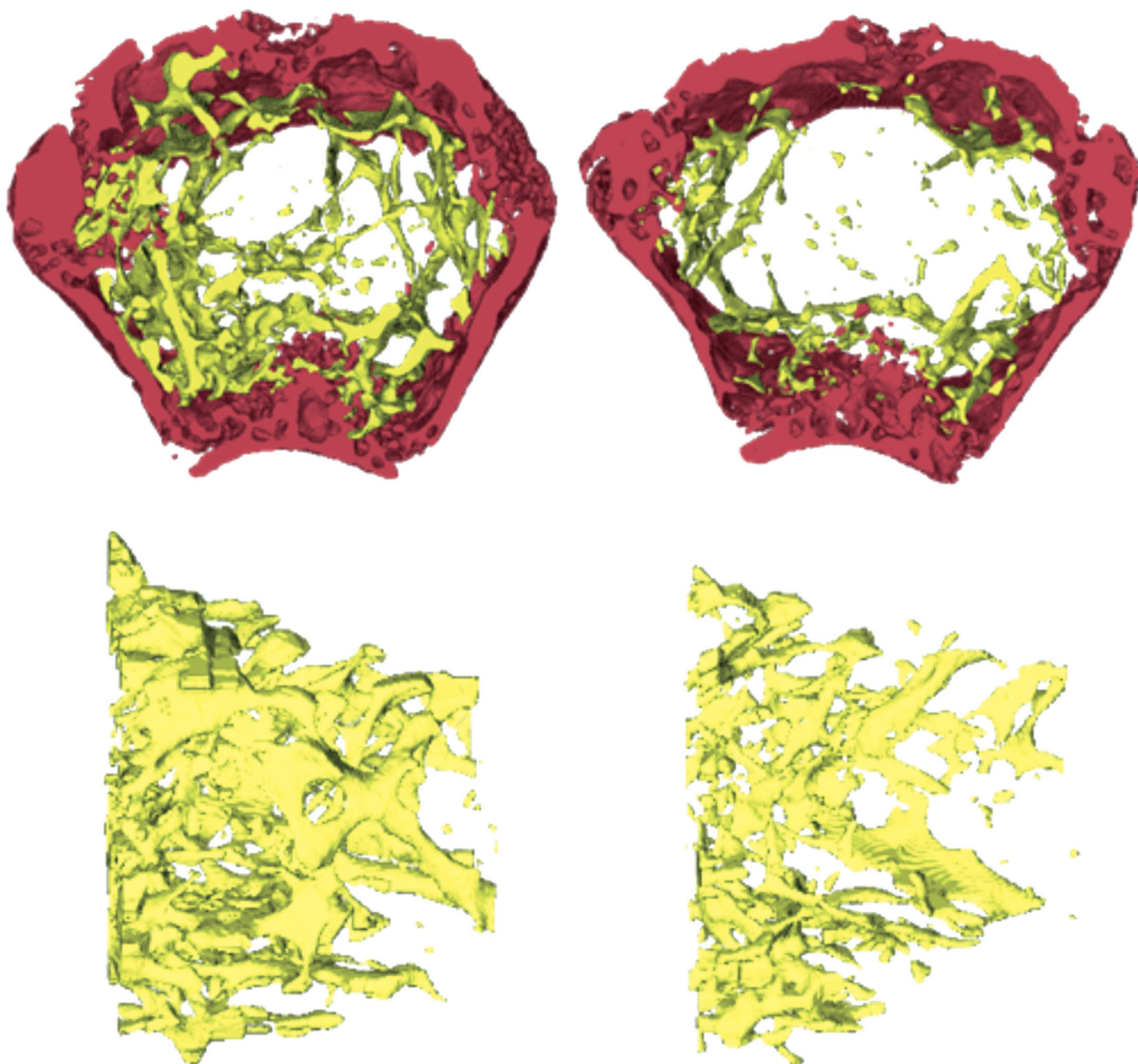
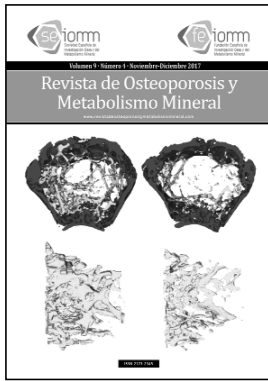


Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com





Nuestra portada

Imágenes representativas de la microarquitectura 3D trabecular ósea obtenidas por microtomografía computarizada de secciones de fémur distal de rata: hueso no osteoporótico (izqda) vs. hueso osteoporótico

Autor:

Imágenes cedidas por el Dr. José R. Caeiro Rey, Trabeculae EBT S.L. San Cibrao das Viñas. Ourense

Director

Manuel Sosa Henriques

Redactora

M^a Jesús Gómez de Tejada Romero

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

Presidente

Josep Blanch Rubió

Vicepresidenta

M^a Jesús Moro Álvarez

Secretario

Enrique Casado Burgos

Tesorero

José Ramón Caeiro Rey

Vocales

Guillermo Martínez Díaz-Guerra

Mercedes Giner García

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



Ibañez & Plaza Asociación, S.L.
EDITORIAL TÉCNICA Y COMUNICACIÓN

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

Tel: +34-915 538 297

e-mail: correo@ibanezyplaza.com

<http://www.ibanezyplaza.com>

Maquetación

Concha García García

Traducción inglés

David Shea

ISSN: 2173-2345

SUMARIO Vol. 9 - Nº 4 - Noviembre-Diciembre 2017

105 EDITORIAL

Diabetes y hueso: una relación inesperada pero intensa

Jódar Gimeno E

107 ORIGINALES

Uso de fármacos para la osteoporosis en pacientes con diabetes mellitus tipo 2: estudio de cohortes de base poblacional

Martínez-Laguna D, Reyes C, Carbonell-Abella C, Losada Grande E, Soldevila Madorell B, Mauricio D, Díez-Pérez A, Nogués X, Prieto-Alhambra D

114 Hipometilación del gen de la PTH por elevado fósforo de la dieta: un posible agravante epigenético de la severidad del hiperparatiroidismo secundario en la enfermedad renal crónica

Bedia Díaz G, Carrillo López N, Solache Berrocal G, Dusso A, Rodríguez I, Naves Díaz M, Cannata Andía JB, Román García P

121 Influencia de la vitamina D sobre la microestructura y propiedades biomecánicas de pacientes con fractura de cadera

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

130 Efecto de dosis suprafisiológicas de calcitriol sobre la expresión proteica de células de músculo liso vascular

Carrillo López N, Tuñón LePoultel D, Quirós Caso C, Rodríguez I, Cannata Andía JB, Naves Díaz M

139 Efecto del estrés oxidativo sobre la calcificación vascular a través del microARN-377

Panizo García S, Carrillo López N, Martínez Arias L, Román García P, Cannata Andía JB, Naves Díaz M

145 NOTA CLÍNICA

Linfoma óseo primario

Rodríguez Duque JC, Núñez Céspedes J, Montes Moreno S, Mazorra Horts R, del Rey Rozas A, Olmos Martínez JM

Indexada en las siguientes bases de datos: Scielo, Web of Sciences, IBECs, 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.

Envío de originales: romm@ibanezyplaza.com

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 Medicina, División de Endocrinología. Facultad de Medicina de la Universidad de Indiana. Indianapolis, Indiana (Estados Unidos)

Dr. Ernesto Canalis

Centro de Osteoporosis. Instituto Músculo-esquelético de la Universidad de Connecticut. Farmington, Connecticut (Estados Unidos)

Dra. Patricia Clark Peralta

Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Unidad Clínica Epidemiológica del Hospital Infantil Federico Gómez. México D.F. (México)

Dr. Oswaldo Daniel Messina

Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Hospital Cosme Argerich. Buenos Aires (Argentina)

Dra. Lilian I Plotkin

Facultad de Medicina de la Universidad de Indiana. Indianapolis, Indiana (Estados Unidos)

Dr. Josep Blanch Rubió

Servicio de Reumatología del Hospital del Mar de Barcelona. Instituto Municipal de Investigaciones Médicas de Barcelona. Parque de Investigación Biomédica de Barcelona (España)

Dr. Manuel Díaz Curiel

Universidad Autónoma de Madrid. Unidad de Metabolismo Óseo del Hospital Fundación Jiménez Díaz. Instituto de Investigación Fundación Jiménez Díaz. Fundación Hispana de Osteoporosis y Metabolismo Mineral (FHOEMO). Madrid (España)

Dr. Adolfo Díez Pérez

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

Dr. José Antonio Riancho Moral

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

Dr. Manuel Sosa Henríquez (Director)

Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Unidad Metabólica Ósea del Hospital Universitario Insular. Las Palmas de Gran Canaria (España)

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)

Revisores Volumen 9 (2017)

Luis Arboleya Rodríguez
Miguel Bernard Pineda
José Antonio Blázquez Cabrera
Jorge Cannata Andía
Pedro Carpintero Benítez
Santos Castañeda Sanz
Manuel Díaz Curiel
José Filgueira Rubio
Carlos Gómez Alonso
Jesús González Macías
Emilio González Reimers
Roberto Güerri Fernández
Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca
Federico Howkins Carranza
M^a Luisa Mariñoso Barba
Leonardo Mellibovsky Saidler
Ana Monegal Brancós
M^a José Montoya García
M^a Jesús Moro Álvarez
Laura Navarro Casado
Joan Miquel Nolla Solé
José Manuel Olmos Martínez
Norberto Ortego Centeno
Esteban Pérez Alonso
Ramón Pérez Cano
José Luis Pérez Castrillón
Pilar Peris Bernal
Javier del Pino Montes
José Antonio Riancho Moral
Arancha Rodríguez de Gortázar
Manuel Sosa Henríquez
Oscar Torregrosa Suau
Antonio Torrijos Eslava

