando factores que podían interferir en la interpretación de la excreción urinaria de AMPc (otras hiperfunciones hormonales o respuestas farmacológicas mediadas por AMPc). La génesis de NAMPC es en su práctica totalidad secundaria a la acción renal de la PTH, con un componente debido a vasopresina prácticamente despreciable a niveles fisiológicos (3). Estos conocimientos llevaron a la estandarización del test de Ellsworth-Howard (4) para la determinación de la respuesta orgánica a la PTH. Posteriormente, apareció la estandarización del mismo con teriparatida en vez de utilizar extracto de PTH purificada (5). Se considera

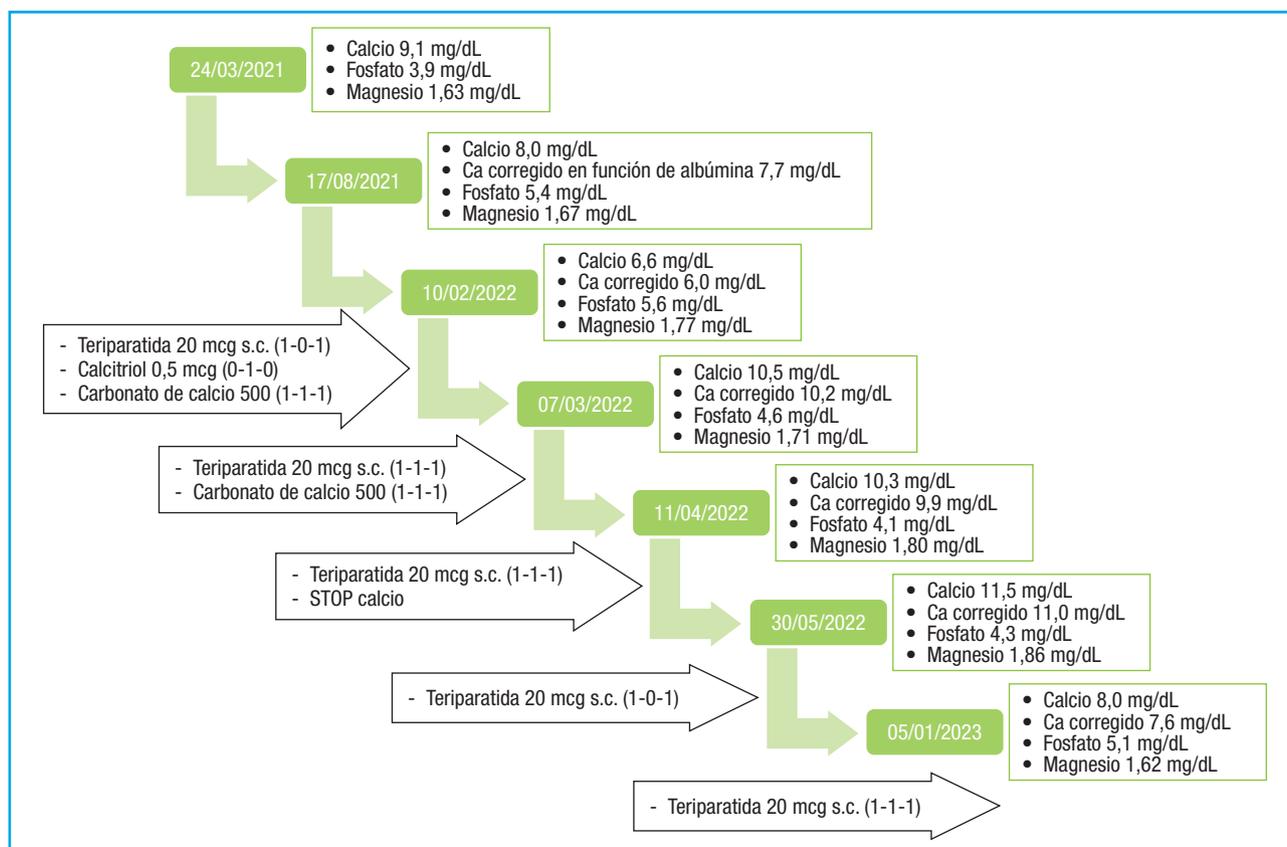


Figura 1. Evolución del metabolismo fosfocálcico desde agosto de 2021.

