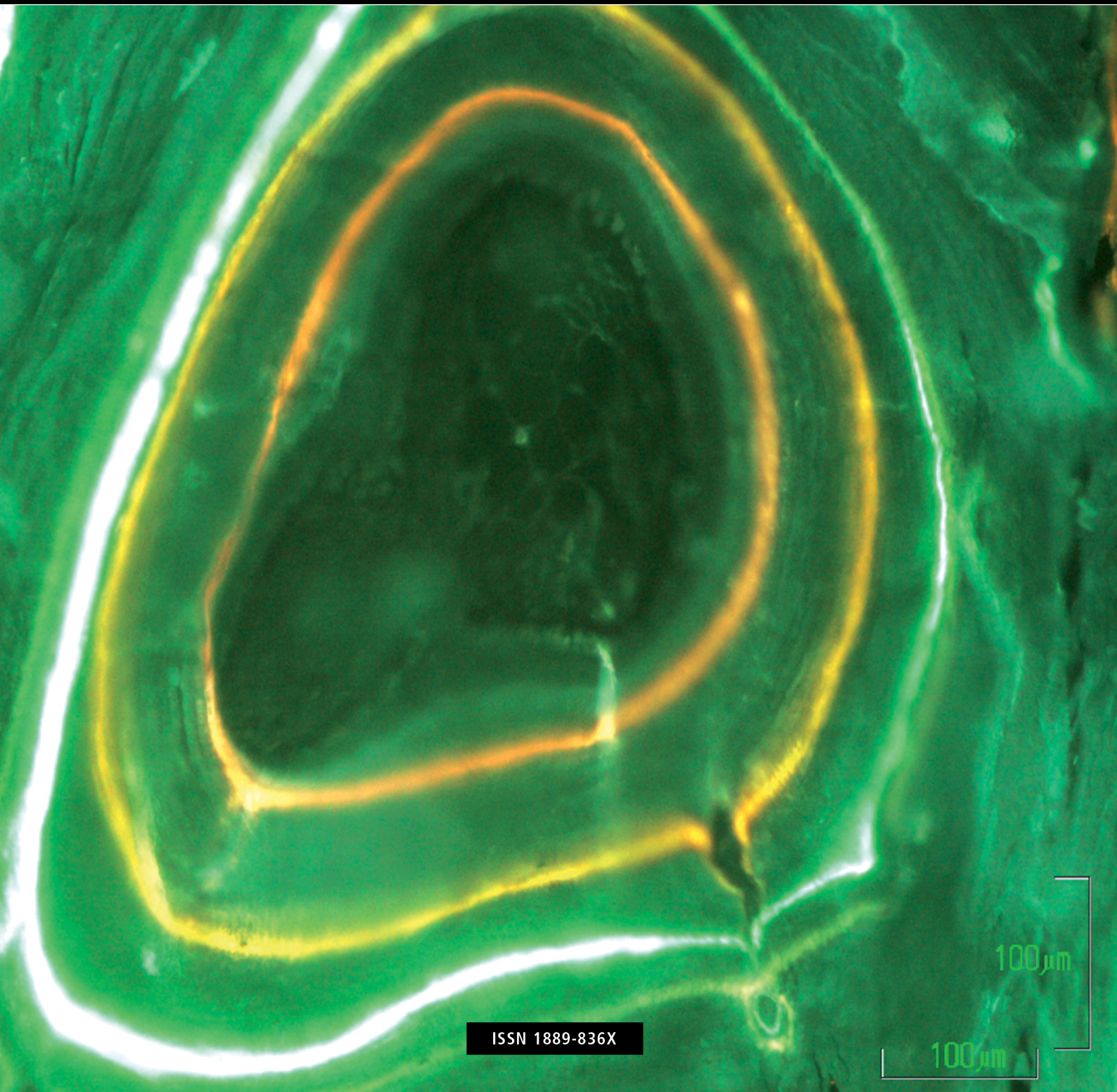


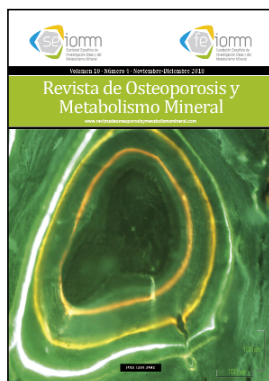
Volumen 10 · Número 4 · Noviembre-Diciembre 2018

Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com



ISSN 1889-836X



Nuestra portada
Marcaje óseo con fluorescencia

Autores:
Dr. Francisco Collía, Departamento de Anatomía e Histología, y Dra. Lorena Benito Garzón, Departamento de Cirugía. Universidad de Salamanca

Director

Manuel Sosa Henríquez

Redactora

M^a Jesús Gómez de Tejada Romero

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

Presidente

Josep Blanch Rubio

Vicepresidenta

M^a Jesús Moro Álvarez

Secretario

Enrique Casado Burgos

Tesorera

Mercedes Giner García

Vocales

Guillermo Martínez Díaz-Guerra

Manel Ciria Recasens

Presidente Electo

Manuel Naves Díaz

Velázquez, 94 (1^a planta)
28006 Madrid

Tel: +34-625 680 737

Fax: +34-917 817 020

e-mail: seiommm@seiommm.org

<http://www.seiommm.org>

Edición



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

Tel. +34-915 538 297

e-mail: correo@ibanezplaza.com

<http://www.ibanezplaza.com>

Maquetación

Concha García García

Traducción inglés

David Shea

ISSN: 2173-2345

Envío de originales:

romm@ibanezplaza.com

SUMARIO Vol. 10 - Nº 4 - Noviembre-Diciembre 2018

105 EDITORIAL
Fracturas femorales atípicas: una rara complicación posiblemente debida a la acumulación de variantes genéticas raras
López-Delgado L, Riancho JA

108 ORIGINALES
Estudio genético de la fractura femoral atípica mediante la secuenciación del exoma en tres hermanas afectas y tres pacientes no relacionadas
Roca-Ayats N, Falcó-Mascaró M, García-Giralt N, Cozar M, Abril JF, Quesada-Gómez JM, Prieto-Alhambra D, Nogués X, Mellibovsky L, Díez-Pérez A, Grinberg D, Balcells S

119 Estudios funcionales de variantes de DKK1 presentes en la población general
Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Vilardell M, Civit S, Urreiziti R, García-Giralt N, Mellibovsky L, Nogués X, Díez-Pérez A, Grinberg D, Balcells S

125 La resistencia mecánica tisular ósea es independiente de la edad en individuos sanos
Taymouri F, Nogués X, Güerri-Fernández R, Mellibovsky L, Díez-Pérez A, Garcia-Giralt N, Ovejero D

131 Factores secretados por células óseas inducen acumulación de calcio intracelular y AMP cíclico y activación de ERK 1/2 en células de cáncer de próstata; evaluación por técnicas de fluorescencia en células vivas
Ardura JA, Gutiérrez Rojas I, Álvarez Carrión L, Friedman P, Alonso V

139 REVISIÓN
Isoflavonas y salud ósea
Cancelo Hidalgo MJ

146 DOCUMENTOS ESPECIALES
Una propuesta para reorganizar el mundo de las publicaciones científicas que permitiría ahorrar millones de euros a nuestro país
Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ

149 Revisión de la evidencia científica sobre uso clínico del Trabecular Bone Score (TBS). Posiciones oficiales de la SEIOMM (2018)
Josep Blanch Rubio, Luis del Río Barquero, José Manuel Olmos Martínez, María José Montoya García, Manuel Muñoz Torres

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

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

Comité Editorial

Dra. Teresita Bellido

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

Dr. Ernesto Canalis

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

Dra. Patricia Clark Peralta

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

Dr. Oswaldo Daniel Messina

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

Dra. Lilian I Plotkin

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

Dr. Josep Blanch Rubió

Unidad de Osteoporosis y de Metabolismo Óseo. Servicio de Reumatología. Departamento de Medicina. Hospital Universitario del Mar. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina. Barcelona (España)
Correo electrónico: JBlanch@parcdesalutmar.cat

Dr. Manuel Díaz Curiel

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

Dr. Adolfo Díez Pérez

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

Dr. José Antonio Riancho Moral

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

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

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

Dr. Manuel Sosa Henríquez (Director)

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

Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero (Redactora)

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

SUMMARY Vol. 10 - Nº 4
November-December 2018

105 EDITORIAL

Atypical femoral fractures: a rare complication possibly due to the accumulation of rare genetic variants

López-Delgado L, Riancho JA

108 ORIGINAL ARTICLES

Genetic study of atypical femoral fractures using exome sequencing in three affected sisters and three unrelated patients

Roca-Ayats N, Falcó-Mascaró M, García-Giralt N, Cozar M, Abril JF, Quesada-Gómez JM, Prieto-Alhambra D, Nogués X, Mellibovsky L, Díez-Pérez A, Grimberg D, Balcells S

119 Functional studies of DKK1 variants present in the general population

Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Vilardell M, Civit S, Urreiziti R, García-Giralt N, Mellibovsky L, Nogués X, Díez-Pérez A, Grimberg D, Balcells S

125 Bone tissue mechanical strength is independent of age in healthy individuals

Taymouri F, Nogués X, Güerri-Fernández R, Mellibovsky L, Díez-Pérez A, García-Giralt N, Ovejero D

131 Factors secreted by bone cells induce intracellular calcium accumulation and cyclic AMP and activation of ERK 1/2 in prostate cancer cells; evaluation by fluorescence techniques in living cells

Ardura JA, Gutiérrez Rojas I, Alvarez Carrión L, Friedman P, Alonso V

139 REVIEW

Isoflavones and bone health

Cancelo Hidalgo MJ

146 SPECIAL DOCUMENTS

A proposal for reorganizing the world of scientific publications which would save Spain millions of euros

Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ

149 Review of the scientific evidence regarding clinical use of the Trabecular Bone Score (TBS). SEIOMM official position (2018)

Josep Blanch Rubio, Luis del Río Barquero, José Manuel Olmos Martínez, María José Montoya García, Manuel Muñoz Torres

Revisores Volumen 10 (2018)

Pilar Aguado Acín
Luis Arboleya Rodríguez
Antonio Cano Sánchez
Enrique Casado Burgos
Santos Castañeda Sanz
Luis Corral Gudino
Jesús Delgado Calle
Bernardino Díaz López
Adolfo Díez Pérez

Iñigo Etxebarria Foronda
Jordi Fiter Ariste
Alberto García Vadillo
M^a Jesús Gómez de Tejada Romero
Jenaro Graña Gil
Daniel Grinberg Vaisman
Federico Hawkins Carranza
José Luis Hernández Hernández
Guillermo Martínez Guerra

Manuel Mesa Ramos
Manuel Muñoz Torres
Manuel Naves García
Enrique Raya Álvarez
Minerva Rodríguez García
Aranzazu Rodríguez de Gortázar
Alonso-Villalobos
Pedro Saavedra Santana
Manuel Sosa Henríquez

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

Fracturas femorales atípicas: una rara complicación posiblemente debida a la acumulación de variantes genéticas raras

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2018000400001>

López-Delgado L, Riancho JA

Servicio de Medicina Interna - Hospital U.M. Valdecilla - Departamento de Medicina y Psiquiatría - Universidad de Cantabria - Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL) - Santander (España)

Correo electrónico: rianchoj@unican.es

Los fármacos antirresortivos, como los bisfosfonatos y denosumab, son muy eficaces para disminuir el riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales en pacientes con osteoporosis. Tienen una forma de administración cómoda, generalmente se toleran bien y los efectos secundarios son leves y poco frecuentes. Sin embargo, algunos pacientes ocasionales pueden presentar complicaciones peculiares con el tratamiento, como las fracturas femorales atípicas (FFA) y la osteonecrosis maxilar. Estas complicaciones ocurren muy raramente, pero son potencialmente graves y de difícil manejo, por lo que son fuente de inquietud para algunos médicos y muchos pacientes. Este temor parece influir de manera negativa, aunque no justificada, sobre el cumplimiento terapéutico. Por eso, sería sumamente útil poder identificar a los raros pacientes que tienen riesgo de desarrollar estas complicaciones.

El caso de las FFA es particularmente paradójico, puesto que se trata de fracturas que aparecen asociadas a tratamientos que se dan precisamente para disminuir el riesgo de fractura. La ASBMR (*American Society for Bone and Mineral Research*) ha elaborado unos criterios para identificar las fracturas atípicas, que incluyen una localización subtrocantérea o diafisaria, un origen en la cortical externa y trayecto transversal o levemente oblicuo, una conminución mínima o ausente, un engrosamiento perióstico en la cortical externa y la ausencia de traumatismo de alto impacto como desencadenante¹. Las FFA se han relacionado sobre todo con los bisfosfonatos, pero también se han comunicado casos asociados a otros fármacos antirresortivos². Asimismo, se ha descrito la aparición de fracturas con características similares a las FFA en pacientes con algunas enfermedades esqueléticas monogénicas, como la osteogénesis imperfecta, la picondisostosis, la osteopetrosis, el raquitismo hipofosfatémico o la hipofosfatasa, incluso sin que hayan recibido antirresortivos^{3,4}. La frecuencia de las FFA varía notablemente de unos estudios a otros. Las estimaciones oscilan

entre 3 y 50 casos por cada 100.000 pacientes-año de tratamiento con bisfosfonatos. El tratamiento prolongado, durante más de 5 años, parece asociarse a un aumento del riesgo, llegando la incidencia, en esos casos, a unos 130 casos por 100.000 pacientes-año⁵. En varios estudios se han explorado los factores clínicos asociados a las FFA. Entre ellos, el tratamiento con glucocorticoides junto a los bisfosfonatos es el que se ha asociado con aumento del riesgo de FFA de manera más consistente^{5,6}.

Siendo las FFA una complicación que aparece muy raramente, sólo en una minoría de los pacientes tratados con antirresortivos, se piensa que la predisposición individual debe de ser un factor muy importante. A favor de ello está el hecho de que con cierta frecuencia las fracturas son bilaterales en los pacientes afectados. De ahí que varios autores han analizado si estos pacientes tienen alguna característica genética predisponente. En esta línea, el trabajo de Roca-Ayats y cols.⁷ que se publica en este número de la revista es particularmente interesante por el hecho de incluir tres hermanas con FFA. La asociación familiar refuerza la idea de la predisposición de causa genética. Los autores secuenciaron el exoma, es decir, las regiones codificantes del ADN. La mayoría de las enfermedades hereditarias se deben a mutaciones en estas regiones, aunque ellas sólo representan alrededor del 1% del ADN. Roca-Ayats y cols. encontraron varias mutaciones en las 3 hermanas estudiadas, incluyendo algunas en genes que codifican enzimas de la vía del mevalonato. Estas mutaciones son particularmente interesantes porque esa vía es diana de los bisfosfonatos, lo que otorga plausibilidad biológica a la relación causal entre esas variantes y las FFA asociadas a estos fármacos antirresortivos. Sin embargo, los autores no pudieron confirmar que esas mutaciones estuvieran implicadas en las FFA sufridas por otras pacientes sin parentesco con las anteriores. En el estudio de Roca-Ayats también se observó que algunas pacientes tenían una muta-

ción en el gen CYP1A1, que metaboliza diversas hormonas, eicosanoides y agentes exógenos. En otros estudios se han encontrado mutaciones en los genes que codifican proteínas óseas como la fosfatasa alcalina o el colágeno en algunos pacientes aislados con FFA. Pero en la mayoría de los casos analizados no se encontraron estas mutaciones⁴.

Estos resultados sugieren que existe heterogeneidad genética, es decir, los genes de susceptibilidad varían de unos pacientes a otros. Los análisis *in silico* y algunos experimentos funcionales sugieren que esas mutaciones tienen un efecto deletéreo sobre la función de las proteínas⁸. Sin embargo, hay que tener en cuenta que aún no se ha demostrado de manera fehaciente que las mutaciones estén directamente relacionadas con el riesgo de sufrir FFA.

Otra cuestión que tampoco está aclarada definitivamente es si las FFA responden a un patrón monogénico o poligénico, es decir, si vienen determinadas por una sola variante en un gen determinado (aunque diferente de unos pacientes a otros) que provoca un grave defecto en la biología ósea, o si se deben a la acumulación de variantes con efectos negativos en varios genes, cada una de ellas con una repercusión limitada. En un estudio previo de genotipado de pacientes con FFA mediante una tecnología de exón-chip, que analiza variantes raras en el exoma, nosotros encontramos que los pacientes tendían a acumular variantes no presentes en los sujetos control⁹. Ello apoya la idea de una susceptibilidad de base poligénica. No obstante, esos resultados están pendientes de confirmar en otros grupos de pacientes.

Aunque los resultados publicados en este campo son aún muy pocos, llama la atención la ausencia de replicación. Es decir, las variantes genéticas asociadas a las FFA, a) son diferentes en los diversos estudios, y b) difieren entre los diversos pacientes de un mismo estudio. Lógicamente, el trabajo de Roca-Ayats es una excepción en este último aspecto, puesto que incluyó varios miembros de una misma familia. Ello sugiere que las variantes que predisponen a las FFA son variantes raras, muy poco frecuentes en la población general, probablemente propias de un grupo poblacional concreto, o incluso de un paciente concreto. Si realmente esto es así, va a resultar muy complejo replicar los resultados en poblaciones distintas.

De hecho, algunos estudios epidemiológicos apoyan la importancia del fondo genético y la raza en la susceptibilidad a las FFA. Así, esta complicación parece ser mucho más frecuente entre los asiáticos que en la población caucásica^{5,10}. Por otro lado, las FFA pueden venir favorecidas por ciertas características del desarrollo esquelético. De hecho, en varios estudios se ha visto una asociación entre la curvatura del fémur y las FFA, de manera que las FFA serían más frecuentes en los pacientes con fémur varo¹¹. Pero este fenómeno no es universal. Algunas pacientes con FFA no presentan varización del fémur y en ellas la susceptibilidad presumiblemente viene condicionada por anomalías del

remodelado u otras alteraciones de la biología ósea, más que por alteraciones en su geometría.

Los estudios de barrido genómico y de análisis de exoma están aportando los primeros datos de cara a iluminar los determinantes de la susceptibilidad individual a las FFA. Para avanzar en este campo, se necesitan, por un lado, estudios genéticos de grupos de pacientes mucho más amplios. Por otro, estudios funcionales que demuestren la repercusión real de esas variantes genéticas sobre el hueso, mediante el análisis de animales transgénicos y *knock-out* y otros experimentos de edición génica. Pero hay que tener en cuenta que no bastará analizar el esqueleto de los animales genéticamente modificados en condiciones basales, sino que será también necesario determinar los cambios esqueléticos en respuesta a los antirresortivos.

Hay otros aspectos aún no explorados y cuya implicación en las FFA no se puede descartar *a priori*. Entre ellos cabe mencionar, por ejemplo, las alteraciones en regiones reguladoras del ADN (regiones no codificantes que no se incluyen en el análisis del exoma) y las marcas epigenéticas como la metilación del ADN y las modificaciones postraslacionales de las histonas.

En definitiva, los estudios clínicos publicados sugieren que existe una susceptibilidad individual a las FFA, determinada, al menos en parte, por factores genéticos. Esos factores aún no se han identificado con seguridad, pero posiblemente sean de tipo poligénico, relacionados con la acumulación de mutaciones poco frecuentes en genes diversos. El estudio de Roca-Ayats es una contribución interesantísima a una cuestión aún apenas explorada. A la espera de avances en este campo, que idealmente nos deberían conducir a poder identificar precozmente los pacientes en riesgo, los clínicos y los pacientes no deben olvidar que las FFA son mucho menos frecuentes que las fracturas por fragilidad y que la relación riesgo-beneficio de los fármacos antirresortivos es claramente favorable. Se ha estimado que por cada FFA que pudiera aparecer en relación con el tratamiento con antirresortivos se previenen más de 100 fracturas de cadera y varios cientos de otras fracturas¹². Por tanto, un efecto adverso muy infrecuente como las FFA no debe ser impedimento para que los pacientes con osteoporosis reciban tratamiento antirresortivo cuando esté indicado y se beneficien así de la notable disminución del riesgo de fractura conseguido con estos fármacos.

Conflicto de intereses: José Antonio Riancho ha recibido becas de investigación, honorarios por conferencias o bolsas de viaje de MSD, Alexion, Lilly, Nycomed y Amgen.

Bibliografía

1. Shane E, Burr D, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD, Cheung AM, et al. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: second report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2014;29(1):1-23.

2. Thompson RN, Armstrong CL, Heyburn G. Bilateral atypical femoral fractures in a patient prescribed denosumab - A case report. *Bone*. 2014;61:44-7.
3. Andersen JD, Bünger MH, Rahbek O, Hald JD, Harsløf T, Langdahl BL. Do femoral fractures in adult patients with osteogenesis imperfecta imitate atypical femoral fractures? A case series. *Osteoporos Int*. 2018 Nov 17; [Epub ahead of print].
4. Nguyen HH, M van de Laarschot D, Verkerk AJ, Milat F, Zillikens MC, Ebeling PR. Genetic risk factors for atypical femoral fractures (AFFs): a systematic review. *J Bone Miner Res Plus*. 2018;2(1):1-11.
5. Starr J, Tay YKD, Shane E. Current understanding of epidemiology, pathophysiology, and management of atypical femur fractures. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(4):519-29.
6. López-Delgado L, Riancho-Zarrabeitia L, Riancho JA. Genetic and acquired factors influencing the effectiveness and toxicity of drug therapy in osteoporosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016;12(4):389-98.
7. Roca-Ayats N, Falcó-Mascaró M, García-Giralt N, Cozar M, Abril JF, Quesada M, et al. Estudio genético de la fractura femoral atípica mediante la secuenciación del exoma en tres hermanas afectas y tres pacientes no relacionadas. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2018;10(4):108-18.
8. Roca-Ayats N, Ng PY, Garcia-Giralt N, Falcó-Mascaró M, Cozar M, Abril JF, et al. Functional characterization of a GGPPS variant identified in atypical femoral fracture patients and delineation of the role of GGPPS in bone-relevant cell types. *J Bone Miner Res*. 2018; 33(12):2091-8.
9. Perez-Nuñez I, Perez-Castrillon JL, Zarrabeitia MT, Garca-Ibarbia C, Martinez-Calvo L, Olmos JM, et al. Exon array analysis reveals genetic heterogeneity in atypical femoral fractures. A pilot study. *Mol Cell Biochem*. 2015;409(1-2):45-50.
10. Marcano A, Taormina D, Egol KA, Peck V, Tejwani NC. Are race and sex associated with the occurrence of atypical femoral fractures? *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472(3):1020-7.
11. Hagen JE, Miller AN, Ott SM, Gardner M, Morshed S, Jeray K, et al. Association of atypical femoral fractures with bisphosphonate use by patients with varus hip geometry. *J Bone Joint Surg Am*. 2014;96(22):1905-9.
12. Black DM, Abrahamsen B, Bouxsein ML, Einhorn T, Napoli N. Atypical Femur Fractures – Review of epidemiology, relationship to bisphosphonates, prevention and clinical management. *Endocr Rev*. 2018 Aug 29; [Epub ahead of print].

Roca-Ayats N¹, Falcó-Mascaró M¹, García-Giralt N², Cozar M¹, Abril JF³, Quesada-Gómez JM⁴, Prieto-Alhambra D^{5,6}, Nogués X², Mellibovsky L², Díez-Pérez A², Grinberg D¹, Balcells S¹

1 Departamento de Genética, Microbiología y Estadística - Facultad de Biología - Universidad de Barcelona - Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona (IBUB) - Instituto de Investigación Sant Joan de Déu (IRSJD) - Barcelona (España)

2 Unidad de Investigación en Fisiopatología Ósea y Articular (URFOA); Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM) - Parque de Salud Mar - Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES); Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Barcelona (España)

3 Departamento de Genética, Microbiología y Estadística; Facultad de Biología; Universidad de Barcelona - Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona (IBUB) - Barcelona (España)

4 Unidad de Metabolismo Mineral; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC); Hospital Universitario Reina Sofía - Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES); Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Córdoba (España)

5 Grupo de Investigación en Enfermedades Prevalentes del Aparato Locomotor (GREMPAL) - Instituto de Investigación en Atención Primaria (DIAP) Jordi Gol - Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES) - Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) - Barcelona (España)

6 Instituto Nacional para la Investigación de la Salud (NIHR); Unidad de Investigación Biomédica (BRU) Musculoesquelética y Centro de Investigación Botnar; Departamento de Ortopedia, Reumatología y Ciencias Musculoesqueléticas Nuffield - Universidad de Oxford - Oxford (Reino Unido)

Estudio genético de la fractura femoral atípica mediante la secuenciación del exoma en tres hermanas afectas y tres pacientes no relacionadas

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2018000400002>

Correspondencia: Neus Roca-Ayats - Departamento de Genética, Microbiología y Estadística - Facultad de Biología - Universidad de Barcelona - Avda. Diagonal, 643 - 08028 Barcelona (España)
Correo electrónico: neus.roca@ub.edu

Fecha de recepción: 12/06/2018

Fecha de aceptación: 24/09/2018

Trabajo becado asistir al 39º Congreso de la ASBMR (Denver, 2017).

Resumen

Objetivos: Las fracturas atípicas de fémur (FAF) son un tipo de fracturas poco frecuentes, a menudo relacionadas con un tratamiento prolongado con bisfosfonatos (BPs). Actualmente no se conocen con exactitud sus mecanismos patogénicos y no hay pruebas para identificar aquellos pacientes con un alto riesgo de sufrir una FAF. El objetivo de este trabajo es investigar las bases genéticas de las FAFs.

Material y métodos: Se secuenció el exoma completo de 3 hermanas y de 3 pacientes adicionales no relacionadas, todas tratadas con BPs durante más de 5 años. Se seleccionaron variantes compartidas por las hermanas, de baja frecuencia y potencialmente patogénicas, y se construyó una red de interacciones de genes y proteínas con los datos hallados.

Resultados: Identificamos 37 variantes raras (en 34 genes) compartidas por las 3 hermanas, algunas de ellas no descritas anteriormente. La variante más llamativa fue la mutación p.Asp188Tyr en el enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa (codificada por el gen *GGPS1*), de la vía del mevalonato y esencial para la función del osteoclasto. Otro hallazgo interesante fueron dos mutaciones (una en las 3 hermanas y una en una paciente no relacionada) en el gen *CYP11A1*, implicado en el metabolismo de los esteroides. Identificamos otras variantes que también podrían estar involucradas en la susceptibilidad a las FAFs o en el fenotipo osteoporótico subyacente, tales como las presentes en los genes *SYDE2*, *NGEF*, *COG4* y la *FN1*.

Conclusiones: Nuestros datos son compatibles con un modelo donde la acumulación de variantes de susceptibilidad podría participar en la base genética de las FAFs.

Palabras clave: *fractura atípica de fémur, bisfosfonatos, GGPS1, CYP11A1, secuenciación completa del exoma.*

Genetic study of atypical femoral fractures using exome sequencing in three affected sisters and three unrelated patients

Summary

Objectives: Atypical femoral fractures (AFF) are rare, often related to long-term bisphosphonate (BPs) treatment. Their pathogenic mechanisms are not precisely known and there is no evidence to identify patients with a high risk of AFF. The aim of this work is to study the genetic bases of AFFs.

Material and methods: Whole-exome sequencing was carried out on 3 sisters and 3 unrelated additional patients, all treated with BPs for more than 5 years. Low frequency, potentially pathogenic variants shared by the 3 sisters, were selected, and a network of gene and protein interactions was constructed with the data found.

Results: We identified 37 rare variants (in 34 genes) shared by the 3 sisters, some not previously described. The most striking variant was the p.Asp188Tyr mutation in the enzyme geranylgeranyl pyrophosphate synthase (encoded by the *GGPS1* gene), from the mevalonate pathway and essential for osteoclast function. Another noteworthy finding was two mutations (one in the 3 sisters and one in an unrelated patient) in the *CYP11A1* gene, involved in the metabolism of steroids. We identified other variants that could also be involved in the susceptibility to AFFs or in the underlying osteoporotic phenotype, such as those present in the *SYDE2*, *NGEF*, *COG4* and *FN1* genes.

Conclusions: Our data are compatible with a model where the accumulation of susceptibility variants could participate in the genetic basis of AFFs.

Key words: atypical femoral fractures, bisphosphonates, *GGPS1*, *CYP11A1*, whole-exome sequencing.

Introducción

La osteoporosis y sus fracturas asociadas son el problema óseo postmenopáusico más común, y afecta a mujeres y hombres de todas las etnias. Los bisfosfonatos nitrogenados (N-BPs), incluyendo alendronato, risendronato, ibandronato y zolendronato, son el tratamiento más utilizado para la osteoporosis en millones de pacientes en todo el mundo. A pesar de la importante eficacia anti-fractura de los BPs, ampliamente demostrada en varios ensayos clínicos¹ y revisiones sistemáticas², se han descrito algunos efectos adversos poco frecuentes potencialmente asociados a su uso prolongado, entre ellos las fracturas atípicas de fémur (FAFs)³. Estas fracturas son no-traumáticas y están caracterizadas por su localización subtrocanterica o en la diáfisis del fémur, y frecuentemente son bilaterales⁴.

Los mecanismos patogénicos de las FAFs no son del todo conocidos, y se ha especulado mucho sobre sus causas. Se ha propuesto que una supresión excesiva de la resorción ósea por parte de los N-BPs podría contribuir a desencadenar una FAF pero su fisiopatología es compleja y se cree que hay otros factores importantes involucrados. Algunos factores de riesgo propuestos son el grosor cortical y la geometría pélvica⁵. Además, se han descrito casos de FAF en pacientes afectados por otras enfermedades óseas monogénicas, como la hipofosfatasa⁶, la osteogenesis imperfecta⁷ o el síndrome de osteoporosis pseudoglioma⁸.

Dada la baja incidencia de las FAFs en la población general (5,9 casos por 100.000 personas/año), podemos hipotetizar que hay unas causas genéticas raras subyacentes que pueden incrementar la susceptibilidad a las FAFs, y que pueden ocurrir espontáneamente o desencadenarse después de la interacción con los BPs. Actualmente

no hay pruebas genéticas o bioquímicas que puedan ayudar a identificar los pacientes con un elevado riesgo a sufrir una FAF. La identificación de los determinantes genéticos de las FAFs ayudaría a esclarecer los mecanismos etiológicos, al desarrollo de herramientas de diagnóstico y de evaluación del riesgo de sufrir una FAF, y a posibles estrategias terapéuticas.

Anteriormente, identificamos 3 hermanas diagnosticadas con FAF que fueron tratadas con BPs durante más de 5 años⁹. Esta observación nos sugirió que podría haber un trasfondo genético que predispusiera a las FAFs relacionadas al uso prolongado de BPs. En consecuencia, llevamos a cabo la secuenciación del exoma completo de las 3 hermanas y de otras 3 pacientes no relacionadas para identificar mutaciones potencialmente relacionadas con las FAFs en estas pacientes. Identificamos 37 variantes raras compartidas por las 3 hermanas, una de las cuales se estudió en detalle⁹. En el presente trabajo describimos el conjunto de variantes encontradas y su posible interacción.

Material y métodos

Pacientes

Se estudiaron seis pacientes con FAFs y que habían sido tratadas durante más de 5 años con BPs: 3 hermanas visitadas en el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España) y 3 pacientes no relacionadas visitadas en el Hospital del Mar (Barcelona, España). Como controles, se estudiaron 3 pacientes tratadas con BPs por más de 6 años pero sin FAFs. Las características de pacientes y controles están descritas en la tabla 1. Las 3 hermanas afectas fueron tratadas con estatinas y recibían regularmente PPIs pero no habían sido tratadas con glucocorticoides ni ningún otro compuesto que afecte al

hueso, aparte de los BPs. En el caso de las fracturas unilaterales, se realizaron pruebas radiológicas y RMN que descartaban la fractura contralateral. Se obtuvo consentimiento informado escrito de todas las pacientes, de acuerdo con la regulación del Comité Ético de Investigación Clínica del Parque de Salud Mar, que aprobó el estudio.

Secuenciación del exoma completo

Se extrajo ADN de sangre periférica de las pacientes con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) y se utilizó para secuenciar el exoma completo en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG) (Barcelona). Las librerías se generaron con el kit de captura de exones SureSelect XT Human All Exon; cat:5190-6208 (Agilent Technologies), después de haber fragmentado el ADN y ligado los adaptadores específicos de Agilent. La secuenciación *paired-end* (2x76 pb) se realizó en la plataforma Illumina HiSeq2000. Las imágenes del instrumento se procesaron utilizando el programa del fabricante para generar archivos de secuencia FASTQ.

El análisis bioinformático se llevó a cabo en la plataforma de Bioinformática para Enfermedades Raras (Bier) del CIBERER, en Valencia. Los archivos FASTQ se alinearon con el programa libre Burrows-Wheeler Aligner¹⁰ (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) utilizando el ensamblado del genoma humano de referencia GRCh37 (hg19)¹¹. Las variantes de un solo nucleótido y los indels se identificaron utilizando el programa GATK¹². Finalmente, para añadir a las variantes información sobre la frecuencia del alelo minoritario (*minor allele frequency*; MAF) proveniente de dbSNP y del proyecto 1000 Genomas (<http://www.1000genomes.org>)¹³, se utilizó la herramienta de anotación VARIANT¹⁴. Los datos se convirtieron al formato BAM (*binary equivalent SAM*) y se visualizaron mediante el programa Integrative Genomics Viewer (IGV) (<http://www.broadinstitute.org/igv>).

Las variantes genéticas se filtraron según las siguientes premisas: a) variante no-sinónima, b) no descrita previamente o con una MAF <0,005 en dbSNP y en el proyecto 1000 Genomas, c) no presente en NHLBI Go Exome Sequencing Project (ESP) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), y d) no presente en 8 exomas de individuos de la población general, obtenidos en nuestro laboratorio.

Inicialmente sólo se tuvieron en cuenta las mutaciones compartidas por las tres hermanas, tanto en un modelo de herencia dominante como recesivo. Después se priorizaron mutaciones en genes candidatos en las otras tres pacientes. Las puntuaciones de SIFT¹⁵, PolyPhen¹⁶ y de conservación evolutiva obtenidas de PhastCons¹⁷ se utilizaron para priorizar las variantes.

Validación de las variantes genéticas

Las mutaciones encontradas se validaron mediante PCR y secuenciación Sanger, que fue llevada a cabo bidireccionalmente utilizando el kit BigDyeTM v3.1 Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados para la validación se diseñaron utilizando el programa OligoEvaluator (Sigma-Aldrich). Finalmente, las mutaciones validadas se buscaron en el Exome Aggregation Consortium (ExAC) para obtener sus frecuencias poblacionales, y se analizaron mediante secuenciación Sanger en las 3 mujeres controles.

Tabla 1. Características de pacientes y controles

Paciente	Fractura atípica	Edad ^a (años)	Peso (Kg)	T-score columna vertebral	T-score cadera	Tiempo de tratamiento con BPs (años)	Fracturas osteoporóticas previas
AFS1	Unilateral; medio-diafisaria ^b	64	77	-1,1	-0,2	6	Colles
AFS2	Unilateral; medio-diafisaria ^b	73	75	-2,5	-1,4	6	Colles
AFS3	Bilateral; medio-diafisaria ^b	60/61	100	-0,3	Rbpc ^c	6	Ninguna
AFU1	Bilateral; medio-diafisaria	73/75	50,8	-1,9	-0,5	6	Ninguna
AFU2	Unilateral; medio-diafisaria	72	90	-2,0	-0,6	7	Ninguna
AFU3	Unilateral; subtrocantérica	87	59,8	N/A	N/A	10	Ninguna
Control 1		78	66,5	-2,5	-1,9	7	Ninguna
Control 2		70	57,5	-1,2	-2,4	6	Ninguna
Control 3		74	77,1	-1,5	-0,9	8	Ninguna

AFS: hermanas con FAF; AFU: pacientes con FAF no relacionadas, (^a): edad al momento de la fractura atípica; (^b): fracturas localizadas aproximadamente en el mismo sitio; (^c): reemplazo bilateral de prótesis cadera.