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

SUMMARY Vol. 9 - Nº 4 - November-December 2017**105 EDITORIAL****Diabetes and bone: an unexpected but intense relationship**

Jódar Gimeno E

107 ORIGINAL ARTICLES**Use of drugs for osteoporosis treatment in patients with type 2 diabetes mellitus: population-based cohort study**

Martínez-Laguna D, Reyes C, Carbonell-Abella C, Losada Grande E, Soldevila Madorell B, Mauricio D, Díez-Pérez A, Nogués X, Prieto-Alhambra D

114 Hypomethylation of the PTH gene due to high dietary phosphorus: a possible aggravating of severe secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure

Bedia Díaz G, Carrillo López N, Solache Berrocal G, Dusso A, Rodríguez I, Naves Díaz M, Cannata Andía JB, Román García P

121 Influence of vitamin D on biomechanical microstructure and properties of patients with hip fracture

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

130 Effect of supra-physiological calcitriol doses on protein expression of vascular smooth muscle cells

Carrillo López N, Tuñón LePoutel D, Quirós Caso C, Rodríguez I, Cannata Andía JB, Naves Díaz M

139 The effect of oxidative stress on vascular calcification through microRNA-377

Panizo García S, Carrillo López N, Martínez Arias L, Román García P, Cannata Andía JB, Naves Díaz M

145 CLINICAL NOTE**Primary bone lymphoma**

Rodríguez Duque JC, Núñez Céspedes J, Montes Moreno S, Mazorra Horts R, del Rey Rozas A, Olmos Martínez JM

Diabetes y hueso: una relación inesperada pero intensa

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000400001>

Jódar Gimeno E

Departamento de Endocrinología y Nutrición Clínica - Hospitales Universitarios Quirón Salud Madrid (Pozuelo, Ruber Juan Bravo, San José) - Madrid (España)
Facultad de Ciencias de la Salud - Universidad Europea de Madrid - Madrid (España)

Correo electrónico: esteban.jodar@gmail.com

Como título de este editorial hemos descrito la asociación entre diabetes *mellitus* (DM) y osteoporosis como inesperada pero intensa. No obstante, quizá primero deberíamos decir "aún controvertida para algunos", puesto que hoy en día todavía son objeto de discusión la proporción e intensidad con las que las alteraciones descritas en la cantidad y la calidad de hueso, además de las alteraciones en el metabolismo mineral, se asocian tanto a la diabetes tipo 1 (DMt1) como la tipo 2 (DMt2), e influyen un aumento de la tasa de fracturas¹.

Sabemos que la diabetes de inicio juvenil puede asociarse a una reducción en el pico de densidad mineral ósea (DMO), con las consecuencias que ello conlleva para las fracturas en edades más avanzadas. Además, en la DMt2 se ha descrito una DMO mayor de la esperada, a diferencia de la DMt1 en la que se ha descrito una reducción de la DMO, especialmente asociada a la aparición de complicaciones crónicas. En el modelo actual, la DMt2 se caracterizaría por mayor afectación de la calidad ósea frente a la DMO reducida, que jugaría un papel secundario. De hecho, se ha propuesto aumentar las estimaciones de riesgo de fractura que se basan en la DMO (multiplicándolas hasta por 2)², por el escaso valor predictivo de aquélla. Así mismo, se ha descrito un hipoparatiroidismo funcional en las personas con DM, además de las alteraciones secundarias a la aparición de nefropatía u otras complicaciones crónicas.

Finalmente, no podemos despreciar el riesgo incrementado de caídas secundarias a neuropatía, alteraciones visuales, enfermedad cerebrovascular o por la propia hipoglucemia que causan muchos de los tratamientos más clásicos para la diabetes, como las sulfonilureas y otros secretagogos o la insulina¹.

Además, las personas con diabetes sufren un número inesperadamente alto de fracturas en esqueleto apendicular (brazos, tobillos, piernas...),

por lo que se ha sugerido un papel de la neuropatía, e incluso de la microangiopatía localizada en esas zonas.

En el presente número, Martínez-Laguna y cols.³ pretenden determinar si hay diferencias en el uso de fármacos entre personas con DMt2 y sin diabetes utilizando para ello la potente base de datos de Atención Primaria en Cataluña (Sistema de Información para el Desarrollo de la Investigación en Atención Primaria, SIDIAP). Cuando seleccionan los sujetos con DMt2 mayores de 50 años y los emparejan con dos no diabéticos similares, el análisis de sus características clínicas y tratamientos arrojó datos muy interesantes.

Primero se corroboró una tasa de fracturas –prevalencia en realidad– mucho más elevada de la esperada –de hecho, casi excesivamente elevada: 1,3% vs. 0,3% en sujetos sin DM–, pero lo que es aún mucho más preocupante, incluso con esa enorme prevalencia de fracturas (que hemos de asumir como osteoporóticas en su inmensa mayoría), es que el uso de, por ejemplo, bisfosfonatos fue un 30% menor en personas con diabetes, lo que resulta inasumible.

El análisis multivariante animado a despejar el papel de variables confusoras, confirmó que el ser diabético se asociaba a una menor probabilidad de ser tratado para la osteoporosis.

Por lo tanto, además de saludar este nuevo interesante trabajo del grupo que lidera Daniel Prieto Alhambra, no podemos menos que recordar que existen recomendaciones actualizadas para la evaluación de osteoporosis secundarias a enfermedades endocrinas², e incluso recomendaciones específicas sobre los tratamientos anti-diabéticos y su impacto en el riesgo de fractura⁴, promovidas por el Grupo de Trabajo de Osteoporosis y Enfermedades Óseas Metabólicas de la Sociedad Española de Endocrinología, las cuales, desde aquí, volvemos a recomendar a todos aquéllos con preocupación en el tratamiento de la osteoporosis y de la diabetes, una pareja con una relación mucho más intensa de lo esperado.

Bibliografía

1. Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, Abrahamsen B, Schwartz AV, Ferrari SL. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(4):208-19.
2. Reyes-García R, García-Martín A, Varsavsky M, Rozas-Moreno P, Cortés-Berdonces M, Luque-Fernández I, et al. Actualización de las recomendaciones para la evaluación y tratamiento de la osteoporosis asociada a enfermedades endocrinas y nutricionales. Grupo de Trabajo de Osteoporosis y Metabolismo Mineral de la SEEN. *Endocrinol Nutr.* 2015;62(5):e47-e56.
3. Martínez-Laguna D, Reyes C, Carbonell-Abella C, Losada Grande E, Soldevila Madorell B, Mauricio D, et al. Uso de fármacos para la osteoporosis en pacientes con diabetes mellitus tipo 2: estudio de cohortes de base poblacional. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2017;9(4):107-13.
4. Rozas-Moreno P, Reyes-García R, Jódar-Gimeno E, Varsavsky M, Luque-Fernández I, Cortés-Berdonces M, et al. Recommendations on the effect of antidiabetic drugs in bone. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2017;64 (Suppl 1):1-6.

Martínez-Laguna D^{1,2,3}, Reyes C^{2,3}, Carbonell-Abella C^{1,2,3}, Losada Grande E¹, Soldevila Madorell B^{5,6}, Mauricio D^{5,6}, Díez-Pérez A^{3,7}, Nogués X^{2,3,7}, Prieto-Alhambra D^{2,3,8}

1 Atención Primaria Barcelona Ciutat - Instituto Catalán de la Salud - Barcelona (España)

2 Grupo de Investigación en Enfermedades Prevalentes del Aparato Locomotor en Atención Primaria (GREMPAL) - Instituto Universitario de Investigación en Atención Primaria (IDIAP) Jordi Gol - Universidad Autónoma de Barcelona - Barcelona (España)

3 Área de Fragilidad y Envejecimiento Saludable del Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERFES) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Madrid (España)

4 Unidad de Endocrinología - Hospital Can Misses - Ibiza (España)

5 Servicio de Endocrinología y Nutrición - Hospital Universitario Germans Trias i Pujol - Badalona (España)

6 Área de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas del Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERDEM) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Madrid (España)

7 Departamento Medicina Interna - Instituto de Investigaciones Médicas del Hospital del Mar (IMIM) - Universidad Autónoma de Barcelona - Barcelona (España)

8 Departamento de Ortopedia, Reumatología y Ciencias Musculoesqueléticas de Nuffield (NDORMS) - Unidad de Investigación Biomédica Musculoesquelética del Instituto Nacional para la Investigación en Salud (NIHR) - Universidad de Oxford (Reino Unido)

Uso de fármacos para la osteoporosis en pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2: estudio de cohortes de base poblacional

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000400002>

Correspondencia: Daniel Prieto-Alhambra - Musculoskeletal Pharmaco and Device Epidemiology, Botnar Research Centre - Nuffield Orthopaedics Centre - Windmill Road - Oxford OX3 7LD (Reino Unido)

Correo electrónico: Daniel.prietoalhambra@ndorms.ox.ac.uk

Fecha de recepción: 20/03/2017

Fecha de aceptación: 21/05/2017

Trabajo premiado con una Beca de Investigación Clínica FEIOMM 2014.