normal un aumento de la respuesta fosfatúrica de, al menos, 200 % y de la de AMPc nefrogénico de al menos 1000 % (6); esta respuesta es más llamativa en los pacientes con hipoparatiroidismo. Por otra parte, una respuesta inferior se describe en estados de resistencia a la PTH (pseudohipoparatiroidismo).

Se realizó un test de Ellsworth-Howard (E-H) al enfermo objeto del caso (paciente 1) administrando 20 mcg de teriparatida endovenosa en infusión lenta durante 15 minutos; paralelamente, se realizó el mismo test a una paciente control (paciente 2) afecta igualmente de hipoparatiroidismo posquirúrgico y osteoporosis, en la que se indicó tratamiento con teriparatida 20 mcg diarios como tratamiento de la misma. Ambos test siguieron el mismo protocolo y se administró la misma biomolécula (teriparatida Movymia [Laboratorios STADA]). Las respuestas del metabolismo fosfocálcico de ambos pacientes se recogen en la siguiente tabla (Tabla I).

Analizando la respuesta al estímulo con PTH 1-34 del paciente 1, observamos una respuesta fosfatúrica bloqueada, así como un aumento subóptimo del AMPc nefrogénico. La paciente 2 sin embargo presenta una respuesta fosfatúrica óptima, así como un gran aumento en la génesis de AMPc nefrogénico (Fig. 2).

En el caso del paciente 1, enfermo afecto de hipoparatiroidismo crónico, con una respuesta inicial óptima a teriparatida, la disminución de la efectividad del tratamiento sustitutivo y la respuesta al test de

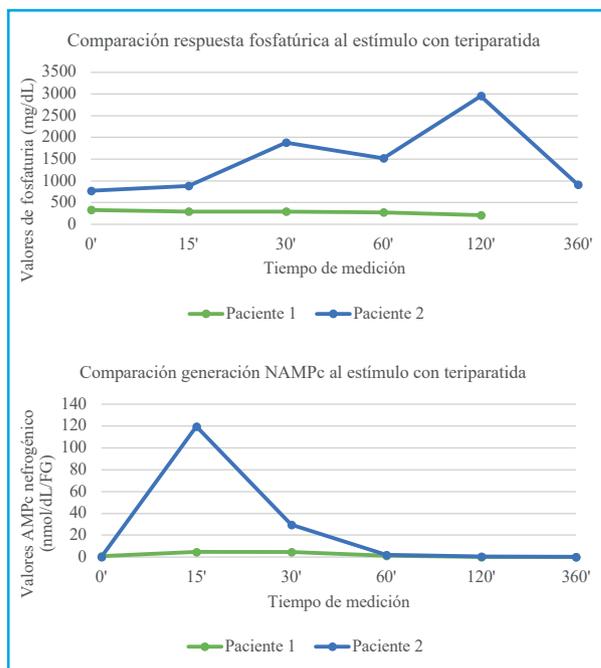


Figura 2. Comparación resultados test E-H.

Ellsworth-Howard, es compatible con un fallo primario al tratamiento sustitutivo con teriparatida con patrón de resistencia a la acción de la misma. Esta conclusión se ve refrendada por la respuesta adecuada de una paciente control (paciente 2) con la misma patología