Análisis *in silico*

Las mutaciones se localizaron en su contexto genético utilizando el UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) y el Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>) y se extrajo información de los genes de GeneCards (<http://www.genecards.org/>) y BioGPS (<http://biogps.org/>). Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional utilizando la herramienta bioinformática DAVID¹⁸ (<https://david.ncifcrf.gov/>).

El estudio funcional *in silico* de las proteínas mutadas se realizó utilizando Uniprot (<http://uniprot.org/>), RCSB Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>) y Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). Los alineamientos de proteínas se realizaron utilizando el UCSC Genome Browser y los programas Clustal Omega (<http://www.clustal.org/omega/>) y ESPript (<http://esript.ibcp.fr/>).

Construcción de la red

La red de interacción de los genes FAF (AFFGeNet) se construyó según Boloc *et al.*¹⁹ para identificar genes o proteínas que interactúan con los 37 genes FAF, considerados como genes *driver* (Tablas 2a y 2b), teniendo en cuenta las interacciones binarias y direccionales. Los datos de interacción *high-throughput* se obtuvieron de BioGRID (versión 3.4.133)²⁰ y STRING [Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins] versión 10²¹ y la red se enriqueció con información adicional de GeneOntology (<http://geneontology.org/>), GeneCards, OMIM, UniProt, RefSeq, y UCSC.

Se implementó un *script* de Perl para capturar la sub-red de interacción utilizando los genes FAF para encontrar todos los caminos más cortos entre dos genes aplicando el algoritmo Dijkstra. La conectividad por parejas se analizó utilizando Circos²². El *script* produjo un gráfico esqueleto en formato JSON para poder visualizar los datos en la interficie web AFFGeNet (<https://compgen.bio.ub.edu/AFFgenes>, disponible bajo demanda). El formulario web contiene una entrada que se centra en los genes seleccionados, y la visualización de la red permite añadir o quitar nodos y mostrar información de los genes FAF. El color del borde identifica los nodos como *drivers* (lila), parejas *upstream* (verde) o *downstream* (azul) de los *drivers* seleccionados, y otros (gris). El color del interior de los nodos representa la expresión génica específica del hueso, que se obtuvo del Gene Expression Omnibus (GEO)²³, concretamente de un estudio sobre células precursoras de osteoclastos tratadas o no tratadas con BPs (alendronato o risendronato) durante su diferenciación a osteoclasto maduro²⁴ (GSE63009). La escala de colores va de amarillo intenso (subexpresado) a azul oscuro (sobrexpresado), siendo el blanco indicativo de ningún cambio de expresión.

Resultados

Variantes detectadas en la secuenciación del exoma completo en las 3 hermanas

Las tres hermanas (AFS1, AFS2, AFS3) y las 3 pacientes no relacionadas (AFU1, AFU2, AFU3) se analizaron separadamente.

Los exomas de las 3 hermanas se interseccionaron y no se identificó ninguna variante en homocigosis en común. Por el contrario, se identificaron 74 variantes en heterocigosis compartidas (coherentes con un modelo de herencia dominante), 37 de las cuales se validaron por secuenciación Sanger. En 3 de los genes (*FNI*, *BRAT1* y *XAB2*), se encontraron 2 mutaciones diferentes. En los tres casos se pudo determinar que las variantes se encontraban en fase, siendo alelos doble-mutantes y no heterocigotos compuestos, mediante la visualización de los *reads* con el programa IGV y el análisis de polimorfismos intragénicos. Las 37 variantes compartidas por las 3 hermanas, todas ellas codificantes, se muestran en la tabla 2a, ordenadas según su puntuación de conservación. Se trata de variantes de cambio de sentido (n=35), una variante truncante y una delección en fase. La primera variante de la lista, con la mejor puntuación de conservación y predicha como deletérea, se encuentra en el gen *GGPS1*, tal y como describimos anteriormente⁹.

Análisis de los genes mutados en las 3 pacientes no relacionadas

Los genes con variantes compartidas por las 3 hermanas (Tabla 2a) se analizaron en los exomas de las pacientes no relacionadas utilizando el programa IGV. Ninguna de las variantes de la Tabla 2a se encontró en las pacientes no relacionadas. No obstante, se encontraron otras dos variantes en los genes *BRAT1* y *CYP11A1*, en las pacientes AFU3 y AFU1, respectivamente (Tabla 2b).

La variante de *CYP11A1* presente en la paciente AFU1 (p.Ser216Cys) supone el cambio de una serina a una cisteína, en una posición cercana al sitio de unión al sustrato. Los predictores de patogenicidad sugirieron que este cambio es muy deletéreo para la función de la proteína. Igualmente, la variante de *CYP11A1* presente en las tres hermanas (p.Arg98Trp) supone el cambio de un aminoácido básico (arginina) a un aminoácido aromático hidrofóbico (triptófano), en un giro de la proteína con puentes de hidrógeno. Por el contrario, las tres variantes encontradas en el gen *BRAT1* (dos en las tres hermanas, en un alelo doble mutante, y una en la paciente AFU3) no afectan a la función de la proteína, según los predictores.

Análisis de genes candidatos en 3 pacientes no relacionadas

A continuación, se utilizó el programa IGV para analizar, en los exomas de las tres pacientes no relacionadas, distintos genes involucrados en el metabolismo óseo, la función osteoclastica y la vía del mevalonato. Se encontraron variantes en los genes *MMP9* (AFU3), *MVD* (AFU2) y *RUNX2* (AFU3), que se validaron por secuenciación Sanger (Tabla 2b). La mutación en el gen *MMP9*, que codifica la colagenasa de tipo IV, implica el cambio de una metionina (un aminoácido hidrofóbico con un grupo que contiene azufre) a una treonina (aminoácido hidrofílico) en la posición 419, dentro del dominio catalítico. Esta variante aparece en la base de datos ExAC,

con una frecuencia alélica muy baja (8,2e-06), y SIFT y PolyPhen predijeron que probablemente perjudica su función. El gen *MVD* codifica la enzima mevalonato 5-difosfato decarboxilasa, de la vía del mevalonato. La variante encontrada (p.Arg97Gln; rs376949804) supone el cambio de un aminoácido básico a un aminoácido neutro y está presente en la base de datos ExAC, también con una frecuencia alélica muy baja (3,4e-05). Se trata de un cambio no

perjudicial para la función de la proteína, según SIFT y PolyPhen. La mutación en *RUNX2* es una substitución de una prolina, un aminoácido cíclico, por una leucina, un aminoácido alifático hidrofóbico, en la posición 296, dentro de una región rica en prolinas, serinas y treoninas. Este cambio, descrito en dbSNP (rs20184115), tiene una MAF=0,0004 y probablemente afecta la función de la proteína, según los predictores.

Tabla 2a. Variantes compartidas por las 3 hermanas, encontradas en la secuenciación del exoma

Gen	Proteína	Variante ^a	Efecto en la proteína	dbSNP ^b	ExAC ^c	Conservación ^d	SIFT ^e	PolyPhen ^f
<i>GGPS1</i>	Geranilgeranil difosfato sintasa	chr1:g.235505746G>T	p.D188Y			700	0,000	1,000
<i>LRRC1</i>	Proteína con repeticiones ricas en leucinas 1	chr6:g.53707020G>A	p.R91Q		4,946e-05	685	0,050	0,746
<i>TUSC2</i>	Candidato supresor de tumores 2	chr3:g.50363807T>C	p.H83R		8,244e-06	674	0,338	0,000
<i>SYDE2</i>	Proteína activadora de GTPasa Rho	chr1:g.85634903G>T	p.L893I		8,339e-06	639	0,018	0,997
<i>COG4</i>	Subunidad 4 del complejo oligomérico conservado del Golgi	chr16:g.70553552C>T	p.G85D			627	0,150	0,735
<i>EML1</i>	Proteína asociada a microtúbulos	chr14:g.100360993G>A	p.R211H		6,611e-05	588	0,030	0,963
<i>KDM4C</i>	Demetilasa específica de lisinas(K) 4C	chr9:g.6849579A>G	p.I170V	rs192832191 MAF=0,0004	2,471e-05	584	0,000	0,509
<i>ERCC6L2</i>	Proteína de reparación por escisión del DNA	chr9:g.98718284A>T	p.I657L		8,278e-06	573	0,630	0,007
<i>PGRMC1</i>	Componente de membrana 1 del receptor de progesterona	chrX:g.118377159C>A	p.P177H			573	0,130	0,742
<i>FN1</i> *	Fibronectina	chr2:g.216235149C>T	p.V2241I		8,245e-06	551	0,009	0,045
<i>CYP1A1</i>	Citocromo P450 1A1	chr15:g.75015147G>A	p.R98W		0,000108	540	0,000	0,998
<i>XAB2</i> *	Proteína de unión a XPA 2	chr19:g.7688142C>G	p.V385L		1,651e-05	535	0,007	0,600
<i>GPR20</i>	Receptor acoplado a proteína G 20	chr8:g.142367729C>T	p.D99N	rs200892677 MAF=0,0004	3,324e-05	515	0,000	0,998
<i>TMEM25</i>	Proteína transmembrana 25	chr11:g.118404174_118404176del	p.V239del			510	N/A	N/A
<i>NGEF</i>	Factor intercanviador de nucleótidos de guanina	chr2:g.233748153G>A	p.S542L		1,279e-05	500	0,350	0,910
<i>NKAP</i>	Proteína activadora de NFκB	chrX:g.119066123C>T	p.S265N	rs182030723 MAF=0,0006	6,847e-05	497	0,120	0,184
<i>NVL</i>	Proteína nuclear que contiene valosina	chr1:g.224491450G>A	p.T312I		8,268e-06	474	0,000	0,995
<i>FN1</i> *	Fibronectina	chr2:g.216251538G>A	p.R1496W	rs139078629 MAF=0,003	0,004904	466	0,005	0,998
<i>ATP6AP1</i>	Subunidad S1 de ATPasa de protones vacuolar	chrX:g.153664043G>A	p.V407I		4,561e-05	464	0,260	0,990
<i>LURAP1L</i>	Proteína adaptadora rica en leucinas 1	chr9:g.12821722G>A	p.R217H		4,948e-05	452	0,270	0,371
<i>HEPHL1</i>	Proteína similar a la hefestina	chr11:g.93839224G>A	p.W991*			451	0,000	N/A

Tabla 2a. (cont.)

Gen	Proteína	Variante ^a	Efecto en la proteína	dbSNP ^b	ExAC ^c	Conservación ^d	SIFT ^e	PolyPhen ^f	
<i>NTPCR</i>	Trifosfatasa de nucleósidos relacionada con cáncer	chr1:g.233091444G>A	p.R59Q		5,779e-05	439	0,034	0,502	
<i>XAB2</i> *	Proteína de unión a XPA 2	chr19:g.7688159G>C	p.T379R		1,652e-05	420	0,059	0,200	
<i>CHERP</i>	Proteína del retículo endoplasmático de homeostasis del calcio	chr19:g.16631044C>T	p.R793H	rs202164310 MAF=0,0000	0,0001009	366	0,120	0,716	
<i>MEX3D</i>	Proteína de unión a RNA MEX3D	chr19:g.1555839G>C	p.T560R	rs538022731 MAF=0,0002		366	0,030	N/A	
<i>BRAT1</i> *	Activador de ATM asociado a BRACA1	chr7:g.2594007C>T	p.R20K	rs143390199 MAF=2e-05	1,651e-05	333	0,192	0,010	
<i>BRAT1</i> *	Activador de ATM asociado a BRACA1	chr7:g.2580668G>A	p.T447M	rs368808380 MAF=0,0002	5,845e-05	333	0,110	0,275	
<i>CUL9</i>	Culina 9	chr6:g.43154714C>T	p.T423I			251	0,000	0,993	
<i>ALPK1</i>	α-quinasa 1	chr4:g.113353195A>C	p.D831A		0,0001255	0	0,060	0,243	
<i>CD37</i>	Antígeno de leucocito CD37	chr19:g.49840212C>G	p.I63M		2,476e-05	0	0,040	0,028	
<i>IQCF6</i>	Proteína F7 que contiene motivos IQ	chr3:g.51812782G>A	p.R61W			0	0,010	N/A	
<i>LFNG</i>	Péptido O-fucosil 3-β-N-acetilglucosaminil-transferasa	chr7:g.2566829C>T	p.R375C		1,69e-05	0	0,020	0,772	
<i>MGA</i>	Proteína asociada al gen MAX	chr15:g.41988923C>T	p.S571L			0	0,130	N/A	
<i>POLI</i>	Polimerasa de ADN iota	chr18:g.51820404T>C	p.V597A	rs543509008 MAF=0,0002	0,00024	0	0,590	N/A	
<i>SHC4</i>	Proteína 4 transformadora de SHC	chr15:g.49254675G>T	p.H180N			0	1,000	0,000	
<i>SMS</i>	Espermina sintasa	chrX:g.21958982G>C	p.G14R			0	0,350	0,002	
<i>SNAPC4</i>	Polipéptido 4 del complejo activador de snRNAs	chr9:g.139272279C>G	p.G1334R		2,675e-05	0	0,160	0,707	

Tabla 2b. Otras variantes encontradas en las pacientes no relacionadas

Gen	Proteína	Variante ^a	Efecto en la proteína	dbSNP ^b	ExAC ^c	Conservación ^d	SIFT ^e	PolyPhen ^f	Paciente FAF
<i>BRAT1</i>	Activador de ATM asociado a BRACA1	chr7:g.2580636C>T	p.E458L			333	0,568	0,000	AFU3
<i>CYP11A1</i>	Citocromo P450 11A1	chr15:g.75014793T>A	p.S216C	rs146622566 MAF=0,0003	0,0001153	0	0,004	0,987	AFU1
<i>MMP9</i>	Metalopeptidasa de matriz 9	chr20:g.44641147T>C	p.M419T		8,242e-06	496	0,000	1,000	AFU3
<i>MVD</i>	Mevalonato difosfato decarboxilasa	chr16:g.88723957C>T	p.R97Q	rs376949804 MAF=3e-05	3,448e-05	0	0,448	0,009	AFU2
<i>RUNX2</i>	Factor de transcripción 2 relacionado con Runt	chr6:g.45480010C>T	p.P296L	rs201584115 MAF=0,0004	0,0002066	642	0,040	0,999	AFU3

(^a): posición genómica de la variante en el genoma de referencia humano GRCh37; (^b): número de identificador de referencia del SNP (rs) y MAF (frecuencia del alelo minoritario) de las variantes descritas; (^c): frecuencia alélica de las variantes descritas en la base de datos ExAC; (^d): puntuación de conservación del PhastCons (0 a 1,000), siendo 1,000 el *locus* más conservado y 0 un *locus* no conservado; (^e): SIFT: 0-0,05 perjudicial (en negrita); 0,051-1 tolerable; (^f): PolyPhen: 0-0,4 benigno; 0,41-0,89 posiblemente perjudicial; 0,9-1 patogénico (en negrita); (*): presente en un alelo doble mutante.

Análisis de las variantes en individuos controles y en la población general

Ninguna variante de las tablas 2a y 2b fue encontrada en 3 controles (pacientes tratadas con BPs durante un período largo de tiempo pero sin FAFs). Todas las variantes detectadas en las pacientes con FAF se buscaron en la base de datos ExAC para determinar si se trataba de variantes nuevas o muy raras (MAF <0,005). En ese sentido, once mutaciones no se encontraron ni en dbSNP ni en ExAC (*GGPS1*: p.D188Y; *COG4*: p.G85D; *PGRMC1*: p.P177H; *TMEM25*: p.V239del; *HEPHL1*: p.W991*; *CUL9*: p.T423I; *IQCF6*: p.R61W; *MGA*: p.S571L; *SHC4*: p.H180N; *SMS*: p.G14R; *BRAT1*: p.E458L). Las otras variantes tienen frecuencias $\leq 1/10000$, según ExAC.

Red de interacción génica/proteica y enriquecimiento de vías

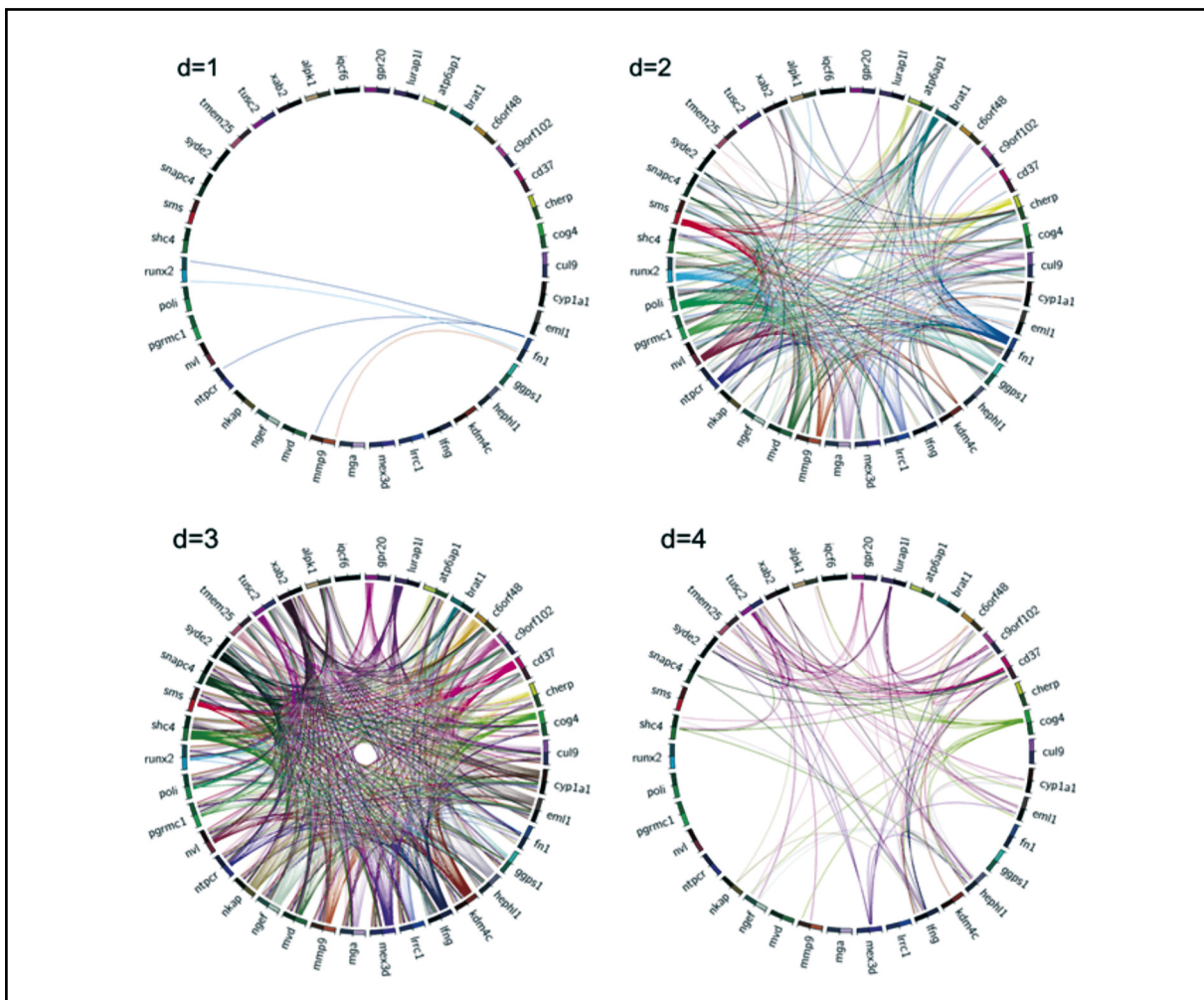
Se construyó una red de interacciones entre genes y/o proteínas para investigar las vías funcionales relacionadas con los 37 genes mutados encontrados en la secuenciación de los exomas y detectar otros genes potencialmente causales, así como mecanismos moleculares que puedan estar implicados en la generación de las FAFs. La figura 1

muestra la conectividad entre parejas de genes. En distintos círculos, se muestran las conexiones de entrada y de salida para los 37 genes a distancias 1 a 4, respectivamente. A distancia 1 casi no hay interacciones, siendo *FNI* el único gen conectado con otros. A distancia 2 se observa más conectividad. La mayoría de la conectividad entre parejas de genes se observa a distancia 3. El único gen que no presenta ninguna interacción a ningún nivel es *IQCF6*.

La red de interacciones de genes/proteínas muestra que *GGPS1* y *CYP1A1*, dos de los genes *driver* más relevantes, se conectan a distancia 3, a través de *INS* y *IL6* (Figura 2a). Otros 4 genes *driver* (*RUNX2*, *MVD*, *MMP9* y *PGRMC1*) están conectados con *GGPS1* a distancia 2. *MMP9* también está a distancia 2 de *CYP1A1*. Además, *FNI* y *MMP9* están conectados a distancia 1. De manera similar, los genes *driver* *SYDE2* y *NGEF* están interconectados a distancia 2, a través de *RHOB* (Figura 2b).

El análisis de enriquecimiento de vías en los 37 genes mutados, realizado con la herramienta DAVID, dio como resultado la vía de biosíntesis de los isoprenoides (GO:0008299) ($p=0,0006$), que contiene los genes *GGPS1*, *MVD* y *CYP1A1*.

Figura 1. Esquema de la conectividad entre parejas de genes a distancias 1 a 4. En los círculos se muestran los símbolos de los 37 genes FAF encontrados en este estudio y sus conexiones de entrada y de salida



Discusión

En este trabajo hemos estudiado el trasfondo genético de 3 hermanas con FAF y 3 pacientes adicionales, no relacionadas, a través de la secuenciación masiva del exoma para identificar posibles genes de susceptibilidad a la patología. Hemos identificado 37 variantes raras (en 34 genes) compartidas por las 3 hermanas, algunas de ellas no descritas anteriormente y consideradas dañinas por los predictores. La variante más llamativa fue la mutación p.Asp188Tyr en el gen *GGPS1*, que presentó la mejor puntuación de conservación, y que ya hemos descrito en un trabajo previo⁹. Otro hallazgo interesante fueron las dos mutaciones en el gen *CYP11A1*, una encontrada en las tres hermanas y la otra en una paciente no relacionada. Sin embargo, hay otras variantes que también podrían estar involucradas, en distintos grados, en la susceptibilidad a las FAFs asociadas a BPs o en el fenotipo osteoporótico subyacente, de modo que nuestros datos serían compatibles con un modelo en el cual la acumulación de variantes de susceptibilidad podría contribuir a la base genética de las FAFs.

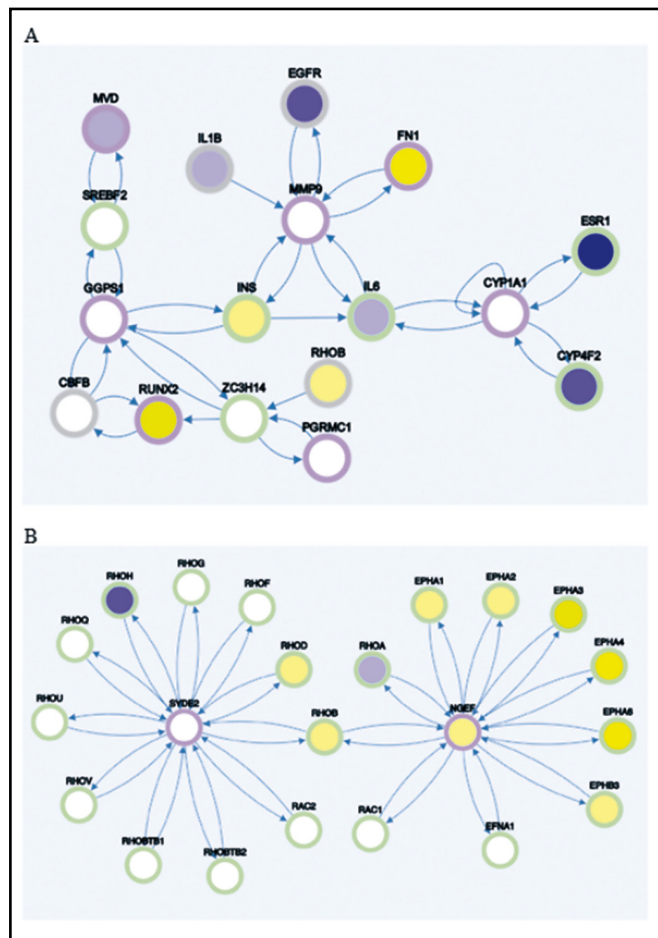
Los estudios epidemiológicos sugieren que existe una relación entre las FAFs y un tratamiento prolongado con BPs. Shane *et al.*, describieron períodos de tratamiento de una mediana de 7 años⁴. El riesgo absoluto de sufrir una FAF asociada al tratamiento con BPs se encuentra entre 2 casos por 100.000 pacientes/año a los 2 años de tratamiento y 78 casos por 100.000 pacientes/año a los 8 años de tratamiento²⁵. Estos datos sugieren que la duración de la terapia con BPs influiría positivamente en el riesgo de sufrir estas fracturas. En nuestro estudio, los casos de 6 pacientes con FAF después de un tratamiento a largo plazo con BPs son consistentes con esta asociación. Además, la ocurrencia de las FAFs en las 3 hermanas sugiere una predisposición genética con un papel determinante en la patología. Este estudio ha sido el primer análisis de exoma de pacientes de FAF. Hemos priorizado mutaciones raras, no-sinónimas, compartidas por las 3 hermanas. No se encontró ninguna mutación en homocigosis o heterocigosis compuesta en ningún gen. Estos hallazgos van en contra de un patrón de herencia recesivo para estos casos y son consistentes con el hecho que la FAF no es una enfermedad genética severa que ocurra durante las primeras etapas de la vida. No obstante, en el modelo dominante, se encontraron 34 genes mutados, algunos muy importantes para el metabolismo óseo. En un trabajo anterior que tenía por objetivo descubrir las causas genéticas de las FAFs, se utilizó un chip de exoma con >300.000 variantes codificantes ya conocidas y se encontraron 21 variantes raras sobrerrepresentadas en 13 pacientes de FAF²⁶. Sin embargo, ninguno de estos alelos de riesgo se encontró en los pacientes analizados en nuestro estudio. En concreto, no se encontraron variantes en el gen *PPEF2*, el único con un cambio asociado significativamente con el fenotipo en el estudio de Pérez-Núñez *et al.*²⁶ Esto apunta a una base genética heterogénea para las FAFs. En todo caso, es importante señalar que nuestra aproximación metodológica difiere de la del estudio mencionado en tanto que analizamos toda

la secuencia del exoma, cosa que nos permitió encontrar variantes no descritas anteriormente.

En el presente estudio, el único gen con mutaciones en las 3 hermanas y en pacientes no relacionados fue *CYP11A1*. Recientemente, Peris *et al.*²⁷ secuenciaron este gen en 17 pacientes de FAF y encontraron otra mutación en una de ellas. El gen *CYP11A1* codifica la enzima citocromo P450 1A1 que está involucrada en el metabolismo de fármacos y xenobióticos. Se trata de una hidroxilasa de hidrocarburos arilos y sus sustratos exógenos potenciales incluyen hidrocarburos aromáticos policíclicos, y está implicada en la formación de distintos tipos de cáncer humanos. Sus sustratos endógenos incluyen eicosanoides, que pueden generar productos biológicamente activos que actúan en el sistema vascular, entre otros. Este gen también es responsable de la hidroxilación del 17 β -estradiol, la estrona y la vitamina D en tejidos extrahepáticos²⁸. Esto es coherente con su papel en la biología ósea, una idea apoyada por Napoli *et al.*²⁹, quienes demostraron que el polimorfismo C4887A estaba relacionado con un aumento significativo del catabolismo de los estrógenos y con una densidad mineral ósea (DMO) femoral baja en mujeres postmenopáusicas. Por lo tanto, *CYP11A1* se presenta como otro gen de susceptibilidad potencial a las FAFs, aunque el mecanismo exacto de su acción en el metabolismo óseo todavía es desconocido y más estudios son necesarios para elucidarlo.

Entre los otros genes con variantes en las tres hermanas, *FNI* codifica la fibronectina, una proteína de la matriz extracelular necesaria para la regulación de la deposición del colágeno de tipo I por parte de los osteoblastos, esencial para la mineralización de la matriz extracelular, y cuyos niveles se han visto afectados por el tratamiento con BPs³⁰. Encontramos que las tres hermanas eran portadoras de un alelo doble mutante (p.V2241I y p.R1496W) en *FNI*, donde las dos mutaciones fueron consideradas como dañinas por los predictores de patogenidad. Esta fibronectina alterada podría afectar la mineralización ósea y/o la respuesta a los BPs y estar relacionada con el riesgo a sufrir una FAF en estas mujeres. También encontramos mutados 2 reguladores de GTPasas pequeñas: *SYDE2* y *NGEF*. Sus funciones respectivas (activación de las GTPasas RHO y de intercambio de sus nucleótidos de guanina) constituyen pistas sobre posibles efectos en la función osteoclástica y en la respuesta a los BPs. Las RHO GTPasas están en la vía del mevalonato en una posición por debajo del sitio de acción de los BPs, ya que tienen que ser preniladas (farnesiladas o geranilgeraniladas) para su correcta función celular. Por otra parte, nuestra red de interacción de genes/proteínas muestra como *NGEF* está muy relacionado con las efrinas y los receptores de efrinas (Figura 2b), que tienen un papel clave en el mecanismo de acoplamiento entre osteoclastos y osteoblastos³¹. Otro grupo de genes mutados en las 3 hermanas codifican proteínas nucleares con efectos pleiotrópicos sobre la expresión génica y/o la reparación del DNA (*KDM4C*, *XAB2*, *NVL*, *NKAP*, *ERCC6L2*). De ellos destacamos el gen *KDM4C*, que codifica una demetilasa lisina-específica que contiene un dominio JmjC, que ha sido previamente asociado con la edad de menarquia³², un biomarcador para la densidad ósea.

Figura 2. Detalles de la red de interacción entre genes/proteínas. El color del interior de los nodos indica la subexpresión (amarillo), sobreexpresión (azul) o ningún cambio de expresión (blanco) en osteoclastos tratados con alendronato o risendronato (datos de Yuen *et al.*, 2014²⁴). El color externo identifica los genes como *drivers* (mutados en nuestras pacientes) en lila, *upstream* de los genes mutados en verde, y otros en gris. a) Interacciones de los genes *GGPS1* y *CYP11A1* a distancia 2 (y algunas del gen *MMP9* a distancia 1). Nota: algunas conexiones se han omitido para la claridad de la figura. En particular, los nodos *RUNX2* y *FN1* no se han expandido para mostrar todos sus conectores. b) Interacciones de los genes *SYDE2* y *NGEF* a distancia 1



Otros genes encontrados mutados en las hermanas fueron el gen *PGRMC1* que codifica el componente 1 del receptor de membrana de la progesterona, y que fue previamente asociado al fallo ovárico prematuro³³; el gen *COG4* (que codifica la subunidad 4 del complejo oligomérico conservado del Golgi), relevante dada la importancia del transporte de vesículas a través del Golgi en los osteoclastos³⁴; y el gen *EML1* (que codifica una proteína asociada a microtúbulos) que puede ser importante en relación al cilio primario en osteocitos³⁵. En conjunto, las funciones y conocimiento previo de 13 de los 34 genes mutados en las 3 hermanas concuerdan con su posible implicación en la patología. Estas mutaciones se buscaron en las 3 pacientes de FAF no relacionadas, con resultados negativos.

No obstante, mediante una aproximación de genes candidatos, se encontraron mutaciones en

estas pacientes en dos proteínas claves para el remodelado óseo (*RUNX2* y *MMP9*) y en otra enzima de la vía del mevalonato (*MVD*, mevalonato difosfato carboxilasa). *RUNX2* es un factor de transcripción esencial para la diferenciación osteoblástica³⁶, mientras que *MMP9* es una metaloproteasa expresada en osteoclastos que degrada la matriz extracelular ósea³⁷, afectando a la arquitectura del hueso trabecular y a la estructura del hueso cortical³⁸. Por estas razones, ambos pueden estar involucrados en el riesgo a la FAF. Es sabido que *RUNX2* activa la expresión génica de *MMP9*³⁹ y esta interacción puede tener efectos sinérgicos en las propiedades biomecánicas del hueso en la paciente AFU3, que tiene ambas mutaciones (Nota: esta interacción no se muestra en la Figura 2a para que otras interacciones se puedan mostrar claramente). Finalmente, en la paciente AFU2 se encontró una mutación de cambio de sentido en el gen *MVD*, añadiendo una segunda proteína mutada de la vía del mevalonato. En la figura 3 se muestran, en el contexto de las células óseas, las proteínas codificadas por los genes que hemos encontrado mutados y cuya función en el hueso se conoce o está predicha.

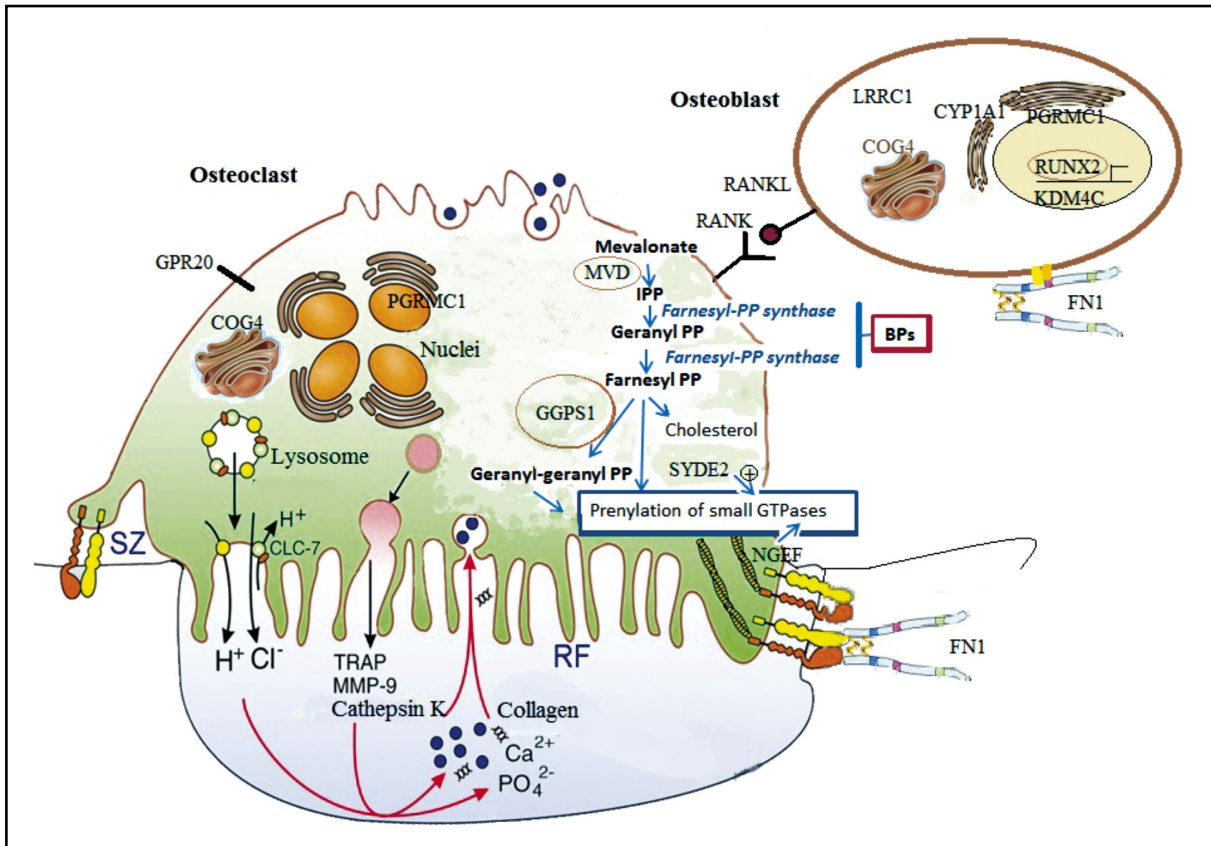
En conjunto, todas estas variantes raras pueden formar parte de un trasfondo genético asociado al desarrollo de los cambios óseos que dan lugar a las FAFs y a la posible interacción negativa con los BPs. Es probable que varios genes con efectos aditivos pequeños, y sus interacciones, estén implicados en las FAFs relacionadas con los BPs. Además, cada paciente individual podría ser portador de distintas variantes genéticas específicas.