Resumen

Objetivo: Determinar si existen diferencias en la prevalencia del uso de fármacos para la osteoporosis entre pacientes diabéticos tipo 2 (DM2) y no diabéticos.

Material y método: Estudio de cohortes retrospectivas con datos del Sistema de Información para el Desarrollo de la Investigación en Atención Primaria (SIDIAPI), que contiene información clínica anonimizada de más de 5 millones de pacientes de Cataluña. Se seleccionaron todos los pacientes de ≥ 50 años de edad con diagnóstico de DM2, que fueron apareados con dos sujetos sin diabetes. Se recogió información sobre variables descriptivas, fracturas prevalentes y el uso de fármacos para la osteoporosis agrupados en bifosfonatos (BF), suplementos calcio y vitamina D (CaD), y cualquier fármaco para la osteoporosis (FPO). Mediante regresión logística se calculó la asociación entre la presencia de DM2 y el uso de FPO, ajustando por variables confusoras.

Resultados: Se identificaron 166.106 pacientes con DM2 y 332.212 no diabéticos. Los DM2 tenían mayor prevalencia de fractura que los no diabéticos (1,3% vs. 0,3%). El uso de BF en los pacientes con DM2 era del 6,6%, frente al 9,3% en los no diabéticos ($p < 0,001$); de CaD, 9,7% vs. 12,3% ($p < 0,001$); y de FPO, 7,6% vs. 10,7% ($p < 0,001$). Tras ajustar por variables confusoras, los pacientes con DM2 presentaban menor probabilidad de ser tratados con BF (OR=0,67; IC95%: 0,64-0,68), con CaD (OR=0,71; IC95%: 0,70-0,73) o con FPO (OR=0,66; IC95%: 0,64-0,67) que los no diabéticos.

Conclusiones: A pesar de presentar una mayor prevalencia de fracturas previas, los pacientes con DM2 tienen más del 30% de probabilidad de no recibir un FPO que los no diabéticos. Esto podría ser debido a una infravaloración del riesgo en estos pacientes.

Palabras clave: osteoporosis, bifosfonatos, diabetes mellitus tipo 2, epidemiología, estudio población general.

Use of drugs for osteoporosis treatment in patients with type 2 diabetes mellitus: population-based cohort study

Summary

Objective: Ascertain whether there are differences in the prevalence of osteoporosis drugs in patients with type 2 diabetes (DM2) and non-diabetic patients.

Material and methods: Retrospective cohort study with data from the Information System for the Development of Primary Care Research (SIDIAP), which contains anonymous clinical information from more than 5 million patients in Catalonia. All 50-year-old patients diagnosed with DM2, who were matched with two subjects without diabetes, were selected. Information on descriptive variables, prevalent fractures and the use of osteoporosis drugs grouped in bisphosphonates (BF), calcium and vitamin D supplements (CaD), and any osteoporosis drug (OD) were collected. Through logistic regression, the association between the presence of DM2 and the use of OD was calculated, adjusting for confounding variables.

Results: A total of 166,106 patients with DM2 and 332,212 non-diabetics. The DM2 group presented a higher prevalence of fracture than did diabetics (1.3% vs 0.3%). The use of BF in patients with DM2 was 6.6%, compared to 9.3% in non-diabetics ($p < 0.001$). Of CaD, 9.7% vs 12.3% ($p < 0.001$) and OD, 7.6% vs 10.7% ($p < 0.001$). After adjusting for variable confounders, the patients with DM2 presented a lower probability of being treated with BF (OR=0.67, 95% CI: 0.64-0.68), with CaD (OR=0.71, 95% CI: 0.70-0.73) or with OD (OR=0.66, 95% CI: 0.64-0.67) than non-diabetics.

Conclusions: Despite having a higher prevalence of fractures in patients with DM2, they have more than 30% chance of not having received an OD than non-diabetic patients. This may be attributed to an underestimation of risk in these patients.

Key words: osteoporosis, bisphosphonates, type 2 diabetes mellitus, epidemiology, general population studies.

Introducción

La osteoporosis es una enfermedad del metabolismo óseo que se caracteriza por un aumento de la fragilidad ósea y la propensión a fracturas. En mujeres posmenopáusicas estas fracturas se han asociado con una disminución de la densidad mineral ósea (DMO)¹. Sin embargo, esta correlación con la baja DMO no se da en todas las situaciones; los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) presentan un incremento del riesgo de fracturas, especialmente de fracturas de fémur²⁻⁴, a pesar de presentar unos valores de DMO más elevados en comparación con la población no diabética que se fractura^{5,6}.

Se han postulado diferentes mecanismos a través de los cuales podría incrementarse el riesgo de fractura en la población diabética. Entre ellos destacan algunas complicaciones asociadas a la DM2 (hipoglucemias, neuropatía, nefropatía y retinopatía diabéticas)⁷⁻¹⁰ y que también se asocian a un mayor riesgo de caídas y, en consecuencia, de fracturas. También algunos fármacos antidiabéticos, como las sulfonilureas, las glitazonas y la insulina, se han visto asociados con un mayor riesgo de fracturas^{11,12}. Recientemente se ha descrito también un mayor riesgo de fracturas en pacientes tratados con un inhibidor del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (iSGLT-2), la canagliflozina, hecho que no se ha observado hasta el momento con otros iSGLT-2^{13,14}. Otra posible explicación sería el efecto que tiene el depósito de los productos de glucosilación avanzada sobre el colágeno óseo que podría disminuir la resistencia del hueso¹⁵⁻¹⁸.

Para la prevención de las fracturas osteopóricas se dispone de diferentes fármacos para la osteoporosis (FPO). Estos han sido analizados en multitud de ensayos clínicos, variando su efecto en función del fármaco, de la población estudiada y de la localización de la fractura. Sin embargo, existe poca información de dichos fármacos en la práctica clínica habitual, especialmente en pacientes diabéticos¹⁹⁻²².

Si los pacientes con DM2 presentan una mayor DMO que los no diabéticos y un mayor riesgo de fracturas, parece lógico pensar que la valoración del riesgo real de fracturas en estos pacientes esté infraestimada y, en consecuencia, estén infratratados. Nuestro objetivo ha sido determinar si existirían diferencias en la prevalencia del uso de fármacos para la osteoporosis entre pacientes con DM2 y los no diabéticos.

Material y método

Diseño del estudio:

Estudio de cohortes retrospectivas de base poblacional con datos de la base de datos del Sistema de Información para el Desarrollo de la Investigación en Atención Primaria (SIDIAP) (www.sidiap.org). El SIDIAP contiene la información socio-demográfica, registros clínicos de los médicos de Atención Primaria que trabajan en el Instituto Catalán de Salud (ICS), principal proveedor de los servicios sanitarios en Cataluña, así como los resultados analíticos y los datos de facturación de Farmacia. Dispone de información de más de 5 millones de pacientes (aproximadamente un 80% de la población catalana). La represen-

tatividad de SIDIAP sobre la población general de Cataluña ha sido previamente demostrada²³. Estudios previos realizados con el SIDIAP en pacientes con DM2 observaron una prevalencia de la enfermedad similar a otros estudios realizados en España^{24,25}. También se dispone de multitud de estudios que analizan nuevos predictores de fractura por fragilidad²⁶⁻³⁰.

Participantes:

Se seleccionaron todos los sujetos de 50 o más años de edad con diagnóstico de DM2 prevalente o incidente entre 2006 y 2013, usando códigos CIE10 (E11.0, E11.1, E11.2, E11.3, E11.4, E11.5, E11.6, E11.7, E11.8 y E11.9). Por cada sujeto con DM2 se seleccionaron dos sujetos no diabéticos de igual sexo, edad (± 2 años) y del mismo Centro de Salud. Se consideraron no diabéticos aquellos sujetos sin diagnóstico registrado de diabetes *mellitus* tipo 2 o tipo 1, y que no hubiesen recibido ningún fármaco anti-diabético previamente a la inclusión.

Variables de estudio:

Se recogió información sobre la edad, el sexo y algunas variables clínicas: índice de masa corporal (IMC), tabaquismo (fumador, no fumador y ex-fumador) y consumo de alcohol (medido por unidades de consumo a la semana y clasificado en: consumo de bajo riesgo, cuando el consumo en hombres es inferior a 17 unidades o en mujeres a 11; consumo moderado, cuando en hombres es entre 17 y 28 unidades o en mujeres entre 11 y 17; y consumo de riesgo, cuando en hombres es superior a 28 unidades o en mujeres a 17, tal y como se define en el Programa de Actividades Preventivas y Promoción de la Salud)³¹. Se valoró la presencia de cardiopatía isquémica (angina estable, angina inestable o infarto de miocardio) y enfermedad cerebro-vascular (infarto cerebral o accidente isquémico transitorio) en el momento de inclusión, utilizando códigos CIE10. También se recogieron las fracturas prevalentes (de cualquier localización excepto cara o cráneo, y dedos de manos o pies). El uso de fármacos para la osteoporosis se agrupó en tres categorías: 1) bifosfonatos (BF), 2) suplementos calcio y vitamina D (CaD), y 3) cualquier fármaco para la osteoporosis (FPO). Para ello se utilizaron los códigos de la Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química de la Organización Mundial de la Salud (*Anatomical Therapeutic Chemical Classification*, ATC).