Tabla I. Respuestas del metabolismo fosfocálcico								
	Paciente	0'	15'	30'	60'	120'	360'	Niveles de normalidad
Filtrado glomerular	1	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 60 mL/min/1,73 m ²
	2	72	75	75	82	85	78	
PTH	1	< 10						15-65 pg/mL
	2	11,4						
Calcio ajustado a albúmina	1	6,9	7,2	7,2	8,08	7,8	6,9	8,4-10,2 md/dL
	2	8,5	8,5	8,54	8,6	8,9	9,2	
Magnesio	1	1,62	1,66	1,65	1,59	1,7	1,53	1,6-2,6 mg/dL
	2	1,81	2,04	1,85	1,82	1,84	1,91	
Fosfato	1	4,6	4,4	4,6	4,8	4,7	4,7	2,5-4,5 mg/dL
	2	4,8	4,4	4,4	4,4	4,5	4,7	
25(OH)-D	1	13,5						20-40 mg/mL
	2	20,9						
1,25(OH)-2D	1	44						20-54 mg/mL
	2	22						
Fosfatúria	1	329	295	292	269	211	No calc	40-136 mg/dL
	2	772	882	1885	1518	2952	909	
NAMPc	1	0,71	4,76	4,73	1,32	< 0,3	< 0,3	0,30-3,80 nmol/dL FG
	2	> 0,3	119,62	29,75	2,16	> 0,3	< 0,3	

de base (hipoparatiroidismo crónico bajo tratamiento sustitutivo con PTH 1-34), al test de E-H con una dosis de teriparatida extraída del mismo lote y pluma que el caso objeto de la publicación, lo cual excluye la posibilidad de fármaco adulterado o inactivo.

En el desarrollo clínico de teriparatida Movymia se describió la presencia de anticuerpos antiteriparatida en 2 de los 126 individuos incluidos en el grupo de teriparatida Forsteo, ninguno de ellos bloqueante y no se describió desarrollo de autoanticuerpos en el grupo asignado a teriparatida Movymia (7). Debemos destacar que los estudios de desarrollo clínico de teriparatida Movymia se realizaron en pacientes con osteoporosis sin hipoparatiroidismo, por lo que no podemos extrapolar los resultados de autoinmunidad a nuestro paciente.

Para esclarecer la naturaleza de la sustancia bloqueante se intentó solicitar un *kit* de determinación de anticuerpos antiteriparatida (no comercializado) o determinaciones seriadas de PTH 1-34 en soluciones diluidas o precipitación en polietilenglicol para eliminar la interferencia de anticuerpos bloqueantes, si bien los actuales ensayos comerciales de tercera generación para determinación de PTH presentan una doble unión a los fragmentos 1-38 y 38-84, no pudiéndose llevar a cabo estas pruebas. Aun así, el desarrollo de autoanticuerpos supone la principal hipótesis de la génesis del bloqueo a la acción de teriparatida, siguiendo los modelos de fallo primario a la respuesta a tratamientos con otras moléculas como, por ejemplo, los fármacos biológicos.

En conclusión, presentamos nuestro primer caso de fallo primario al tratamiento sustitutivo con teriparatida en un varón con hipoparatiroidismo crónico posquirúrgico de larga evolución, con respuesta compatible a resistencia a la misma probablemente inducida por autoanticuerpos bloqueantes frente a la teriparatida.

Sería de interés estudiar la pérdida de efectividad del tratamiento sustitutivo en pacientes de estas características a largo plazo y esclarecer su origen, considerando la determinación de anticuerpos antiteriparatida en caso de pérdida de actividad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Morán-López JM, Crespo-Gutiérrez J, Puech-De Oriol M. Teriparatida en el tratamiento sustitutivo del hipoparatiroidismo crónico. A propósito de un caso. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2022;14(4):104-6. DOI: 10.4321/s1889-836x2022000400002
2. Winer. Advances in the treatment of hypoparathyroidism with PTH 1-34. *Bone* 2019;129:535-41. DOI: 10.1016/j.bone.2018.09.018
3. Broadus AE, Mahaffey JE, Bartter C, Neer RM. Nephrogenous Cyclic Adenosine Monophosphate as a Parathyroid Function Test. *J Clin Invest* 1977;60:771-83. DOI: 10.1172/JCI108831
4. Mallet E, De Ménibus CH, Lecoindre C. L'e test d'ellsworth-howard [The Ellsworth-Howard test]. *Arch Fr Pediatr* 1976;33(8):835-7.
5. Sohn HE, Furukawa Y, Yumita S, Miura R, Unakami H, Yoshinaga K. Effect of synthetic 1-34 fragment of human parathyroid hormone on plasma adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) concentrations and the diagnostic criteria based on the plasma cAMP response in Ellsworth-Howard test. *Endocrinol Jpn* 1984;31(1):33-40. DOI: 10.1507/endocrj1954.31.33
6. Lavin N, editor. *Manual of Endocrinology and Metabolism*. 4th ed. 2009 Chapter 25. Disorders of Calcitropic Hormones in Adults. Lippincott; 2009. pp. 357.
7. Hagino N, Narita R, Yokoyama Y, et al. A multicenter, randomized, rater-blinded, parallel-group, phase study to compare the efficacy, safety, and immunogenicity of biosimilar RGB-10 and reference once-daily teriparatide in patients with osteoporosis. *Osteoporosis Int* 2019;30(10):2027-37. DOI: 10.1007/s00198-019-05038-y