Los puntos fuertes de este estudio son la posibilidad de analizar 3 hermanas con FAF y el abordaje por secuenciación del exoma completo, que carece de hipótesis previa. En este sentido, pudimos identificar mutaciones dañinas en genes que pertenecen a

la vía del mevalonato, así como otros genes relacionados con el metabolismo óseo. Por otro lado, el bajo número de pacientes y controles estudiados es una limitación del estudio y serán necesarios más estudios de secuenciación del exoma de pacientes de FAF adicionales y de pacientes no fracturados con un tratamiento a largo plazo con BPs (actuando como controles) para clarificar el papel preciso de estos genes y mutaciones. A pesar de la plausibilidad biológica del efecto dañino de las mutaciones encontradas, se necesita la replicación de estos hallazgos.

La identificación del trasfondo genético para las fracturas atípicas de fémur abre la puerta al futuro desarrollo de herramientas de diagnóstico y predicción del riesgo a sufrir este tipo de fracturas para determinar la idoneidad del tratamiento con BPs.

Figura 3. Proteínas codificadas por los genes mutados en las pacientes de FAF de este estudio y relacionadas con la función ósea



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

Bibliografía

1. Freemantle N, Cooper C, Diez-Perez A, Gitlin M, Radcliffe H, Shepherd S, et al. Results of indirect and mixed treatment comparison of fracture efficacy for osteoporosis treatments: A meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2013;24(1):209-17.
2. Peng J, Liu Y, Chen L, Peng K, Xu Z, Zhang D, et al. Bisphosphonates can prevent recurrent hip fracture and reduce the mortality in osteoporotic patient with hip fracture: A meta-analysis. *Pakistan J Med Sci.* 2016;32(2):499-504.
3. Kennel KA, Drake MT. Adverse effects of bisphosphonates: Implications for osteoporosis management. *Mayo Clinic Proceedings.* 2009;84(7):632-7.
4. Shane E, Burr D, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD, Cheung AM, et al. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: second report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2014;29(1):1-23.
5. Taormina DP, Marciano AI, Karia R, Egol KA, Tejwani NC. Symptomatic atypical femoral fractures are related to underlying hip geometry. *Bone.* 2014;63:1-6.
6. Sutton RAL, Mumm S, Coburn SP, Ericson KL, Whyte MP. "Atypical femoral fractures" during bisphosphonate exposure in adult hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2012;27(5):987-94.
7. Meier RPH, Lorenzini KI, Uebelhart B, Stern R, Peter RE, Rizzoli R. Atypical femoral fracture following bisphosphonate treatment in a woman with osteogenesis imperfecta case report. *Acta Orthop.* 2012;83(5):548-50.
8. Alonso N, Soares DC, V McCloskey E, Summers GD, Ralston SH, Gregson CL. Atypical femoral fracture in

- osteoporosis pseudoglioma syndrome associated with two novel compound heterozygous mutations in LRP5. *J Bone Miner Res.* 2015;30(4):615-20.
9. Roca-Ayats N, Balcells S, Garcia-Giralt N, Falcó-Mascaró M, Martínez-Gil N, Abril JF, et al. GGPS1 mutation and atypical femoral fractures with bisphosphonates. *N Engl J Med.* 2017;376(18):1794-5.
10. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-60.
11. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-9.
12. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytisky A, et al. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-303.
13. Consortium T 1000 GP. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature.* 2012;491:56.
14. Medina I, De Maria A, Bleda M, Salavert F, Alonso R, Gonzalez CY, et al. VARIANT: Command Line, Web service and Web interface for fast and accurate functional characterization of variants found by Next-Generation Sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:W54-8.
15. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4:1073-81.
16. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods.* 2010;7(4):248-9.
17. Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, Rosenbloom K, et al. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.* 2005;15(8):1034-50.

18. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4:44-57.
19. Boloc D, Castillo-Lara S, Marfany G, González-Duarte R, Abril JF. Distilling a Visual Network of Retinitis Pigmentosa Gene-Protein Interactions to Uncover New Disease Candidates. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135307.
20. Chatr-Aryamontri A, Oughtred R, Boucher L, Rust J, Chang C, Kolas NK, et al. The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D369-79;
21. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(D1):D808-15.
22. Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, et al. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 2009;19(9):1639-45.
23. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets - Update. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(D1):D991-5.
24. Yuen T, Stachnik A, Iqbal J, Sgobba M, Gupta Y, Lu P, et al. Bisphosphonates inactivate human EGFRs to exert antitumor actions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(50):17989-94.
25. Brown JP, Morin S, Leslie W, Papaioannou A, Cheung AM, Davison KS, et al. Bisphosphonates for treatment of osteoporosis: expected benefits, potential harms, and drug holidays. *Can Fam Physician.* 2014;60(4):324-33.
26. Pérez-Núñez I, Pérez-Castrillón JL, Zarrabeitia MT, García-Ibarbia C, Martínez-Calvo L, Olmos JM, et al. Exon array analysis reveals genetic heterogeneity in atypical femoral fractures. A pilot study. *Mol Cell Biochem.* 2015;409:45-50.
27. Peris P, González-Roca E, Rodríguez-García SC, del Mar López-Cobo M, Monegal A, Guañabens N. Incidence of mutations in the ALPL, GGPS1 and CYP1A1 genes in patients with atypical femoral fractures. *JBMR Plus.* 2018; [Epub ahead of print].
28. Zhou SF, Liu J-P, Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev.* 2009;41(2):89-295.
29. Napoli N, Villareal DT, Mumm S, Halstead L, Sheikh S, Cagaanan M, et al. Effect of CYP1A1 gene polymorphisms on estrogen metabolism and bone density. *J Bone Miner Res.* 2005;20(2):232-9.
30. Insalaco L, Gaudio F Di, Terrasi M, Amodeo V, Caruso S, Corsini LR, et al. Analysis of molecular mechanisms and anti-tumoural effects of zoledronic acid in breast cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2012;16(9):2186-95.
31. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep.* 2014;3:481.
32. Perry JRB, Day F, Elks CE, Sulem P, Thompson DJ, Ferreira T, et al. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature.* 2014;514(7520):92-7.
33. Mansouri MR, Schuster J, Badhai J, Stattin EL, Lösel R, Wehling M, et al. Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Hum Mol Genet.* 2008;17(23):3776-83.
34. Xia WF, Tang FL, Xiong L, Xiong S, Jung JU, Lee DH, et al. Vps35 loss promotes hyperresorptive osteoclastogenesis and osteoporosis via sustained RANKL signaling. *J Cell Biol.* 2013;200(6):821-37.
35. Nguyen AM, Jacobs CR. Emerging role of primary cilia as mechanosensors in osteocytes. *Bone.* 2013;54(2):196-204.
36. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997;89(5):747-54.
37. Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, et al. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: Implications for bone resorption. *Lab Investig.* 1995;72(3):311-22.
38. Nyman JS, Lynch CC, Perrien DS, Thielloy S, O'Quinn EC, Patil CA, et al. Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. *J Bone Miner Res.* 2011;26(6):1252-60.
39. Pratap J, Javed A, Languino LR, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, et al. The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion. *Mol Cell Biol.* 2005;25(19):8581-91.

Martínez-Gil N¹, Roca-Ayats N¹, Vilardell M², Civit S², Urreiziti R¹, García-Giralt N³, Mellibovsky L³, Nogués X³, Díez-Pérez A³, Grinberg D¹, Balcells S¹

1 Departamento de Genética, Microbiología y Estadística - Facultad de Biología - Universidad de Barcelona - Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) - Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona (IBUB) - Instituto de Investigación Sant Joan de Déu (IRSJD) - Barcelona (España)

2 Departamento de Genética, Microbiología y Estadística - Facultad de Biología - Universidad de Barcelona - Barcelona (España)

3 Unidad de Investigación en Fisiopatología Ósea y Articular (URFOA) - Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM) - Parque de Salud Mar - Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES) - Barcelona (España)

Estudios funcionales de variantes de DKK1 presentes en la población general

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2018000400003>

Correspondencia: Susana Balcells Comas - Departamento de Genética, Microbiología y Estadística - Facultad de Biología - Universitat de Barcelona - Avda. Diagonal, 643 - 08028 Barcelona (España)
Correo electrónico: sbalcells@ub.edu

Fecha de recepción: 02/06/2018

Fecha de aceptación: 01/09/2018

Trabajo premiado con una beca FEIOMM de Investigación Básica 2015.

Resumen

Objetivo: En las últimas décadas se han identificado genes asociados a la masa ósea y al riesgo de fractura osteoporótica, varios de los cuales pertenecen a la vía de Wnt. En este proyecto se estudió la funcionalidad de 7 mutaciones de cambio de sentido del gen *DKK1* –un inhibidor de la vía de Wnt– presentes en la población general.

Material y métodos: Se realizaron estudios *in vitro* del gen reportero luciferasa para medir la actividad de la vía de Wnt en presencia o ausencia de DKK1 silvestre o mutada, y estudios de *western blot*, para evaluar si las distintas mutaciones afectan a su síntesis y/o a su estabilidad.

Resultados: La proteína DKK1 con la variante p.Ala41Thr presenta menor actividad inhibidora de la vía en comparación con la proteína silvestre. También se observaron diferencias significativas entre los experimentos realizados en ausencia de DKK1 y los que incluyen DKK1 con la mutación p.Ala41Thr. Los *western blots* mostraron que la cantidad de proteína era similar para todas las variantes, tanto las mutadas como la silvestre, por lo que la pérdida de actividad de p.Ala41Thr no parecía deberse a falta de proteína. El resto de las mutaciones no presentaron un comportamiento diferente al de la proteína DKK1 silvestre.

Conclusiones: La variante de cambio de sentido p.Ala41Thr de la proteína DKK1, con una frecuencia poblacional de 0,013%, presenta una pérdida parcial de su función inhibidora, que no es debida a la falta de expresión de ésta. Esta variante génica podría conllevar un aumento de la densidad mineral ósea en las personas de la población general portadoras de esta mutación.

Palabras clave: *DKK1, estudios funcionales, variantes de cambio de sentido, luciferasa, vía de Wnt, masa ósea elevada, osteoporosis.*

Functional studies of DKK1 variants present in the general population

Summary

Objective: In recent decades, genes associated with bone mass and osteoporotic fracture risk have been identified, several of which belong to the Wnt pathway. In this project, the functionality of 7 missense mutations of the gene *DKK1*—an inhibitor of the Wnt pathway—present in the general population was studied.

Material and methods: *In vitro* studies of the luciferase reporter gene were carried out to measure Wnt pathway activity in the presence or absence of wild-type or mutated *DKK1*, and western blot studies, to evaluate if the different mutations affect its synthesis and/or stability.

Results: The *DKK1* protein with the p.Ala41Thr variant shows lower pathway inhibitory activity compared to the wild-type protein. Significant differences were also observed between the experiments performed in the absence of *DKK1* and those that include *DKK1* with the p.Ala41Thr mutation. Western blots showed that the amount of protein was similar for all variants, both mutated and "wild-type", so the loss of p.Ala41Thr activity did not seem to be due to a lack of protein. The rest of the mutations did not show different behavior from that of the wild *DKK1* protein.

Conclusions: The missense variant p.Ala41Thr of the *DKK1* protein, with a population frequency of 0.013%, shows a partial loss of its inhibitory function, which is not due to the lack of expression. This gene variant could lead to an increase in bone mineral density in those people in the general population who carry this mutation.

Key words: *DKK1*, functional studies, missense variants, luciferase, Wnt pathway, High Bone Mass (HBM), osteoporosis.

Introducción

El papel de la vía de Wnt sobre la regulación del remodelado óseo se ha demostrado en múltiples estudios. Por un lado, se han descrito polimorfismos en diversos genes de la vía de Wnt que muestran asociación con la densidad mineral ósea (DMO) y el riesgo de fractura¹⁻⁶. También se han descrito mutaciones poco frecuentes o raras en genes de la vía de Wnt, causantes de fenotipos óseos más raros, tales como la osteoporosis-pseudoglioma (OPPG; OMIM 259770)⁷, la osteogénesis imperfecta autosómica recesiva de tipo XV (OMIM 615220)⁸, y la osteosclerosis (OMIM 144750)⁹. La vía de Wnt se inicia con la formación de un complejo heterotrimérico entre el receptor *Frizzled*, el co-receptor LRP5 y el ligando Wnt. Una vez formado este complejo, la β -catenina se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo donde puede activar la transcripción de numerosos genes diana. En osteoblastos se ha demostrado que la vía de Wnt activa la transcripción de genes que contribuyen netamente a la formación de hueso¹⁰. Además, esta vía se encuentra finamente regulada por una serie de inhibidores extracelulares, entre los que destacan la proteína esclerostina, codificada por el gen *SOST*, y la proteína *DKK1*, codificada por un gen con el mismo nombre. Estas dos proteínas realizan su función, impidiendo la formación del complejo heterotrimérico. Las proteínas esclerostina y *DKK1* forman así otros complejos heterotriméricos, junto con LRP5 y LRP4 (en el caso de esclerostina)^{11,12} y junto con LRP5 y Kremen (en el caso de *DKK1*)¹³.

La sobreexpresión transgénica del gen *DKK1* en osteoblastos produce una disminución relativa del número de osteoblastos frente al de osteoclastos, produciendo así una disminución en la forma-

ción de hueso. Del mismo modo, en ratones, la delección homocigota del gen *DKK1* es letal, pero la delección en heterocigosis presenta un fenotipo de sobrecrecimiento de hueso (alta masa ósea)^{14,15}.

Gracias al efecto directo sobre la inhibición de la osteoblastogénesis y de la activación indirecta de la osteoclastogénesis¹⁶, en la última década esclerostina y *DKK1* se han convertido en unas dianas interesantes para el tratamiento de la osteoporosis. En cuanto a *DKK1* se refiere, se han desarrollado anticuerpos (BHQ880, DKN-01 y PF-04840082), el primero de los cuales se encuentra en fase de ensayo clínico en mujeres postmenopáusicas con baja densidad mineral ósea (DMO)¹⁷⁻¹⁹.

En un estudio previo de nuestro grupo²⁰ se secuenció *DKK1* para identificar variantes que pudieran explicar el fenotipo de alta masa ósea (HBM, por sus iniciales en inglés), definida por una *Z-score* femoral + lumbar > 4, presente en 15 mujeres. En una de ellas, se encontró una mutación de cambio de sentido (p.Tyr74Phe) que cosegregaba con el fenotipo HBM en la familia. En otro estudio de resecuenciación del gen *DKK1* en mujeres postmenopáusicas de la cohorte BARCOS, hemos encontrado otra mutación de cambio de sentido (p.Arg120Leu) en otra mujer con HBM²¹. Además de estas mutaciones, en la población general existen otras variantes de cambio de sentido en *DKK1* (<http://exac.broadinstitute.org/>), cuyo efecto en términos de masa ósea se desconoce.

En este trabajo, hemos realizado estudios *in vitro* de las mutaciones p.Arg120Leu y p.Tyr74Phe, junto con otras mutaciones de cambio de sentido de *DKK1* frecuentes en la población general (p.Met16Leu, p.Ala41Thr, p.Pro84Leu, p.Ala106Thr, p.Ser157Ile), para valorar su posible implicación en fenotipos óseos.

Material y método

Vectores de expresión y mutagénesis

Los vectores de expresión *mouse* Wnt1-V5, *mesdc2*, *human wildtype* LRP5, pRL-TK, PGL3-OT y DKK1-FLAG²², fueron cortesía del Dr. Wim van Hul (Amberes, Bélgica). Las mutaciones p.Met16Leu, p.Ala41Tyr, p.Tyr74Phe, p.Pro84Leu, p.Ala106Thr, p.Arg120Leu, p.Ser157Ile se introdujeron en el vector de expresión DKK1-FLAG utilizando el kit *Quick Change Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). Se verificó la presencia de las mutaciones y la ausencia de errores mediante secuenciación Sanger.

Cultivo celular, producción de medio condicionado y western blot

Se han utilizado células HEK293, cultivadas con medio DMEM suplementado con FBS (10% V/V, Gibco, LifeTechnologies) y 1% de estreptomycin-penicilina (Gibco, LifeTechnologies) y mantenidas en incubadores a 37°C al 5% en CO₂. Se sembraron 3 x 10⁵ células por pocillo en placas de 6 pocillos, 24 h antes de la transfección. Se transfectó 2.000 ng/pocillo de los plásmidos DKK1-FLAG mutado o silvestre. La transfección se realizó utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. A las 24 h se cambió el medio, reduciendo de 2 a 1 ml de DMEM, sin FBS (*Fetal Bovine Serum*) ni antibióticos. A las 48 h de la transfección se recogió el sobrenadante de cada condición. Las proteínas del medio condicionado se concentraron utilizando filtros Amicon Ultra (Millipore) y se fueron cuantificadas mediante el ensayo BCA (Pierce). Las proteínas de los medios condicionados concentrados (4,5 µg/carril) se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para los análisis de *western blot* se utilizaron los anticuerpos de Abcam ab109416 contra DKK1 y ab2413 contra la proteína extracelular fibronectina, utilizada como control de carga. Las imágenes se desarrollaron usando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich). Para cada mutante se obtuvo medio condicionado en 2 días diferentes y se realizó el análisis por *western blot* 2 veces con estos medios condicionados.

Ensayos de gen reportero

Se utilizaron células HEK293, cultivadas como se indica en el apartado anterior. Se sembraron 10⁴ células por pocillo en placas de 96 pocillos, 24 h antes de la transfección. Se cotransfectaron hasta 5 plásmidos en células HEK293: *Mouse* Wnt1-V5 (3,2 ng), *mesdc2* (6,4 ng), *human wildtype* LRP5 (6,4 ng), pRL-TK (8 ng), y pGL3-OT (160 ng). Además, dependiendo del experimento también se cotransfectó el plásmido DKK1-FLAG (0,6 ng) silvestre o mutado. En caso necesario, se utilizó el vector vacío pcDNA3 para igualar la cantidad total de ADN de cada experimento. La transfección se realizó utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. A las 48 h de la transfección, las células se lisaron y se midió la actividad de las luciferasas de *Photinus*

pyralis y *Renilla reniformis* utilizando un luminómetro Glomax Multi+ (Promega) siguiendo las instrucciones del sistema *Dual-luciferase reporter assay* (Promega). Cada experimento incluyó 5 réplicas y se repitió independientemente en 3 experimentos separados.

Análisis estadísticos

Se realizó un modelo *one-way blocked* ANOVA para cada mutante teniendo en cuenta el factor de prueba, el día como factor de bloqueo y la variable de respuesta la relación entre las actividades de las luciferasas (*Photinus pyralis* vs. *Renilla reniformis*). El bloqueo es una técnica para lidiar con el factor de molestia y este puede ser un factor que influya en la respuesta. Para cada proteína mutante, el factor de prueba tiene los siguientes niveles: control (se refiere a la actividad de la luciferasa resultante de la vía de Wnt endógena), el activador (actividad de la luciferasa producida por la vía de Wnt en presencia de Wnt y LRP5 exógenos), el inhibidor (actividad en presencia del inhibidor DKK1 silvestre) y mutante (cada una de las proteínas DKK1 mutantes). Se utilizó el test de TukeyHSD para realizar la prueba *post hoc* para comparaciones múltiples de grupos. Los test ANOVA se realizaron utilizando el programa R estudio v.3.4.0, y valores de p<0,05 fueron considerados significativos. Todos los datos fueron evaluados para la normalidad, la homogeneidad de la varianza y la detección de valores atípicos.

Resultados

Expresión, secreción y estabilidad de las proteínas mutadas

Se ha realizado un ensayo de *western blot* para comprobar si las proteínas DKK1 mutantes se encuentran correctamente en el espacio extracelular, utilizando un cultivo de células HEK293, que expresan elevadas cantidades de DKK1 silvestre o DKK1 mutadas. Los resultados muestran que, en todos los casos, las distintas proteínas DKK1 mutadas se detectan en el espacio extracelular (Figura 1) y a niveles iguales o superiores a los de la proteína silvestre.

Actividad de las proteínas DKK1 mutadas

Con el objetivo de testar la actividad inhibidora de proteínas DKK1 mutantes sobre la vía de Wnt, hemos realizado un ensayo de gen reportero (luciferasa), específico para esta vía (Figura 2).

Los resultados de la condición endógena en la que se han cotransfectado los plásmidos pRLTK y pGL3-OT se muestran en las figuras 2A y 3 que representan la actividad de la vía de Wnt en las células HEK293.

En la condición activa, además de pRLTK y pGL3-OT, se ha cotransfectado los vectores que expresan Wnt1 y LRP5. Wnt1 actúa como ligando activador de la vía y LRP5 como co-receptor, dos elementos indispensables para la activación de la vía. En esta condición (Figura 2B) la actividad de la luciferasa se ha incrementado 3 veces, en promedio, en comparación con la vía endógena (Figura 3, activador).

La vía inhibida contenía los mismos vectores que la condición activa pero además se ha cotransfectado el vector que expresa la proteína DKK1-WT (proteína silvestre). En esta condición, se ha inhibido la vía de Wnt, al secuestrar al co-receptor LRP5 (Figura 2C). En estos experimentos la actividad de la luciferasa se ha aumentado 2,2 veces respecto a la condición endógena y ha resultado significativamente inferior a la de la vía activada (Figura 3, inhibidor).

Cuando se ha comprobado la funcionalidad de los mutantes de DKK1, se han cotransfectado los distintos vectores de la vía inhibida, pero sustituyendo

el de DKK1-WT por los que expresan las distintas DKK1 mutadas. Para las proteínas mutantes DKK1-p.Met16Leu, DKK1-p.Tyr74Phe, DKK1-p.Pro84Leu, DKK1-p.Ala106Thr, DKK1-p.Arg120Leu y DKK1-p.Ser157Ile no se han hallado diferencias significativas en la actividad inhibidora comparada con la proteína DKK1 WT (datos no mostrados).

En cambio, en presencia de la proteína mutante DKK1-p.Ala41Thr se ha observado una actividad de la luciferasa que es significativamente mayor a la de la vía inhibida por la DKK1-WT (Figura 3), y a su vez significativamente inferior a la de la vía activa.

Figura 1. Niveles de expresión de la proteína DKK1 *wild-type* o mutada analizados mediante *western blot*. Se transfectaron células HEK293 con vectores de expresión de las diferentes variantes de DKK1 que se indican en cada carril. Los medios condicionados resultantes, debidamente concentrados se emplearon para este análisis. En cada carril se cargó 4,5 ug de proteína total. Como control de carga se ha utilizado la proteína extracelular fibronectina

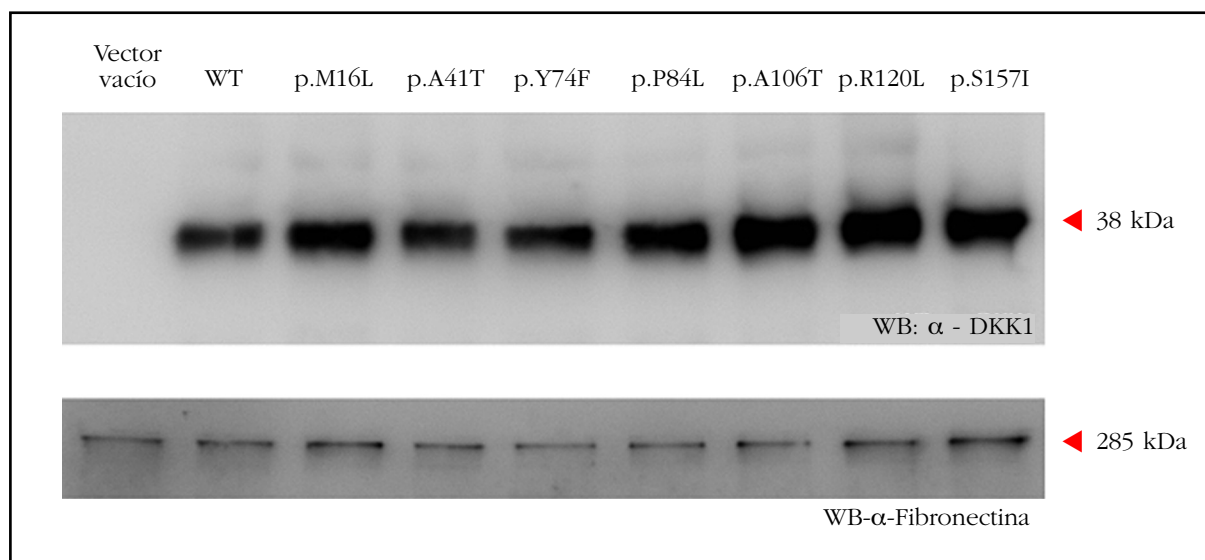
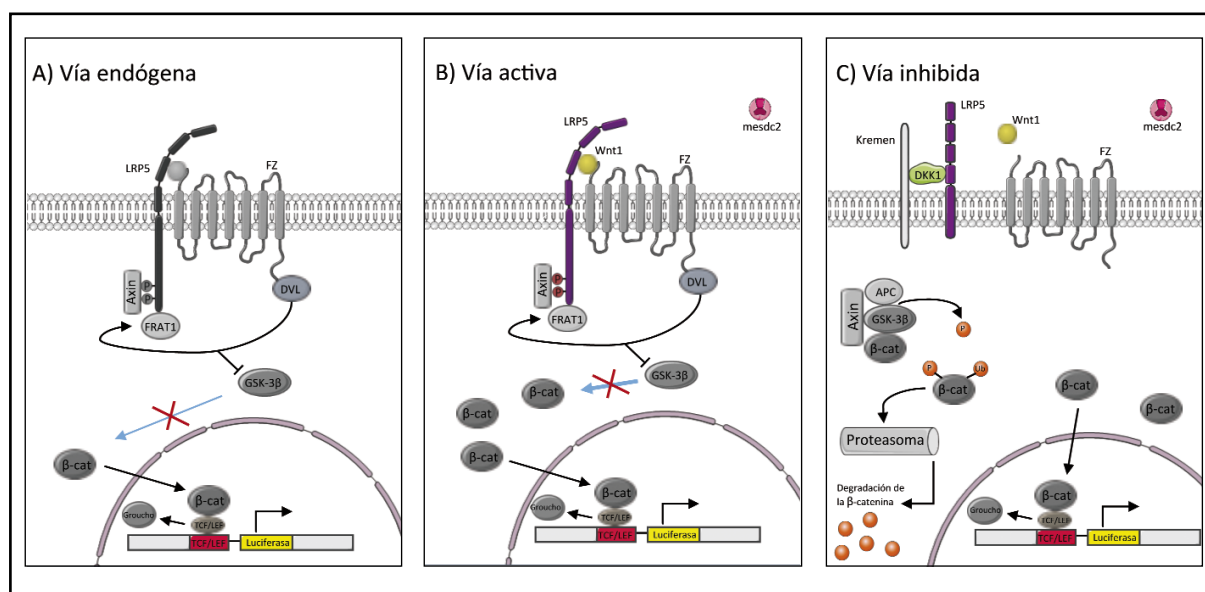


Figura 2. Diseño de ensayo de gen reportero. A) Condición endógena: transfectamos los plásmidos pRLTK y pGL3OT. B) Condición activa: transfectamos los plásmidos pRLTK, pGL3OT, Wnt1, LRP5 y mesdc2. C) Condición inhibida: transfectamos los plásmidos pRLTK, pGL3OT, Wnt1, LRP5, mesdc2 y DKK1-WT. En gris los elementos endógenos de las células HEK293 de la vía de Wnt, en color los elementos transfectados en cada condición

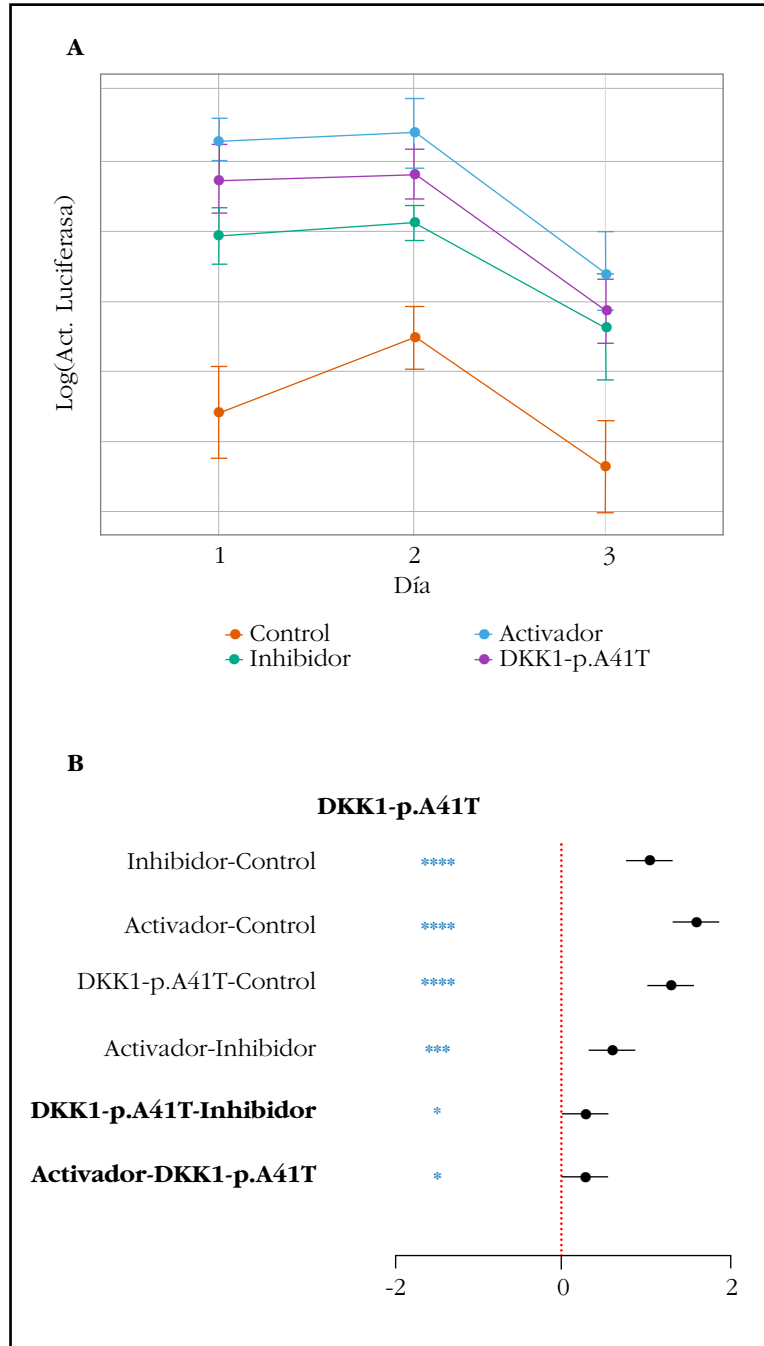


Discusión

El gen *DKK1* codifica una proteína del mismo nombre, que actúa en el espacio extracelular como inhibidor de la vía de señalización de Wnt. Numerosos estudios han asociado la vía de Wnt con la formación ósea, mientras que su bloqueo mediante esclerostina o DKK1 se ha asociado con mayor pérdida de masa ósea y riesgo de fractura. La búsqueda de variantes génicas que puedan explicar la regulación de la vía Wnt en la población general puede abrir un campo de investigación muy relevante para el estudio de la osteoporosis. En este trabajo hemos estudiado la función inhibidora de 7 proteínas DKK1 mutantes sobre la vía de Wnt y hemos observado que la proteína mutante DKK1-p.Ala41Thr presenta una pérdida parcial de su función inhibidora, que no es debida a la pérdida de su expresión. La actividad de la proteína DKK1-p.A41T se reduce aproximadamente un 50% en comparación con la proteína DKK1-WT. La mutación, en el aminoácido 41 no se encuentra en el dominio de unión a LRP5 (aminoácidos 189-263), pero sí que afecta el motivo NAIKN (aminoácidos 40-44), crucial para la unión a las proteínas LRP5 y LRP6 y que se encuentra conservado en todos los inhibidores de la vía de Wnt²³.

Según la base de datos ExAC, la frecuencia poblacional de la variante p.Ala41Thr es de 15 heterocigotos en 60.000 individuos adultos exentos de patologías graves. Dado nuestro resultado de pérdida de actividad inhibidora de esta variante de DKK1, podríamos inferir que el fenotipo asociado sería de una mayor densidad ósea no patológica. A partir de esta frecuencia, estimamos que en España hay unos 6.000 portadores de esta variante en heterocigosis. Por otra parte, hay una única referencia a la mutación p.Ala41Thr que la asocia a patología, concretamente a la malformación de Chiari tipo I (CMI)²⁴. Esta enfermedad se caracteriza por un defecto del desarrollo del hueso occipital y la fosa posterior (PF) y la consiguiente hernia de la amígdala cerebelosa. Será interesante estudiar la posible relación entre mutaciones en *DKK1* y esta patología, que en muchos casos es asintomática y no diagnosticada.

Figura 3. Ensayo de actividad de la proteína DKK1-p.Ala41Thr. A) Gráfico de interacciones siguiendo el modelo, $Y_{ij} = \mu + \text{día} + \text{test} + \text{día:test} + \epsilon_{ijk}$. En el eje de las Y se muestra el logaritmo de la media de la *ratio* de actividades de las luciferasas (*Photinus pyralis/Renilla reniformis*) con su intervalo de confianza; en el eje de las X se muestran los tres días en los que se ha testado el experimento. B) Test Tukey de comparaciones múltiples entre las diferentes condiciones testadas. Se muestran los niveles de significación mediante el código: (****)<0,000001, (***)<0,0001, (**)<0,01, (*)<0,05



No se han encontrado diferencias en la actividad del resto proteínas mutantes y la proteína DKK1 WT. Estos resultados coinciden con los resultados encontrados por Korvala *et al.*²⁵ para la mutación p.Arg120Leu. Estos autores encontraron dicha mutación en un paciente con osteoporosis primaria, un fenotipo diametralmente opuesto al fenotipo de la mujer HBM donde nosotros encontramos la muta-

ción. Esta misma mutación se encuentra en pacientes con enfermedad de Paget (PDB)²⁶ y su frecuencia en pacientes es el doble que en controles, aunque la diferencia no resulta significativa.

Ninguna de las siete mutaciones testadas se encuentra en el dominio que afecta a la vía de señalización de Wnt (dominio de unión a LRP5: aminoácidos 189-263), y solo la p.Ala41Thr afecta al motivo NAIKN. Esto podría ser una razón por la que no se han observado diferencias de actividad inhibidora en 6 de las 7 DKK1 mutadas. Alternativamente, estas DKK1 mutantes mostrarían diferencias de actividad inhibidora menores a las que se puedan detectar con la sensibilidad del ensayo de gen reportero que se ha utilizado. Una limitación del estudio sería que el ensayo realizado conlleva la cotransfección de varios vectores para tener unos valores altos de actividad de la luciferasa, lo que le confiere una elevada variabilidad. Otra limitación sería que el efecto que se espera de estas mutaciones es pequeño, ya que son variantes presentes en la población general. Esta cuestión solo podrá resolverse cuando se disponga de algún ensayo con una mayor sensibilidad.

En conclusión, en este estudio se ha visto que la proteína DKK1-p.Ala41Thr presenta una pérdida parcial de su función inhibidora, que no se debe a su falta de expresión. Esto podría conllevar un aumento de la densidad mineral ósea en las personas de la población general portadoras de dicha mutación.

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

Financiación: Este estudio ha sido cofinanciado con fondos del proyecto SAF2016-75948R.