Análisis estadístico:

Las características de la población estudiada se describen mediante análisis descriptivo univariante, calculando la media y la desviación estándar para las variables continuas, y la frecuencia absoluta y el porcentaje para las variables categóricas. Para comparar las prevalencias de enfermedad cardiovascular y de fracturas en ambos grupos se utilizó la prueba de Chi cuadrado. Mediante regresión logística se calculó la asociación entre la presencia de DM2 y el uso de FPO; se ajustó por los siguientes factores de confusión, definidos *a priori* según

la literatura disponible y la plausibilidad biológica: edad, sexo, IMC, tabaquismo, consumo de alcohol, cardiopatía isquémica (CI) o enfermedad cerebrovascular (ECV) previas y fracturas previas. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con una confianza (IC) del 95% y suponiendo un contraste bilateral. Se utilizó para todos los análisis el paquete estadístico Stata SE versión 12.0 para Mac.

Aspectos éticos:

El SIDIAP proporcionó datos puramente observacionales para este estudio. Los datos del SIDIAP son totalmente anónimos e identificados por un código interno que se crea en el momento de la incorporación de los datos, hecho que imposibilita la identificación de los sujetos incluidos. Se obtuvo la aprobación del Comité Ético de Investigaciones Clínicas local (CEIC IDIAP Jordi Gol), con código P15/150.

Resultados

Se identificaron 166.106 pacientes con diagnóstico de DM2 prevalente o incidente entre 2006 y 2013, y se emparejaron con 332.212 pacientes no diabéticos. Las características basales de ambas cohortes se recogen en la tabla 1. Los sujetos con DM2 presentaban mayor prevalencia de CI y ECV que los no diabéticos. También presentaban una mayor prevalencia de fracturas previas, de forma general y por localizaciones específicas (Tabla 2).

Los pacientes con DM2 presentaban una menor proporción de uso de fármacos para la osteoporosis, tanto de BF como de cualquier FPO y también para CaD, estadísticamente significativa ($p < 0,001$ en las tres situaciones) en comparación con los pacientes no diabéticos (Figura 1).

Al analizar la probabilidad de recibir un fármaco para la osteoporosis en sujetos con DM2, en comparación con los no diabéticos, las *odds ratio* no ajustadas fueron de 0,67 (IC 95%: 0,65-0,68) para BF, de 0,74 (IC 95%: 0,72-0,75) para CaD, y de 0,66 (IC 95%: 0,65-0,68) para cualquier FPO.

Tras ajustar por la edad, el sexo, el IMC, el tabaquismo, el consumo de alcohol, los CI o ECV previos y las fracturas previas, los sujetos con DM2 presentaban una menor probabilidad de ser tratados con BF (OR=0,67; IC95%: 0,64-0,68), con CaD (OR=0,71; IC95%: 0,70-0,73) o con cualquier FPO (OR=0,66; IC95% 0,64-0,67) que los no diabéticos.

Discusión

Los pacientes con DM2, a pesar de tener una mayor prevalencia de fracturas previas, presentaron más de un 30% de probabilidad de no recibir un fármaco para la osteoporosis, en comparación con los sujetos no diabéticos. Igual que en trabajos previos, observamos una mayor proporción de fracturas en los pacientes con DM2 en comparación con los no diabéticos, principalmente a nivel de fémur donde la prevalencia se multiplicó por cuatro. Estos datos coinciden con dos metaanálisis recientes donde se describe un 30% más de riesgo de fractura de fémur en los pacientes con DM2^{33,32}.

Tabla 1. Características basales en pacientes con DM2 y no diabéticos emparejados

Variable	Pacientes con DM2 (n=166.106)	Pacientes no diabéticos (n=332.212)	Valor de p
Género ♀; n (%)	79.249 (47,7)	158.498 (47,7)	1
Edad; media ± DE	65,4 ± 11,4	63,8 ± 11,8	<0,001
IMC (kg/m ²); n (%)			<0,001
<24,99	17.076 (10,3)	55.088 (16,6)	
25-29,99	60.404 (36,4)	112.913 (34,0)	
>30	75.923 (45,7)	79.220 (23,8)	
Pérdidas	12.703 (7,6)	84.991 (25,6)	
Tabaquismo; n (%)			<0,001
No fumador	78.593 (47,3)	142.888 (43,0)	
Fumador	23.821 (14,4)	42.736 (12,9)	
Exfumador	16.835 (10,1)	26.137 (7,9)	
Pérdidas	45.857 (28,2)	120.451 (36,2)	
Consumo alcohol; n (%)			<0,001
Abstemio	100.203 (60,3)	164.381 (49,5)	
Bajo riesgo	42.167 (25,4)	81.081 (24,4)	
Consumo nocivo	5.257 (3,2)	8.924 (2,7)	
Pérdidas	18.479 (11,1)	77.826 (23,4)	
ECV previa; n (%)	9.762 (5,9)	10.039 (3,0)	<0,001
CI previa; n (%)	16.416 (9,9)	13.678 (4,1)	<0,001

♀: mujeres; DE: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal; ECV: enfermedad cerebro vascular; CI: cardiopatía isquémica.

Tabla 2. Prevalencia de fracturas en pacientes con DM2 y no diabéticos emparejados

Localización	Pacientes con DM2 (n=166.106)	Pacientes no diabéticos (n=332.212)	Valor de p
Cualquier localización n (%)	4.012 (2,4)	1.732 (0,5)	<0,001
Fractura principal* n (%)	2.215 (1,3)	1.055 (0,3)	<0,001
Fémur n (%)	609 (0,4)	382 (0,1)	<0,001

*Fractura de cadera, muñeca, antebrazo, húmero o vertebral.

Paradójicamente, aún presentando mayor prevalencia de fracturas previas, los pacientes con DM2 tienen una menor probabilidad de ser tratados con un bifosfonato, con suplementos de calcio y vitamina D o con cualquier fármaco para la osteoporosis. Una posible explicación de estos hechos podría ser una infravaloración del riesgo de fractura en estos sujetos. A pesar de que no disponemos de datos en nuestra cohorte sobre DMO, trabajos previos que comparan pacientes con DM2 con pacientes no diabéticos observan que los primeros

presentan una mayor DMO⁵. Por tanto, si la valoración del riesgo de fractura se realiza exclusivamente por los valores de DMO, los pacientes con DM2 serían infravalorados. Otra posibilidad sería la valoración del riesgo de fracturas mediante el uso de herramientas que permitan el cálculo del riesgo absoluto de fractura. En nuestro medio, la más utilizada es FRAX[®], que no considera la DM2 como un factor de riesgo. Diferentes estudios^{33,34} apoyan la idea de no utilizar FRAX[®] en pacientes con DM2, puesto a que a igual valor de riesgo absoluto calcu-

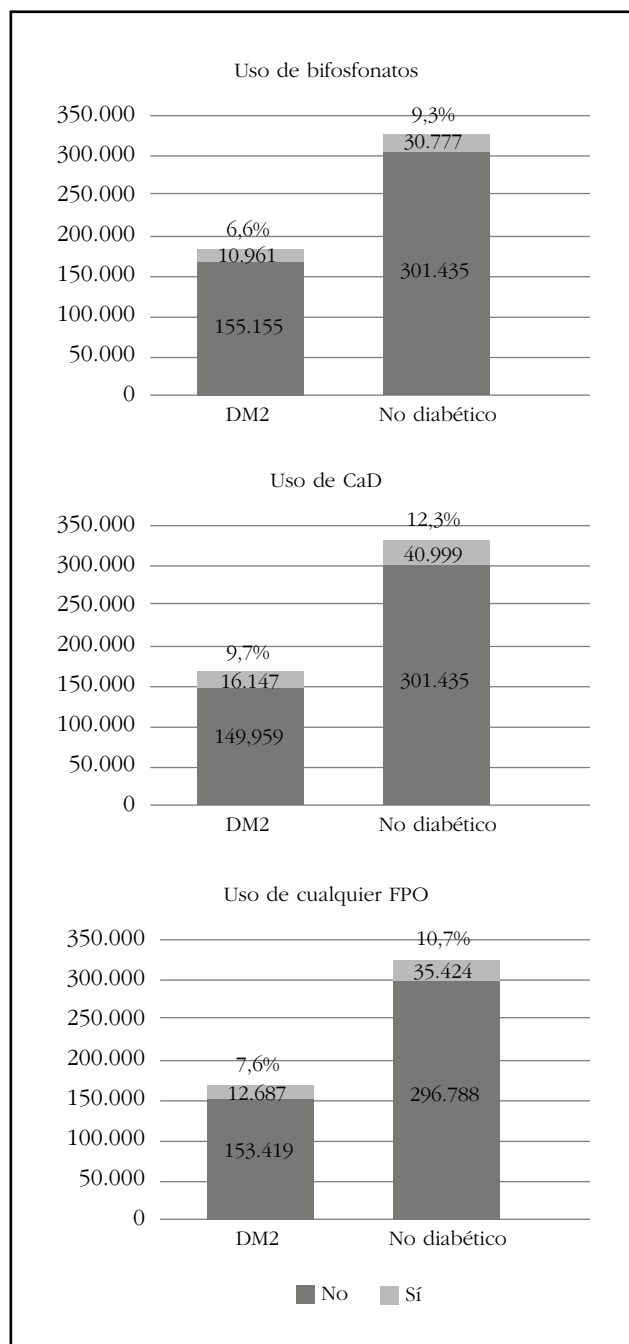
lado por FRAX® los pacientes con DM2 presentan un riesgo real mayor de fracturas que los no diabéticos³⁵. En un análisis de la cohorte Manitoba se observó que los pacientes con DM2 presentaban una mayor proporción de fracturas observadas que las esperadas, tanto fracturas principales como de fémur, hecho que no sucedía en sujetos no diabéticos³⁶. Una tercera explicación plausible sería que los pacientes con DM2 reciben más fármacos que los no diabéticos, y esto podría condicionar al facultativo a la hora de prescribir un fármaco para la osteoporosis. Si bien no disponemos del número de fármacos que de media recibían nuestros pacientes, otros trabajos realizados en pacientes con DM2 de la base de datos del SIDIAP³⁷ describe un coste en medicación casi del doble en comparación con pacientes no diabéticos, y, en consecuencia, un mayor número de fármacos.