Nota Clínica

Síndrome de calcio-alcálinos: ¿una causa rara de hipercalcemia?

Silvia Górriz Pintado¹, Alberto Vilchez Rodríguez², Felipe de la Fuente García¹, Pedro Luis Estela Burriel¹

¹Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario de la Ribera. Alzira, Valencia. ²Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Francesc de Borja. Gandía, Valencia

Resumen

La hipercalcemia severa es un trastorno hidroelectrolítico con expresión clínica variable que puede ser grave si no se toman las medidas correctoras adecuadas. Entre las principales causas de hipercalcemia se encuentran el hiperparatiroidismo primario y las neoplasias. Sin embargo, parece ser que están aumentando los casos de una tercera causa de hipercalcemia secundaria. El síndrome de calcio y alcalinos, anteriormente denominado como síndrome de leche y alcalinos, es un trastorno derivado de la excesiva ingesta de calcio y compuestos alcalinos que cursa con hipercalcemia, alcalosis metabólica y fallo renal. Uno de los causantes de este síndrome es la ingesta de antiácidos de carbonato cálcico para las dispepsias, que también se utilizan (algunas veces junto con metabolitos de la vitamina D) para tratar patologías óseas o en tratamientos médicos posquirúrgicos tras la intervención de las glándulas tiroideas y paratiroides.

Describimos cuatro casos de pacientes que desarrollaron este síndrome con hipercalcemia grave en el contexto del tratamiento del hipoparatiroidismo posquirúrgico con el objetivo de sensibilizar a clínicos y pacientes acerca de los riesgos potenciales de los suplementos de calcio asociados a calcitriol.

Palabras clave:
Hipercalcemia.
Alcalosis. Calcio.
Carbonato.
Calcitriol.

Recibido: 08/05/2024 • Aceptado: 28/02/2024

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflictos de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Górriz Pintado S, Vilchez Rodríguez A, de la Fuente García F, Estela Burriel PL. Síndrome de calcio-alcálinos: ¿una causa rara de hipercalcemia? Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(1):28-31

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00037

Correspondencia:

Felipe de la Fuente García. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario de la Ribera. Ctra. de Corbera, km 1. 46600 Alzira, València
e-mail: dlf.g.felipe@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La hipercalcemia es un hallazgo relativamente frecuente en la práctica clínica diaria. Es el resultado del fracaso de la excreción renal de calcio para compensar el aumento de la entrada de calcio en la circulación (1). Entre las principales causas se encuentran el hiperparatiroidismo primario y la hipercalcemia secundaria a un proceso neoplásico maligno, si bien existen múltiples situaciones que pueden provocar niveles elevados de calcio sérico, aunque con menor frecuencia (2). Identificar correctamente la causa de la elevación de la calcemia es fundamental para aplicar el tratamiento adecuado (3).