Bibliografía

- Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet*. 2008;371(9623):1505-12.
- Rivadeneira F, Styrkarsdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV, Hsu YH, Richards JB, et al. Twenty bone mineral density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet*. 2010;41(11):1199-206.
- Styrkarsdóttir U, Halldórsson BV, Gudbjartsson DF, Tang NL, Koh JM, Xiao SM, et al. European bone mineral density loci are also associated with BMD in East-Asian populations. *PLoS One*. 2010;5(10):e13217.
- Duncan EL, Danoy P, Kemp JP, Leo PJ, McCloskey E, Nicholson GC, et al. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet*. 2011;7(4):e1001372.
- Estrada K, Styrkarsdóttir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet*. 2012;44(5):491-501.
- Zheng HF, Forgetta V, Hsu YH, Estrada K, Rosello-Diez A, Leo PJ, et al. Whole-genome sequencing identifies EN1 as a determinant of bone density and fracture. *Nature*. 2015;526(7571):112-7.
- Gong Y, Vikkula M, Boon L, Liu J, Beighton P, Ramesar R, et al. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. *Am J Hum Genet*. 1996;59(1):146-51.
- Keupp K, Beleggia F, Kayserili H, Barnes AM, Steiner M, Semler O, et al. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *Am J Hum Genet*. 2013;92(4):565-74.
- Piters E, Culha C, Moester M, Van Bezooijen R, Adriaensen D, Mueller T, et al. First missense mutation in the SOST gene causing sclerosteosis by loss of sclerostin function. *Hum Mutat*. 2010;31(7):E1526-43.
- Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*. 2013;19(2):179-92.
- Choi HY, Dieckmann MH, Herz J, Niemeier A. Lrp4, a novel receptor for dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo. *PLoS One*. 2009;4(11):e7930.
- Leupin O, Piters E, Halleux C, Hu S, Kramer I, Morvan F, et al. Bone overgrowth-associated mutations in the LRP4 gene impair sclerostin facilitator function. *J Biol Chem*. 2011;286(22):19489-500.
- Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signalling. *Nature*. 2002;417(6889):664-7.
- Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, Chen L, Tsukui T, Gomer L, et al. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell*. 2001;1(3):423-34.
- Li J, Sarosi I, Cattle RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone*. 2006;39(4):754-66.
- Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS One*. 2011;6(10):e25900.
- Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Entenberg SA, et al. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood*. 2009;114(2):371-9.
- Bendell JC, Murphy JE, Mahalingam D, Halmos B, Sirard CA, Landau SB, et al. A Phase 1 study of DKN-01, an anti-DKK1 antibody, in combination with paclitaxel (pac) in patients with DKK1 relapsed or refractory esophageal cancer (EC) or gastro-esophageal junction tumors (GEJ). *J Clin Oncol*. 2016; 34, Abstract 111.
- Betts AM, Clark TH, Yang J, Treadway JL, Li M, Giovanelli MA, et al. The Application of Target Information and Preclinical Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling in Predicting Clinical Doses of a Dickkopf-1 Antibody for Osteoporosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;333(1):2-13.
- Sarrion P, Mellibovsky L, Urreiziti R, Civit S, Cols N, García-Giralt N, et al. Genetic analysis of high bone mass cases from the BARCOS cohort of spanish postmenopausal women. *PLoS One*. 2014;9(4):e94607.
- Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Monistrol-Mula A, García-Giralt N, Díez-Pérez A, Nogués X, et al. Common and rare variants of WNT16, DKK1 and SOST and their relationship with bone mineral density. *Sci Rep*. 2018;8:10951.
- Balemans W, Piters E, Cleiren E, Ai M, Van Wesenbeeck L, Warman ML, et al. The binding between sclerostin and LRP5 is altered by DKK1 and by high-bone mass LRP5 mutations. *Calcif Tissue Int*. 2008;82(6):445-53.
- Bourhis E, Wang W, Tam C, Hwang J, Zhang Y, Spittler D, et al. Wnt antagonists bind through a short peptide to the first b-propeller domain of LRP5/6. *Structure*. 2011;19(10):1433-42.
- Merello E, Tattini L, Magi A, Accogli A, Piatelli G, Pavanello M, et al. Exome sequencing of two Italian pedigrees with non-isolated Chiari malformation type I reveals candidate genes for cranio-facial development. *Eur J Hum Genet*. 2017;25(8):952-9.
- Korvala J, Löija M, Mäkitie O, Sochett E, Jüppner H, Schnabel D, et al. Rare variations in WNT3A and DKK1 may predispose carriers to primary osteoporosis. *Eur J Med*. 2012;55(10):515-9.
- Beauregard M, Gagnon E, Guay-Bélanger S, Siris ES, Morissette J, Brown JP, et al. Genetic association study of dickkopf-1 and sclerostin genes with paget disease of bone. *Calcif Tissue Int*. 2013;93(5):405-12.

Taymouri F¹, Nogués X¹, Güerri-Fernández R¹, Mellibovsky L¹, Díez-Pérez A¹, Garcia-Giralt N¹, Ovejero D^{1,2}

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

² Consejo Nacional de Investigación. Instituto de Fisiología Clínica. Lecce (Italia)

La resistencia mecánica tisular ósea es independiente de la edad en individuos sanos

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2018000400004>

Correspondencia: Diana Ovejero Crespo - Unidad de Investigación Muculoesquelética - Instituto de Investigaciones Médicas del Hospital del Mar (IMIM) - C/Dr. Aiguader, 88 (Habitación 200.10) - 08003 Barcelona (España)
Correo electrónico: dianaovejero@hotmail.com

Fecha de recepción: 19/06/2018

Fecha de aceptación: 27/07/2018

Trabajo remitido como prestación de la beca FEIOMM de Investigación Genética 2010.

Resumen

Objetivo: La microindentación de impacto (MII) es una técnica que permite medir *in vivo* la resistencia tisular mecánica ósea. Se ha demostrado que la MII proporciona información útil sobre la evaluación de enfermedades esqueléticas, pero se desconoce el efecto que la edad puede ejercer sobre la propiedad ósea medida. El objetivo del estudio es analizar la relación entre la edad y la MII.

Material y métodos: El índice de Resistencia Mineral Ósea (BMSi), la variable de medición de MII, se midió en 69 mujeres (mediana de edad: 49 años; rango: 30-81 años) y 19 varones (mediana de edad: 34 años; rango: 24-98 años) sanos. La correlación entre BMSi y la edad se analizó mediante regresión lineal. La asociación entre BMSi y edad se evaluó mediante ANOVA tras ajustar por el índice de masa corporal. El posible efecto de depleción estrogénica postmenopáusica sobre el BMSi se estudió comparando el subgrupo de mujeres más jóvenes con las más mayores mediante la prueba t de Student.

Resultados: Los análisis de regresión lineal mostraron que la BMSi no se correlaciona con la edad en varones ($R^2=0,0016$, $p=0,74$) ni en mujeres ($R^2=0,076$, $p=0,25$). Asimismo, el análisis ajustado de ANOVA no demostró asociación entre la BMSi y la edad ni en varones ($p=0,78$) ni en mujeres ($p=0,73$). Finalmente, no se encontraron diferencias entre la BMSi entre las mujeres más jóvenes y las mayores ($p=0,8$).

Conclusiones: La resistencia tisular mecánica ósea en individuos sanos es independiente a la edad y a la depleción estrogénica postmenopáusica.

Palabras clave: *microindentación de impacto, índice de Resistencia Mineral Ósea (BMSi).*

Bone tissue mechanical strength is independent of age in healthy individuals

Summary

Objective: Impact microindentation (IMI) is a technique that allows the measurement of mechanical bone tissue resistance *in vivo*. IMI has proven to provide useful information on the evaluation of skeletal diseases, but the effect of age on the bone property that is measured by this technique is unknown. This study aims to analyze the relationship between age and MIH.

Material and methods: Bone Material Strength index (BMSi), IMI's output variable, was measured in 69 healthy women (median age: 49 years, range: 30-81 years) and 19 healthy men (median age: 34 years, range: 24-98 years). The correlation between BMSi and age was analyzed by linear regression. The association between BMSi and age was evaluated by ANOVA after adjusting for body mass index. The potential effect of postmenopausal estrogenic depletion on BMSi was studied by comparing the younger vs the older subset of women through a t-student test.

Results: Linear regression analysis showed that BMSi was not correlated with age in either men ($R^2=0.0016$, $p=0.74$) or women ($R^2=0.076$, $p=0.25$). Similarly, the BMI-adjusted ANOVA model revealed a lack of association of BMSi with age in men ($p=0.78$) and women ($p=0.73$). Finally, there were not significant differences on BMSi detected between the younger and the older subset of women ($p=0.8$).

Conclusions: Bone tissue mechanical resistance in healthy individuals is independent of age and postmenopausal estrogenic depletion.

Key words: *impact microindentation, Bone Material Strength index (BMSi).*

Introducción

Las fracturas osteoporóticas representan un grave problema de salud pública dada su elevada prevalencia y enorme impacto en términos de morbilidad, mortalidad y coste económico¹. Consecuentemente, existe un gran interés en entender la fisiopatología subyacente de la fragilidad ósea, la cual, desde un punto de vista mecánico, está determinada por la resistencia ósea. La resistencia ósea, a su vez, proviene de la integración de tres componentes: la cantidad mineral ósea, la arquitectura ósea, y las propiedades materiales del hueso.

La cantidad mineral del hueso es medida habitualmente mediante la densitometría ósea (DXA), la cual representa el método más utilizado y estandarizado para la evaluación de la masa ósea y del riesgo de fractura². La arquitectura ósea, tanto a nivel micro- como macroscópico, se examina mediante diferentes técnicas de imagen, como la tomografía cuantitativa periférica de alta resolución, la resonancia magnética ósea, y la más accesible *Trabecular Bone Score*³, entre otras. Sin embargo, las propiedades materiales del hueso son difícilmente evaluables debido a su elevada complejidad que se refleja en sus múltiples constituyentes incluyendo las proteínas no colágenas, la cristalinidad, la hidratación del tejido óseo, y las características de la mineralización y del colágeno, entre otros^{4,5}. Dado que, además, se han requerido muestras de tejido óseo para su análisis, el estudio de estas propiedades ha estado tradicionalmente restringido a unos pocos centros especializados en Biomecánica.

La microindentación se ha introducido como una técnica capaz de medir las propiedades materiales del hueso de forma fácil y no invasiva. No obstante, cabe resaltar que aún no se ha determinado la propiedad específicamente medida por lo que por el momento se considera que evalúa la

resistencia mecánica del hueso de manera global. La técnica se basa en la medición de la distancia de penetración de una aguja en la cortical del hueso como reflejo de su resistencia mecánica⁶. El procedimiento se realiza habitualmente en la cara antero-medial de la tibia de una forma práctica, segura e indolora⁷. Actualmente existen 2 modalidades de microindentación clínica: la microindentación cíclica, realizada con el instrumento BioDent® (Active Life Scientific Inc., Santa Bárbara, EE.UU.) y la microindentación de impacto (MII), realizada con el instrumento OsteoProbe® (Active Life Scientific Inc., Santa Bárbara, EE.UU.). Diversos estudios clínicos han demostrado la capacidad de proporcionar información relevante sobre la resistencia ósea y el riesgo de fractura con ambas modalidades^{6,8}. No obstante, dada su mayor manejabilidad, el OsteoProbe® ha reemplazado al BioDent® en los estudios clínicos. A pesar de su creciente uso, todavía quedan muchas cuestiones básicas no resueltas alrededor de la implementación de la MII, incluyendo el efecto de la edad sobre las propiedades materiales óseas. Por este motivo, en el presente estudio se examinó la influencia de la edad sobre la resistencia mecánica tisular ósea en una cohorte de mujeres y varones sanos.

Materiales y métodos

Participantes

Se reclutaron voluntarios sanos mayores de 18 años de forma consecutiva procedentes de las consultas externas de Medicina Interna sin patologías relacionadas con el metabolismo óseo.

Se excluyeron del estudio aquellos individuos con los siguientes criterios:

- Antecedentes de fracturas por fragilidad o fracturas traumáticas en la tibia.

- Antecedentes de enfermedades óseas primarias (incluyendo la osteoporosis), enfermedades óseas secundarias, deformidades en las extremidades inferiores de origen congénito o adquirido, y metástasis ósea.

- Historial de diabetes *mellitus*, enfermedad renal crónica e insuficiencia hepática grave.

- Tratamiento previo o concurrente con glucocorticoides, inhibidores de la aromatasa, terapia de privación androgénica, quimioterapia y agentes antirresortivos u osteoformadores (bifosfonatos, teriparatida, denosumab, ranelato de estroncio y moduladores selectivos del receptor de estrógeno).

Se midió la altura y el peso de los participantes para calcular el índice de masa corporal (IMC, kg/m²).

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Parque de Salud Mar y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes.

Microindentación de impacto

La microindentación de impacto (MII) se evaluó mediante el OsteoProbe®, un instrumento de mano que consiste en un dispositivo con un mecanismo de impacto, una sonda desechable con una punta cónica (radio de nitidez de la punta: <10 µm) y un transductor de desplazamiento. Los aspectos del procedimiento han sido descritos de forma detallada con anterioridad⁷. Resumiendo, previamente a la microindentación se aplica un anestésico local (mepivacaína al 2%) en la parte anteromedial de la tibia no dominante. Posteriormente, la sonda se inserta perpendicularmente a la cortical ósea en la región anestesiada hasta alcanzar la superficie del hueso. El dispositivo se comprime lentamente hasta que alcanza una resistencia de precarga de 10 Newtons (N), después de lo cual se activa automáticamente una carga de impacto de 30 N. El transductor de desplazamiento mide la profundidad de la indentación. El operador tiene la capacidad de eliminar las mediciones que considera erróneas.

Después de 8 indentaciones válidas separadas por aproximadamente 2 mm, se realizan 5 indentaciones adicionales con la misma sonda en un bloque de polimetilmetacrilato (PMMA) para la calibración. El valor obtenido en la MII es el índice

de Resistencia Mineral Ósea (BMSi, del inglés *Bone Material Strength index*), que se define como 100 veces la relación entre la media armónica de la distancia de las 8 indentaciones óseas y la de las 5 indentaciones en el bloque de PMMA. Nueve operadores diferentes con un nivel de experiencia en la técnica similar realizaron las mediciones en el presente estudio.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis separados para mujeres y varones. Los valores descriptivos se muestran utilizando media y desviación estándar, así como mediana y rango total, según corresponda. Se representó la correlación entre edad y BMSi mediante una regresión lineal, y se evaluó su asociación con una ANOVA ajustando por IMC. Debido a la falta de información clínica sobre el estado menstrual de las participantes, se analizó el potencial efecto de la privación de estrógenos en la resistencia tisular mecánica del tejido óseo comparando la BMSi de mujeres entre 20-39 años (muy probablemente premenopáusicas) con mujeres ≥60 años (muy probablemente postmenopáusicas) mediante la prueba t de Student.

Las figuras del estudio se obtuvieron a través del programa Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, California, EE.UU.). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 23 (IBM Corp®, Armonk, Nueva York, EE.UU.), aceptando como significativos los resultados con p<0,05.

Resultados

Para el estudio se reclutaron 69 mujeres y 19 varones de origen caucásico. Las características de los participantes y las mediciones de BMSi se exponen en la tabla 1. El coeficiente de variación interoperador fue menor del 5%.

Los análisis de regresión lineal mostraron que la BMSi no se correlaciona con la edad ni en mujeres (R²=0,076, p=0,25) ni en varones (R²=0,0016, p=0,74) (Figura 1). Asimismo, no se detectaron asociaciones significativas entre la BMSi y la edad en el análisis de ANOVA ajustado por IMC ni en mujeres (p=0,73) ni en varones (p=0,78). Finalmente, no se observaron diferencias significativas en el BMSi entre el subgrupo de mujeres de 20-39 años y el de más de 60 años (p=0,8) (Figura 2).

Tabla 1. Características de los participantes

	Mujeres (n=69)	Hombres (n=19)
Edad, años (mediana, rango)	49, 30-81	34, 24-98
IMC, kg/m ² (media ± DE)	24,3±4,5	24,6±3,1
BMSi (media ± DE)	82±7,4	88±7,6

IMC: índice de masa corporal; DE: desviación estándar; BMSi: índice de Resistencia Mineral Ósea.

Figura 1. Análisis de regresión lineal realizado para evaluar la correlación entre el índice de Resistencia Mineral Ósea (BMSi) y edad en mujeres y hombres sanos

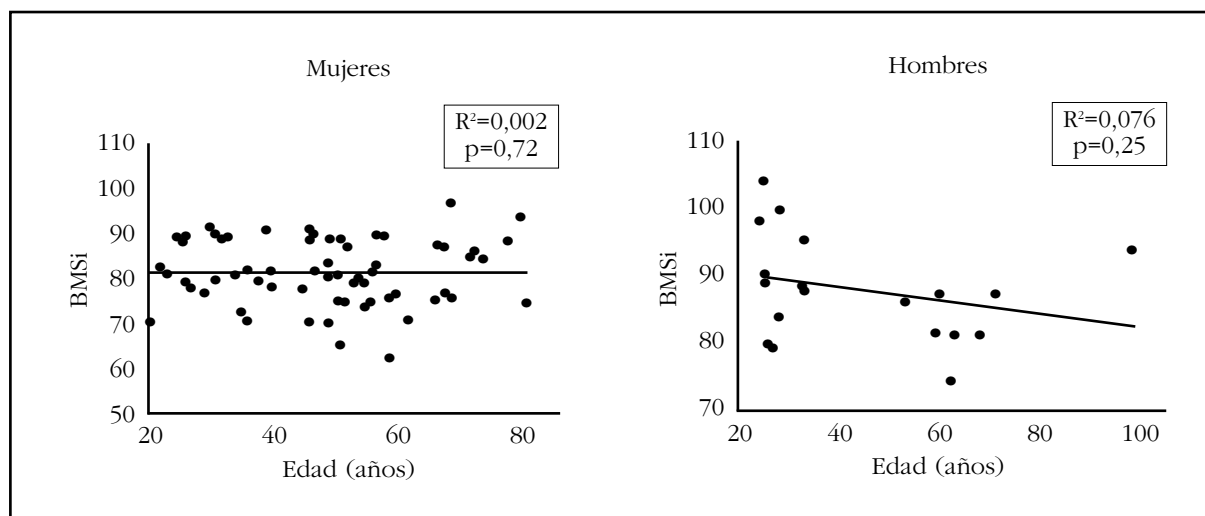
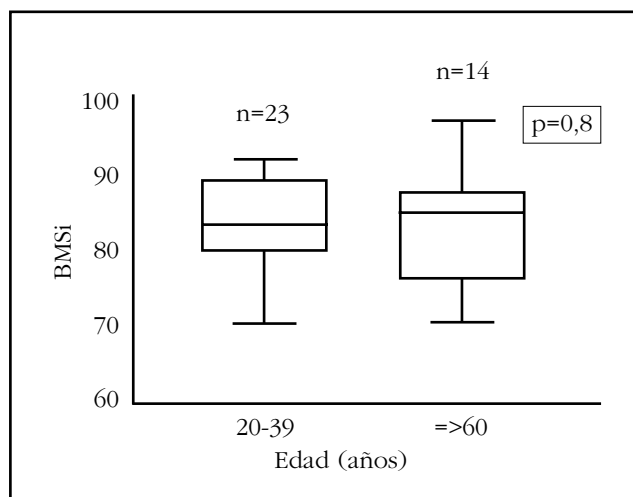


Figura 2. T-test realizado para comparar el índice de Resistencia Mineral Ósea (BMSi) entre mujeres de 20-39 años y mujeres de >60 años como medida indirecta del estatus pre y postmenopáusico, respectivamente



Discusión

En el presente estudio se ha evaluado la influencia de la edad en la resistencia mecánica del tejido óseo medida mediante MII en una cohorte de mujeres y varones sanos. Los resultados indican que la resistencia del tejido óseo no está determinada por la edad ni en mujeres ni en varones, y que por lo tanto, no se ve afectada por el envejecimiento. Además, el hecho de no encontrar diferencias en la BMSi entre el subconjunto de mujeres más jóvenes frente al subconjunto de mujeres más mayores indica que la depleción de estrógenos que acompaña a la menopausia no ejerce un efecto significativo sobre la resistencia mecánica del tejido óseo.

La microindentación ósea se ha incorporado como una nueva herramienta prometedora para evaluar la resistencia mecánica ósea en individuos vivos⁶⁻⁸. Aunque todavía no está claro cuáles son

las propiedades físicas específicamente medidas, varios estudios clínicos han revelado que esta técnica tiene una buena capacidad discriminante entre pacientes con y sin fracturas por fragilidad^{9,11}, si bien es cierto que hay estudios en poblaciones geriátricas con fracturas osteoporóticas que muestran resultados discrepantes¹².

Las mediciones que resultan en un BMSi alterado parecen ser especialmente informativas en aquellas condiciones asociadas con un mayor riesgo de fractura que no se explican por valores anormales de DMO¹³⁻¹⁶.

Dado el creciente uso de la MII como una técnica complementaria para la evaluación de la salud ósea en la investigación clínica y su potencial función en el futuro en la práctica clínica, es imperativo aclarar cuáles son los efectos de los factores fisiológicos, como la edad, sobre la resistencia mecánica del tejido óseo.

Los resultados de nuestro estudio indican que la BMSi no se ve significativamente afectada por el envejecimiento o la depleción estrogénica. De acuerdo con nuestros hallazgos, Mirzaali MJ, *et al.* observaron mediante estudios micromecánicos en hueso de cadáver, que las propiedades de microindentación en ancianos eran constantes con la edad¹⁷. Por el contrario, es conocido que el envejecimiento y la depleción estrogénica ejercen un efecto negativo sobre la DMO y la arquitectura ósea^{18,19}. Esto refuerza la noción de que la técnica de la microindentación mide una característica muy concreta de la resistencia ósea o calidad ósea completamente diferente al resto de técnicas disponibles hasta ahora. Se especula que la microindentación provoca la separación de las proteínas pegamentosas (del inglés, *protein-based "glue"*) a las que se les atribuye la función de mantener unidas las fibrillas de colágeno mineralizadas, propiedad que constituiría la primera barrera de resistencia a la fractura²⁰.

En la actualidad, se postula que la resistencia tisular del tejido óseo está genéticamente determinada, pero, al mismo tiempo, estudios clínicos muestran que puede verse negativamente influenciada por factores no genéticos, como un control glucémico deficiente^{13,15,21}, un exceso de tejido adiposo local¹⁶, tratamiento con glucocorticoides²², exceso de hormona de crecimiento²³, enfermedad renal crónica^{24,25} e infección por VIH²⁶. Además, alteraciones en ciertas vías de señalización y en el almacenamiento intracelular de lípidos también parecen afectar la resistencia mecánica del tejido óseo como se ha observado en estudios sobre las enfermedades de Camuratti-Englemann²⁷ y Gaucher tipo 1²⁸, respectivamente.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. Primero, el número reducido de sujetos incluidos en el estudio limita la generalización de nuestros hallazgos. Otra limitación es que aún no se conocen completamente los factores que pueden afectar la resistencia mecánica del tejido óseo y, por lo tanto, dichos factores no se han introducido como covariables en el modelo estadístico para el ajuste del factor de confusión. Esto se ha intentado compensar mediante los estrictos criterios de exclusión utilizados en el momento del reclutamiento de los individuos y así controlar la posible heterogeneidad de la cohorte estudiada. Otra limitación reside en el hecho de que esta técnica se realiza exclusivamente en el hueso cortical de la tibia anteromedial, por lo que es discutible la generalización de los resultados de BMSi a otras localizaciones esqueléticas. No obstante, pensamos que los valores obtenidos mediante la microindentación en la tibia reflejan la resistencia mecánica del hueso a nivel global, ya que estudios clínicos han demostrado una correlación inversa entre los valores de BMSi y la incidencia de fracturas osteoporóticas en otras localizaciones esqueléticas como la cadera, e incluso en huesos con una mayor componente trabecular, como las vértebras^{10,11}. Finalmente, no se recogieron los datos sobre el estado menstrual, limitando así la evaluación de los efectos de la menopausia sobre la resistencia mecánica del tejido óseo. Este problema se contrarrestó categorizando el subgrupo de mujeres más jóvenes como premenopáusicas y el subconjunto de mujeres más mayores como postmenopáusicas.

En conclusión, la resistencia mecánica del tejido óseo no parece verse afectada por el envejecimiento y la depleción estrogénica relacionada con la menopausia. Se necesitan estudios adicionales para corroborar estos hallazgos a fin de facilitar la implementación de la MII en la investigación y en la práctica clínica.

Conflicto de intereses: Adolfo Diez-Pérez declara que posee acciones de Active Life Scientific, el fabricante de los dispositivos de microindentación. Los autores restantes declaran que no tienen ningún conflicto de interés.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por la beca de Investigación FEIOMM 2010, el Centro

de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES; CB16/10/00245), y los fondos FEDER.

Bibliografía

1. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* 2006;17(12):1726-33.
2. Leslie WD, Brennan-Olsen SL, Morin SN, Lix LM. Fracture prediction from repeat BMD measurements in clinical practice. *Osteoporos Int.* 2016;27(1):203-10.
3. Hans D, Goertzen AL, Krieg MA, Leslie WD. Bone microarchitecture assessed by TBS predicts osteoporotic fractures independent of bone density: the Manitoba study. *J Bone Miner Res.* 2011;26(11):2762-9.
4. Bala Y, Seeman E. Bone's material constituents and their contribution to bone strength in health, disease, and treatment. *Calcif Tissue Int.* 2015;97(3):308-26.
5. Fantner GE, Hassenkam T, Kindt JH, Weaver JC, Birkeedal H, Pechenik L, et al. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nat Mater.* 2005;4(8):612-6.
6. Allen MR, McNerny EM, Organ JM, Wallace JM. True gold or pyrite: a review of reference point indentation for assessing bone mechanical properties in vivo. *J Bone Miner Res.* 2015;30(9):1539-50.
7. Diez-Perez A, Bouxsein ML, Eriksen EF, Khosla S, Nyman JS, Papapoulos S, et al. Technical note: Recommendations for a standard procedure to assess cortical bone at the tissue-level in vivo using impact microindentation. *Bone Rep.* 2016;5:181-5.
8. Herrera S, Diez-Perez A. Clinical experience with microindentation in vivo in humans. *Bone.* 2017;95:175-82.
9. Malgo F, Hamdy NA, Papapoulos SE, Appelman-Dijkstra NM. Bone material strength as measured by microindentation in vivo is decreased in patients with fragility fractures independently of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(5):2039-45.
10. Malgo F, Hamdy NAT, Papapoulos SE, Appelman-Dijkstra NM. Bone material strength index as measured by impact microindentation is low in patients with fractures irrespective of fracture site. *Osteoporos Int.* 2017;28(8):2433-7.
11. Sosa DD, Eriksen EF. Reduced bone material strength is associated with increased risk and severity of osteoporotic fractures. An impact microindentation study. *Calcif Tissue Int.* 2017;101(1):34-42.
12. Rozental TD, Walley KC, Demissie S, Caksa S, Martinez-Betancourt A, Parker AM, et al. Bone material strength index as measured by impact microindentation in postmenopausal women with distal radius and hip fractures. *J Bone Miner Res.* 2018;33(4):621-6.
13. Farr JN, Drake MT, Amin S, Melton LJ, 3rd, McCready LK, Khosla S. In vivo assessment of bone quality in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Bone Miner Res.* 2014;29(4):787-95.
14. Guerri-Fernandez RC, Nogue X, Quesada Gomez JM, Torres Del Pliego E, Puig L, Garcia-Giralt N, et al. Microindentation for in vivo measurement of bone tissue material properties in atypical femoral fracture patients and controls. *J Bone Miner Res.* 2013;28(1):162-8.
15. Nilsson AG, Sundh D, Johansson L, Nilsson M, Mellstrom D, Rudang R, et al. Type 2 Diabetes mellitus is associated with better bone microarchitecture but lower bone material strength and poorer physical function in elderly women: a population-based study. *J Bone Miner Res.* 2017;32(5):1062-71.
16. Sundh D, Rudang R, Zoulakis M, Nilsson AG, Darelid A, Lorentzon M. A high amount of local adipose tissue is associated with high cortical porosity and low bone material strength in older women. *J Bone Miner Res.* 2016;31(4):749-57.
17. Mirzaali MJ, Schwiedrzik JJ, Thaiwichai S, Best JP, Michler J, Zysset PK, et al. Mechanical properties of

- cortical bone and their relationships with age, gender, composition and microindentation properties in the elderly. *Bone*. 2016;93:196-211.
18. <https://www.nof.org/patients/what-is-osteoporosis/>.
 19. Dufour R, Winzenrieth R, Heraud A, Hans D, Mehsen N. Generation and validation of a normative, age-specific reference curve for lumbar spine trabecular bone score (TBS) in French women. *Osteoporos Int*. 2013;24(11):2837-46.
 20. Hansma PK, Fantner GE, Kindt JH, Thurner PJ, Schitter G, Turner PJ, et al. Sacrificial bonds in the interfibrillar matrix of bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2005;5(4):313-5.
 21. Furst JR, Bandeira LC, Fan WW, Agarwal S, Nishiyama KK, McMahon DJ, et al. Advanced glycation endproducts and bone material strength in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(6):2502-10.
 22. Mellibovsky L, Prieto-Alhambra D, Mellibovsky F, Guerri-Fernandez R, Nogues X, Randall C, et al. Bone tissue properties measurement by reference point indentation in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2015;30(9):1651-6.
 23. Malgo F, Hamdy NA, Rabelink TJ, Kroon HM, Claessen KM, Pereira AM, et al. Bone material strength index as measured by impact microindentation is altered in patients with acromegaly. *Eur J Endocrinol*. 2017;176(3):339-47.
 24. Perez-Saez MJ, Herrera S, Prieto-Alhambra D, Nogues X, Vera M, Redondo-Pachon D, et al. Bone density, microarchitecture, and tissue quality long-term after kidney transplant. *Transplantation*. 2017;101(6):1290-4.
 25. Perez-Saez MJ, Herrera S, Prieto-Alhambra D, Vilaplana L, Nogues X, Vera M, et al. Bone density, microarchitecture, and material strength in chronic kidney disease patients at the time of kidney transplantation. *Osteoporos Int*. 2017;28(9):2723-7.
 26. Guerri-Fernandez R, Molina D, Villar-Garcia J, Prieto-Alhambra D, Mellibovsky L, Nogues X, et al. Brief Report: HIV infection is associated with worse bone material properties, independently of bone mineral density. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016;72(3):314-8.
 27. Herrera S, Soriano R, Nogues X, Guerri-Fernandez R, Grinberg D, Garcia-Giralt N, et al. Discrepancy between bone density and bone material strength index in three siblings with Camurati-Engelmann disease. *Osteoporos Int*. 2017;28(12):3489-93.
 28. Herrera S, Perez-Lopez J, Molto-Abad M, Guerri-Fernandez R, Cabezudo E, Novelli S, et al. Assessment of bone health in patients with type 1 Gaucher disease using impact microindentation. *J Bone Miner Res*. 2017;32(7):1575-81.

Ardura JA^{1,2}, Gutiérrez Rojas I¹, Álvarez Carrión L¹, Friedman PA³, Alonso V^{1,2}

1 Laboratorio de Fisiopatología Ósea - Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA) - Universidad San Pablo-CEU - Madrid (España)

2 Departamento de Ciencias Médicas Básicas - Facultad de Medicina - Universidad San Pablo-CEU - Madrid (España)

3 Departamento de Farmacología y Biología Química - Universidad de Pittsburgh - Pensilvania (Estados Unidos)

Factores secretados por células óseas inducen acumulación de calcio intracelular y AMP cíclico y activación de ERK 1/2 en células de cáncer de próstata; evaluación por técnicas de fluorescencia en células vivas

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2018000400005>

Correspondencia: Verónica Alonso Rodríguez - Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA) - Facultad de Medicina - Universidad San Pablo-CEU - 28925 Alcorcón - Madrid (España)

Correo electrónico: veronica.alonsorodriguez@ceu.es

Fecha de recepción: 05/07/2018

Fecha de aceptación: 18/11/2018

Trabajo becado para asistir al 39º Congreso de la ASBMR (Denver, 2017).

Resumen

Objetivos: Analizar en células tumorales de próstata los efectos causados por el secretoma de células óseas sobre la proliferación y sobre vías de señalización intracelular relacionadas con la progresión del cáncer de próstata.

Materiales y métodos: Se caracterizaron los efectos de factores secretados presentes en medios condicionados de pre-osteoblastos MC3T3-E1 y osteocitos MLO-Y4 sobre la proliferación de células de adenocarcinoma de próstata metastásicas PC-3 mediante tinción por azul de tripano. Se observó por técnicas de fluorescencia en células vivas los efectos de los medios condicionados por células MC3T3-E1 y MLO-Y4 en moléculas de señalización intracelular implicadas en la progresión tumoral de células de adenocarcinoma de próstata PC-3. Se estudió la acumulación de calcio intracelular utilizando el indicador de calcio fluorescente Fluo-4AM y la generación de AMP cíclico, y la activación de la quinasa ERK 1/2 por Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET) usando los biosensores EPAC y ERK-NES, respectivamente.

Resultados: La estimulación de células PC-3 con medios condicionados de pre-osteoblastos MC3T3-E1 y osteocitos MLO-Y4 indujo aumento en la proliferación de las células de adenocarcinoma PC-3. Los medios condicionados por células óseas causaron también aumento transitorio en la acumulación de calcio intracelular y de la generación de AMP cíclico e incrementaron la activación de la quinasa ERK 1/2.

Conclusiones: Las células óseas secretan factores activadores de la proliferación y de vías de señalización que favorecen la progresión tumoral de células de cáncer de próstata, sugiriendo que la comunicación cruzada entre estos tipos celulares puede favorecer el desarrollo de nichos metastásicos de cáncer de próstata en el hueso.

Palabras clave: *cáncer de próstata, factores secretados óseos, señalización intracelular, fluorescencia en células vivas, calcio, AMP cíclico, ERK 1/2.*

Factors secreted by bone cells induce intracellular calcium accumulation and cyclic AMP and activation of ERK 1/2 in prostate cancer cells; evaluation by fluorescence techniques in living cells

Summary

Objectives: To analyze in prostate tumor cells the effects caused by the secretome of bone cells on proliferation and on intracellular signaling pathways related to the progression of prostate cancer.

Materials and methods: The effects of secreted factors present in conditioned media of pre-osteoblasts MC3T3-E1 and osteocytes MLO-Y4 on the proliferation of metastatic prostate adenocarcinoma cells PC-3 were characterized using trypan blue staining. The effects of media conditioned by MC3T3-E1 and MLO-Y4 cells on intracellular signaling molecules involved in the tumor progression of prostate adenocarcinoma cells PC-3 were observed by fluorescence techniques in living cells. The accumulation of intracellular calcium was studied using the fluorescent calcium indicator Fluo-4AM and the generation of cyclic AMP, and ERK 1/2 activation by Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) using the EPAC and ERK-NES biosensors, respectively.

Results: The stimulation of PC-3 cells with conditioned media of pre-osteoblasts MC3T3-E1 and osteocytes MLO-Y4 induced an increase in PC-3 adenocarcinoma cell proliferation. Media conditioned by bone cells also caused a transient increase in intracellular calcium accumulation and generation of cyclic AMP and increased ERK 1/2 activation.

Conclusions: Bone cells secrete proliferation-activating factors and signaling pathways that favor the tumor progression of prostate cancer cells, suggesting that cross-communication between these cell types may favor the development of metastatic niches of prostate cancer in the bone.

Key words: prostate cancer, secreted bone factors, intracellular signaling, fluorescence in living cells, calcium, cyclic AMP, ERK 1/2.