Como era de esperar, los pacientes DM2 de nuestra cohorte presentaron una mayor prevalencia de CI y ECV que los no diabéticos, casi el doble. Algunos autores sugieren que existe una relación entre enfermedad cardiovascular y metabolismo óseo. Un estudio de casos-controles realizado en sujetos con síndrome metabólico observó que los pacientes con un evento coronario en los últimos seis meses presentaban una mayor prevalencia de fractura vertebral y de cualquier localización, en comparación con los sujetos que no habían sufrido un evento coronario³⁸.

Una de las limitaciones de nuestro estudio es que los datos provienen de la historia clínica informatizada y, a diferencia de los estudios clásicos de cohortes, no se dispone de una validación caso por caso de cada fractura. Pero estudios previos han validado los datos del SIDIAP en comparación con estudios de cohortes clásicas y bases de datos de alta hospitalaria, observándose una sensibilidad moderada (próxima al 70%) y una especificidad elevada (>95%)³⁹. Además, la codificación CIE-10 no distingue entre fracturas traumáticas y fracturas por fragilidad. Una reciente validación de una muestra de más de 300 fracturas registradas en pacientes de >50 años de la base del SIDIAP observó que más del 90% de las fracturas de fémur, más del 87% de las vertebrales y más del 80% de las fracturas principales eran por fragilidad (no relacionadas con un traumatismo)⁴⁰, hecho que da una mayor validez a nuestros datos. Otra posible limitación es que los datos en relación a la prescripción se recogen de los datos de facturación a Farmacia, de tal forma que puede existir una prescripción indicada no retirada en la farmacia y, en consecuencia, no considerada. Pero este hecho se daría en todo caso en ambas cohortes, tanto pacientes con DM2 como no diabéticos.

Por el contrario, este estudio tiene importantes fortalezas como es el elevado número de individuos incluidos, lo que permite detectar diferencias

Figura 1. Uso de fármacos para la osteoporosis en función de la presencia de DM2 o no



estadísticamente significativas que en otros estudios de cohortes con un tamaño muestral más pequeño no se hubieran detectado.

Consideramos necesaria la búsqueda de herramientas que permitan estimar mejor el riesgo de fracturas de los pacientes con DM2. Una posibilidad podría ser la incorporación de la DM2 como factor de riesgo en el FRAX® o disponer de una herramienta específica para los pacientes con DM2 que tenga en cuenta los factores de riesgo clásicos y los propios de la DM2. Otra opción sería la incorporación de nuevas técnicas, como la microindentación, que permiten valorar el riesgo de fractura de forma independiente a la DMO^{41,42}.

Conclusiones

Los pacientes con DM2 presentan cerca de un 30% más de probabilidad de no recibir un bifosfonato, suplementos de calcio y vitamina D o cualquier fármaco para la osteoporosis que los pacientes no diabéticos. Creemos que esta menor probabilidad de ser tratados es debida a una infravaloración del riesgo real de fractura en pacientes con DM2, lo que justifica la necesidad de una herramienta específica para la estimación del riesgo de fracturas en estos pacientes.

Financiación: Este trabajo contó con la ayuda de la Beca de Investigación Clínica FEIOMM 2014 y recibió un premio Italfármaco a la mejor Comunicación Oral del Congreso de la SEIOMM 2016 celebrado en Gran Canaria.

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

Bibliografía

- Siris ES, Miller PD, Barrett-Connor E, Faulkner KG, Wehren LE, Abbott TA, et al. Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. *JAMA*. 2001;286:2815-22.
- Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol*. 2007;166:495-505.
- Dytfeld J, Michalak M. Type 2 diabetes and risk of low-energy fractures in postmenopausal women: meta-analysis of observational studies. *Aging Clin Exp Res*. 2017;29(2):301-9.
- Fan Y, Wei F, Lang Y, Liu Y. Diabetes mellitus and risk of hip fractures: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2016;27:219-28.
- Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2007;18:427-44.
- Ma L, Oei L, Jiang L, Estrada K, Chen H, Wang Z, et al. Association between bone mineral density and type 2 diabetes mellitus: A meta-Analysis of observational studies. *Eur J Epidemiol*. 2012;27:319-32.
- Johnston SS, Conner C, Aagren M, Ruiz K, Bouchard J. Association between hypoglycaemic events and fall-related fractures in Medicare-covered patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14:634-43.
- Barzilay JI, Bůžková P, Chen Z, de Boer IH, Carbone L, Rassouli NN, et al. Albuminuria is associated with hip fracture risk in older adults: the cardiovascular health study. *Osteoporos Int*. 2013;24:2993-3000.
- Ivers RQ, Cumming RG, Mitchell P, Peduto AJ. Diabetes and risk of fracture: The Blue Mountains Eye Study. *Diabetes Care*. 2001;24:1198-203.
- Rasul S, Ilhan A, Wagner L, Luger A, Kautzky-Willer A. Diabetic polyneuropathy relates to bone metabolism and markers of bone turnover in elderly patients with type 2 diabetes: greater effects in male patients. *Gend Med*. 2012;9:187-96.
- Zhu Z-N, Jiang Y-F, Ding T. Risk of fracture with thiazolidinediones: An updated meta-analysis of randomized clinical trials. *Bone*. 2014;68:115-23.
- Majumdar SR, Josse RG, Lin M, Eurich DT. Does sitagliptin affect the rate of osteoporotic fractures in type 2 diabetes? population-based cohort study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:1963-9.
- Watts NB, Bilezikian JP, Usiskin K, Edwards R, Desai M, Law G, et al. Effects of canagliflozin on fracture risk in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:157-66.
- Ljunggren Ö, Bolinder J, Johansson L, Wilding J, Langkilde AM, Sjöström CD, et al. Dapagliflozin has no effect on markers of bone formation and resorption or bone mineral density in patients with inadequately controlled type 2 diabetes mellitus on metformin. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14:990-9.
- Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, et al. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:260-70.
- Jehle PM, Jehle DR, Mohan S, Böhm BO. Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus patients. *J Endocrinol*. 1998;159:297-306.
- Takagi M, Kasayama S, Yamamoto T, Motomura T, Hashimoto K, Yamamoto H, et al. Advanced glycation endproducts stimulate interleukin-6 production by human bone-derived cells. *J Bone Miner Res*. 1997;12:439-46.
- Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T. Serum pentosidine levels are positively associated with the presence of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:1013-9.
- Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Are antiresorptive drugs effective against fractures in patients with diabetes? *Calcif Tissue Int*. 2011;88:209-14.
- Johnell O, Kanis JA, Black DM, Balogh A, Poor G, Sarkar S, et al. Associations between baseline risk factors and vertebral fracture risk in the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Study. *J Bone Miner Res*. 2004;19:764-72.
- Ensrud KE, Stock JL, Barrett-Connor E, Grady D, Mosca L, Khaw K-T, et al. Effects of raloxifene on fracture risk in postmenopausal women: the Raloxifene Use for the Heart Trial. *J Bone Miner Res*. 2008;23:112-20.
- Schwartz AV, Pavo I, Alam J, Disch DP, Schuster D, Harris JM, et al. Teriparatide in patients with osteoporosis and type 2 diabetes. *Bone*. 2016;91:152-8.
- García-Gil MM, Hermosilla E, Prieto-Alhambra D, Fina F, Rosell M, Ramos R, et al. Construction and validation of a scoring system for the selection of high-quality data in a Spanish population primary care database (SIDIAP). *Inform Prim Care*. 2011;19:135-45.
- Vinagre I, Mata-Cases M, Hermosilla E, Morros R, Fina F, Rosell M, et al. Control of glycemia and cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes in primary care in Catalonia (Spain). *Diabetes Care*. 2012;35:774-9.
- Mata-Cases M, Franch-Nadal J, Real J, Mauricio D. Glycaemic control and antidiabetic treatment trends in primary care centres in patients with type 2 diabetes mellitus during 2007-2013 in Catalonia: a population-based study. *BMJ Open*. 2016;6(10):e012463.
- Prieto-Alhambra D, Premaor MO, Fina Avilés F, Hermosilla E, Martínez-Laguna D, Carbonell-Abella C, et al. The association between fracture and obesity is site-dependent: a population-based study in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2012;27:294-300.
- Prieto-Alhambra D, Premaor MO, Avilés FF, Castro AS, Javaid MK, Nogués X, et al. Relationship between mortality and BMI after fracture: a population-based study of men and women aged ≥ 40 years. *J Bone Miner Res*. 2014;29:1737-44.
- Reyes C, Pottgård A, Schwarz P, Javaid MK, Van Staa TP, Cooper C, et al. Real-Life and RCT Participants: Alendronate Users Versus FITs' Trial Eligibility Criterion. *Calcif Tissue Int*. 2016;99:243-9.
- Reyes C, García-Gil M, Elorza JM, Fina-Avilés F, Mendez-Boo L, Hermosilla E, et al. Socioeconomic status and its association with the risk of developing hip fractures: A region-wide ecological study. *Bone*. 2015;73:127-31.
- Güerri-Fernandez R, Vestergaard P, Carbonell C, Knobel H, Avilés FF, Castro AS, et al. HIV infection is strongly associated with hip fracture risk, indepen-