Los tratamientos con calcitriol están indicados en pacientes con osteodistrofia renal, hipoparatiroidismo posquirúrgico idiopático (4), pseudohiparatiroidismo, raquitismo dependiente de vitamina D (5) o resistente a esta, osteomalacia y para el tratamiento prequirúrgico en hiperparatiroidismo primario. El carbonato cálcico está indicado en la prevención de la deficiencia de calcio y como coadyuvante en el tratamiento de la osteoporosis (6). Ambos medicamentos tienen como reacción adversa la hipercalcemia, muy frecuente (más de un caso por cada 10 pacientes tratados) en el caso del calcitriol y poco frecuente (más de un caso por cada 1000 pacientes tratados) para el carbonato cálcico.

El síndrome de calcio y alcalinos (SCA) es el término más actualizado del ampliamente conocido síndrome de leche y alcalinos. El cuadro se caracteriza por la tríada de hipercalcemia, alcalosis metabólica y distintos grados de fallo renal como consecuencia de la ingesta de calcio junto con un alcalino absorbible (7,8).

A continuación, se reportan cuatro casos de SCA que presentaron hipercalcemia grave para aumentar la conciencia entre clínicos y pacientes acerca de la no inocuidad de los suplementos de calcio asociados a calcitriol.

CASOS CLÍNICOS

PRIMER CASO CLÍNICO

Mujer de 77 años con antecedentes de dislipemia y cardiopatía isquémica crónica, con función renal conservada (creatinina sérica de 1,15 mg/dL), que seguía tratamiento con enalapril, torasemida y ácido acetilsalicílico. Fue diagnosticada de hiperparatiroidismo primario, por lo que se realizó una paratiroidectomía derecha. Ante la persistencia de la clínica, requirió una nueva intervención quirúrgica que implicó paratiroidectomía y hemitiroidectomía izquierda. Se inició tratamiento farmacológico con carbonato cálcico (2 g cada 24 horas) y calcitriol (0,5 µg cada 24 horas).

A pesar del tratamiento, la paciente presentó un cuadro de hipocalcemia con hiperreflexia y signo de Trousseau positivo que precisó de ingreso hospitalario para reposición electrolítica. El electrocardiograma realizado al ingreso fue normal. Tras el alta, se procedió al aumento de dosis de carbonato cálcico a 5 g cada 6 horas. En un control rutinario, la paciente presentó una calcemia de 17,1 mg/dL (8,7-10,4 mg/dL) con: calcio iónico: 2,3 mmol/L (1-1,4 mmol/L); creatinina: 1,93 mg/dL (0,5-1,1 mg/dL); bicarbonato de 33 mmol/L (22-28 mmol/L); fosfato: 2,2 mg/dL (2,4-5,1 mg/dL); PTH suprimida (15-65 pg/mL) y 25 hidroxivitamina D (250 HD) de 21,1 ng/mL (30-40 ng/mL). Ante estos hallazgos analíticos se contactó con el médico encargado del control de la paciente para ampliar el estudio analítico del pH; se obtuvo un valor de 7,43 (7,32-7,42).

La paciente fue citada en el hospital y se suspendió de manera inmediata el tratamiento con carbonato cálcico y calcitriol. A la exploración, la paciente se encontraba asintomática, sin signos electrocardiográficos sugestivos de complicación por hipercalcemia, por lo que no se le aplicaron otras medidas correctoras. En controles posteriores, tras la retirada del calcitriol y del carbonato cálcico, la paciente mostró una progresiva mejoría de la función renal y descenso de la calcemia hasta los valores de referencia.

SEGUNDO CASO CLÍNICO

Varón de 51 años sin antecedentes clínicos de interés ni alteraciones analíticas a destacar en controles previos, y con una última determinación de creatinina de 1,14 mg/dL, que precisó tiroidectomía total por bocio endotorácico. Tras una segunda intervención por persistencia de la clínica, inició tratamiento farmacológico con levotiroxina (125 µg cada 24 h), carbonato cálcico (4,5 g cada 24 h) y calcitriol (0,50 µg cada 24 horas). En un control rutinario, el paciente presentó una calcemia de 13,1 mg/dL con calcio iónico de 1,57 mmol/L; creatinina: 2,23 mg/dL; pH: 7,39; bicarbonato: 31,1 mmol/L, PTH suprimida y 25° HD de 27 ng/mL.