Introducción

La metástasis a hueso es una complicación frecuente en fases avanzadas de pacientes con cáncer de próstata, uno de los cánceres con mayor mortalidad y morbilidad en países desarrollados¹. Evitar las distintas etapas necesarias para que la célula tumoral abandone el tumor primario, migre y se establezca en el microambiente óseo es una de las principales estrategias para prevenir la diseminación de las metástasis óseas². La invasión de células de tumor primario a nichos esqueléticos se asocia con la activación de células óseas que liberan factores de crecimiento y citoquinas, que a su vez promueven el crecimiento del tumor en las metástasis. Como resultado se genera el denominado “ciclo vicioso” de las metástasis óseas, que varía la fisiología del hueso y altera el remodelado óseo^{3,4}. En el caso de las metástasis óseas causadas por cáncer de próstata se originan lesiones osteolíticas y osteoblásticas como resultado de la activación de osteoclastos y de osteoblastos respectivamente⁵. En procesos de metástasis ósea, se ha observado que las células tumorales son capaces de secretar factores como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 11 (IL-11), metaloproteasa de matriz 1 (MMP1), Jagged1 y proteína relacionada con la parathormona (PTHrP), que activan directa o indirectamente osteoclastos, dando lugar a metástasis osteoclásticas⁶. La degradación de matriz por osteoclastos libera factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) que promueven la supervivencia de células tumorales⁷. En

contraste, la secreción por parte de células tumorales de otros factores como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) pueden estimular la diferenciación de osteoblastos resultando en lesiones osteoblásticas⁸.

Por otro lado, algunos estudios han descrito la importancia de segundos mensajeros y vías de señalización intracelular en la modulación de la proliferación, malignidad y capacidad metastásica de células tumorales. De este modo moléculas como el calcio, el adenosín monofosfato cíclico (AMP cíclico) o las quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2), han sido propuestos como mediadores y posibles dianas terapéuticas en la progresión tumoral y la metástasis ósea⁹⁻¹¹.

A pesar de la existencia de diversas observaciones analizando los factores secretados por células tumorales que afectan a células óseas, existe escasa información sobre los factores secretados por osteoblastos y osteocitos que actúan sobre células tumorogénicas de próstata. En concreto, es poco conocido el efecto de factores secretados por células óseas sobre vías de señalización y segundos mensajeros relevantes en la mediación de procesos de progresión tumoral y metástasis a hueso en células tumorales de próstata.

En este estudio hemos usado técnicas de fluorescencia en células vivas para analizar si factores secretados por células óseas pueden modificar vías de señalización y segundos mensajeros en células de adenocarcinoma de próstata. Nuestras observaciones muestran que factores secretados por osteo-

blastos y osteocitos pueden inducir proliferación de células tumorales de próstata asociada a acumulación de AMP cíclico y calcio intracelulares y a la activación de la quinasa ERK. Estos resultados sugieren el papel clave de los factores óseos en mecanismos intracelulares relevantes para la progresión tumoral y la metástasis ósea.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Las células humanas de carcinoma prostático derivadas de metástasis óseas (PC-3, ATCC: CRL-1435) se cultivaron en RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). La línea celular preosteoblástica murina MC3T3-E1 (ATCC: CRL-2593) y osteocítica murina MLO-Y4 (generosamente donada por Lynda Bonewald) se cultivaron en DMEM con 10% de SFB o α -MEM con 2,5% de suero fetal de carnero (SCF) y 2,5% SFB, respectivamente. Todas las células fueron cultivadas en medios que contenían penicilina (100 unidades/mL) y estreptomina (100 μ g/mL) en un incubador humidificado a 37°C y 5% CO₂ atmosférico. Los medios condicionados fueron obtenidos de las células PC-3, MLO-Y4 o MC3T3-E1 cultivadas en α -MEM en ausencia de suero durante 24 h.

Transfecciones

Para transfecciones transitorias, las células PC-3 se cultivaron en cubreobjetos de cristal de 25 mm de diámetro durante 12 h previa a la transfección con FuGENE 6 (Roche Applied Science), que se realizó en medio de cultivo completo. Tras 24 h los cubreobjetos fueron transferidos en una cámara Attofluor (Invitrogen, Carlsbad, CA) con solución HEPES/albumina de suero bovino (ASB) (pH=7,4) (solución HEPES al 0,1% (p/v) ASB) para los experimentos de fluorescencia a tiempo real.

Ensayo de proliferación celular

El número de células viables PC-3 estimuladas con medios condicionados de células MC3T3-E1, MLO-Y4 o de las propias PC-3 fue evaluada por el ensayo de exclusión por azul de tripano como previamente ha sido descrito¹².

Medida del calcio intracelular

La acumulación de calcio intracelular fue cuantificada con el sensor sensible a calcio Fluo-4/AM (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo del fabricante como ha sido descrito previamente¹³. Brevemente, las células PC-3 fueron cultivadas en placas de cultivo MatTek con 2 μ M Fluo-4/AM en la solución salina equilibrada Hanks' (Invitrogen) a 22°C durante 45 min. Las células fueron lavadas tres veces en la solución Hanks' e incubada a 22°C durante 30 min. Las cuantificaciones de calcio intracelular fueron realizadas con el microscopio de fluorescencia invertido Nikon A1s. Los niveles de fluorescencia fueron medidos a intervalos de 1 s hasta 20 min. Al menos 30-40 células se evaluaron bajo cada condición. Se utilizaron los reactivos ionomina (aumenta la entrada de iones de calcio en las células) 10 μ M y EGTA (quelante de calcio) 10 mM

para obtener el máximo y el mínimo de estimulación en cada célula analizada.

Transferencia de Energía por Resonancia Fluorescente (FRET): evaluación de AMP cíclico intracelular y fosforilación de ERK

Las células PC-3 fueron transfectadas transitoriamente con el biosensor de AMP cíclico EPAC¹⁴ o con el biosensor de fosforilación de ERK, ERK-NES¹⁵. La generación de AMP cíclico y la activación por fosforilación de ERK se evaluaron por Transferencia de Energía por Resonancia Fluorescente (FRET) como se describió previamente¹⁶. Las células se cultivaron en placas de cultivo Ibidi de 35 mm de diámetro y mantenidas en solución tampón FRET (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 0,1% albúmina de suero bovino, pH 7,4) donde se transfectaron transitoriamente con constructos constituidos por las proteínas de fusión: proteína fluorescente cian (CFP)-EPAC-proteína fluorescente amarillo (YFP) o por CFP-ERK-NES-YFP y que es activada por la unión directa de AMP cíclico o por fosforilación, respectivamente, experimentando cambios conformacionales que dan como resultado variaciones en las respuestas de FRET. Las cuantificaciones fueron realizadas en un microscopio Leica equipado con objetivo 40x de aceite de inmersión realizándose registros secuenciales de los canales de fluorescencia CFP e YFP. Las intensidades de la emisión de fluorescencia fueron determinadas a 535/15 nm (YFP) y 480/20 nm (CFP) con un paso largo dicróico (DCLP) de 505 nm. La señal de FRET se monitorizó como el índice de emisión de YFP (FYFP) y CFP (FCFP). Los resultados se muestran como la media normalizada (nFRET) \pm error estándar.

Análisis estadísticos

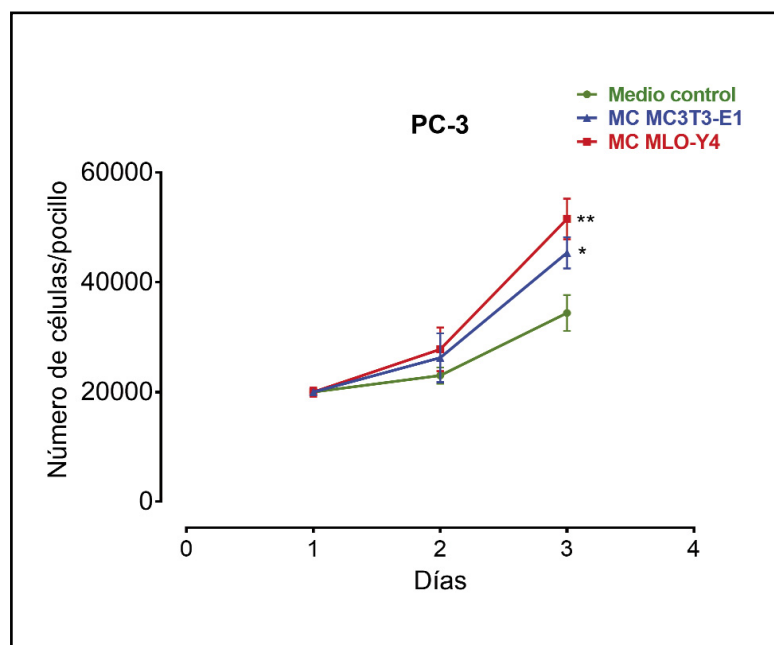
Los datos fueron expresados como media \pm error estándar. Las diferencias entre las condiciones experimentales y los controles fueron realizadas utilizando el test estadístico U Mann Whitney, en el que valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

Resultados

Factores solubles de MC3T3-E1 y MLOY-4 inducen incremento de proliferación en las células de adenocarcinoma prostático humanas PC-3

Estudios previos sugieren que el entorno óseo favorece la estimulación de células de cáncer de próstata promoviendo el establecimiento de metástasis esqueléticas¹⁷. Para evaluar los efectos de factores secretados por células óseas sobre células de carcinoma de próstata, primero se analizaron las acciones de medios condicionados de osteoblastos MC3T3-E1 y osteocitos MLO-Y4 sobre la proliferación de células de cáncer de próstata PC-3. Se observó que tanto los medios condicionados de osteoblastos MC3T3-E1 como los de MLO-Y4 indujeron un aumento en la proliferación de células PC-3 tras 3 días de estimulación en comparación con medios condicionados control (de las propias células PC-3) (Figura 1).

Figura 1. Factores secretados por osteoblastos MC3T3-E1 y osteocitos MLO-Y4 aumentan la proliferación de células de carcinoma de próstata PC-3. Las células PC-3 se incubaron durante 1-3 días con medios condicionados (MC) obtenidos de MC3T3-E1 o MLO-Y4 y se evaluó el número de células mediante ensayo de azul de tripano. Los datos mostrados son medias \pm error estándar de 3 experimentos independientes * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. Medio condicionado (MC) Control



Factores solubles óseos osteoblásticos y osteocíticos inducen la formación de AMP cíclico y liberación de calcio intracelular en las células de adenocarcinoma prostático humanas PC-3

Seguidamente se estudiaron los efectos de los medios condicionados de células óseas en la activación de segundos mensajeros y vías de señalización relacionadas con la progresión tumoral, metástasis y la activación de respuestas osteogénicas^{9-11,18} mediante técnicas de fluorescencia en células vivas. Los medios condicionados de osteoblastos MC3T3-E1 y de osteocitos MLO-Y4 causaron un aumento rápido y transitorio en la concentración de calcio intracelular en las células de cáncer de próstata PC-3 comparado con la estimulación con medio condicionado por las propias células PC-3 (Figura 2A-C). De manera similar, la generación de AMP cíclico detectada mediante FRET fue estimulada por medios condicionados de osteoblastos y de osteocitos (Figura 3 A-C). Los niveles de AMC cíclico no variaron al estimular las células PC-3 con medios condicionados de PC-3 (datos no mostrados).

Activación de la vía de señalización ERK 1/2 en las células de adenocarcinoma prostático humanas PC-3 tras la estimulación de factores solubles óseos

La fosforilación de la quinasa ERK 1/2, una proteína directamente implicada en la proliferación de las células tumorales de próstata¹⁹, también fue inducida por medios condicionados de osteoblastos MC3T3-E1 y osteocitos MLO-Y4 (Figura 4A y B). El medio condicionado de células PC-3 por el

contrario, no causó cambios en la fosforilación de ERK 1/2 de las células PC-3 (Figura 4B).

Estos resultados en su conjunto muestran que los factores secretados por parte de células óseas modulan moléculas de señalización claves en procesos celulares como la proliferación de células tumorales de próstata.

Discusión

Nuestros resultados muestran que las células de adenocarcinoma prostáticas metastásicas aumentan su proliferación con factores secretados tanto por células osteoblásticas como osteocíticas. En el caso de las metástasis óseas, se ha hipotetizado que las células tumorales se establecen en zonas específicas de hueso como en el nicho endosteal, el nicho de células madre hematopoyéticas y el nicho vascular²⁰. Estos nichos son microambientes complejos en los que se secretan factores que promueven las funciones fisiológicas de las células que los componen. Se ha demostrado que al aumentar el número de estos nichos

experimentalmente también se incrementa el número de células tumorales diseminadas de tumores primarios²¹. Estas observaciones sugieren que los mismos factores que mantienen el correcto funcionamiento de las células de los nichos óseos son capaces a su vez de promover el establecimiento y crecimiento de células tumorales en las metástasis óseas. Desde este punto de vista, los osteoblastos y osteocitos localizados cerca de la superficie formarían parte del nicho endosteal y pueden generar factores promotores del crecimiento de células tumorales de próstata en este nicho.

Existen varios mecanismos que regulan el ciclo mitótico de células metastásicas en el hueso, incluyendo procesos reguladores del sistema inmune, de la angiogénesis, de la matriz extracelular, diversos factores y hormonas y procesos intracelulares²². Entre estos mecanismos se observó que el balance en la activación entre 2 quinasas proteicas activadas por mitógenos (MAP quinasas), p38 y ERK 1/2 afecta de manera clave a la mitosis de células tumorales metastásicas²³. Cuando ERK 1/2 se encuentra activado en comparación con p38, la proliferación celular se favorece, y por el contrario la activación de p38 frente a ERK 1/2 induce un estado quiescente celular²³. Nosotros hemos observado que los pre-osteoblastos y osteocitos pueden enviar factores solubles que activan a la quinasa ERK 1/2 en células PC-3 fomentando de este modo la proliferación de células tumorales.

Además, hemos observado que factores secretados al medio condicionado por pre-osteoblastos

y osteocitos también causaron aumento transitorio en la concentración de calcio intracelular y en la generación de AMP cíclico. Ambos segundos mensajeros pueden regular procesos de proliferación y metástasis tumoral y han sido propuestos como posibles dianas terapéuticas en varios cánceres^{9,10,24}. El AMP cíclico puede tener efectos positivos o negativos en el crecimiento y supervivencia de células tumorales dependiendo del tipo celular¹⁰. En tumores de origen epitelial como es el caso del cáncer de próstata, el AMP cíclico parece jugar un papel promotor de la oncogénesis mediante la activación de la proteína quinasa A y otras proteínas activadas a continuación (por ejemplo EPAC y CREB)^{25,26}.

Por otro lado, se ha demostrado que el aumento de la concentración de calcio intracelular de origen extracelular es un factor inductor de la proliferación de líneas celulares prostáticas de metástasis ósea (PC-3 y C4-2B), pero no afecta a la proliferación de líneas celulares prostáticas no metastásicas como las células LNCaP⁹. El aumento de la concentración de calcio de origen extracelular causa en PC-3 un aumento en la expresión de ciclina D1 (una proteína reguladora del ciclo celular necesaria en la proliferación), en la activación de Akt (proteína requerida para la proliferación y progresión tumoral)^{27,28}, y aumenta la capacidad de unión de células tumorales a sustrato⁹. Además, alteraciones en la expresión génica de diversos canales iónicos de calcio, como los TRP y Orai, se han asociado con aumentos de la entrada de calcio en las células tumorales de próstata que facilitan la proliferación y resistencia a apoptosis de dichas células^{29,30}.

Estos estudios en su conjunto muestran la función relevante de la activación de la quinasa ERK 1/2, del calcio y del AMP cíclico en la progresión del cáncer de próstata. Aunque la modulación de estas vías de señalización por parte de factores secretados por células óseas no ha sido descrita previamente, algunos estudios han demostrado la capacidad de las

Figura 2. Factores secretados por MC3T3-E1 y MLO-Y4 aumentan la señalización de calcio intracelular de PC-3. Se analizaron los efectos de factores secretados de medios condicionados obtenidos durante 24 horas de MC3T3-E1 (A), MLO-Y4 (B) o de PC-3 (C) en la liberación de calcio intracelular de PC-3. La evaluación de los niveles de calcio intracelular se realizó mediante fluorescencia confocal en células vivas con el indicador Fluo-4AM según se ha descrito en el texto. Las flechas indican el momento de estimulación con medios condicionados. Los datos mostrados son medias \pm error estándar de 3 experimentos independientes

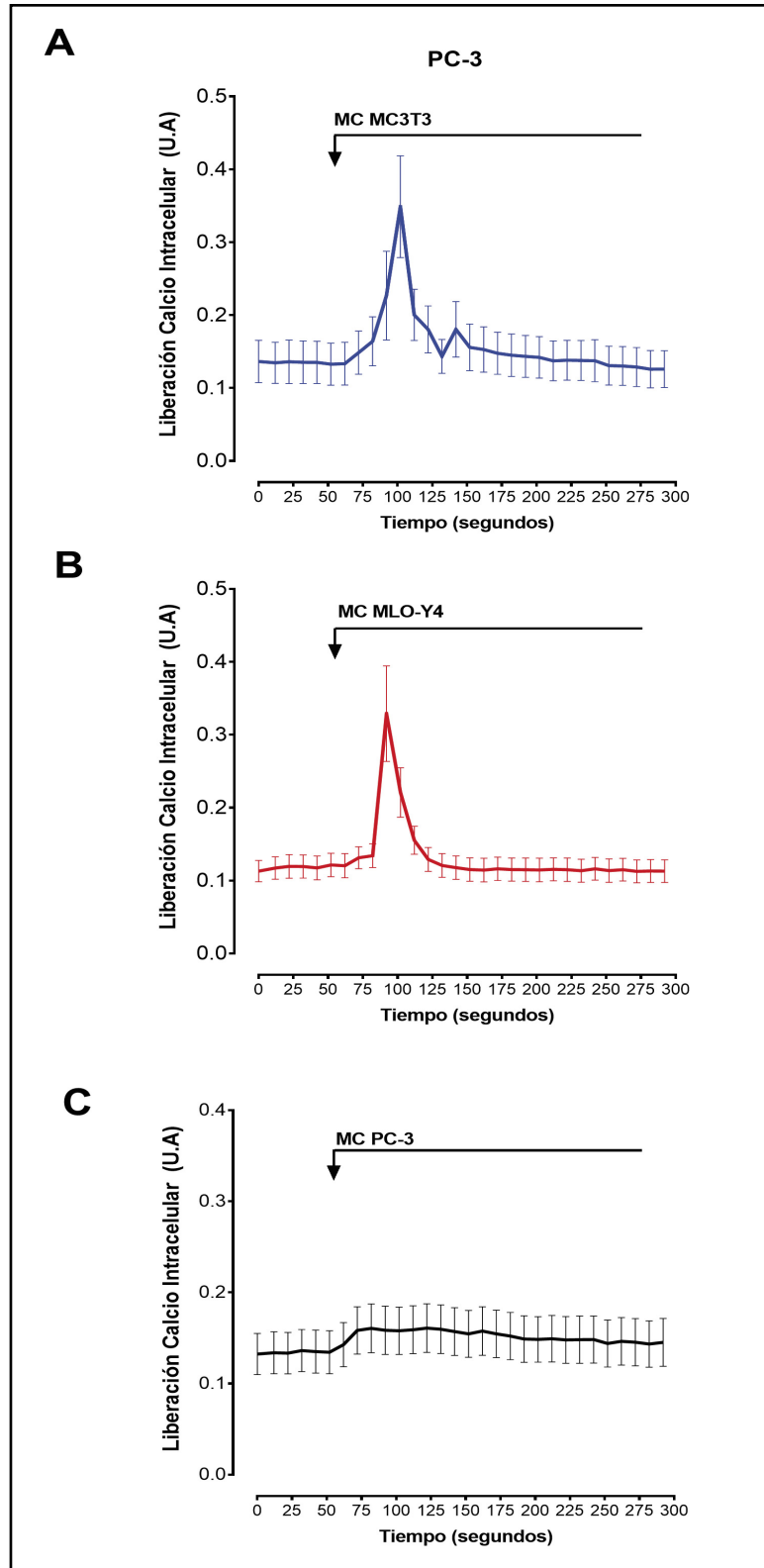
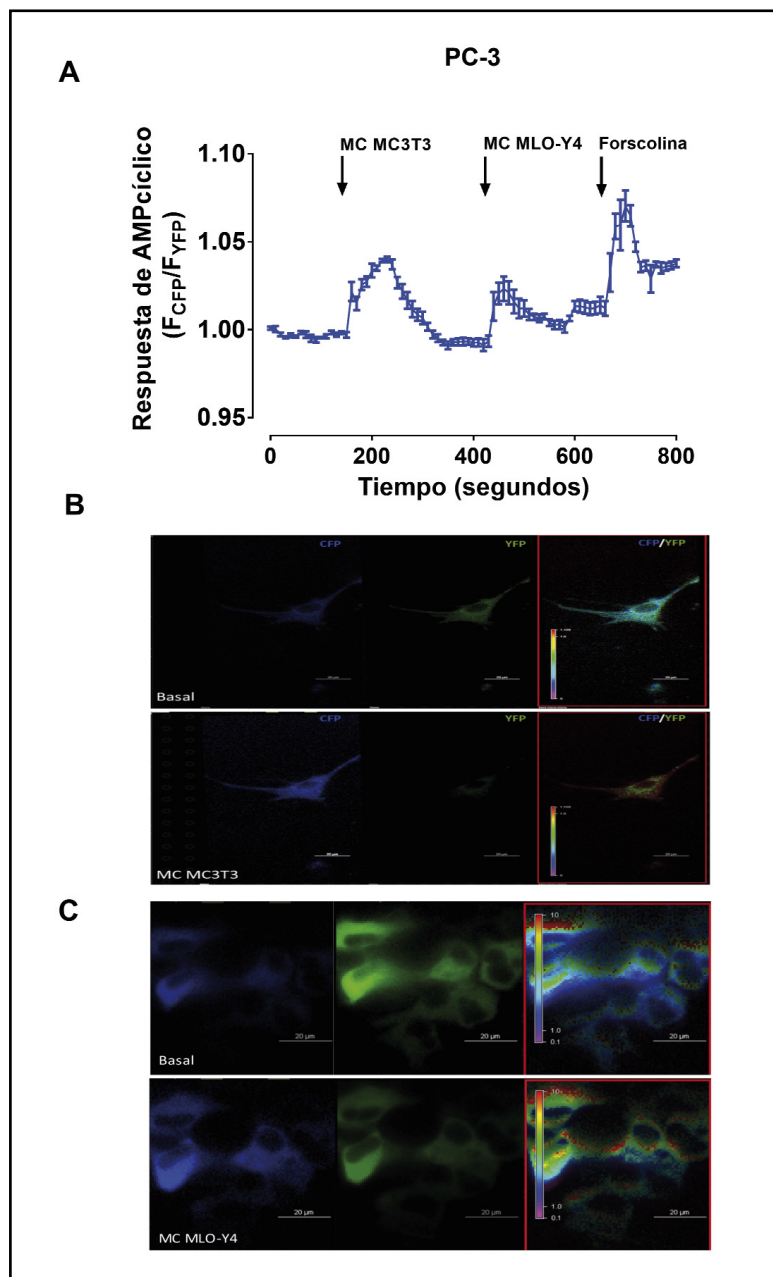


Figura 3. Factores secretados por MC3T3-E1 y MLO-Y4 aumentan la señalización de AMP cíclico de PC-3. (A) Se analizaron los efectos de factores secretados de medios condicionados obtenidos durante 24 horas de MC3T3-E1 y MLO-Y4 en la activación de AMP cíclico de PC-3. La evaluación de AMP cíclico se realizó mediante fluorescencia confocal en células vivas con el sensor CFPEPACYFP según se ha descrito en el texto. Las flechas indican el momento de la estimulación con medios condicionados. Se utilizó forskolina para obtener el máximo de estimulación de AMP cíclico. Los datos mostrados son medias \pm error estándar de 3 experimentos independientes. (B y C) Imágenes representativas de los cambios en fluorescencia de las proteínas fluorescentes CFP e YFP del sensor de AMP cíclico EPAC en células PC-3 tras la estimulación con medio condicionado de células MC3T3-E1 o MLO-Y4



células residentes del hueso para modular la actividad de las células tumorales en los nichos metastásicos. Se ha observado que los osteocitos estimulados mecánicamente por incremento de la presión ocasionada por tumores metastásicos inducen crecimiento e invasividad de tumores de próstata mediante la secreción de la quimiocina (C-C) ligando 5

(CCL5)³¹. Curiosamente, la estimulación de células de distintos tipos de cáncer por CCL5 es capaz de aumentar la capacidad invasiva y migratoria de células tumorales mediante mecanismos dependientes de la movilización intracelular de calcio³² o de activación de la quinasa ERK^{33,34}. Estas observaciones sugieren que CCL5 u otros factores similares del secretoma de células óseas podrían ser los responsables de los cambios en vías de señalización de células tumorales que hemos observado en el presente estudio. Por otra parte, publicaciones previas también han demostrado el papel clave de las células óseas para promover la activación de células tumorales y favorecer los procesos metastásicos basados en el contacto directo célula ósea-célula tumoral mediante la activación de la vía de señalización Notch-Jagged³⁵. Es posible que factores secretados por células óseas puedan mediar procesos de reclutamiento y crecimiento iniciales del tumor metastásico, en los que no haya contacto directo entre el tumor y las células óseas, mientras que vías de señalización como Notch-Jagged puede que regulen las interacciones del tumor en fases metastásicas más avanzadas (en las que el tumor sí entre en contacto directo con las células del hueso).

En base a estas investigaciones y a nuestros resultados proponemos que las células osteobásticas y osteocíticas regulan la proliferación y la activación de mediadores moleculares de la progresión tumoral en células metastásicas de cáncer de próstata mediante la secreción de factores solubles. Sugerimos, además, que la modulación de los mediadores intracelulares calcio, AMP cíclico y ERK 1/2 por factores secretados por células óseas pueden ser clave en el establecimiento de metastasis óseas por parte de células tumorales de próstata.

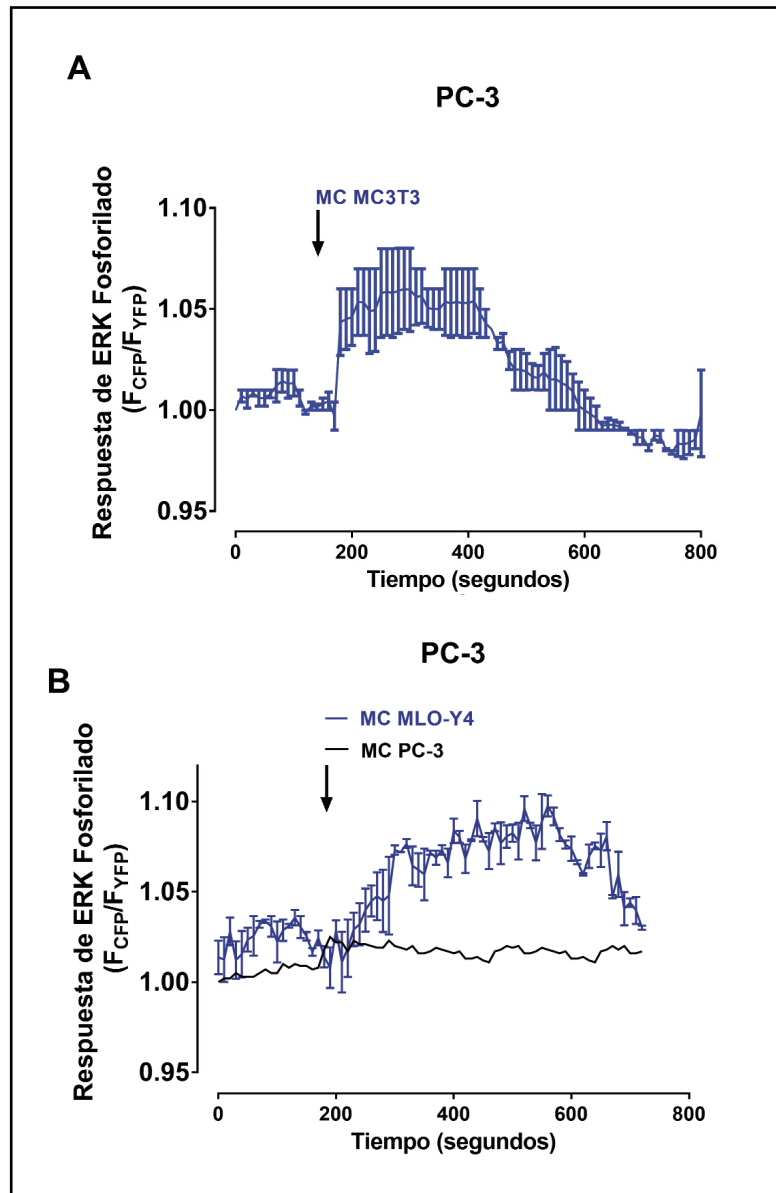
Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Financiación: Este trabajo se realizó gracias a proyectos del Instituto de Salud Carlos III (PI12/02390) y CEU San Pablo-Santander (USP-BS-PPC 11/2012, USP-BS-APP-2/2016 y MERMERG-2).

Bibliografía

1. Wong MC, Goggins WB, Wang HH, Fung FD, Leung C, Wong SY, et al. Global incidence and mortality for prostate cancer: analysis of temporal patterns and trends in 36 countries. *Eur Urol.* 2016;70(5):862-74.
2. Kan C, Vargas G, Pape FL, Clézardin P. Cancer cell colonisation in the bone microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10):1-16.
3. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med.* 2004;350(16):1655-64.
4. Guise TA, Mohammad KS, Clines G, Stebbins EG, Wong DH, Higgins LS, et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res.* 2006;12(20 Pt 2):6213-7.
5. Keller ET, Brown J. Prostate cancer bone metastases promote both osteolytic and osteoblastic activity. *J Cell Biochem.* 2004;91(4):718-29.
6. Ell B, Kang Y. SnapShot: bone metastasis. *Cell.* 2012;151(3):690-690.e1.
7. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2013;19(11):1423-37.
8. Suva LJ, Washam C, Nicholas RW, Griffin RJ. Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(4):208-18.
9. Liao J, Schneider A, Datta NS, McCauley LK. Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res.* 2006;66(18):9065-73.
10. Fajardo AM, Piazza GA, Tinsley HN. The role of cyclic nucleotide signaling pathways in cancer: targets for prevention and treatment. *Cancers (Basel).* 2014;6(1):436-58.
11. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1263-84.
12. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2001; Appendix 3: Appendix 3B.
13. Wang B, Ardura JA, Romero G, Yang Y, Hall RA, Friedman PA. Na/H exchanger regulatory factors control parathyroid hormone receptor signaling by facilitating differential activation of G(alpha) protein subunits. *J Biol Chem.* 2010;285(35):26976-86.
14. Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem.* 2004;279(36):37215-8.
15. Komatsu N, Aoki K, Yamada M, Yukinaga H, Fujita Y, Kamioka Y, et al. Development of an optimized back bone of FRET biosensors for kinases and GTPases, *Mol Biol Cell.* 2011;22(23):4647-56.
16. Alonso V, Ardura JA, Wang B, Sneddon WB, Friedman PA. A naturally occurring isoform inhibits parathyroid hormone receptor trafficking and signaling. *J Bone Miner Res.* 2011;26(1):143-55.

Figura 4. Factores secretados por MC3T3-E1 y MLO-Y4 aumentan la fosforilación de la quinasa ERK 1/2 de PC-3. Se analizaron los efectos de factores secretados de medios condicionados obtenidos durante 24 horas de MC3T3-E1 (A) o MLOY-4 (B) en la fosforilación de la quinasa ERK 1/2 en PC-3. A modo de control se estimularon células PC-3 con medio condicionado de células PC-3. La evaluación de AMP cíclico se realizó mediante fluorescencia confocal en células vivas con el sensor CPERK-NESYFP según se ha descrito en el texto. Las flechas indican el momento de estimulación con medios condicionados. Los datos mostrados son medias ± error estándar de 3 experimentos independientes



17. Karlsson T, Sundar R, Widmark A, Landström M, Persson E. Osteoblast-derived factors promote metastatic potential in human prostate cancer cells, in part via non-canonical transforming growth factor β (TGFB) signaling. *Prostate.* 2018;78(6):446-56.
18. Thompson WR, Rubin CT, Rubin J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene.* 2012;503(2):179-93.
19. Rodríguez-Berriguete G, Fraile B, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Royuela M. MAP kinases and prostate cancer. *J Signal Transduct.* 2012;2012:169170.
20. Ottewill PD. The role of osteoblasts in bone metastasis. *J Bone Oncol.* 2016;5(3):124-7.

21. Shiozawa Y, Pedersen EA, Havens AM, Jung Y, Mishra A, Joseph J, et al. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J Clin Invest.* 2011; 121(4):1298-312.
22. Shaked Y, McAllister S, Fainaru O, Almog N. Tumor dormancy and the angiogenic switch: possible implications of bone marrow-derived cells. *Curr Pharm Des.* 2014;20(30):4920-33.
23. Aguirre-Ghiso JA, Ossowski L, Rosenbaum SK. Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth. *Cancer Res.* 2004;64(20):7336-45.
24. Cui C, Merritt R, Fu L, Pan Z. Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2017;7(1):3-17.
25. Caretta A., Mucignat-Caretta C. Protein kinase A in cancer. *Cancers.* 2011;3(1):913-26.
26. Borland G, Smith BO, Yarwood SJ. EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP. *Br J Pharmacol.* 2009;158(1):70-86.
27. Graff JR, Konicek BW, McNulty AM, Wang Z, Houck K, Allen S, et al. Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem.* 2000;275(32):24500-5.
28. Chen H, Zhou L, Wu X, Li R, Wen J, Sha J, et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer. *Front Biosci.* 2016;21:1084-91.
29. Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firlej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, et al. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res.* 2010;70(3):1225-35.
30. Dubois C, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V, Gkika D, Guarmit B, Lepage G, et al. Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer. *Cancer Cell.* 2014;26(1):19-32.
31. Sottnik JL, Dai J, Zhang H, Campbell B, Keller ET. Tumor-induced pressure in the bone microenvironment causes osteocytes to promote the growth of prostate cancer bone metastases. *Cancer Res.* 2015;75(11):2151-8.
32. Singh SK, Mishra MK, Eltoum IA, Bae S, Lillard JW Jr, Singh R. CCR5/CCL5 axis interaction promotes migratory and invasiveness of pancreatic cancer cells. *Sci Rep.* 2018;8(1):1323.
33. Huang CY, Fong YC, Lee CY, Chen MY, Tsai HC, Hsu HC, et al. CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF-kappaB pathways. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(5):794-803.
34. Kato T, Fujita Y, Nakane K, Mizutani K, Terazawa R, Ehara H, et al. CCR1/CCL5 interaction promotes invasion of taxane-resistant PC3 prostate cancer cells by increasing secretion of MMPs 2/9 and by activating ERK and Rac signaling. *Cytokine.* 2013;64(1):251-7.
35. Sethi N, Dai X, Winter CG, Kang Y. Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell.* 2011;19(2):192-205.

Cancelo Hidalgo MJ

Hospital Universitario de Guadalajara - Universidad de Alcalá - Guadalajara (España)

Isoflavonas y salud ósea

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2018000400006>

Correspondencia: M.J. Cancelo Hidalgo - Servicio de Ginecología y Obstetricia - Hospital Universitario de Guadalajara - C/ Donante de Sangre, s/n - 19002 Guadalajara (España)
Correo electrónico: mcanceloh@sego.es

Resumen

Los fitoestrógenos representan una familia de componentes derivados de plantas. Tienen una estructura esteroidea y son capaces de actuar en el receptor estrogénico. Poseen propiedades tanto estrogénicas como antiestrogénicas, en función del tejido en el que actúen. Los mecanismos potenciales por los cuales los fitoestrógenos pueden afectar a las actividades celulares se han dividido en efectos genómicos y no genómicos. Los primeros actúan a través de receptores de estrógenos, y estos últimos están mediados por proteínas celulares.

El mecanismo de acción de las isoflavonas de soja en el hueso puede considerarse beneficioso, ya que actúan estimulando la actividad de los osteoblastos. Por otra parte, a través del sistema RANK-L/OPG inducen una disminución en la supervivencia y la actividad de los osteoclastos.