- dently of age, gender, and comorbidities: a population-based cohort study. *J Bone Miner Res.* 2013;28:1259-63.
31. Córdoba García R, Camaralles Guillem F, Muñoz Seco E, Gómez Puente JM, Ramírez Manent JL, José Arango JS, et al. Recomendaciones sobre el estilo de vida. *Aten Primaria.* 2016;48(Suppl 1):27-38.
 32. Fan Y, Wei F, Lang Y, Liu Y. Diabetes mellitus and risk of hip fractures: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2016;27:219-28.
 33. Bridges MJ, Ruddick S a. Do FRAX/NOGG guidelines predict fractures in post-menopausal women with Type 2 diabetes? *Diabet Med.* 2012;29:555-6.
 34. Carnevale V, Morano S, Fontana A, Annese MA, Fallarino M, Filardi T, et al. Assessment of fracture risk by the FRAX algorithm in men and women with and without type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. *Diabetes Metab Res Rev.* 2014;30:313-22.
 35. Schwartz A V, Vittinghoff E, Bauer DC, Hillier TA, Strotmeyer ES, Ensrud KE, et al. Association of BMD and FRAX score with risk of fracture in older adults with type 2 diabetes. *JAMA.* 2011;305:2184-92.
 36. Giangregorio LM, Leslie WD, Lix LM, Johansson H, Oden A, McCloskey E, et al. FRAX underestimates fracture risk in patients with diabetes. *J Bone Miner Res.* 2012;27:301-8.
 37. Mata-Cases M, Casajuana M, Franch-Nadal J, Casellas A, Castell C, Vinagre I, et al. Direct medical costs attribu-
 - table to type 2 diabetes mellitus: a population-based study in Catalonia, Spain. *Eur J Health Econ.* 2016;17:1001-10.
 38. Silva HC, Pinheiro MM, Genaro PS, Castro CHM, Monteiro CMC, Fonseca FAH, et al. Higher prevalence of morphometric vertebral fractures in patients with recent coronary events independently of BMD measurements. *Bone.* 2013;52:562-7.
 39. Pagès-Castellà A, Carbonell-Abella C, Avilés FF, Alzamora M, Baena-Díez JM, Laguna DM, et al. Burden of osteoporotic fractures in primary health care in Catalonia (Spain): a population-based study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012;13:79.
 40. Martínez-Laguna D, Soria-Castro A, Carbonell-Abella C, Orozco P, Estrada-Laza P, Nogues X, et al. P172 Validation of fragility fractures in primary care electronic medical records: a population-based study. *Osteoporos Int.* 2016;27:79-548.
 41. Farr JN, Drake MT, Amin S, Melton LJ, McCready LK, Khosla S. In vivo assessment of bone quality in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Bone Miner Res.* 2014;29:787-95.
 42. Nilsson AG, Sundh D, Johansson L, Nilsson M, Mellström D, Rudäng 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;32:1062-71.

Bedia Díaz G, Carrillo López N, Solache Berrocal G, Dusso A, Rodríguez I, Naves Díaz M, Cannata Andía JB, Román García P
Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica - Red de Investigación Renal (REDinREN) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Universidad de Oviedo - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

Hipometilación del gen de la PTH por elevado fósforo de la dieta: un posible agravante epigenético de la severidad del hiperparatiroidismo secundario en la enfermedad renal crónica

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000400003>

Correspondencia: Manuel Naves Díaz - Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Hospital Universitario Central de Asturias - Edificio FINBA, Planta primera F1.1 (Aula 14) - Avenida de Roma, s/n - 33011 Oviedo (España)
Correo electrónico: manuel@hca.es

Fecha de recepción: 18/05/2017

Fecha de aceptación: 02/07/2017

Trabajo premiado con una beca FEIOMM de Investigación Traslacional 2014.

Resumen

Introducción: En pacientes con enfermedad renal crónica (ERC), la hiperfosfatemia agrava tanto la hiperplasia paratiroidea como la síntesis y secreción de PTH. La mayor hiperplasia se asocia a descensos en la expresión génica de los receptores de calcio (CaSR), vitamina D (VDR) y también de α -Klotho, induciendo resistencia de la glándula paratiroides para responder tanto al tratamiento como a los aumentos de FGF23. Este estudio examinó la posible contribución epigenética del fósforo elevado en agravar el hiperparatiroidismo secundario (HPTS).

Material y métodos: Se comparó el grado de metilación mediante pirosecuenciación de bisulfito en secuencias ricas en CpG de los promotores en los genes del CaSR, VDR, PTH y α -Klotho en ADN de glándulas paratiroides de ratas urémicas alimentadas con dieta con contenido normal y elevado en fósforo.

Resultados: La dieta rica en fósforo incrementó la expresión de PTH y causó una marcada reducción del grado de metilación en el promotor del gen de PTH. En cambio, las regiones promotoras de los genes de CaSR, VDR y α -Klotho no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de metilación entre ambos grupos de ratas, no siendo, por tanto, éste el mecanismo determinante de la disminución de la expresión de estos genes observada en el HPTS.

Conclusiones: Las alteraciones epigenéticas inducidas por la dieta rica en fósforo en el HPTS, en particular la hipometilación del gen de la PTH, podrían contribuir a los aumentos que se producen en la síntesis y secreción de esta hormona. La identificación de los mecanismos implicados permitiría diseñar mejores tratamientos para el HPTS en fases tempranas de la ERC.

Palabras clave: *metilación del DNA, PTH, enfermedad renal crónica, glándulas paratiroides, hiperfosfatemia.*

Hypomethylation of the PTH gene due to high dietary phosphorus: a possible aggravating of severe secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure

Summary

Introduction: Hyperphosphataemia aggravates both parathyroid hyperplasia and PTH secretion in patients with chronic kidney disease (CKD). Hyperplasia is associated with decreases in calcium receptor expression (CaSR), vitamin D (VDR) and α -Klotho, inducing resistance of the parathyroid gland to respond both to treatment and to increases in FGF23. This study examined the possible epigenetic contributions of raised phosphorus to aggravate secondary hyperparathyroidism (SHPT) in patients with (CRD).

Material and methods: The degree of methylation was compared by pyrosequencing of bisulfite in CpG-rich sequences of the promoters in the CaSR, VDR, PTH and α -Klotho genes in parathyroid gland DNA from uremic rats fed a normal and high phosphorus diet.

Results: The diet rich in phosphorus increased PTH expression and caused a marked reduction in the degree of methylation in the promoter of the PTH gene. In contrast, the promoter regions of the CaSR, VDR and α -Klotho genes did not show significant differences in the percentage of methylation between the two groups of rats. Thus, it was not the determining mechanism for the decrease of the expression of these genes observed in the SHPT.

Conclusions: The epigenetic alterations induced by the phosphorus rich diet in SHPT, particularly the PTH gene hypomethylation, could contribute to the increases that occur in the synthesis and secretion of this hormone. The identification of the mechanisms involved would allow better treatments for SHPT to be designed in the early stages of CKD.

Key words: DNA methylation, PTH, chronic kidney disease, parathyroid glands, hiperphosphataemia.

Introducción

El hiperparatiroidismo secundario (HPTS) es una complicación frecuente de la enfermedad renal crónica (ERC) caracterizada por hiperplasia de las glándulas paratiroides y aumentos en la síntesis y secreción de hormona paratiroidea (PTH). Las elevaciones de los niveles séricos de PTH causan alteraciones en el remodelado óseo y en la homeostasis fosfo-cálcica que incrementan tanto la propensión a fracturas como a calcificación vascular, procesos que agravan la morbi-mortalidad del enfermo renal¹.

En el curso de la ERC, los estímulos más importantes para el desarrollo de HPTS son los descensos en los niveles circulantes de calcio, de vitamina D nutricional y de su forma hormonal, el calcitriol, como así también las elevaciones en el fósforo sérico, aún cuando se alcancen niveles inferiores al límite superior del rango normal².

Es importante destacar que el grado de hiperplasia paratiroidea en la ERC se asocia también con una disminución proporcional de la expresión paratiroidea de los receptores de calcio y vitamina D (CaSR y VDR)³. Estas reducciones atenúan la capacidad de la glándula de suprimir tanto las tasas de proliferación celular como las de secreción de PTH en respuesta a los cambios en los niveles circulantes de calcio y vitamina D, inducidos por el tratamiento dirigido a corregir la hipocalcemia o la deficiencia de vitamina D. Un agravante adicional a la disfunción paratiroidea de la ERC es la disminución temprana de la molécula anti-envejecimiento, α -Klotho, en la membrana de las células paratiroides⁴. Esta reducción conduce a una ineficaz supresión de la síntesis y secreción de PTH por la hor-

mona fosfatúrica FGF23, ya que α -Klotho actúa como co-receptor obligado para las señales celulares del complejo de FGF23 con su receptor específico FGFR^{5,6}.