El paciente fue citado en el hospital, donde se confirmaron los hallazgos analíticos. A la exploración presentaba dolor en zona lumbar, parestesias, astenia y dolores musculares generalizados que se habían incrementado en los últimos días. Se suspendió el tratamiento farmacológico de inmediato y se procedió al ingreso hospitalario para tratamiento fluidoterápico (300 ml de NaCl 0,9 % cada 24 h) con el objetivo de hidratar y minimizar el daño renal, y ácido zoledrónico como inhibidor de la resorción ósea para impedir la liberación de calcio desde el hueso (ampolla 4 mg / 5 mL en infusión durante 15 minutos) (9). Ante la normalización de la calcemia (8,2 mg/dL), se procedió al alta hospitalaria tras cuatro días de ingreso. Se realizó interconsulta con el Servicio de Nefrología ante la persistencia de la in-

suficiencia renal, con valores de creatinina de 1,63 mg/dL. En una ecografía renal se detectaron cálculos radiopacos sugestivos de oxalato cálcico en ambos riñones. Tras la expulsión de los cálculos el paciente mostró una recuperación completa de la función renal.

TERCER CASO CLÍNICO

Mujer de 58 años diagnosticada de hiperparatiroidismo primario, por lo que se le realizó una paratiroidectomía izquierda. Ante la progresión de la osteoporosis y la persistencia de la clínica, se realizó paratiroidectomía total. Tras la intervención, se pautó carbonato cálcico (3 g cada 24 horas), calcitriol (1 µg cada 24 horas), levotiroxina (50 µg cada 24 horas) y esomeprazol (40 mg cada 24 horas). Las analíticas anteriores al episodio no mostraban signos a destacar. La última determinación de creatinina previa era de 1,37 mg/dL.

La paciente acudió al Servicio de Urgencias por un cuadro de malestar general, estreñimiento y disminución de la diuresis de varios días de evolución, junto con náuseas, vómitos y debilidad generalizada. En la analítica realizada se objetivó una creatinina de 2,73 mg/dL, calcemia de 17,3 mg/dL con calcio iónico de 2,08 mmol/L, PTH suprimida, pH de 7,40, bicarbonato de 33,1 mmol/L y TSH de 1,05 µg/mL (0,27-5,0 µg/mL).

Ante los resultados la paciente ingresó con el diagnóstico de insuficiencia renal e hipercalcemia. Se pautó fluidoterapia intravenosa (300 ml de NaCl 0,9 % cada 24 h) para conservar la función renal y disminuir la calcemia, metilprednisolona (40 mg cada 12 horas en dilución intermitente) junto con la retirada inmediata de carbonato cálcico y calcitriol. Después de tres días de ingreso, se normalizó la calcemia (9,8 mg/dL) y la creatinina mejoró discretamente (2,17 mg/dL). Se procedió al alta hospitalaria, con control posterior en Atención Primaria.

CUARTO CASO CLÍNICO

Mujer de 63 años con dislipemia y depresión tratadas con atorvastatina y fluoxetina como antecedentes clínicos de interés. Además, años atrás se le había realizado una tiroidectomía total, que fue tratada para el hipotiroidismo posquirúrgico con levotiroxina (100 µg cada 24 horas), carbonato cálcico (2 g cada 12 horas) y calcitriol (0,5 µg cada 12 horas). Ingresó en el servicio de urgencias con clínica de mareos, debilidad y vómitos, a lo que se añadió, tras la primera exploración, una tensión arterial de 164/90 mmHg. Las analíticas previas no mostraban alteraciones de interés y tanto la función renal como el calcio estaban en rango de normalidad unos meses antes durante una analítica de rutina (creatinina de 0,9 mg/dL y calcio total de 10,4 mg/dL).