Este artículo revisa estudios *in vitro*, en animales y humanos, que involucran a las isoflavonas y la salud ósea con el fin de conocer el efecto que sobre ésta tendrán dichas sustancias en aquellas mujeres postmenopáusicas que las utilizan en el contexto del tratamiento o prevención del síndrome climatérico.

En general, la valoración global de los estudios en humanos muestra variabilidad en el diseño, en la variedad de fuentes de isoflavonas, en el tiempo del análisis y en la dosis. Además, es preciso considerar la variabilidad en la biodisponibilidad y el metabolismo de las isoflavonas entre los sujetos. Todo ello dificulta obtener conclusiones consistentes.

En conclusión, los resultados arrojan algunos resultados positivos, justificando la necesidad de investigaciones adicionales. Desde un punto de vista clínico, las isoflavonas son utilizadas en aquellas mujeres con síntomas climatéricos que no pueden o no desean realizar terapia hormonal. No estarían indicadas con el objetivo de tratar la osteoporosis, pero aquellas mujeres que las utilizan a las dosis y tiempo adecuados pueden esperar un beneficio en el sentido de mantenimiento de su masa ósea.

Palabras clave: *salud ósea, soja, isoflavonas.*

Isoflavones and bone health

Summary

Phytoestrogens are a family of plant-derived components that present a steroid structure and can act in the estrogen receptor. They contain both estrogenic and antiestrogenic properties, depending on the tissue in which they act.

The potential mechanisms by which phytoestrogens can affect cell activities have been divided into genomic and non-genomic effects. The former act through estrogen receptors, and the latter are mediated by cellular proteins. The active mechanism of soy isoflavones in bone may be beneficial, as they act by stimulating the activity of the osteoblasts. On the other hand, through the RANK-L/OPG system they bring about a decrease in osteoclast survival and activity. This article reviews *in vitro* studies, in animals and humans, that involve isoflavones and bone health to ascertain how these substances affect those postmenopausal women who use them in treatment or prevention of the climacteric syndrome.

In general, the global assessment of human studies shows variability in the design, in the variety of isoflavone sources, in the time of the analysis and in the dose. In addition, the variability in the bioavailability and metabolism of isoflavones between the subjects must be considered. All this makes it difficult to obtain consistent conclusions.

To sum up, some positive results justify the need for further research. From a clinical point of view, isoflavones are used in women with climacteric symptoms who cannot or do not wish to undergo hormone therapy. They would not be indicated for treating osteoporosis, but those women who use them at the right doses and time can expect a benefit in maintaining bone mass.

Key words: *bone health, soy, isoflavones.*

Introducción

El déficit estrogénico derivado de la disminución de la función ovárica conduce a un estado de remodelado óseo aumentado, con un balance negativo que lleva a una pérdida de masa ósea. El resultado es el mayor riesgo de desarrollar osteopenia, osteoporosis y, como consecuencia, aumento del riesgo de fractura.

La terapia hormonal es considerada como un tratamiento muy eficaz para el alivio de los síntomas climatéricos, habiendo demostrado un efecto beneficioso en el hueso con reducción de fractura vertebral y de cadera incluso en mujeres postmenopáusicas no osteoporóticas¹, pero las informaciones sobre el aumento del riesgo de algunas enfermedades crónicas han aumentado notablemente el interés de los clínicos y de las mujeres por alternativas a este tratamiento. Algunas de las más populares se basan en alimentos o suplementos de fitoestrógenos.

De todas las alternativas naturales actualmente investigadas, los fitoestrógenos y sus componentes, las isoflavonas, parecen ofrecer el mayor potencial para la prevención de la pérdida ósea.

Isoflavonas y metabolismo óseo

Los fitoestrógenos representan un grupo de compuestos derivados de plantas que han demostrado tener propiedades tanto agonistas estrogénicas como antagonistas, en función del tejido donde actúen.

Por su estructura química, los fitoestrógenos se dividen en cuatro clases principales:

- 1.- Isoflavonas
- 2.- Estilbenos
- 3.- Cumestanos
- 4.- Lignanós

Las isoflavonas son las mejor conocidas, siendo sus principales representantes genisteína y daidzeína. Se encuentran en cantidades significativas en la soja. La estructura química es similar al 17 β estradiol y tienen la capacidad de unirse a los receptores de estrógeno (RE). La unión de un fitoestrógeno al RE puede dar como resultado la activación parcial del mismo (efecto agonista) o el desplazamiento de una molécula de estrógeno, lo que reduce la activación del receptor (efecto antagonista).

Presentan una afinidad por el RE inferior a la del estradiol. La afinidad y el tiempo de ocupación de las isoflavonas por el receptor β es unas 30 veces superior que por el receptor α . En los tejidos existe una diferente distribución de estos receptores, lo que apunta a que ejercen efectos tisulares selectivos en función del tejido en el que actúan. En el tejido reproductivo, especialmente útero y mama, predomina el tipo α , mientras que el tejido óseo tiene una mayor cantidad de receptores β ². Además, las isoflavonas presentan otras acciones independientes del RE, como inhibición enzimática o actividad antioxidante.

Los mecanismos exactos del efecto de las isoflavonas y otros componentes de la soja en el hueso siguen sin estar totalmente aclarados. Se ha postulado que el principal efecto sería genómico a través de los RE, pero también se han comprobado otros efectos no genómicos³.

Se ha demostrado la presencia de RE en las células osteoblásticas y la unión de la genisteína al RE de esta localización. El resultado parece ser una mayor formación de hueso por la activación de los osteoblastos mediante el mecanismo genómico que implica la activación del receptor de estrógeno nuclear, y también se ha descrito una

variedad de mecanismos no genómicos, incluida la inhibición de la tirosin-kinasa y la topoisomerasa II⁴. Por otra parte, se ha puesto de manifiesto que la daidzeína induce la apoptosis de los osteoclastos⁵.

Otro mecanismo de acción propuesto más recientemente es a través del aumento de la síntesis de osteoprotegerina (OPG) por el osteoblasto. En una cohorte de mujeres postmenopáusicas osteopénicas, la administración de genisteína en comparación con el placebo mostró que el nivel de RANK-L fue más bajo ($p < 0,001$ vs. placebo) y el de OPG mayor ($p < 0,001$ vs. placebo) en el seguimiento a 1 y 2 años⁶.

Otro posible mecanismo de acción es el diferente comportamiento que tiene la proteína de la soja en comparación con las proteínas animales frente a la absorción intestinal de calcio⁷. El consumo de proteína de soja produce una menor excreción urinaria de calcio que la ingesta de proteína animal⁸. Esto podría tener una posible importancia clínica en el sentido de las recomendaciones sobre hábitos de salud para la mujer postmenopáusica, sugiriendo la sustitución de proteína animal por proteína de soja.

En resumen, desde el punto de vista fisiológico del remodelado óseo, estos hallazgos sustentan la hipótesis de un efecto estimulador de los osteoblastos y un posible efecto inhibidor del reclutamiento de osteoclastos (vía RANK-L), además de un acortamiento de su vida media al promover su apoptosis. El resultado sería un efecto antirresortivo con balance positivo hacia la formación mediado por la OPG, y con actuación en el RE, pero también mediante la acción en determinadas enzimas⁹.

Estudios *in vitro*

Son múltiples los estudios de investigación básica que señalan el efecto positivo de las isoflavonas en las variables relacionadas con el metabolismo óseo, la osteoporosis, la fractura y la calidad ósea.

Las células osteoblásticas MC3T3-E1 han sido cultivadas en medio que contenía diversas concentraciones de daidzeína, mostrando un aumento significativo en la actividad de la fosfatasa alcalina y el contenido de proteína. Este efecto se contrarresta completamente al añadir un antiestrógeno como tamoxifeno, lo que indica el efecto estimulador sobre la proliferación y diferenciación de las células osteoblásticas MC3T3-E1 mediado a través del RE. El efecto de la genisteína en las células osteoblásticas parece ser el mismo que el de la daidzeína¹⁰.

Por otra parte, la genisteína inhibe la actividad osteoclastica directamente a través de la inhibición de la tirosin-kinasa, que a su vez inhibe la resorción ósea¹¹.

Estudios en animales

La mayoría de los estudios de la acción de los fitoestrógenos sobre el hueso, en experimentación animal, se han realizado en modelos de ratas ovariectomizadas (OVX) y algunos en primates. En

ellos hay una gran variabilidad porque, por ejemplo, la vía de administración ha sido la inyección subcutánea, parenteral continua o la alimentación oral. En general, el producto analizado ha sido isoflavonas, ya sea compuestos puros (principalmente genisteína) o proteínas de soja, con o sin sus isoflavonas, pero con gran variación en cuanto a las dosis empleadas.

Los controles se han realizado con caseína o dietas semipurificadas. En varios estudios el efecto de los fitoestrógenos se ha comparado con el estrógeno conjugado equino o el estradiol.

Los objetivos primarios han sido la variación de la masa del hueso trabecular y/o cortical, la densidad mineral ósea (DMO) y la resistencia mecánica en algún estudio. Los objetivos secundarios incluyeron la variación en los marcadores del recambio óseo y los efectos sobre el peso uterino.

En general, los efectos de las isoflavonas en el tejido esquelético de los animales de experimentación han sido consistentes en el sentido de mostrar un efecto favorable de las isoflavonas sobre el hueso.

Los primeros estudios examinaron los efectos de la leche de soja¹² y de la proteína de soja⁷ en comparación con la caseína en el modelo animal de ratas OVX. Las ratas alimentadas con dieta de soja mostraron densidad ósea significativamente más alta en el fémur y columna lumbar que las ratas del grupo control. La cuestión sobre si el efecto se debía a la proteína en sí o a la presencia de isoflavonas en la soja no queda aclarada en estos estudios iniciales. Para aclarar esta cuestión, las ratas OVX se alimentaron con una dieta que contenía 44 $\mu\text{mol/día}$ de genisteína. Las ratas controles fueron alimentadas con una dieta idéntica en la que se eliminaron las isoflavonas. Los resultados mostraron que la genisteína fue efectiva para reducir la pérdida ósea en ratas OVX, apoyando la hipótesis de que actuaría como inhibidor osteoclastico⁴.

En otro estudio, el aislado de proteína de soja fue tan eficaz como el estradiol en el control de la pérdida ósea después de la ovariectomía realizada en ratas¹³.

Sin embargo, en otro estudio, que mostró un aumento significativo en el ARNm de IGF-1 en los grupos tratados con isoflavona, y de manera dosis dependiente, no se constató un efecto significativo en la densidad ósea¹⁴.

Utilizando técnicas como microTAC y DXA se ha demostrado cómo el volumen del hueso trabecular de la metafisis femoral distal se redujo marcadamente en ratones OVX, mostrando la genisteína capacidad para restaurar esta pérdida¹⁵.

En un ensayo aleatorizado que estudió la capacidad de revertir la pérdida ósea ya establecida mediante la ingesta diaria de isoflavonas de soja a largo plazo y en diferentes dosis (20, 40 u 80 mg/kg/día durante 84 días), y realizado en ratas a las que se extirparon los ovarios y ratas a las que se hizo cirugía simulada conservando los ovarios¹⁶, la DMO fue significativamente menor en las ratas OVX que en las que se practicó la cirugía simulada. La alimen-

tación con isoflavonas no afectó la DMO en esta población. Tampoco indujo cambios en el peso uterino, lo que indica la ausencia de efecto uterotrófico. La actividad anti-osteoclástica inducida por isoflavonas ocurrió de una manera dosis dependiente; sin embargo, aunque la administración de isoflavonas redujo el recambio óseo, no logró revertir la pérdida ósea ya establecida. Estos resultados apoyan la idea de que el consumo de isoflavonas de soja puede tener un papel más preventivo que curativo en la salud ósea.

Se ha señalado la importancia de la exposición neonatal a las isoflavonas. El análisis de la DMO y resistencia ósea en ratones en edad adulta, es superior cuando estos han tenido una exposición intrauterina a genisteína y/o daidzeína¹⁷.

En el análisis de la calidad ósea, genisteína conservó la calidad biomecánica del hueso trabecular independientemente de parámetros de la microestructura, como la densidad o la longitud de las microfracturas, la tasa de aposición mineral o la DMO¹⁸.

Sin embargo, los estudios en primates no concuerdan con los resultados en ratas OVX. En monas *cynomolgus* premenopáusicas (*Macaca fascicularis*), la dieta de soja con alto contenido de isoflavonas no afectó significativamente las características óseas, la DMO, ni las mediciones de biomarcadores óseos¹⁹. En las monas ovariectomizadas, no se observó ningún efecto de los fitoestrógenos de soja de la dieta para ninguna medida de la masa ósea²⁰, y la proteína de soja por sí sola no evitó el aumento del recambio óseo²¹.

En resumen, el efecto de las isoflavonas en la investigación básica (estudios *in vitro* y modelos animales) señala que existe:

- Reducción de los marcadores de resorción ósea
- Aumento de los marcadores de formación ósea
- Preservación de la estructura y calidad ósea
- Preservación de la resistencia ósea a la fractura

Estudios en humanos

Estudios observacionales

Los estudios observacionales de intervención dietética han mostrado hallazgos similares a los efectos *in vitro* de los fitoestrógenos en cultivos de células óseas y de marcadores del recambio óseo, que son indirectamente consistentes con la reducción del remodelado óseo.

La mayoría de los estudios observacionales sobre marcadores óseos se han realizado en mujeres que viven en países donde la población tiene una ingesta relativamente alta de fitoestrógenos. Estos han encontrado una correlación inversa significativa entre la ingesta de isoflavonas y la excreción urinaria de los marcadores de resorción ósea piridinolina y desoxipiridinolina en mujeres postmenopáusicas de países asiáticos²².

Dentro de las poblaciones asiáticas, varios estudios observacionales muestran que las mujeres postmenopáusicas que consumen alimentos de soja, y por lo tanto isoflavonas, tienen la DMO de la columna lumbar y/o cadera más alta²³, de la misma manera que ocurre en poblaciones esta-

dounidenses de origen japonés^{24,25}. Se ha descrito un mayor pico de masas ósea y el mantenimiento de esta masa ósea en mujeres jóvenes²⁶, y una menor pérdida en mujeres perimenopáusicas²⁷ y postmenopáusicas²⁸. Este efecto no se ha mostrado en supervivientes de cáncer de mama²⁹.

En adultos que viven en países occidentales, los datos son limitados, por lo que es difícil sacar conclusiones sobre la relación entre la ingesta de fitoestrógenos y la DMO o la tasa de fracturas, ya que su consumo es generalmente insignificante en dichos países³⁰. Un estudio en mujeres de raza blanca americanas encontró una disminución del 18% de los marcadores de resorción en aquellas con alta ingesta de genisteína en la dieta²⁸.

Estudios clínicos

El mayor problema con los ensayos clínicos en humanos que analizan el efecto de las isoflavonas en el hueso es la gran variabilidad en cuanto al diseño, fuente de los productos analizados, dosis y, especialmente, la duración relativamente corta para poder detectar con precisión cambios significativos en la DMO. Además, un factor de confusión en los estudios de tratamiento de isoflavonas es la variabilidad en la biodisponibilidad y el metabolismo de las isoflavonas entre los sujetos.

Los sujetos varían de metabolizadores bajos a moderados y altos. Por lo tanto, aunque se administre la misma dosis de isoflavona, se puede esperar una variabilidad en la respuesta. La daidzeína es metabolizada a equol por la microbiota intestinal en aproximadamente el 30% de las personas. Este metabolito es biológicamente más activo que su precursor³¹.

Un ensayo a doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo, de 1 año de duración, administrando suplementos de equol (10 mg/día) a 93 mujeres japonesas menopáusicas no productoras de equol, mostró que la intervención aumentó las concentraciones de este metabolito en suero y orina de manera dosis dependiente. La desoxipiridinolina urinaria disminuyó significativamente, con un -23,94% de cambio en el grupo que recibió suplemento de equol en comparación con un cambio de -2,87% en el grupo placebo ($p=0,020$). Además, en el grupo tratado se mantuvo la DMO, que disminuyó en el grupo placebo³².

Son pocas las informaciones de estudios en mujeres premenopáusicas, y no es posible extraer conclusiones sobre el impacto de los fitoestrógenos en el hueso en ellas^{33,34}. La administración de soja rica en isoflavonas no tuvo efectos en la DMO en mujeres adultas jóvenes sanas con menstruación normal³⁵.

En otro estudio de 24 semanas realizado en 69 mujeres perimenopáusicas se analizó el efecto en la pérdida ósea de administrar proteína de soja rica en isoflavonas (80,4 mg/día), proteína de soja pobre en isoflavonas (4,4 mg/día) o caseína. El grupo control tuvo una pérdida significativa de hueso, mientras que el tratamiento rico en isoflavonas atenuó la pérdida ósea de la columna lumbar²⁷. Un estudio de similar diseño en mujeres postmenopáusicas hipercolesterolémicas, obtuvo semejantes resultados³⁶.

Según estas informaciones, es posible que la inclusión de productos de soja que contienen isoflavonas en las dietas de mujeres perimenopáusicas pueda atenuar la pérdida ósea y disminuir el riesgo de osteoporosis. Sin embargo, en otro estudio realizado en mujeres blancas postmenopáusicas tempranas (51-56 años), aparentemente sanas, el consumo de alimentos que contenían isoflavona de soja aglicona en cantidades de 110 mg/día durante 1 año no previno la pérdida ósea postmenopáusica y no afectó el recambio óseo³⁷. Similares resultados se muestran en otro estudio en mujeres postmenopáusicas tardías, con un año de seguimiento, en el que, aunque se identificaron cambios en los marcadores, no ocurrió en la DMO, incluso cuando se analizaron los resultados por productoras y no productoras de equol³⁸.

Se han analizado los efectos cooperativos de las isoflavonas y el ejercicio sobre el metabolismo óseo y el lipídico en 128 mujeres postmenopáusicas durante 24 semanas asignadas aleatoriamente a 4 grupos: placebo; placebo combinado con caminar (3 veces por semana); ingesta de isoflavona (75 mg de conjugados de isoflavonas por día); e isoflavona combinada con caminar. La combinación de isoflavonas y ejercicio mostró efectos favorables sobre los lípidos séricos y la composición corporal de las mujeres postmenopáusicas. Los hallazgos de este estudio sugieren que los efectos preventivos de las isoflavonas sobre la pérdida ósea dependen de la microbiota intestinal del individuo para la producción de equol³⁹, aunque otros estudios no encuentran diferencias en función del fenotipo productor o no productor de equol³⁷.

Un meta-análisis de diez ensayos aleatorizados y controlados con placebo, relacionados con los efectos de la ingesta de isoflavonas de soja sobre la DMO de la columna lumbar, incluyó 608 mujeres a las que se administró isoflavonas de soja en dosis de 44-160 mg/día con un tiempo de tratamiento de 4-24 meses. En conclusión, la intervención con isoflavonas atenuó significativamente la pérdida ósea de la columna vertebral en mujeres menopáusicas. Estos efectos favorables son más marcados cuando se consumen más de 90 mg/día de isoflavonas. El efecto beneficioso se pondría de manifiesto tras el consumo durante 6 meses⁴⁰.

Sin embargo, otro meta-análisis que incluyó diez ensayos aleatorizados controlados con placebo de, al menos, un año de duración y que analizó a 896 mujeres indicó que es poco probable que la suplementación con isoflavonas de soja tenga un efecto favorable significativo sobre la DMO en la columna lumbar y la cadera. Se obtuvieron resultados similares en los análisis de subgrupos por fuentes de isoflavonas (proteína de soja *vs.* extracto de isoflavonas) y diferencias étnicas (asiáticas *vs.* occidentales). Solo el análisis según la dosis igual o mayor a 80 mg/día en comparación con dosis menores tendía a tener un efecto beneficioso débil sobre la DMO de la columna lumbar⁴¹.

Sobre los efectos de la ingesta de isoflavonas en los marcadores de remodelado óseo, se analizaron en un meta-análisis los resultados de nueve ensayos aleatorizados en el que se incluyó a 432 sujetos. Se concluyó que la intervención con isoflavonas inhibe de manera significativa la resorción y estimula la formación de hueso, según la respuesta de los marcadores de recambio óseo. Estos efectos favorables ocurren incluso si se consumen <90 mg/día de isoflavonas o si la intervención dura menos de 12 semanas⁴².

Los efectos de las isoflavonas sobre la resistencia ósea en humanos son desconocidos. Se ha indicado que el tratamiento con isoflavonas de soja durante 3 años fue modestamente beneficioso en la medición de la densidad mineral ósea volumétrica del fémur medial, así como en el índice fuerza-deformación⁴³.

Un reciente meta-análisis⁴⁴ analizó el efecto de las isoflavonas en la DMO. Se incluyeron 21 estudios con 2.652 mujeres postmenopáusicas. Los resultados indicaron que en columna lumbar el tratamiento con isoflavonas se asocia a un incremento significativo de la DMO en comparación con el control. En cuello femoral, el número de estudios que aportan esta información es de 18 (n=1.604), encontrando también un cambio significativo. Los estudios que emplearon isoflavonas agliconas encontraron mejores resultados comparado con el control, siendo superiores los efectos a los estudios que utilizaron las formas glicosiladas.

Genisteína redujo la excreción urinaria de pirodolina y deoxipirodolina aumentando los niveles de fosfatasa alcalina y del factor de crecimiento insulínico-1 (*insulin-like growth factor-1, IGF-1*), sin mostrar cambios en la medida ecográfica del espesor endometrial. Los autores concluyeron que el tratamiento con isoflavonas ejerce un moderado efecto beneficioso contra la pérdida ósea relacionada con la deprivación estrogénica en la postmenopausia. El efecto parece estar relacionado con la forma aglicona de las isoflavonas.

Efecto sobre el riesgo de fractura

Las únicas informaciones del efecto de las isoflavonas sobre el riesgo de fractura derivan de algunos estudios poblacionales. No hay datos de ensayos clínicos sobre fractura.

Un estudio prospectivo de una gran cohorte asiática⁴⁵ de 24.403 mujeres postmenopáusicas que no tenían antecedentes de fractura o cáncer, seguidas durante una media de 4,5 años, y después de ajustar por edad, estado socioeconómico, factores de riesgo de osteoporosis y otros factores dietéticos, encontró una relación del riesgo de fractura con el consumo de proteína de soja o de isoflavonas, con una relación inversa que fue más pronunciada en las mujeres en la menopausia temprana. Los autores concluyeron que el consumo de soja puede reducir el riesgo de fractura en las mujeres postmenopáusicas, especialmente entre las que se encuentran en los años próximos a la menopausia.

Conclusiones

La evidencia de los estudios epidemiológicos y prospectivos de cohortes indican un efecto positivo de la ingesta de isoflavonas sobre el riesgo de osteoporosis y fractura por fragilidad.

Existen diversos mecanismos de actuación que explican las acciones de las isoflavonas sobre el hueso y, aunque los mecanismos exactos involucrados no están totalmente aclarados, parece que el consumo de isoflavonas de soja atenúa la pérdida ósea inducida por la menopausia mediante la disminución de la resorción y estimulación de la formación.

Como se muestra de manera consistente tanto en estudios *in vitro* y en animales, las isoflavonas parecen estimular la formación de hueso a través de la acción sobre los osteoblastos, siendo capaces de inhibir la resorción ósea por actuación sobre los osteoclastos y estableciendo, por tanto, un balance positivo.

Los estudios en humanos muestran variabilidad en los resultados debido, al menos en parte, a la diferente metodología empleada, a la variedad de fuentes de isoflavonas, las dosis empleadas y el tiempo del análisis; a lo que hay que sumar la variabilidad de la biodisponibilidad y el metabolismo de las isoflavonas entre los sujetos, siendo a veces difícil deslizar los resultados de una posible influencia genética y ambiental.

Los estudios revisados muestran evidencia de un efecto beneficioso de las isoflavonas de soja sobre la salud ósea en mujeres perimenopáusicas y postmenopáusicas cuando la proteína de soja con alto contenido de isoflavonas se incorpora a la dieta. Esta podría ser una adecuada estrategia para mejorar la salud ósea de la mujer postmenopáusica.

La evidencia resulta insuficiente para recomendar el consumo de isoflavonas para la prevención o el tratamiento de la osteoporosis, pero en aquellas mujeres que estén tomando unas dosis adecuadas de isoflavonas puede esperarse una menor pérdida de la DMO relacionada con la privación estrogénica.

Los resultados de los estudios muestran algunos resultados positivos, lo que justifica la necesidad de llevar a cabo ensayos clínicos adicionales en los que sería deseable contar con una población muestral mayor y una mayor duración que permitieran, además de demostrar el efecto de isoflavonas en los marcadores bioquímicos de remodelación ósea, la densidad ósea y la calidad ósea, investigar el efecto sobre la prevención de fracturas.

Conflicto de intereses: El autor declara no tener conflicto de interés.

Bibliografía

- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002; 288(3):321-33.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997;138:863-70.
- Anderson JJ, Anthony M, Messina M, Garne SC. Effects of phyto-oestrogens on tissues. *Nutr Res Rev*. 1999; 12(1):75-116.
- Blair HC, Jordan SE, Peterson TG, Barnes S. Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*. 1996;61(4):629-37.
- Rassi CM, Lieberherr M, Chaumaz G, Pointillart A, Cournot G. Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase 3. *J Bone Miner Res*. 2002; 17(4):630-8.
- Marini H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, Atteritano M, et al. OPG and sRANKL serum concentrations in osteopenic, postmenopausal women after 2-year genistein administration. *J Bone Miner Res*. 2008; 23(5):715-20.
- Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, et al. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr*. 1996;126:161-7.
- Breslau NA, Brinkley L, Hill KD, Pak CY. Relationship of animal protein-rich diet to kidney stone formation and calcium metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;66(1):140-6.
- Zheng X, Lee SK, Chun OK. Soy isoflavones and osteoporotic bone loss: a review with an emphasis on modulation of bone remodeling. *J Med Food*. 2016;19(1):1-14.
- Sugimoto E, Yamaguchi M. Stimulatory effect of daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Pharmacol*. 2000;59(5):471-5.
- Williams JP, Jordan SE, Barnes S, Blair HC. Tyrosine kinase inhibitor effects on avian osteoclastic acid transport. *Am J Clin Nutr*. 1998;68:1369S-74S.
- Omi N, Aoi S, Murata K, Ezawa I. Evaluation of the effect of soybean milk and soybean milk peptides on bone metabolism in the rat model with ovariectomized osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol*. 1994;40:201-11.
- Arjmandi BH, Birnbaum R, Goyal NV, Getlinger MJ, Juma S, Alekel L, et al. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *Am J Clin Nutr*. 1998;68:1364S-8S.
- Arjmandi BH, Getlinger MJ, Goyal NV, Alekel L, Hasler CM, Juma S, et al. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. *Am J Clin Nutr*. 1998;68:1358S-63S.
- Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, et al. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*. 1999;140:1893-900.
- Picherit C, Bennetau-Pelissero C, Chanteranne B, Lebecque P, Davicco MJ, Barlet JP, et al. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr*. 2001;131(3):723-8.
- Kaludjerovic J, Ward WE. Neonatal exposure to daidzein, genistein, or the combination modulates bone development in female CD-1 mice. *J Nutr*. 2009;139(3):467-73.
- Dai R, Ma Y, Sheng Z, Jin Y, Zhang Y, Fang L, et al. Effects of genistein on vertebral trabecular bone microstructure, bone mineral density, microcracks, osteocyte density, and bone strength in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*. 2008;26(4):342-9.
- Lees CJ, Kaplan JR, Chen H, Jerome CP, Register TC, Franke AA. Bone mass and soy isoflavones in socially housed, premenopausal macaques. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(1):245-50.
- Register TC, Jayo MJ, Anthony MS. Soy phytoestrogens do not prevent bone loss in postmenopausal monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(9):4362-70.
- Lees CJ, Ginn TA. Soy protein isolate diet does not prevent increased cortical bone turnover in ovariectomized macaques. *Calcif Tissue Int*. 1998;62(6):557-8.

22. Horiuchi T, Onouchi T, Takahashi M, Ito H, Orimo H. Effect of soy protein on bone metabolism in postmenopausal women. *Osteoporosis*. 2000;11:721-4.
23. Somekawa Y, Chiguchi M, Ishibashi T, Aso T. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstet Gynecol*. 2001;97:109-15.
24. Fukui Y, Miura A, Nara Y, Uesugi T, Yamori H, Yamori Y. Relationship between urinary isoflavones and bone metabolism in postmenopausal Japanese women. *J Nutr*. 2000;130:686S.
25. Rice MM, LaCroix AZ, Lampe JW, van Belle G, Kestin M, Sumitani M, et al. Dietary soy isoflavone intake in older Japanese American women. *Public Health Nutr*. 2001;4(5):943-52.
26. Ho SC, Chan SG, Yi Q, Wong E, Leung PC. Soy intake and the maintenance of peak bone mass in Hong Kong Chinese women. *J Bone Miner Res*. 2001;16(7):1363-9.
27. Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(3):844-52.
28. Mei J, Yeung SS, Kung AW. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(11):5217-21.
29. Baglia ML, Gu K, Zhang X, Zheng Y, Peng P, Cai H, et al. Soy isoflavone intake and bone mineral density in breast cancer survivors. *Cancer Causes Control*. 2015;26(4):571-80.
30. Guthrie JR, Ball M, Murkies A, Dennerstein L. Dietary phytoestrogen intake in mid-life Australian-born women. *Climacteric*. 2000;3:254-61.
31. Wu J, Oka J, Ezaki J, Ohtomo T, Ueno T, Uchiyama S, et al. Possible role of equol status in the effects of isoflavone on bone and fat mass in postmenopausal Japanese women: a double-blind, randomized, controlled trial. *Menopause*. 2007;14(5):866-74.
32. Tousen Y, Ezaki J, Fujii Y, Ueno T, Nishimuta M, Ishimi Y. Natural S-equol decreases bone resorption in postmenopausal, non-equol-producing Japanese women: a pilot randomized, placebo-controlled trial. *Menopause*. 2011;18(5):563-74.
33. Song YS, Paik HY. Soybean intake and bone mineral density change in Korean college women. *Epidemiological observations*. *J Nutr*. 2002;132:616S.
34. Di Leo C, Tarolo GL, Bestetti A, Tagliabue L, Del Sole A, Aliberti G, et al. Osteoporosis and phytoestrogens: an assessment of bone mineral density via quantitative peripheral computed tomography in milk-egg-vegetarian women in the premenopause. *Radiol Med*. 2000;99:250-7.
35. Anderson JJ, Chen X, Boass A, Symons M, Kohlmeier M, Renner JB, et al. Soy isoflavones: no effects on bone mineral content and bone mineral density in healthy, menstruating young adult women after one year. *J Am Coll Nutr*. 2002;21(5):388-93.
36. Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 1998;68:1375S-9S.
37. Brink E, Coxam V, Robins S, Wahala K, Cassidy A, Branca F; PHYTOS Investigators. Long-term consumption of isoflavone-enriched foods does not affect bone mineral density, bone metabolism, or hormonal status in early postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(3):761-70.
38. Kenny AM, Mangano KM, Abourizk RH, Bruno RS, Anamani DE, Kleppinger A, et al. Soy proteins and isoflavones affect bone mineral density in older women: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(1):234-42.
39. Wu J, Oka J, Higuchi M, Tabata I, Toda T, Fujioka M, et al. Cooperative effects of isoflavones and exercise on bone and lipid metabolism in postmenopausal Japanese women: a randomized placebo-controlled trial. *Metabolism*. 2006;55(4):423-33.
40. Ma DF, Qin LQ, Wang PY, Katoh R. Soy isoflavone intake increases bone mineral density in the spine of menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr*. 2008;27(1):57-64.
41. Liu J, Ho SC, Su YX, Chen WQ, Zhang CX, Chen YM. Effect of long-term intervention of soy isoflavones on bone mineral density in women: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Bone*. 2009;44(5):948-53.
42. Ma DF, Qin LQ, Wang PY, Katoh R. Soy isoflavone intake inhibits bone resorption and stimulates bone formation in menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr*. 2008;62(2):155-61.
43. Shedd-Wise KM, Alekel DL, Hofmann H, Hanson KB, Schiferl DJ, Hanson LN, et al. The soy isoflavones for reducing bone loss study: 3-yr effects on pQCT bone mineral density and strength measures in postmenopausal women. *J Clin Densitom*. 2011;14(1):47-57.
44. Lambert MNT, Hu LM, Jeppesen PB. A systematic review and meta-analysis of the effects of isoflavone formulations against estrogen-deficient bone resorption in peri- and postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2017;106(3):801-11.
45. Zhang X, Shu XO, Li H, Yang G, Li Q, Gao YT, et al. Prospective cohort study of soy food consumption and risk of bone fracture among postmenopausal women. *Arch Intern Med*. 2005;165(16):1890-5.

Sosa Henríquez M^{1,2}, Gómez de Tejada Romero MJ^{1,3}

1 Universidad de Las Palmas de Gran Canaria - Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias. Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral - Las Palmas de Gran Canaria (España)

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

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

Una propuesta para reorganizar el mundo de las publicaciones científicas que permitiría ahorrar millones de euros a nuestro país

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2018000400007>

Correspondencia: Manuel Sosa Henríquez - c/Espronceda, 2 - 35005 Las Palmas de Gran Canaria (España)
Correo electrónico: manuel.sosa@ulpgc.es

1. ¿Cuál era la razón de las publicaciones científicas? Todo cambió con Eugene Garfield

A comienzos del siglo XX existían muy pocas revistas científicas y la difusión de las mismas era más bien escasa. En el campo de la Medicina destacaban dos: en Estados Unidos *The New England Journal of Medicine*, existente desde 1812, y *The Lancet* en Europa, creada en 1823. El objetivo fundamental de los autores, mayormente investigadores, era el de comunicar a la comunidad científica una novedad importante, a menudo esperada, como ocurrió, por ejemplo, con la publicación por Watson y Crick del descubrimiento de la estructura del ADN en *Nature*¹ o por Fleming de la penicilina², hitos en el campo de la Medicina que se conocieron por medio de su publicación como artículos científicos o simplemente como una carta, como ocurrió con el descubrimiento del ADN¹.

Todo cambió cuando Eugene Garfield, hace más de 30 años, creó el factor de impacto de las revistas científicas³. Inicialmente este índice fue concebido como un método para valorar la calidad de las revistas y para servir como orientación para los bibliotecarios (la esencia del factor de impacto es enumerar el número de veces que un determinado artículo es citado en otras revistas también de calidad en relación al número de artículos que la propia revista publica)⁴. El factor de impacto sufrió una distorsión malévola en su utilización y, por extensión, comenzó a usarse como índice de calidad de los artículos científicos publi-

cados en las revistas con factor de impacto; a partir de ese momento condicionó la actitud profesional de editoriales, revistas científicas, investigadores e incluso de institutos de investigación, universidades y ministerios, fenómeno reconocido y últimamente cuestionado⁵.

El factor de impacto condujo inmediatamente a la división de las revistas en aquellas de “primera categoría”, que eran las que estaban incluidas dentro de *Journal of Citation Reports* (JCR), y todas las demás, las que no lo estaban y, por lo tanto, no tenían dicho factor de impacto. A su vez, las revistas incluidas en JCR se clasificaron en cuartiles, donde las revistas mejores eran las que estaban en los puestos más altos de esta lista. Este hecho condicionó el desarrollo de una cadena, cuyas aseveraciones, en nuestra opinión erróneas, se mantienen hasta hoy: las revistas de mayor impacto son las mejores, los artículos mejores se publican en las revistas de más impacto, por eso son las mejores; los mejores investigadores, que son aquellos que producen los artículos de más calidad, publican éstos en las revistas de mayor impacto y, por lo tanto, la mejor forma de valorar la calidad de una investigación (de sus investigadores, de sus institutos de investigación, sus hospitales, etc.) es valorando el factor de impacto de sus publicaciones (que es, realmente, el de las revistas donde son publicadas). Por ello, en función del mismo, hoy en día se conceden las ayudas y subvenciones a la investigación, las becas, los sexenios de investigación, e

incluso se valora por las agencias de evaluación para la acreditación de los profesores universitarios, catedráticos y titulares. Todo gira alrededor del factor de impacto y los artículos que publican las revistas que lo tienen. Si se tiene un elevado factor de impacto acumulado se es bueno para todo. Si no se tiene, no se merece nada.