Hoy sabemos que, además de los defectos en el control transcripcional tanto del gen de la PTH como del CaSR y del α -Klotho debidos a la deficiencia de calcitriol, o a la disminución de los niveles de su receptor, el VDR, en la glándula paratiroides hiperplásica^{3,4}, podrían también contribuir a la disfunción paratiroidea del enfermo renal modificaciones epigenéticas, como la hipermetilación de los genes de CaSR, VDR o α -Klotho en sus regiones promotoras. El interés en la epigenética del HPTS en la ERC surgió de la evidencia del rol crítico de la hipermetilación de genes supresores de tumores en procesos de proliferación celular exacerbada^{7,8}, tal y como ocurre en el HPTS nodular. Esta forma de HPTS es similar en su desarrollo a un tumor benigno endocrino, con un impacto adverso muy grave tanto en la progresión del HPTS, del daño renal y vascular, como también en la supervivencia del enfermo renal por el desarrollo de resistencias al tratamiento^{9,10}.

Por el contrario, existen evidencias del impacto significativo de aumentos leves de la metilación del gen α -Klotho inducidas por el envejecimiento en el cerebro y por toxinas urémicas en el riñón, tanto en la expresión de α -Klotho en la membrana celular como también en sus funciones anti-oxidantes y anti-inflamatorias^{11,12} que no se han estudiado en la glándula paratiroides.

Otra modificación epigenética de gran interés para el control del HPTS es la hipometilación global del gen de la PTH, demostrada exclusivamente en el teji-

do paratiroideo¹³. Aun cuando el grado de hipometilación global del gen de PTH es similar en glándulas con función normal y glándulas hiperfuncionantes¹³, este hallazgo sugiere que un proceso de metilación diferencial de este gen en sus regiones promotoras podría contribuir a la severidad del HPTS.

Debido a que la retención de fósforo por el riñón enfermo es el mayor factor de riesgo para exacerbar directamente el grado de hiperplasia paratiroidea, de estabilización del ARN mensajero de PTH, de la secreción de PTH a la circulación y de los aumentos de FGF23 en la ERC, por mecanismos no transcripcionales, el objetivo de este trabajo fue evaluar en un modelo murino de ERC, la posible contribución de alteraciones epigenéticas inducidas por elevaciones en el fósforo sérico a la severidad de la disfunción paratiroidea. Para ello, comparamos el grado de metilación de los promotores de los genes de CaSR, VDR, Klotho y PTH en ratas urémicas alimentadas con dietas con contenido en fósforo normal o elevado y su asociación con la gravedad del HPTS.

Material y métodos

Estudio experimental

Para el estudio se utilizaron ratas Wistar macho de 4 meses de edad procedentes del animalario de la Universidad de Oviedo, sometidas a una nefrectomía (NX) de 7/8 consistente en la eliminación de tres cuartas partes del riñón izquierdo y con resección total del riñón derecho¹⁴.

Inmediatamente después de la nefrectomía, un grupo de animales urémicos continuó con la dieta de mantenimiento para roedores que posee contenido normal (N) en fósforo (P) (0,6%; grupo NX-NP), mientras que el otro grupo de animales nefrectomizados recibió una dieta con elevado (E) contenido en fósforo (0,9%; grupo NX-EP) durante 20 semanas.

En el momento del sacrificio, realizado bajo anestesia con CO₂ y por exanguinación, se recogió suero para determinar marcadores generales del grado de ERC y de alteraciones en el metabolismo óseo y mineral y también las glándulas paratiroides de cada grupo experimental (14 glándulas de 7 ratas por grupo) almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Análisis de la metilación de los promotores de los genes a estudio mediante pirosecuenciación de bisulfito

Para la extracción del material genómico de las glándulas paratiroides de rata se utilizó el método del fenol-cloroformo. El ADN extraído de las glándulas paratiroides se trató con bisulfito sódico siguiendo las instrucciones del kit de bisulfatación EZ DNA Methylation-Gold™ Kit D5005™ (Zymo Research, Orange, EE.UU.). A continuación se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica, con cebadores biotinilados, seguida luego por el protocolo de pirosecuenciación (PyroMark QUIAGEN® Q24), consistente en desnaturar las dobles cadenas de los productos de PCR para obtener cadenas simples, una de ellas marcada con biotina. La cadena biotinilada se utilizó como molde para la unión del cebador de secuenciación. Con el programa informático Pyromark 2.0.6 se analizó el patrón de metilación de la región de los promotores de los genes de PTH, VDR, CaSR y Klotho comprendida entre el inicio de la transcripción hacia el extremo 5' utilizando las parejas de cebadores que se indican en la tabla 1.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico SPSS 17.0. Para las variables cuantitativas analizadas se utilizó la t de Student. Se consideraron las diferencias estadísticamente significativas ante valores de p<0,05.

Tabla 1. Pareja de cebadores utilizadas en los estudios de metilación

Cebador	Secuencia	MR _f	Tamaño	CpG
Klotho F1	TGGAAAGTTT <u>T</u> AGAATGGGAGAAAG			
Klotho R1	CCCTTT <u>A</u> CCTTCCAAA <u>A</u> ACTAAT	51,3	121 pb	5
Klotho SQ	GGGAAAGTAGGTGTTTTATT			
CaR FW1	AGTTTGGGAATGGT <u>T</u> TATAGTT			
CaR RV1	CTCCCTAAATCTCTCAA <u>A</u> TCA <u>A</u> CCTTTA	52,7	169 pb	8
CaR SQ1	TAGGTGGTTTGGGGG			
PTH RW1	GGATTTGAGTTTTGGGT <u>T</u> AGTTT <u>G</u> AT			
PTH RV1	<u>A</u> CCTAAATTTTCATAT <u>A</u> CAA <u>A</u> CCTTTT <u>A</u> CT	52,9	360 pb	2
PTH SQ1	ATTTGAAATTTTAGAGGAGTG			
VDR FW1	AGGAATGTTAGGTAGGAGAGA			
VDR RV1	CCTT <u>A</u> AA <u>A</u> ACCCT <u>A</u> CCTT <u>A</u> T <u>A</u> AAAA <u>A</u> CTCT	52,6	344 pb	6
VDR SQ1	GATATTATTAAGATTGT			

MR_f: temperatura de anillamiento de la PCR; F1: cebador directo; R1: cebador inverso; SQ: cebador de secuenciación.

Resultados

Datos bioquímicos

Los datos bioquímicos de ambos grupos experimentales se presentan en la tabla 2. Como era de esperar, los animales alimentados con la dieta con elevado contenido en fósforo (NX-EP) tuvieron un mayor deterioro de la función renal medida como urea y creatinina séricas, con respecto a los valores de estos parámetros en el grupo de ratas urémicas alimentadas con la dieta con contenido de fósforo normal (NX-NP).

Si bien no se encontraron diferencias significativas en los niveles de calcio sérico entre ambos grupos experimentales, la combinación de una menor función renal y de un elevado fósforo de la dieta condujo a aumentos marcados en los niveles circulantes de fósforo y FGF23 en el orden de 2 y 3 veces superiores a los valores de estos parámetros en los animales urémicos alimentados con fósforo normal. Consecuentemente, el grado de HPTS fue también superior en los animales urémicos con fósforo elevado en la dieta, mostrando niveles séricos 40 veces superiores de PTH.

Metilación de las regiones promotoras de los genes a estudio

La figura 1 muestra los porcentajes de metilación de los sitios CpG en el ADN paratiroideo comprendido en las regiones promotoras de los genes del CaSR, VDR y Klotho. El escaso porcentaje de metilación, inferior al 5% en ambos grupos experimentales, impide toda comparación de posibles alteraciones epigenéticas diferenciales atribuibles al elevado fósforo de la dieta comparado con una ingesta de fósforo normal.

A diferencia de estos genes que disminuyen con la progresión del HPTS, la figura 2 muestra que en las dos CpGs del área estudiada del promotor del gen de la PTH se encontró que en las glándulas paratiroides de las ratas urémicas alimentadas con fósforo normal existe un porcentaje de ADN paratiroideo metilado superior al 40%. Más importante aún, para el mismo grado basal de daño renal y de duración de la uremia (20 semanas), el elevado fósforo en la dieta se asoció a una disminución significativa del 80% en la metilación de esa región del promotor de PTH. Esta disminución está en consonancia con incrementos en los niveles de PTH en el suero de estos animales 40 veces por encima de la PTH sérica de animales con el mismo grado basal de uremia alimentados con dieta con fósforo normal.

Discusión

Este estudio demuestra por vez primera una posible asociación epigenética entre la hiperfosfatemia de la ERC y la severidad del HPTS: la hipometilación del gen de la PTH. Además, nuestros resultados corroboran los hallazgos de otros investigadores en cuanto a que los descensos en el contenido paratiroideo de CaSR y de VDR no pueden atribuirse a un proceso epigenético de silenciamiento por hipermetilación de estos genes, ambos críticos para el tratamiento efectivo del HPTS. Nuestros

hallazgos también cuestionan la contribución de la hipermetilación del promotor de α -Klotho en los descensos del α -Klotho de membrana que ocurre con la progresión del HPTS.

En general, la hipermetilación de islas CpG en regiones promotoras da lugar al silenciamiento de la transcripción de los genes. Nuestros resultados indican un grado de metilación inferior al 5% en el CaSR y el VDR, ambos reguladores decisivos tanto de la función paratiroidea normal como del desarrollo de resistencia al tratamiento. Además, el elevado fósforo de la dieta, que condujo a aumentos significativos tanto en el grado de daño renal como del HPTS de estos animales nefrectomizados, no indujo cambios significativos en el grado de metilación del CaSR o del VDR, tal y como demostraron también otros investigadores en modelos murinos¹⁵, pero tampoco utilizando medidas del grado de metilación global de estos dos genes en glándulas paratiroides humanas provenientes de sujetos normales o con grado variable de HPTS y primario, y en las que la contribución de la hiperfosfatemia no era el objetivo principal del análisis epigenético^{16,17}.