La analítica mostró un calcio total de 19 mg/dL, un calcio iónico de 2,08 mmol/L, bicarbonato de 31,8 mmol/L, un pH de 7,45, PTH suprimida y creatinina de 1,31 mg/dL, lo que ofrece un juicio diagnóstico de hipercalcemia secundaria grave. Se procede a tratamiento con fluidos, metilprednisolona (40 mg cada 24 horas en dilución intermitente) y ácido zoledrónico intravenoso (4 mg / 100 ml durante 15 minutos).

La paciente queda ingresada. De inmediato se le privó del carbonato cálcico y del calcitriol. Se monitorizaron los niveles de calcio, que llegaron a alcanzar valores tras dos días de ingreso hospitalario de 11,4 mg/dL y un pH de 7,52. La paciente continuó ingresada y al cuarto día de ingreso se objetivaron valores de calcio de 10,0 mg/dL y un pH de 7,42. Al alta se pautó analítica de seguimiento a los dos meses y se recomendó reinstaurar el tratamiento de carbonato de calcio y calcitriol, reduciendo la dosis respecto a la pautada anteriormente a 500 mg cada 12 horas y 0,5 µg al día, respectivamente.

DISCUSIÓN

Desde la introducción de los fármacos inhibidores de la bomba de protones en el tratamiento de la dispepsia, el SCA pasó a considerarse una causa poco frecuente de hipercalcemia (< 1 % de los casos) (10). Sin embargo, numerosos autores sugieren que está produciéndose un aumento en la incidencia de este síndrome. En las últimas series estudiadas, es el causante de más del 12 % de los casos de hipercalcemia. Estos datos situarían al SCA como la tercera causa de hipercalcemia (7) y la segunda causa de hipercalcemia severa (7,8). Esta situación puede explicarse debido al aumento de la prescripción de suplementos de calcio considerados como seguros en diversas patologías, como el hipoparatiroidismo, o en procesos fisiológicos como la menopausia (8-11). Sin embargo, en los casos que presentamos se pone de manifiesto que estos fármacos pueden dar lugar a hipercalcemias graves cuando se consumen de manera prolongada.

Todos nuestros pacientes habían sido previamente intervenidos quirúrgicamente, lo que les generaba un estatus de hipoparatiroidismo posquirúrgico con niveles de PTH suprimidos. Estaban en tratamiento con carbonato cálcico, que, además de suponer un aporte de calcio que contribuye *per se* a la hipercalcemia, incorpora el componente alcalino imprescindible para el desarrollo del síndrome. Esto se debe a que los componentes del carbonato cálcico contribuyen al aumento de bicarbonato plasmático, lo que disminuye su excreción renal (12). Ninguno de los pacientes recibía previamente otros tratamientos que pudieran ser causa de hipercalcemia, como, por ejemplo, diuréticos tiazídicos, así que la única causa yatrogénica plausible

se debe al calcitriol y al carbonato cálcico. La alcalosis metabólica también aumentaría la reabsorción de calcio a nivel tubular. Además, el hecho de que recibiesen suplementos de metabolitos de vitamina D (calcitriol) con efectos en la resorción ósea, en la absorción y reabsorción de calcio a nivel intestinal y renal, respectivamente, y secreción de PTH (13), provocó un efecto sinérgico hipercalcemiante, lo que contribuye a la instauración del cuadro clínico (14,15). En la ficha técnica del calcitriol se recomienda monitorizar los niveles de calcio al menos dos veces por semana al instaurar el tratamiento y, una vez ajustada la dosis óptima, la calcemia se controlará mensualmente.

El tratamiento de urgencia de la hipercalcemia provocada por el SCA reside en la retirada del carbonato cálcico y del calcitriol, y si procede, fluidoterapia, ácido zoledrónico y metilprednisolona, esta última utilizada en situaciones concretas en el tratamiento de primera línea para la hipercalcemia causada por calcitriol.

Aunque el mecanismo fisiopatológico del SCA no se encuentra todavía claramente dilucidado, podemos decir que el desencadenante es la hipercalcemia provocada por el descontrol entre el aumento de la absorción intestinal de calcio y la capacidad de excreción del riñón (12). Esta hipercalcemia aumenta de forma indirecta la reabsorción de bicarbonato en el riñón, lo que provoca la alcalosis.