2. ¿Cuál es en la actualidad la razón de las publicaciones científicas?

Desengañémonos o aceptemos la realidad sin falsedades. La principal razón de ser, hoy en día, de las publicaciones científicas no es el transmitir unos conocimientos a la comunidad científica. Es cierto que muchas de ellas cumplen con esta función, pero en nuestra opinión esto es secundario y si fuera para ello, sobrarían muchísimas revistas. El investigador hoy más que nunca necesita “publicar o morir”^{7,8}. Se ha entrado en una vorágine de la que es imposible salir: se necesita publicar para progresar profesionalmente (cátedras, titularidades, jefaturas de servicio), para mejorar nuestras condiciones económicas (sexenios), para poder mantener el trabajo (becas, ayudas a la investigación) y, por qué no decirlo, para obtener un reconocimiento en la comunidad científica, que, además de mejorar nuestro *curriculum vitae*, de paso complace nuestro ego, ya que un número importante de publicaciones científicas en revistas con factor de impacto elevado produce un reconocimiento que puede generar invitaciones a congresos, reuniones científicas, asesoramiento de nuevos proyectos de investigación, etc. La publicación científica ahora se ha convertido en un medio de conseguir otras cosas, de cubrir necesidades y de autopromoción, ya sea personal o colectivo.

3. El negocio que se ha desarrollado alrededor de las publicaciones científicas. Llegó Internet y “con ella llegó el escándalo”

Con la llegada de Internet, en los últimos años del pasado siglo XX, se produjo una verdadera revolución en el campo de las publicaciones científicas. Los autores podían enviar sus artículos por correo electrónico primero y después utilizando unos programas de edición específicos que permitió acortar notablemente el proceso de publicación de los artículos. Además, las revistas ya podían publicar sus artículos “online” y poco a poco todas fueron añadiendo una edición digital a su formato tradicional en papel, que coexiste aún hoy, al menos en las de más prestigio: *The New England Journal of Medicine*, *The Lancet*, *Nature*, *Science*, *Annals of Internal Medicine*, *The American Journal of Medicine*, por solo nombrar algunas en el campo de la Medicina Interna. Lo mismo ha ocurrido en nuestro país con Revista Clínica Española o Medicina Clínica. Pero junto a estas revistas “clásicas” se ha desarrollado todo un mundo de nuevas revistas que tienen dos hechos en común: son todas digitales (es decir, solo se publican “online”, no tienen versión en papel) y, por otra parte, se han adherido al formato “open access” o acceso abierto. Este formato significa que los lectores tie-

nen acceso completo y gratuito a los artículos que publican las revistas que se han sumado a este movimiento. Algunas de estas revistas con este nuevo formato han alcanzado un notable prestigio, desplazando incluso a revistas clásicas con “pedigrí y solera”. Así, por ejemplo, la revista *PLOS One*, ha alcanzado un factor de impacto importante que la sitúa en el primer cuartil en el campo de la Medicina Interna. Pero ahora el mantenimiento de esta forma de publicar los artículos científicos lo realizan los investigadores, **quienes tienen que pagar** por publicar sus artículos.

Efectivamente, hemos llegado a un punto en este mundo de las publicaciones científicas en el que, si queremos publicar un artículo debemos elegir entre una revista “clásica” que se publique en formato tradicional en papel y “online” que no cobra a los autores, pero que cobra el acceso a los lectores, ya sea por suscripciones personales o a instituciones, o una revista solo “online” en formato de acceso abierto (*open access*), a la que podrán acceder libremente todos los lectores, pero por lo que el autor deberá pagar una cantidad importante de dinero. Hemos pasado del “publicar o morir” a “pagar por publicar” (y si no también morir).

4. Las invitaciones diarias a que publiquemos en estas revistas. El fraude que se ha generado alrededor de ellas. ¿Y quién paga estas facturas?

Todos aquellos que hayamos publicado un artículo en una revista con factor de impacto en los últimos 5 años estamos continuamente recibiendo correos electrónicos de nuevas revistas que acaban de crearse, que tienen en común que “están francamente admirados de nuestro artículo previo” (del que obtuvieron el correo electrónico para dirigirse a nosotros), nos invitan a que les enviemos una actualización o nueva versión del mismo y finalmente nos informan de que el proceso de publicación será muy breve, incluso en menos de un mes en algunas invitaciones, eso sí con un costo que nunca está por debajo de los 1.500 €. En ocasiones, la invitación viene generosamente “implementada” con la invitación a formar parte del comité editorial de la revista, que por lo general, no está indexada en Scopus, ni siquiera en Google Académico y mucho menos en JCR, aunque es cierto que existen algunas excepciones al respecto. Algunas de estas revistas tratan de engañar a sus potenciales clientes calculando su propio “factor de impacto”, que no es el obtenido en JCR, porque no está incluida en el mismo, sino calculándolo ellos mismos a partir de Google Académico, explicado con un asterisco y una letra de pequeño tamaño, casi ilegible, al final.

Pero como lo que se trata es de publicar al precio que sea (nunca mejor dicho), el resultado final es que el negocio que han creado todas estas revistas lo financian los investigadores, inmersos en su vertiginoso círculo de tener que publicar para poder competir. Y la mayor parte de este dinero proviene de organismos públicos: universidades, institutos de investigación, servicios auto-

nómicos de salud, hospitales, fundaciones, etc., quienes han tenido que incluir en sus presupuestos nuevas partidas que incluyan el pago de los artículos que los investigadores generan. De una manera torticera, los organismos públicos e instituciones sanitarias están manteniendo con el dinero de los impuestos a todas estas revistas científicas y a las editoriales que están detrás de este negocio, ya sea pagando los artículos de sus investigadores, o pagando las suscripciones de las revistas para sus bibliotecas, las cuales no son precisamente económicas⁸. De una forma u otra, las editoriales siempre ganan porque su negocio estará siempre financiado por fondos públicos.

Dicho de otra manera: los organismos públicos pagan a los investigadores y la investigación que producen, ya sea directamente o como becas o subvenciones. Para publicar el resultado de esta investigación se debe pagar a una revista, que, o bien cobra por hacerlo y después permite que se lea en formato abierto (*open access*) o bien no cobra por publicarlo pero lo hace para poder leerlo en forma de suscripción. De una forma u otra, todos los organismos públicos y los investigadores están trabajando para las editoriales.

Por último, no debemos olvidar que en algunas ocasiones se han detectado casos de fraudes. Se trata de revistas inexistentes, como comprueban *a posteriori* los investigadores una vez que han remitido el pago, sin obtener nada a cambio.

Una propuesta que permitiría ahorrar millones de euros a nuestro país

Proponemos la creación de una revista científica española, que publique sus artículos científicos en español e inglés exclusivamente en versión digital, (ecológicamente es muy conveniente) constituida por un equipo editorial de reconocido prestigio, que cuente con la colaboración de revisores cualificados y acreditados, a los que se podría considerar la posibilidad de retribuirles económicamente. Este equipo editorial debe velar por la veracidad y calidad de los artículos allí publicados con el fin de adquirir desde el principio un prestigio científico.

La revista sería completamente gratuita para los autores y los lectores, es decir, la publicación de los artículos y su acceso una vez publicados serían

completamente gratuitos. Para ello, esta revista debería ser financiada por fondos públicos y editada por una entidad de prestigio, ya sea un Ministerio o un Instituto de Investigación.

La creación, financiación y puesta en marcha de la revista debe completarse con un acuerdo nacional a todos los niveles de todas las administraciones públicas, centrales y autonómicas, para que los artículos publicados en esta revista digital sean debidamente considerados en todos los apartados que hemos enumerado a lo largo del artículo: acreditación por las agencias estatales y autonómicas, fundaciones, universidades, servicios autonómicos de salud, etc. Esto es esencial, ya que, de esta forma, los autores españoles ya tendrían la motivación para enviar sus artículos de calidad a la revista y el costo de mantener una publicación digital de estas características no superaría al mes la cantidad que las instituciones públicas pagan por 3 ó 4 publicaciones en revistas "de impacto" en acceso abierto.

El ahorro anual que se conseguiría en toda España sería de varios millones de euros. ¿Es que no vale la pena intentarlo?

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

Bibliografía

1. Watson JD, Crick FHD. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953;171(4356):737-8.
2. Fleming A. On the specific antibacterial properties of penicillin and potassium tellurite. Incorporating a method of demonstrating some bacterial antagonisms. *J Pathol Bacteriol*. 1932;35(6):831-42.
3. Garfield E. The history and meaning of the journal impact factor. *J Am Med Assoc*. 2006;295(1):90-3.
4. Sosa-Henríquez M, González-Macías J, Díez-Pérez A. ¿Qué es el factor de impacto bibliográfico? Su aplicación en el campo de metabolismo mineral óseo. *Rev Esp Enf Metab Oseas*. 1996;5(6):182-4.
5. Ranjan CK. Bibliometric indices of scientific journals: Time to overcome the obsession and think beyond the impact factor. *Med J Armed Forces India*. 2017;73(2):175-7.
6. Özcan M. Publish or perish, publish and perish. *J Adhes Dent*. 2014;16(2):103.
7. Torrie P, Berstock J, Hayward E, Bannister G. Publish or perish – How to avoid perishing. *Med Teach*. 2013;35(3):260.
8. Halperin E. Publish or perish and bankrupt the medical library while we're at it. *Acad Med*. 1999;74(5):470-2.

Presidente de la SEIOMM: Josep Blanch Rubio¹

Coordinador: Luis del Río Barquero²

Investigadores: José Manuel Olmos Martínez³, María José Montoya García⁴, Manuel Muñoz Torres⁵

1 Servicio de Reumatología - Unidad de Metabolismo Óseo - Hospitales Universitarios de la Esperanza y del Mar - Parque de Salud Mar - Unidad de Investigación en Fisiopatología Ósea y Articular (URFOA) - Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM) - Barcelona (España)

2 CETIR - Grupo Médico - Grupo Ascires - Barcelona (España)

3 Servicio de Medicina Interna - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL) - Universidad de Cantabria - Santander (España)

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

5 Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición - Hospital Universitario San Cecilio - Departamento de Medicina - Universidad de Granada - Instituto de Investigación Biosanitaria (IBS) - Granada (España)

Revisión de la evidencia científica sobre uso clínico del *Trabecular Bone Score* (TBS)

Posiciones oficiales de la SEIOMM (2018)

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2018000400008>

Introducción

La incorporación de nuevas aplicaciones tecnológicas en el campo médico conlleva un prolongado periodo de valoración de la evidencia científica que se va generando en el proceso de validación clínica.

En los últimos 5 años se han generado múltiples publicaciones, comunicaciones en congresos y reuniones de sociedades científicas. La aplicación del *Trabecular Bone Score* (TBS) ha recibido también la atención de la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (*The International Society for Clinical Densitometry* -ISCD-) que la ha incorporado a sus posiciones oficiales.

El concepto de Medicina Basada en la Evidencia (MBE) fue desarrollado por un grupo de internistas y epidemiólogos clínicos liderados por Gordon Guyatt, de la Escuela de Medicina de la Universidad McMaster de Canadá. El concepto de MBE fue definido por sus creadores como la utilización consciente, explícita y juiciosa de la mejor evidencia clínica disponible para tomar decisiones sobre el cuidado de los pacientes individuales. En esencia, el objetivo de la MBE es contar con la mejor información científica disponible, la evidencia, para aplicarla a la práctica clínica.

La Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM) iniciaba en 2014 un proyecto que facilitaba a sus socios la valoración del software TBS, mediante una convocatoria competitiva. El proyecto finalizó en 2017. Esta aplicación requiere imágenes de densitometría con DXA (Absorciometría Dual por Rayos X) de columna lumbar, y mediante el análisis de la textura de imagen ofrece información relacionada con la calidad microestructural del hueso trabecular. El pro-

yecto contó con el soporte logístico de Medimaps, desarrollador francés, que distribuyó 20 licencias de TBS entre los socios que propusieron su uso en determinados escenarios clínicos y terapéuticos.

De forma simultánea se valoró el rendimiento diagnóstico en el ámbito de la predicción de fracturas en sujetos con densidad ósea disminuida, la identificación de sujetos que han sufrido fracturas óseas y la evaluación de este nuevo parámetro en el seguimiento de los pacientes.

Con el objetivo de que SEIOMM alcance un posicionamiento global que pueda compartir con sus socios, varios expertos de la Sociedad han efectuado una revisión crítica de la evidencia científica existente sobre la aplicación clínica del TBS, que expondremos a continuación.

En función del rigor científico del diseño de los estudios, se valora su calidad usando escalas de clasificación jerárquica de la evidencia, a partir de las cuales se establecen recomendaciones respecto a la adopción de un determinado procedimiento médico o intervención sanitaria. Todas ellas tienen rasgos comunes. En este caso se ha utilizado la usada por la Red de Guías Intercolegiales Escocesas (*The Scottish Intercollegiate Guidelines Network* -SIGN-), ya que la propuesta por la Agencia de Evaluación de Tecnología Médica (*Agència d'Avaluació de Tecnologia Médica* -AATM-) de la *Generalitat* de Cataluña, que tiene en cuenta además del diseño de los estudios la valoración específica de su calidad, requiere de un volumen de evidencia científica creada a través de un periodo de tiempo más prolongado que permite generar un mayor número de publicaciones.

Tabla 1. Número de publicaciones que describen la técnica y su uso clínico desde 2008 hasta 2017 (aportada por gentileza de Medimaps)

Año	Número de publicaciones	Número acumulado de publicaciones
2017	107	290
2016	76	183
2015	39	107
2014	33	68
2013	20	35
2012	6	15
2011	5	9
2010	2	4
2009	1	2
2008	1	1

Las primeras publicaciones que describen la técnica y su uso clínico datan de 2009-2010. No es hasta 2013 donde se advierte un incremento notable en la penetración de la nueva técnica y la descripción de sus resultados (Tabla 1).

El interés por esta nueva aplicación para evaluación de la técnica DXA para estimación de calidad microestructural del hueso trabecular ha experimentado un incremento exponencial, como se puede observar en el gráfico de calidad de publicaciones (Figura 1).

Las principales instituciones científicas internacionales (la Sociedad Americana de Investigación Ósea y Mineral -*The American Society for Bone and Mineral Research* [ASBMR]-, la Fundación Internacional de Osteoporosis -*International Osteoporosis Foundation* [IOF]-, la ISCD) dedicadas al ámbito de las osteopatías metabólicas y en especial al manejo clínico de la osteoporosis han sido el principal destino de las presentaciones y publicaciones sobre el TBS (Figura 2).

La evaluación de los expertos propuestos por la SEIOMM ha seguido los criterios metodológicos de la escala SIGN (Tabla 2), en los que se indica el nivel de calidad de la evidencia científica y el grado de recomendación que en función de ella se ofrece a los lectores. Se ha efectuado una selección de las principales publicaciones relacionadas con los aspectos clínicos en los que el TBS puede influir.

El documento divide el proceso de revisión para dar debida respuesta a tres grandes cuestiones:

1. ¿Se puede utilizar el TBS para evaluar el riesgo de fractura en la práctica clínica?
2. ¿Se puede usar el TBS para el seguimiento de pacientes con osteoporosis?
3. ¿En qué patologías el TBS es especialmente útil?

Los expertos de la SEIOMM que han efectuado la revisión de la evidencia científica son la Dra. María José Montoya, el Dr. José Manuel Olmos Martínez y el Dr. Manuel Muñoz, coordinados por el Dr. Luis del Río.

Cuestiones y revisores designados

Revisor: Dr. José Manuel Olmos Martínez

1. Cuestión: ¿Se puede utilizar el TBS para evaluar el riesgo de fractura en la práctica clínica?

Propuesta del enunciado 1: El TBS puede utilizarse para valorar el riesgo de fractura vertebral, de fémur y fragilidad global en mujeres y hombres a partir de los 50 años.

Propuesta de enunciado 2: El TBS puede usarse junto con la densidad mineral ósea (DMO) para valorar la fragilidad vertebral, de fémur y global en hombres y mujeres a partir de los 50 años de edad.

Revisora: Dra. M^a José Montoya

2. Cuestión: ¿Se puede usar el TBS para el seguimiento de pacientes con osteoporosis?

Propuesta de enunciado 1: El TBS puede utilizarse para evaluar cambios en el tiempo.

Propuesta de enunciado 2: El TBS puede ser usada para valorar los efectos del tratamiento a lo largo del tiempo.

Revisor: Dr. Manuel Muñoz

3. Cuestión: ¿En qué patologías el TBS es especialmente útil?

Propuesta de enunciado 1: El TBS se puede utilizar para evaluar el riesgo de fractura en sujetos que padecen diabetes.

Propuesta de enunciado 2: El TBS se puede utilizar para evaluar el riesgo de fractura en sujetos tratados con glucocorticoides.

Propuesta de enunciado 3: El TBS se puede usar para la orientación clínica de sujetos que padecen hipo e hiperparatiroidismo.

Propuesta de enunciado 4: El TBS se puede usar para la orientación diagnóstica de pacientes en presencia de osteoartritis.

1. Cuestión: ¿Se puede utilizar el TBS para evaluar el riesgo de fractura en la práctica clínica?

Propuesta del enunciado 1: El TBS puede utilizarse para valorar el riesgo de fractura vertebral, de fémur y fragilidad global en mujeres y hombres a partir de los 50 años.

- Nivel de evidencia, 2++.

- Grado de recomendación, B.

Resumen: En el año 2013, Leslie *et al.*¹ realizaron un estudio retrospectivo de una cohorte de 29.407 mujeres de más de 49 años en las que evaluaron las relaciones existentes entre el TBS y los principales factores clínicos de riesgo de osteopo-

rosis. Estos autores, utilizando modelos de regresión lineal y regresión múltiple, demostraron que la existencia de un TBS bajo se asoció con el uso reciente de glucocorticoides, antecedentes de fracturas mayores previas, artritis reumatoide, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, consumo elevado de alcohol y un índice de masa corporal alto. Por el contrario, la terapia reciente contra la osteoporosis se asoció con una probabilidad significativamente menor de tener un TBS reducido. Por todo ello, los autores concluyeron que el TBS estaba fuertemente asociado con muchos de los factores de riesgo predictivos de fracturas osteoporóticas, que a su vez están incorporados en la herramienta FRAX® de la OMS (la herramienta FRAX® incluye los siguientes factores de riesgo clínicos: índice de masa corporal (IMC), fractura previa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (hábito tabáquico), uso de glucocorticoides >90 días, artritis reumatoide, osteoporosis secundaria y alto consumo de alcohol). Más recientemente, McCloskey *et al.*², tras el seguimiento de una cohorte de 33.352 mujeres de 40-99 años de la provincia canadiense de Manitoba, comprobó que el TBS seguía siendo un factor de predicción estadísticamente significativo de fracturas osteoporóticas principales, excluida la fractura de cadera (*hazard ratio*/desviación estándar -HR/DE- =1,18 [IC 95%: 1,12-1,24]), muerte (HR/DE=1,20 [IC 95%: 1,14-1,26]) y fractura de cadera (HR/DE=1,23 [IC 95%: 1,09-1,38]) tras el ajuste completo para los factores de riesgo incluidos en FRAX®. Estos autores³, en un metaanálisis en el que valoraron a 17.809 mujeres y hombres de 14 cohortes prospectivas, demostraron que, tras ajustar por el riesgo absoluto de fractura a 10 años que proporciona la herramienta FRAX®, el TBS seguía comportándose como un factor de riesgo independiente de fractura, principal y de cadera.

Propuesta de enunciado 2: El TBS puede usarse junto con la DMO por área (DMOa) para valorar la fragilidad vertebral, de fémur y global en hombres y mujeres a partir de los 50 años de edad.

- Nivel de evidencia, 2++.
- Grado de recomendación, B.

Resumen: En un estudio retrospectivo de casos y controles que valoraba el rendimiento diagnóstico (sensibilidad y especificidad) del TBS, de la DMO y de ambas técnicas⁴, se demostró que la presencia de un TBS y una DMOa bajos se asociaba con la presencia de fracturas de forma más potente que cuando solo está disminuida la DMOa. Así, el área bajo la curva (AUC) obtenida a partir de las curvas ROC fue en el primer caso (TBS y DMOa bajos) de 0,732 frente a 0,614 ($p=0,005$) cuando solo estaba baja la DMOa, siendo las *odds ratio* (OR) de 2,49 (IC 95%: 1,86-3,47) frente a 1,54 (IC 95%: 1,17-2,03), respectivamente. Por otra parte, del Río *et al.*⁵ encontraron que la combinación de TBS y DMO en columna lumbar mejoraba la predicción del riesgo de fractura del tercio superior de fémur. Estos autores comprobaron también que, tras ajustar por la edad, la DMO lumbar y el TBS mantenían su capacidad para dis-

criminar significativamente las fracturas transcervicales (OR=1,94 [IC 95%: 1,35-2,79]; y 1,71 [IC 95%: 1,15-2,55]), respectivamente. Por otra parte, Leib *et al.*⁶ han obtenido resultados consistentes en una cohorte más grande de mujeres estadounidenses caucásicas no hispanas ($n=2.165$). De hecho, después de ajustar según la edad, el peso, la DMO, el tabaquismo y los antecedentes familiares y maternos de fractura, el TBS siguió siendo un factor predictivo significativo de fractura, siendo la OR de 1,28 (IC 95%: 1,13-1,46). El modelo que combina TBS y DMO aumentó la asociación con la fractura en un 10%, como lo expresa un aumento en las probabilidades del 38% (OR=1,38 [IC 95%: 1,23-1,55]). En otro estudio llevado a cabo en un reducido número de mujeres la combinación de TBS y DMO columna lumbar (OR=2,39 [IC 95%: 1,70-3,37]) mejoró la predicción del riesgo de fractura en un 25%. Hans *et al.*⁷, demostraron que la combinación de la medición de DMO en cualquier región de interés (columna lumbar, cuello femoral o cadera total) con el TBS mejoró significativamente la predicción de fracturas en comparación con la DMO o el TBS en solitario ($p<0,0001$). Briot *et al.*⁸, finalmente, mostraron que, para la predicción de fracturas vertebrales, la combinación de TBS y DMO de columna lumbar aumentó el rendimiento en relación con el uso aislado de la DMO en columna lumbar (*Net Reclassification Improvement* -NRI- =8,6%, $p=0,046$). Por ello, la determinación del TBS se ha incorporado recientemente a los factores que utiliza la herramienta FRAX® para calcular el riesgo de fractura osteoporótica, lo que parece mejorar la capacidad predictiva de este instrumento de valoración del riesgo absoluto de fractura⁹.

2. Cuestión: ¿Se puede usar el TBS para el seguimiento de pacientes con osteoporosis?

Propuesta de enunciado 1: El TBS puede utilizarse para evaluar cambios en el tiempo.

- Nivel de evidencia, 2+.
- Grado de recomendación, C.

Propuesta de enunciado 2: El TBS puede ser usada para valorar los efectos del tratamiento a lo largo del tiempo.

Tras la revisión de la evidencia la propuesta del enunciado 2: el TBS no mejora el seguimiento de la DMO en la valoración de efectos del tratamiento a lo largo del tiempo.

- Nivel de evidencia, 2++.
- Grado de recomendación, B.

Resumen: Para que un método de medición sea útil en el seguimiento de los pacientes debe disponer de una buena precisión y que los cambios influidos por una situación patológica o derivada por un tratamiento sea igual o superior al cambio mínimo significativo (CMS). Varios estudios han evaluado la precisión de las mediciones del TBS y han sido comparadas con las mediciones de DMO en los mismos sistemas de medición por DXA. El primer estudio sobre la precisión del TBS fue realizado por Hans *et al.*⁷ que evaluaron a 92 pacientes de la base

de datos del estudio Manitoba, incluyendo a mujeres de ≥ 50 años de edad (51 realizadas el mismo día y 41 restantes realizadas a los 28 días). La precisión de la medición fue buena con un coeficiente de variación de 2,1%. Otros cinco estudios encontraron resultados similares^{8,10-13}. En general, la precisión del TBS (1,1-2,1%) fue comparable a la precisión de las mediciones de DMO (0,9-1,7%), y no hubo diferencias significativas entre los distintos dispositivos DXA. Con un intervalo de confianza del 95%, el CMS del TBS es del 3,0-5,8%. Todos estos estudios incluían solo a mujeres. En un estudio más reciente de Krueger *et al.*¹⁴ se incluyó a un gran número de hombres y se encontraron resultados similares. De 90 mujeres y 90 hombres evaluados en un iDXA GE-Lunar por 3 operadores diferentes, la precisión del mismo día fue del 1,4% para el TBS y del 1,9% para la DMO de columna lumbar, sin diferencias significativas entre sexos.

Adicionalmente a una buena precisión, una medida útil en el seguimiento de los pacientes con el tratamiento o derivado de la situación patológica requiere que el cambio sea de suficiente magnitud para ser detectado. Varios estudios transversales han demostrado una disminución significativa en el TBS con la edad.

En un estudio de 5.942 mujeres caucásicas francesas¹¹ se encontró una disminución lineal del 14,5% en el TBS entre los 45 y los 85 años de edad. El 8,5% de esta pérdida ocurría a partir de los 65 años. De manera similar, se observó una disminución del 16% en el TBS en 619 mujeres caucásicas de entre 45 y 90 años¹⁵. En un estudio sobre 3.069 mujeres japonesas de 45-80 años de edad se detectó una disminución del 19% en el TBS¹⁶. En 518 mujeres afroamericanas de 50-80 años de edad se apreciaba una disminución menos pronunciada en el TBS del 4,6%¹⁷. El estudio longitudinal más importante por el tamaño de la muestra basado en la base de datos de Manitoba encontró una disminución significativa de $0,31 \pm 0,06\%$ por año en el TBS durante un seguimiento promedio de 3,7 años, similar a la disminución de $0,36 \pm 0,05\%$ por año observada en la DMO de columna lumbar en pacientes no tratados¹⁸.

Actualmente, existen varios tipos de fármacos eficaces y seguros para el tratamiento de la osteoporosis y en los estudios revisados para la redacción de este documento se evaluaron uno o varios de estos tratamientos. Se ha analizado el TBS en 12 estudios en pacientes tratados con bisfosfonatos, en 5 de ellos con denosumab, en 7 con terapia anabólica (teriparatida), en 2 con vitamina D, y en 1 con testosterona. La terapia con bisfosfonatos se asoció, en 8 de los estudios, con un cambio del TBS significativamente mayor comparado con los controles no tratados¹⁹⁻²⁶. Sin embargo, en 2 estudios este hecho no pudo ser comprobado, pero hay que señalar que en uno de ellos se trataba de pacientes con osteoporosis inducida por glucocorticoides³¹, y el otro fue realizado en pacientes sometidos a trasplante hepático reciente²⁴. En un estudio de cohorte retrospectivo, amplio en cuanto al número de sujetos, llevado a cabo por Krieg *et al.*, se compararon los cambios de TBS en 534 mujeres postme-

nopáusicas tratadas (con un cumplimiento superior al 75%) o bien con bisfosfonatos (86%), raloxifeno (10%) o calcitonina (4%); frente a 1.150 mujeres no tratadas. Durante el seguimiento, con un promedio de 3,7 años, se comprobó que el TBS aumentó en las mujeres tratadas en un 0,2%/año, mientras que disminuyó en las mujeres no tratadas en un 0,3%/año (cambios que fueron estadísticamente significativos frente al valor inicial)²⁸. Uno de los estudios más relevantes que analiza el efecto de bisfosfonatos sobre el TBS es el realizado por Leslie *et al.*, en una cohorte retrospectiva. Este trabajo es importante por el elevado número de sujetos incluidos (5.083 mujeres tratadas, mayoritariamente con bisfosfonatos -80%, y 3.961 mujeres sin tratamiento antiosteoporótico) y por el largo periodo de seguimiento (media de 4,1 años). Estos autores encontraron mayores ganancias en TBS en las mujeres con mayor adherencia a la medicación para la osteoporosis (-1,2% cambio en TBS para pacientes no tratadas, frente a +0,8% cambio para pacientes tratadas, con alto índice de adherencia al tratamiento ($>0,8$; p para la tendencia $<0,001$). A pesar de ello, y teniendo en cuenta que el objetivo principal de este estudio era investigar si el cambio en TBS afectaba de forma independiente al riesgo de fractura, no se pudo comprobar este hecho, concluyéndose que el cambio en el TBS no es un indicador útil del riesgo de fractura²³.

Los cambios del TBS con bisfosfonatos son en general de escasa magnitud. Un ensayo clínico que evaluó el efecto del ácido zoledrónico (a dosis superiores a las utilizadas en la enfermedad osteoporótica) *vs.* placebo en mujeres premenopáusicas con cáncer de mama, ha señalado mayores incrementos de TBS a los 2 años (de 2,41%, frente a -2,16% del grupo placebo)²².

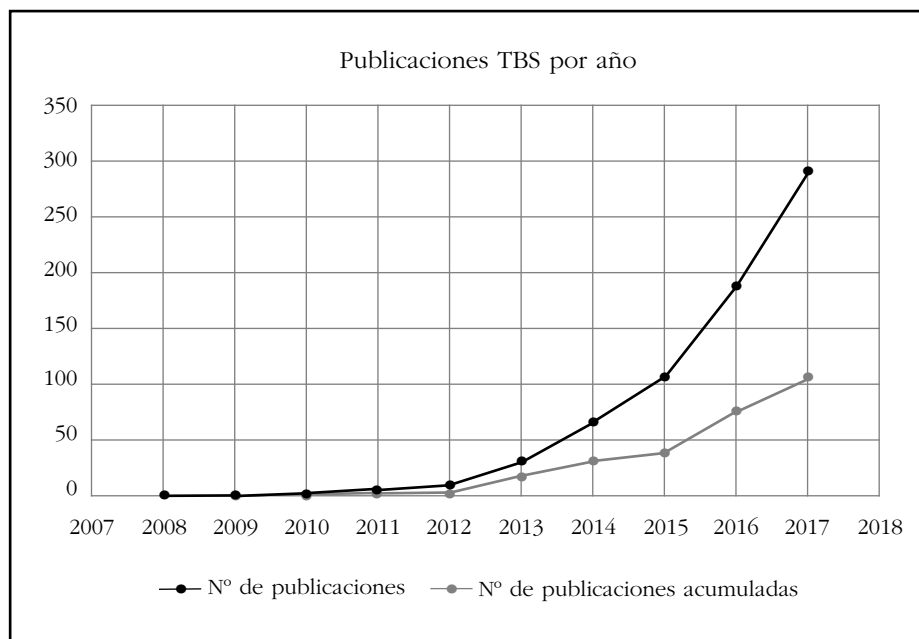
La medicación anabólica también se asoció a aumentos significativos en TBS de manera consistente en 4 estudios^{19,20,31,34} y en algunos casos este efecto se describe tan precozmente como a los 3 meses de iniciado el tratamiento con teriparatida²⁷. Estos cambios son de mayor magnitud a los señalados para los bisfosfonatos. El incremento del TBS se ha comprobado, tanto en un estudio longitudinal abierto de pacientes con osteoporosis primaria¹³, como en un subanálisis de un ensayo clínico de pacientes con osteoporosis por corticoides, en el que se comparó el efecto de teriparatida *vs.* alendronato²⁰. En este último, se demuestra, además, un mayor ascenso en el TBS en el grupo con terapia anabólica, llegando a ser de 3,6% a los 36 meses frente al valor basal, en la rama de teriparatida. En el ensayo clínico DATA-Switch, Tsai *et al.*, señalaron que al final de los 48 meses de tratamiento se incrementa el TBS en un valor medio de 5,1, 3,6 y 6,1% con la terapia secuencial teriparatida-denosumab, denosumab-teriparatida o combinada de ambos, respectivamente³³. En esta misma línea, si bien se trataba de un estudio abierto de dos años de duración, Senn *et al.*, compararon cambios del TBS en 65 pacientes tratados con teriparatida *vs.* 122 tratados con ibandronato, llegando a demostrar que los pacientes tratados con teriparatida tuvieron un

aumento del 4,3% en el TBS ($p < 0,001$ frente al valor inicial) y significativamente superior al observado en el grupo en tratamiento con ibandronato (0,3%)¹³. Por el contrario, solo un estudio, con escasa potencia estadística (solo 14 sujetos), que valoró el TBS en pacientes con fracturas atípicas y tratamiento con teriparatida, no observó cambios significativos en este índice³⁴.

Otros trabajos de investigación que utilizaron como terapia antirresortiva denosumab, también informaron de mejoría significativa en el TBS^{19,29,32,33}. Recientemente, McClung *et al.*, compararon el TBS y la DMO en 157 mujeres postmenopáusicas en tratamiento con denosumab frente a 128 mujeres con placebo, en un subanálisis de pacientes del ensayo clínico FREEDOM. En el grupo de denosumab se observaron aumentos progresivos desde el inicio a los 12, 24 y 36 meses para el TBS (1,4, 1,9 y 2,4%, respectivamente). Los cambios porcentuales en TBS fueron estadísticamente significativos en comparación con el valor inicial y el placebo, además de ser, en gran parte, independientes de la DMO y de los cambios de ésta, inducidos tanto por el tiempo como por el efecto del tratamiento³². Incrementos del TBS de mayor magnitud también han sido señalados en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis corticoidea tras un año de tratamiento con denosumab, alcanzando una media de incremento en el TBS del 5%²⁶.

Curiosamente, los cambios del TBS también se han utilizado para evaluar el efecto del cambio de uno a otro tratamiento. En este sentido, Ebina *et al.*²⁰, en un estudio observacional no aleatorizado, encontraron en mujeres con artritis reumatoide y tratamiento corticoideo que el cambio de tratamiento de bisfosfonatos a teriparatida producía un aumento del TBS mayor que el cambio a denosumab (2,1 *vs.* -0,7%). Además, el cambio a teriparatida consiguió una elevación en el TBS significativamente superior al obtenido en el grupo que continuó con bisfosfonatos (2,1 *vs.* -1,8%)²⁰. Del mismo modo, Tsai *et al.* encontraron, tras 48 meses de seguimiento en un subanálisis de un ensayo clínico, que el cambio de teriparatida a denosumab aumentó el TBS con una magnitud mayor a como lo hizo el cambio de denosumab a teriparatida (5,8 *vs.* 3,6%, respectivamente)³³.

Figura 1. Número de presentaciones y publicaciones sobre TBS presentadas en el periodo 2008-2017 (aportada por gentileza de Medimaps)



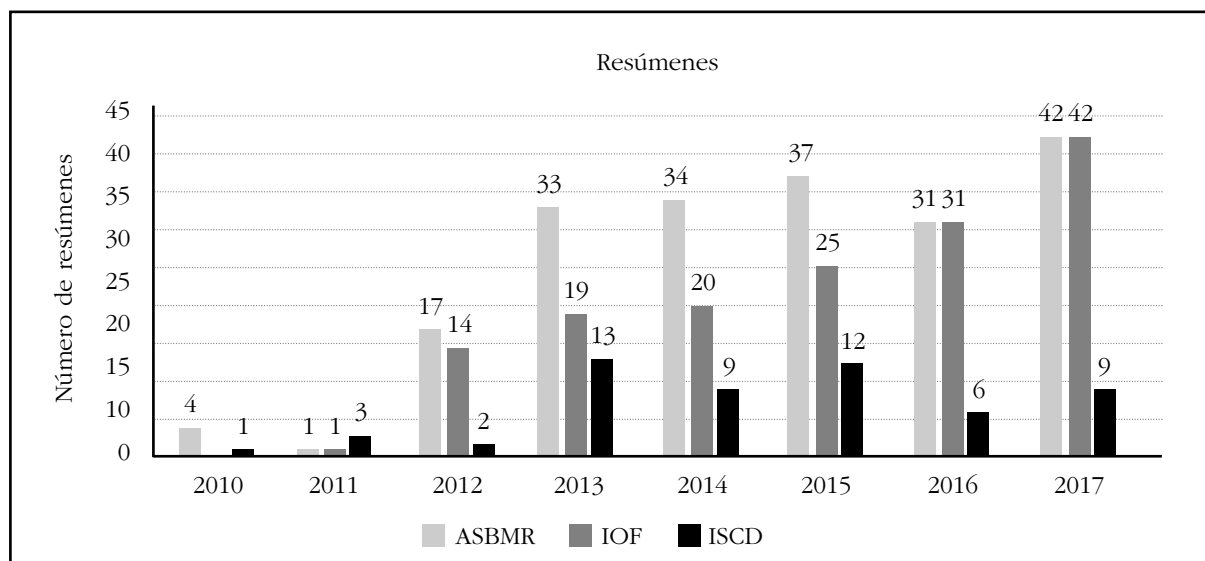
Menos consistentes han sido los cambios en el TBS inducidos en pacientes por el tratamiento con calcio y vitamina D. En un estudio realizado en 87 pacientes seguidos durante 24 meses los resultados de TBS mostraron valores más altos en comparación con los pacientes que no habían recibido tratamiento¹⁹. Sin embargo, estos resultados no se replicaron en un ensayo clínico que comparó los efectos sobre el TBS de dosis baja y dosis alta de colecalciferol frente a placebo, tras 12 meses, en 230 mujeres postmenopáusicas²¹.

El efecto del tratamiento con testosterona sobre el TBS sólo ha sido evaluado en un estudio llevado a cabo en un grupo pequeño de pacientes varones con déficit de testosterona y con tratamiento sustitutivo, comprobándose un incremento significativo del 5% a los 24 meses¹⁹.

En la mayoría de los estudios revisados se ha comprobado que la relación de los valores del TBS y de la DMO era escasa, y tras el tratamiento con los distintos fármacos antiosteoporóticos los cambios inducidos en la DMO eran netamente superiores a los obtenidos con el TBS, llegando a perderse la relación entre ambos parámetros. Esta situación es especialmente llamativa en el tratamiento con bisfosfonatos.

Gran parte de la evidencia científica revisada pone de manifiesto que el TBS aporta un valor complementario y en gran parte independiente a las mediciones de DMO, por lo que no cabe esperar que la respuesta a los cambios óseos por un tratamiento antiosteoporótico sean similares. Los cambios óseos con el TBS son especialmente modestos en el tratamiento con bisfosfonatos, manteniéndose en muchos casos por debajo del CMS. Ello ha llevado a la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (ISCD) a no recomendar el TBS en la monitorización de la respuesta al tratamiento de la osteoporosis con bisfosfonatos^{35,36}.

Figura 2. Resúmenes sobre el TBS presentados a congresos de las ASBMR, IOF, ISCD (aportada por gentileza de Medimaps)



3. Cuestión: ¿En qué patologías el TBS es especialmente útil?

Propuesta de enunciado 1: El TBS se puede utilizar para evaluar el riesgo de fractura en sujetos que padecen diabetes.

- Grado evidencia, 2+.

Resumen: Los pacientes con diabetes tipo 2 (DM2) presentan paradójicamente una mayor DMO y un mayor riesgo de fracturas por fragilidad. En 8 estudios se ha demostrado que, aunque la DMO tiende a ser más alta en los diabéticos de tipo 2 que en los no diabéticos, el TBS tiende a ser más bajo en los diabéticos de tipo 2 que en los no diabéticos.

Un estudio de casos y controles transversales realizado por Dhaliwal *et al.*³⁷, comparó a 57 mujeres con diabetes tipo 2 con 43 mujeres sin ella. El TBS fue menor y la DMO mayor entre los diabéticos ($p=0,001$ y $0,01$, respectivamente). Por otra parte, el TBS fue menor ($p=0,01$) y la DMO no mostró diferencias significativas en los diabéticos con un control glucémico deficiente en comparación con aquellos con un buen control glucémico (A1c anterior $<7,5\%$). Estos datos se confirmaron en un estudio más grande³⁸ que incluyó 1.229 hombres y 1.529 mujeres postmenopáusicas mayores de 50 años de la cohorte Ansong coreana. El TBS en columna lumbar fue significativamente más bajo en mujeres y hombres con diabetes que en mujeres y hombres no diabéticos, mientras que la DMO de la columna lumbar fue significativamente mayor en sujetos con diabetes. Otros estudios recientes de casos y controles confirmaron estos hallazgos, en 131 pacientes diabéticos y 265 controles³⁹ y en 88 pacientes diabéticos y 88 controles⁴⁰. Holloway *et al.*⁴¹ observaron la misma tendencia en sujetos con normoglicemia, pacientes con glucemia basal en ayunas (GBA) elevada y pacientes diabéticos. Los pacientes diabéticos o con GBA elevada tenían una DMO más alta en columna lumbar y un menor TBS que los pacientes con normoglicemia⁴¹.

Iki *et al.*⁴² observaron una DMO significativamente más alta en hombres con diabetes en comparación con los controles pero no observaron diferencias significativas en el TBS. Los niveles de glucemia en ayunas, HbA1c y HOMA-IR (índice *homeostasis model assessment*) se correlacionaron significativamente de forma inversa con el TBS después de ajustar por la edad, el IMC y la DMO. El análisis de regresión lineal multivariante reveló que los índices de glucemia (GBA y HbA1c) se asociaron significativamente con un aumento de la DMO y un TBS disminuido, y que la evaluación de la resistencia a la insulina mediante el modelo HOMA solo se asoció con el TBS. Estas asociaciones no se modificaron después del ajuste adicional para los marcadores de recambio óseo y niveles de pentosidina. Estos datos se confirmaron en un estudio de población coreana (894 controles y 325 pacientes diabéticos) donde el TBS también se correlacionó negativamente con GBA, HbA1c y HOMA-IR.

Leslie *et al.*⁴³ incluyeron en un estudio a 29.407 mujeres canadienses de edad igual o superior a 50 años con exploraciones DXA de referencia, de las cuales 2.356 habían sido diagnosticadas de diabetes. Después del ajuste para los factores de riesgo clínicos, se encontró que las mujeres diabéticas tenían más probabilidades de situarse en el tercil inferior del TBS lumbar, pero eran menos propensas a estar en los terciles más bajos de la DMO de columna lumbar, cuello de fémur o de área total de fémur. Los valores del TBS fueron un predictor de fracturas incidentes independiente de la DMO.

Además, Zhukouskaya *et al.*⁴⁴ evaluaron cómo las variables TBS y DMO podrían ser útiles para identificar fracturas vertebrales (FxV) en una cohorte de 99 pacientes (mujeres postmenopáusicas) con diabetes tipo 2 bien compensada (T2D). Compararon estas pacientes con T2D con 107 sujetos control sin T2D. Encontraron que las pacientes con DM2 tenían una mayor prevalencia de FxV en comparación con los controles (34,3 vs. 18,7%, $p=0,01$). El TBS no fue dife-

rente entre los pacientes diabéticos tipo 2 bien compensados y los controles, pero curiosamente, el TBS estaba disminuido en pacientes con DM2 y fracturas.

Por otro lado, Bonaccorci *et al.*⁴⁰ compararon posibles predictores de fracturas en un grupo de 80 mujeres con DM2 y 88 controles, y mostraron que el TBS (AUC=0,71) y el FRAX® ajustado para el TBS (AUC=0,74) fueron los únicos parámetros estadísticamente significativos en el grupo diabético, a diferencia de la DMO y el análisis estructural del fémur. Finalmente, Choi *et al.*⁴⁵, en un estudio realizado con 169 mujeres postmenopáusicas coreanas con DM2, encontraron un TBS significativamente menor ($p=0,008$) y una puntuación de FRAX® ajustada por el TBS más alta ($p=0,019$) en el grupo con FxV en comparación con el grupo sin FxV. Por el contrario, no hubo diferencias significativas en la DMO y las puntuaciones originales de FRAX® entre los 2 grupos. El TBS (OR=1,8 [IC 95%: 1,1-2,7], $p=0,011$) y la puntuación FRAX® ajustada por el TBS (OR=2,0 [IC 95%: 1,1-3,5], $p=0,020$) mostraron unas OR estadísticamente significativas para FxV. El TBS y la FRAX® ajustada por TBS podrían ser herramientas suplementarias para discriminar fracturas osteoporóticas en DM2.

Propuesta de enunciado 2: El TBS podría ser útil para evaluar el riesgo de fractura en sujetos tratados con glucocorticoides o hipercortisolismo endógeno.

- Grado evidencia, 2+.

Resumen: Los glucocorticoides (GC) producen una pérdida ósea rápida y un aumento en el riesgo de fractura que no puede ser explicado completamente por cambios en la DMO. Leslie *et al.*⁴⁶ investigaron los factores de riesgo clínicos asociados con el TBS. Entre 29.407 mujeres de la cohorte de Manitoba con exploraciones con DXA de columna lumbar, 1.213 tenían antecedentes de uso reciente de GC. Encontraron que la probabilidad de un valor de TBS reducido está aumentada en los sujetos con uso reciente de GC tras ajustar por la DMO (OR=1,67 [IC 95%: 1,40-1,99]). Por otra parte, Leib *et al.* y Paggiosi *et al.*^{47,48} mostraron que el TBS disminuye en sujetos tratados con glucocorticoides y que el TBS es más sensible que la DMO en estos sujetos. En su estudio, Paggiosi *et al.*⁴⁸, que evaluaron a 484 mujeres (edad media $67\pm 7,5$ años) de las cuales 64 habían tomado prednisolona (dosis media de $7,2\pm 3,2$ mg/día, duración media de $9,2\pm 10,8$ años), encontraron que los sujetos con GC presentaban una disminución significativa del TBS en comparación con las mujeres sin tratamiento previo con GC, y no hubo diferencias en la DMO de columna lumbar. Estos resultados fueron corroborados en un estudio a mayor escala por Leib *et al.*⁴⁷. Este estudio involucró a 1.520 hombres y mujeres con edad igual o superior a 40 años. Entre ellos, 416 sujetos que recibieron GC (dosis ≥ 5 mg/día, durante ≥ 3 meses) se compararon con 1.104 sujetos de control ajustados por similares sexo, edad e IMC. Los autores demostraron una disminución significativa del TBS ($p<0,001$) en comparación con los controles, mientras que no se observó cambio en la DMO de la columna lumbar ($p=0,88$). Además, observaron disminuciones en el TBS más pronunciadas en varones frente a mujeres. Finalmente, obser-

varon que esta alteración del TBS era aún más pronunciada cuando se comparó los sujetos con GC y con fractura con los sujetos con GC sin fractura ($p<0,01$), o al compararlos con los controles ($p<0,001$). Este estudio mostró que el TBS se asoció con la presencia de fractura con una OR de 1,51 [IC 95%: 1,23-1,86] por DE de disminución en el TBS y un AUC de 0,648 [IC 95%: 0,599-0,693]. Un pequeño estudio reciente de Chuang *et al.*⁴⁹ confirmó estas tendencias en 30 pacientes que recibieron terapia con GC durante 24 meses y en 16 sin ella. Los resultados mostraron una disminución significativa en el cambio porcentual en el TBS para la columna lumbar y una probabilidad mayor de fractura estimada por FRAX® ajustada por el TBS.

Una de las formas endógenas de la osteoporosis inducida por glucocorticoides (OIG) es la presencia de incidentaloma suprarrenal (IS), que puede inducir hipercortisolismo subclínico y aumentar el riesgo de fractura. En una cohorte de 102 pacientes⁵⁰, los autores establecieron que los sujetos con IS tenían valores de TBS significativamente más bajos que los controles. Es destacable que los pacientes con hipercortisolismo subclínico ($n=34$) exhibieron un TBS significativamente menor que aquellos sin hipercortisolismo subclínico, expresado por un *Z-score* del TBS de $-3,18\pm 1,21$ vs. $-1,70\pm 1,54$ ($p<0,0001$), a pesar de contar con un *Z-score* de la DMO normal en columna vertebral y fémur. Finalmente, el TBS lumbar fue un predictor de fracturas incidentes en un promedio de 40 meses de seguimiento, independientemente de la edad del paciente, el IMC y la DMO de columna lumbar. Sin embargo, Belaya *et al.*⁵¹ encontraron en una población de 182 pacientes con hipercortisolismo subclínico que solo el nivel de cortisol libre en orina de 24 h (24hUFC) fue el único predictor de fractura. Estos autores observaron valores bajos del TBS en su población (puntuación promedio de *Z-score* del TBS= $-1,86$), mientras que la disminución de la DMO fue menor que la puntuación promedio de *Z-score* de la DMO= $-1,60$).

Propuesta de enunciado 3: El TBS puede ser útil en la evaluación clínica de los pacientes con hiperparatiroidismo primario.

- Grado evidencia, 2+.

Resumen: En el hiperparatiroidismo primario (HPTP), las fracturas vertebrales (FxV) ocurren independientemente de la DMO y pueden depender de la disminución de la calidad ósea.

En su estudio transversal, Romagnoli *et al.*¹² observaron un TBS significativamente más bajo en 73 mujeres postmenopáusicas con hiperparatiroidismo primario (29 de ellas con una fractura vertebral documentada) que en 74 controles de similar edad. Además, la presencia de fracturas vertebrales se asoció de forma independiente con la reducción de TBS (OR=0,003 [IC 95%: 0-0,534], $p=0,028$). En un estudio que incluyó tanto componentes transversales como longitudinales, Eller-Vainicher *et al.*⁵² compararon a 92 pacientes con hiperparatiroidismo primario (74 de ellos eran mujeres postmenopáusicas y 18 eran hombres mayores de 50 años) con los resultados de 98 controles reclutados simultáneamente en la clínica. En concordancia con el estudio

previo, el TBS fue menor en pacientes con hiperparatiroidismo primario que en los controles, y se asoció significativamente con fractura vertebral, incluso después del ajuste por edad, sexo, IMC y DMO de la columna lumbar (OR ajustada=1,4 [IC 95%: 1,1-1,9]). En la fase longitudinal del estudio, 20 pacientes con hiperparatiroidismo primario que se sometieron a una paratiroidectomía efectiva se compararon a los 24 meses de seguimiento con 10 pacientes tratados de forma conservadora. En el grupo de cirugía, la puntuación promedio del TBS aumentó en un 47% ($p < 0,01$). En las pacientes seguidas de forma conservadora el TBS disminuyó significativamente frente a las no fracturadas ($p < 0,048$).

Finalmente, Silva *et al.*⁵³ evaluaron la relación entre el TBS, la tomografía computarizada cuantitativa periférica de alta resolución (HRpQCT) y la resistencia ósea (mediante análisis de elementos finitos) en radio distal y tibia en 22 mujeres postmenopáusicas con hiperparatiroidismo primario leve. Encontraron que el TBS se correlacionó con la resistencia ósea completa y todos los índices de HRpQCT, excepto el grosor trabecular y la rigidez trabecular en el radio, mientras que el TBS se correlacionó con las densidades volumétricas, el grosor cortical, el volumen óseo trabecular y la resistencia ósea completa de la tibia. La conclusión fue que el TBS es un instrumento diagnóstico prometedor en la evaluación clínica de la microestructura trabecular en aquellos pacientes que padecen una forma más leve de hiperparatiroidismo primario.

En pacientes con HPTP asintomático, Diaz-Soto *et al.*⁵⁴ no encontraron diferencias significativas en el TBS al comparar pacientes normocalcémicos *vs.*

hipercalcémicos. Cipriani *et al.*⁵⁵ investigaron los cambios esqueléticos después de la restauración del estado euparatiroideo, y, a diferencia de Rolighed *et al.*⁵⁶, no encontraron cambios significativos en el TBS después de la paratiroidectomía en pacientes con HPTP. Sin embargo, encontraron un aumento significativo del TBS después de los 18 meses de tratamiento con parathormona recombinante (rhPTH) en pacientes hipoparatiroides.

Propuesta de enunciado 4: El TBS podría ser útil para valorar fragilidad ósea en pacientes con osteoartritis severa.

- Grado evidencia, 2+.

Resumen: La osteoartritis lumbar sobreestima la densidad ósea medida mediante DXA.

En estos estudios, se ha valorado el impacto de la osteoartritis de columna lumbar sobre el resultado del TBS basándose en una cohorte francesa de 390 mujeres de 50 años o más¹¹ y en una parte de la cohorte OPUS que incluía 727 mujeres postmenopáusicas de 55 años o más⁵⁷. En el estudio de Dufour *et al.*¹¹, se evaluó la presencia de osteoartritis usando la definición ISCD (una diferencia de más de 1 DE en el T-score entre dos vértebras adyacentes). En el estudio de Kolta *et al.*⁵⁷, utilizaron la clasificación de Kellgren y Lawrence (KL) basada en radiografías de la columna lumbar lateral. En ambos estudios se han observado diferencias significativas entre aquellos con y sin osteoartritis en la densidad mineral ósea medida por DXA. En el estudio de Kolta *et al.*, el aumento de DMO se correlacionó con la severidad de la osteoartritis (escala KL). Sin embargo, los valores de TBS no estuvieron influidos por la presencia de osteoartritis en ambos estudios^{11,57}.

Revisión de la evidencia científica sobre uso clínico del TBS: Posiciones oficiales de la SEIOMM

Resumen

1. Cuestión: ¿Se puede utilizar el TBS para evaluar el riesgo de fractura en la práctica clínica?

- El TBS puede utilizarse para valorar el riesgo de fractura vertebral, de fémur y fragilidad global en mujeres y hombres a partir de los 50 años.

[Nivel de evidencia, 2++. Grado de recomendación, B]

- El TBS puede usarse junto con la DMO para valorar la fragilidad vertebral, de fémur y global en hombres y mujeres a partir de los 50 años de edad.

[Nivel de evidencia, 2++. Grado de recomendación, B]

2. Cuestión: ¿Se puede usar el TBS para el seguimiento de pacientes con osteoporosis?

- El TBS puede utilizarse para evaluar cambios en el tiempo.

[Nivel de evidencia, 2+. Grado de recomendación, C]

- El TBS no mejora a la DMO en la valoración del efecto del tratamiento a lo largo del tiempo. No debe utilizarse en la valoración de respuesta a los bifosfonatos.

[Nivel evidencia, 2++. Grado de recomendación, B]

3. Cuestión: ¿En qué patologías el TBS es especialmente útil?

- El TBS se puede utilizar para evaluar el riesgo de fractura en sujetos que padecen diabetes.
- El TBS se puede utilizar para evaluar el riesgo de fractura en sujetos tratados con glucocorticoides.
- El TBS se puede usar para la orientación clínica de sujetos que padecen hipo e hiperparatiroidismo.
- El TBS se puede usar para la orientación diagnóstica de pacientes en presencia de osteoartritis.

[Nivel de evidencia, 2+]

Tabla 2. Niveles de evidencia y grados de recomendación de la Red de Guías Intercolegiales Escocesas (SIGN)

Niveles de evidencia científica	
1++	Metaanálisis de alta calidad, revisiones sistemáticas de ensayos clínicos o ensayos clínicos de alta calidad con muy poco riesgo de sesgo
1+	Metaanálisis bien realizados, revisiones sistemáticas de ensayos clínicos o ensayos clínicos bien realizados con poco riesgo de sesgos
1-	Metaanálisis, revisiones sistemáticas de ensayos clínicos o ensayos clínicos con alto riesgo de sesgos
2++	Revisiones sistemáticas de alta calidad de estudios de cohortes o de casos y controles. Estudios de cohortes o de casos y controles con riesgo muy bajo de sesgo y con alta probabilidad de establecer una relación causal
2+	Estudios de cohortes o de casos y controles bien realizados con bajo riesgo de sesgo y con una moderada probabilidad de establecer una relación causal
2-	Estudios de cohortes o de casos y controles con alto riesgo de sesgo y riesgo significativo de que la relación no sea causal
3	Estudios no analíticos, como informes de casos y series de casos
4	Opinión de expertos
Grados de recomendación	
A	Al menos un metaanálisis, revisión sistemática o ensayo clínico clasificado como 1++ y directamente aplicable a la población diana de la guía; o un volumen de evidencia científica compuesto por estudios clasificados como 1+ y con gran consistencia entre ellos
B	Un volumen de evidencia científica compuesta por estudios clasificados como 2++, directamente aplicable a la población diana de la guía y que demuestran gran consistencia entre ellos; o evidencia científica extrapolada desde estudios clasificados como 1++ ó 1+
C	Un volumen de evidencia científica compuesta por estudios clasificados como 2+ directamente aplicables a la población diana de la guía y que demuestran gran consistencia entre ellos; o evidencia científica extrapolada desde estudios clasificados como 2++
D	Evidencia científica de nivel 3 ó 4; o evidencia científica extrapolada desde estudios clasificados como 2+

Los estudios clasificados como 1- y 2- no deben usarse en el proceso de elaboración de recomendaciones por su alto potencial de sesgo.

Pauta de buena práctica

√1 Práctica recomendada, basada en la experiencia clínica y el consenso del equipo redactor

1. En ocasiones el grupo elaborador se percató de que existe algún aspecto práctico importante sobre el que se quiere hacer énfasis y para el cual no existe, probablemente, ninguna evidencia científica que lo soporte. En general estos casos están relacionados con algún aspecto del tratamiento considerado buena práctica clínica y que nadie cuestionaría habitualmente. Estos aspectos son valorados como puntos de buena práctica clínica. Estos mensajes no son una alternativa a las recomendaciones basadas en la evidencia científica, sino que deben considerarse únicamente cuando no existe otra manera de destacar dicho aspecto

Agradecimientos: A los colaboradores de Medimaps: Renaud Winzenrieth, Laureen Ferchaud, Marie-Emilie Mathieu, Doris Tran y Celine Gerard, por contribuir a iniciar el proyecto y que saliera adelante, por dar soporte económico, aún cuando no tenían clara la compensación; en fin, por todo su esfuerzo. También nuestro agradecimiento a Didier Hans, Director de Medimaps.

Bibliografía

1. Leslie WD, Krieg MA, Hans D; Manitoba Bone Density Program. Clinical factors associated with trabecular bone score. *J Clin Densitom.* 2013;16(3):374-9.
2. McCloskey EV, Odén A, Harvey NC, Leslie WD, Hans D, Johansson H, Kanis JA. Adjusting fracture probability by trabecular bone score. *Calcif Tissue Int.* 2015;96(6):500-9.

3. McCloskey EV, Odén A, Harvey NC, Leslie WD, Hans D, Johansson H, et al. A meta-analysis of trabecular bone score in fracture risk prediction and its interaction with FRAX. *J Bone Miner Res.* 2016;31(5):940-8.
4. Winzenrieth R, Dufour R, Pothuau L, Hans D. A retrospective case-control study assessing the role of trabecular bone score in postmenopausal Caucasian women with osteopenia: analyzing the odds of vertebral fracture. *Calcif Tissue Int.* 2010;86(2):104-9.
5. Del Rio LM, Winzenrieth R, Cormier C, Di Gregorio S. Is bone microarchitecture status of the lumbar spine assessed by TBS related to femoral neck fracture? A Spanish case-control study. *Osteoporos Int.* 2013;24(3):991-8.
6. Leib E, Winzenrieth R, Lamy O, Hans D. Comparing bone microarchitecture by trabecular bone score (TBS) in Caucasian American women with and without osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int.* 2014;95(3):201-8.
7. Hans D, Goertzen AL, Krieg MA, Leslie WD. Bone microarchitecture assessed by TBS predicts osteoporotic fractures independent of bone density: the Manitoba study. *J Bone Miner Res.* 2011;26(11):2762-9.
8. Briot K, Paternotte S, Kolta S, Eastell R, Reid DM, Felsenberg D, et al. Added value of trabecular bone score to bone mineral density for prediction of osteoporotic fractures in postmenopausal women: the OPUS study. *Bone.* 2013;57(1):232-6.
9. Martineau P, Leslie WD, Johansson H, Oden A, McCloskey EV, Hans D, et al. Clinical utility of using lumbar spine Trabecular Bone Score to adjust fracture probability: The Manitoba BMD cohort. *J Bone Miner Res.* 2017;32:1568-74.
10. Iki M, Tamaki J, Kadowaki E, Sato Y, Dongmei N, Winzenrieth R, et al. Trabecular bone score (TBS) predicts vertebral fractures in Japanese women over 10 years independently of bone density and prevalent vertebral deformity: the Japanese Population-Based Osteoporosis (JPOS) cohort study. *J Bone Miner Res.* 2014;29(2):399-407.
11. Dufour R, Winzenrieth R, Heraud A, Hans D, Mehsen N. Generation and validation of a normative, age-specific reference curve for lumbar spine trabecular bone score (TBS) in French women. *Osteoporos Int.* 2013;24(11):2837-46.
12. Romagnoli E, Cipriani C, Nofroni I, Castro C, Angelozzi M, Scarpicello A, et al. "Trabecular Bone Score" (TBS): an indirect measure of bone micro-architecture in postmenopausal patients with primary hyperparathyroidism. *Bone.* 2013;53(1):154-9.
13. Senn C, Günther B, Popp AW, Perrelet R, Hans D, Lippuner K. Comparative effects of teriparatide and ibandronate on spine bone mineral density (BMD) and microarchitecture (TBS) in postmenopausal women with osteoporosis: a 2-year open-label study. *Osteoporos Int.* 2014;25(7):1945-51.
14. Krueger D, Libber J, Binkley N. Spine trabecular bone score precision, a comparison between GE Lunar standard and high-resolution densitometers. *J Clin Densitom.* 2015;18(2):226-32.
15. Simonelli C, Leib E, Mossman N, Winzenrieth R, Hans D, McClung M. Creation of an age-adjusted, dual-energy X-ray absorptiometry-derived trabecular bone score curve for the lumbar spine in non-Hispanic US white women. *J Clin Densitom.* 2014;17(2):314-9.
16. Iki M, Tamaki J, Sato Y, Winzenrieth R, Kagamimori S, Kagawa Y, et al. Age-related normative values of trabecular bone score (TBS) for Japanese women: the Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) study. *Osteoporos Int.* 2015;26(1):245-52.
17. Aloia JF, Mikhail M, Usera G, Dhaliwal R, Islam S. Trabecular bone score (TBS) in postmenopausal African American women. *Osteoporos Int.* 2015;26(3):1155-61.
18. Krieg MA, Aubry-Rozier B, Hans D, Leslie WD. Effects of anti-resorptive agents on trabecular bone score (TBS) in older women. *Osteoporos Int.* 2013;24(3):1073-8.
19. Di Gregorio S, Del Rio L, Rodriguez-Tolra J, Bonel E, Garcia M, Winzenrieth R. Comparison between different bone treatments on areal bone mineral density (aBMD) and bone microarchitectural texture as assessed by the trabecular bone score (TBS). *Bone.* 2015;75: 138-43.
20. Ebina K, Hirao M, Hashimoto J, Hagihara K, Kashii M, Kitaguchi K, et al. Assessment of the effects of switching oral bisphosphonates to denosumab or daily teriparatide in patients with rheumatoid arthritis. *J Bone Miner Metab.* 2018;36(4):478-87.
21. Hansen KE, Johnson RE, Chambers KR, Johnson MG, Lemon CC, Vo TN, et al. Treatment of vitamin D insufficiency in postmenopausal women: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2015;175(10):1612-21.
22. Kalder M, Kyvernitakis I, Albert U S, Baier-Ebert M, Hadji P. Effects of zoledronic acid versus placebo on bone mineral density and bone texture analysis assessed by the trabecular bone score in premenopausal women with breast cancer treatment-induced bone loss: results of the ProBONE II substudy. *Osteoporos Int.* 2015;26(1):353-60.
23. Leslie WD, Majumdar SR, Morin SN, Hans D, Lix LM. Change in Trabecular Bone Score (TBS) with antiresorptive therapy does not predict fracture in women: The Manitoba BMD Cohort. *J Bone Miner Res.* 2017; 32(3):618-23.
24. Librizzi MS, Guadalix S, Martinez-Diaz Guerra G, Allo G, Lora D, Jimenez C, et al. Trabecular bone score in patients with liver transplants after 1 year of risedronate treatment. *Transplant Int.* 2016;29(3):331-7.
25. Rodríguez M, Pineda M, Servitja S, Garcia N, Martos T, Tusquets I, et al. TBS and BMD at the end of Al-therapy: A prospective study of the B-ABLE cohort. *Bone.* 2016;92:1-8.
26. McClung MR, Lippuner K, Brandi ML, Zanchetta JR, Bone HG, Chapurlat R, et al. 2017. Effect of denosumab on trabecular bone score in postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2017; 28(10):2967-73.
27. Miyaoka D, Imanishi Y, Ohara M, Hayashi N, Nagata Y, Yamada S, et al. Effects of teriparatide and sequential minodronate on lumbar spine bone mineral density and microarchitecture in osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2017;101(4):396-403.
28. Muschitz C, Kocijan R, Pahr D, Patsch JM, Amrein K, Misof BM, et al. Ibandronate increases sclerostin levels and bone strength in male patients with idiopathic osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2015;96(6):477-89.
29. Petranova T, Sheytanov I, Monov S, Nestorova R, Rashkov R. Denosumab improves bone mineral density and microarchitecture and reduces bone pain in women with osteoporosis with and without glucocorticoid treatment. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2014; 28(6):1127-37.
30. Popp AW, Guler S, Lamy O, Senn C, Buffat H, Perrelet R, et al. Effects of zoledronate versus placebo on spine bone mineral density and microarchitecture assessed by the trabecular bone score in postmenopausal women with osteoporosis: a three-year study. *J Bone Miner Res.* 2013;28(3):449-54.
31. Saag KG, Agnusdei D, Hans D, Kohlmeier LA, Krohn KD, Leib ES, et al. 2016. Trabecular Bone Score in patients with chronic glucocorticoid therapy-induced osteoporosis treated with alendronate or teriparatide. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(9):2122-8.
32. Shin MS, Cho EH, Kim HY. Longitudinal change in Trabecular Bone Score during and after treatment of osteoporosis in postmenopausal Korean women. *J Bone Metab.* 2017;24(2):117-24.
33. Tsai JN, Jiang LA, Lee H, Hans D, Leder BZ. Effects of teriparatide, denosumab, or both on spine trabecular microarchitecture in DATA-Switch: a Randomized Controlled Trial. *J Clin Densitom.* 2017;20(4):507-12.
34. Watts NB, Aggers D, McCarthy EF, Savage T, Martinez S, Patterson R, et al. 2017. responses to treatment with teriparatide in patients with atypical femur fractures previously treated with bisphosphonates. *J Bone Miner Res.* 2017;32(5):1027-33.
35. Shepherd JA, Schousboe JT, Broy SB, Engelke K, Leslie WD. Executive summary of the 2015 ISCD position development conference on advanced measures from DXA and QCT: fracture prediction beyond BMD. *J Clin Densitom.* 2015;18:274-86.
36. Martineau P, Leslie WD. Trabecular Bone Score (TBS): Method and applications. *Bone.* 2017;104:66-72.

37. Dhaliwal R, Gibula D, Ghosh C, Weinstock RS, Moses AM. Bone quality assessment in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* 2014;25(7):1969-73.
38. Kim JH, Choi HJ, Ku EJ, Kim KM, Kim SW, Cho NH, et al. Trabecular bone score as an indicator for skeletal deterioration in diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(2):475-82.
39. Caffarelli C, Giambelluca A, Ghini V, Francolini V, Pitinca MDT, Nuti R, et al. In type-2 diabetes subjects trabecular bone score is better associated with carotid intima-media thickness than BMD. *Calcif Tissue Int.* 2017;101(4):404-11.
40. Bonaccorsi G, Fila E, Messina C, Maietti E, Ulivieri FM, Caudarella R, et al. Comparison of trabecular bone score and hip structural analysis with FRAX(R) in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Aging Clin Exp Res.* 2017;29(5):951-7.
41. Holloway KL, De Abreu LLF, Hans D, Kotowicz MA, Sajjad MA, Hyde NK, et al. Trabecular Bone Score in men and women with impaired fasting glucose and diabetes. *Calcif Tissue Int.* 2018;102(1):32-40.
42. Iki M, Fujita Y, Kouda K, Yura A, Tachiki T, Tamaki J, et al. Hyperglycemia is associated with increased bone mineral density and decreased trabecular bone score in elderly Japanese men: The Fujiwara-kyo osteoporosis risk in men (FORMEN) study. *Bone.* 2017;105:18-25.
43. Leslie WD, Aubry-Rozier B, Lamy O, Hans D. TBS (trabecular bone score) and diabetes-related fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):602-9.
44. Zhukouskaya VV, Eller-Vainicher C, Gaudio A, Privitera F, Cairoli E, Ulivieri FM, et al. The utility of lumbar spine trabecular bone score and femoral neck bone mineral density for identifying asymptomatic vertebral fractures in well-compensated type 2 diabetic patients. *Osteoporos Int.* 2016;27(1):49-56.
45. Choi YJ, Ock SY, Chung YS. Trabecular Bone Score (TBS) and TBS-adjusted fracture risk assessment tool are potential supplementary tools for the discrimination of morphometric vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Densitom.* 2016;19(4):507-14.
46. Leslie WD, Krieg MA, Hans D. Clinical factors associated with trabecular bone score. *J Clin Densitom.* 2013;16(3):374-9.
47. Leib ES, Winzenrieth R. Bone status in glucocorticoid-treated men and women. *Osteoporos Int.* 2016;27(1):39-48.
48. Paggiosi MA, Peel NFA, Eastell R. The impact of glucocorticoid therapy on trabecular bone score in older women. *Osteoporos Int.* 2015;26(6):1773-80.
49. Chuang MH, Chuang TL, Koo M, Wang YF. Trabecular Bone Score reflects trabecular microarchitecture deterioration and fragility fracture in female adult patients receiving glucocorticoid therapy: a pre-post controlled study. *Biomed Res Int.* 2017;2017:4210217.
50. Eller-Vainicher C, Morelli V, Ulivieri FM, Palmieri S, Zhukouskaya VV, Cairoli E, et al. Bone quality, as measured by trabecular bone score in patients with adrenal incidentalomas with and without subclinical hypercortisolism. *J Bone Miner Res.* 2012;27(10):2223-30.
51. Belaya ZE, Hans D, Rozhinskaya LY, Dragunova NV, Sasonova NI, Solodovnikov AG, et al. The risk factors for fractures and trabecular bone-score value in patients with endogenous Cushing's syndrome. *Arch Osteoporos.* 2015;10:44.
52. Eller-Vainicher C, Filopanti M, Palmieri S, Ulivieri FM, Morelli V, Zhukouskaya VV, et al. Bone quality, as measured by trabecular bone score, in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2013;169(2):155-62.
53. Silva BC, Boutroy S, Zhang C, McMahon DJ, Zhou B, Wang J, et al. Trabecular bone score (TBS) -a novel method to evaluate bone microarchitectural texture in patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):1963-70.
54. Diaz-Soto G, de Luis Roman D, Jauregui OI, Briongo L, Romero E, Perez-Castrillon JL. Trabecular bone score in patients with normocalcemic hyperparathyroidism. *Endocr Pract.* 2016;22(6):703-7.
55. Cipriani C, Abraham A, Silva BC, Cusano NE, Rubin MR, McMahon DJ, et al. Skeletal changes after restoration of the euparathyroid state in patients with hypoparathyroidism and primary hyperparathyroidism. *Endocrine.* 2017;55(2):591-8.
56. Rolighed L, Rejnmark L, Sikjaer T, Heickendorff L, Vestergaard P, Mosekilde L, et al. Vitamin D treatment in primary hyperparathyroidism: a randomized placebo controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(3):1072-80.
57. Kolta S, Briot K, Fechtenbaum J, Paternotte S, Ambrecht G, Felsenberg D, et al. TBS result is not affected by lumbar spine osteoarthritis. *Osteoporos Int.* 2014;25(6):1759-64.