El SCA está convirtiéndose en un importante problema de salud pública debido al aumento creciente del número de casos descritos. Así pues, los clínicos deben tener en cuenta esta entidad, especialmente en aquellos pacientes que reciben suplementos de calcio más un metabolito de la vitamina D de forma continuada, ya que presentan mayor riesgo. Además, es recomendable mantener un estrecho control en este grupo tanto de la función renal como del pH para poder realizar un diagnóstico precoz y evitar posibles complicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Žofková I. (2016). Hypercalcemia. Pathophysiological aspects. *Physiological Res* 2016;65(1):1-10. DOI: 10.33549/physiol-res.933059
2. Garach AM, Martín AG, Torres MM. Alteraciones del metabolismo fosfocálcico. Hipercalcemia. Hiperparatiroidismo. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 2016;12(16):893-9.
3. Makras P, Papapoulos SE. Medical treatment of hypercalcaemia. *Hormones (Athens, Greece)* 2009;8(2):83-95. DOI: 10.14310/horm.2002.1225
4. Khan AA, Guyatt G, Ali DS, Bilezikian JP, Collins MT, Dandurand K, et al. (2022). Management of Hypoparathyroidism. *JBMR* 2022;37(12):2663-77. DOI: 10.1002/jbmr.4716
5. Tanakol R, Gül N, Üzümlü AK, Aral F. Calcitriol treatment in patients with low vitamin D levels. *Archives of Osteoporosis* 2018;13(1):114. DOI: 10.1007/s11657-018-0529-2
6. Heaney RP, Recker RR, Watson P, Lappe JM. Phosphate and carbonate salts of calcium support robust bone building in osteoporosis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2010;92(1):101-5. DOI: 10.3945/ajcn.2009.29085
7. Patel AM, Adeseun GA, Goldfarb S. (2013). Calcium-alkali syndrome in the modern era. *Nutrients* 2013;5(12):4880-93. DOI: 10.3390/nu5124880
8. Arroyo M, Fenves AZ, Emmett M. The calcium-alkali syndrome. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)* 2013;26(2):179-81. DOI: 10.1080/08998280.2013.11928954
9. Walker MD, Shane E. Hypercalcemia: A Review. *JAMA* 2022;328(16):1624-36. DOI: 10.1001/jama.2022.18331
10. Fernández-García M, Vázquez L, Hernández JL. (2012). Calcium-alkali syndrome in post-surgical hypoparathyroidism. *QJM* 2012;105(12):1209-12. DOI: 10.1093/qjmed/hcr179
11. Waked A, Geara A, El-Imad B. Hypercalcemia, metabolic alkalosis and renal failure secondary to calcium bicarbonate intake for osteoporosis prevention--'modern' milk alkali syndrome: a case report. *Cases Journal* 2009;2:6188. DOI: 10.4076/1757-1626-2-6188
12. Fernández García M, Riancho Moral JA, Hernández Hernández JL. Síndrome calcio-alkalinos: actualización de un antiguo problema clínico [Calcium-alkali syndrome: update of an old clinical problem]. *Medicina Clínica* 2011;137(6):269-72. DOI: 10.1016/j.medcli.2011.03.009
13. Jorde R, Grimnes G. (2011). Vitamin D and metabolic health with special reference to the effect of vitamin D on serum lipids. *Progr Lipid Res* 2011;50(4):303-12. DOI: 10.1016/j.plipres.2011.05.001
14. Yang JD, Lawson P, Beland S. Severe hypercalcemia from the milk-alkali syndrome. *Am J Med* 2013;126(9):e1-e2. DOI: 10.1016/j.amjmed.2013.03.016
15. Machado MC, Bruce-Mensah A, Whitmire M, Rizvi AA. Hypercalcemia Associated with Calcium Supplement Use: Prevalence and Characteristics in Hospitalized Patients. *J Clin Med* 2015;4(3):414-24. DOI: 10.3390/jcm4030414