Con respecto al grado de metilación del gen anti-envejecimiento α -Klotho, su grado de metilación fue también inferior al 10%, y no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de metilación de las CpGs inducidas por el elevado fósforo en la dieta, al menos en la zona del promotor estudiada en las glándulas paratiroides proveniente de ambos grupos experimentales de ratas urémicas. Estos hallazgos no son sorprendentes, ya que en las células del túbulo renal distal, que es donde el gen Klotho se expresa mayoritariamente en un riñón normal, parece existir un mecanismo que activamente protege al promotor de Klotho de la metilación de secuencias CpGs¹⁸. En otros tejidos, con baja expresión de α -Klotho, como en cerebro, mama, estómago, colon, músculo esquelético o piel, también parece existir un mecanismo similar de protección de los niveles de α -Klotho previniendo su metilación. Es importante destacar también que varios autores han observado que un exiguo grado de metilación parece ser suficiente para causar diferencias significativas en el grado de expresión del gen. De hecho, King y cols. han demostrado en cerebro de monos envejecidos que un pequeño incremento del 0,4% en la metilación de las islas CpG da lugar a descensos de un 20% en la expresión del gen, corroborando que el grado de metilación de secuencias CpGs pueda estar implicado en la regulación a la baja del gen Klotho asociada al envejecimiento¹³.

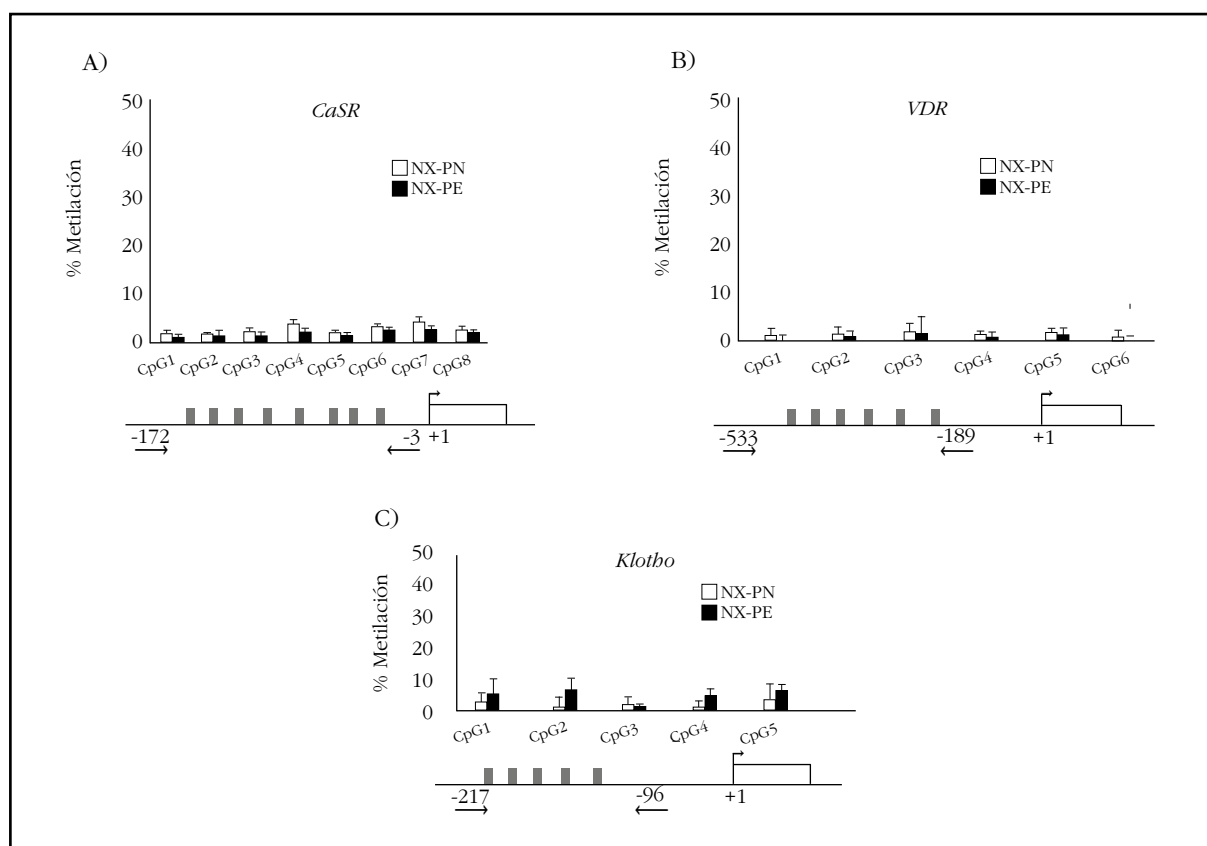
Otros autores han referido también diferencias pequeñas (del 1 al 4,5%) en el grado de metilación a nivel renal en ratones nefrectomizados¹³, similares a los valores de metilación paratiroides obtenidos en este estudio (del 2 al 5%). De todos modos, el elevado fósforo de la dieta no condujo a incrementos significativos en el grado de metilación de este gen en el tejido paratiroideo.

Sin duda, el hallazgo más importante de este estudio ha sido la identificación, por vez primera,

Tabla 2. Marcadores bioquímicos generales y del metabolismo mineral

	Urea (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	PTH (pg/mL)	FGF23 (pg/mL)
NX-PN	104 ± 32	1,0 ± 0,3	11,7 ± 1,1	5,8 ± 1,2	44 ± 23	378 ± 103
NX-EP	201 ± 51	2,1 ± 0,4	10,5 ± 1,1	12,8 ± 1,9	1.762 ± 493	1.029 ± 101
Valor de p	0,001	0,001	0,066	0,001	0,001	0,001

Figura 1. Grado de metilación de los sitios CpGs que preceden el inicio de la transcripción del promotor de los genes de A) *CaSR* (-172 a -3); B) *VDR* (-533 a -189) y C) α -*Klotho* (-217 a -96) en glándulas paratiroides provenientes de ratas nefrectomizadas (NX) alimentadas con una dieta con contenido en fósforo normal PN (NX-PN) o elevado (NX-PE) durante 20 semanas. En la parte inferior de cada gen se representa gráficamente la zona analizada del promotor y el número de sitios CpG existentes en dicho fragmento



de una asociación entre la hiperfosfatemia y una disminución de la metilación del promotor de PTH en la secuencia de 350 nucleótidos que precede al inicio de la transcripción. Si bien estudios de hace casi dos décadas, utilizando técnicas que precedieron el desarrollo de la pirosecuenciación, demostraron una hipometilación global del gen de la PTH exclusiva del tejido paratiroideo, pero sin diferencias significativas entre glándulas con función normal o hiperfuncionantes, el resultado de este estudio agrega una posible modificación epigenética a los conocidos mecanismos post-transcripcionales inducidos por el elevado fósforo para aumentar marcadamente la síntesis y secreción de PTH, como son la estabilización de ARN mensajero

de PTH o la inducción de las vías de secreción¹⁹⁻²¹. Es importante destacar que la significativa hipometilación del gen de la PTH inducida por el elevado fósforo de la dieta podría contribuir en parte a las marcadas elevaciones en los niveles séricos de PTH en este modelo murino de enfermedad renal experimental avanzada. Sin embargo, no podemos descartar con estos resultados que, en realidad, sea el fósforo normal o bajo de la dieta la causa de la mayor metilación del gen de PTH en el curso de las 20 semanas de uremia estudiadas en este trabajo. De hecho, la restricción de fósforo en la dieta no afecta el contenido intraglandular de PTH, sino la capacidad de la célula paratiroidea para su secreción a la circulación²².

Una limitación importante de este estudio es que no se ha estudiado el impacto de la metilación de estas dos CpGs en la transcripción del gen de PTH. Por tanto, solo podemos postular un mecanismo potencial a ser analizado con mayor profundidad en el futuro con el objeto de identificar una relación causa-efecto entre el desarrollo de hipometilación del gen de PTH y sus mecanismos moleculares de control, que permitirían la incorporación de nuevas estrategias terapéuticas para el control del HPTS en la ERC.

En conclusión, estos hallazgos sugieren que el desarrollo de alteraciones epigenéticas como la significativa hipometilación del gen de la PTH, que se alcanza en estadios avanzados de disfunción de la glándula paratiroides en la enfermedad renal experimental, podrían contribuir al incremento tanto de la síntesis como la secreción de PTH. El diseño de estudios que permitan obtener evidencias concluyentes del impacto que la hipometilación tenga sobre la síntesis de PTH y que conduzcan a la identificación de los mecanismos moleculares responsables de esta modificación epigenética inducida por el elevado fósforo de la dieta, constituye el primer paso obligatorio para el diseño de estrategias terapéuticas innovadoras para el tratamiento efectivo del HPTS desde estadios tempranos de la ERC.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida por la beca FEIOMM 2014 para promover la investigación traslacional. A Agustín Fernández Fernández del Laboratorio de Epigenética de Oviedo por sus sugerencias sobre el manuscrito. Este trabajo ha sido también parcialmente financiado con ayuda del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (PI 09/00415), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028), Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo, RETIC RedInRen del ISCIII – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (RD06/0016/1013, RD12/0021/1023 y RD16/0009), por la Sociedad Asturiana Fomento Investigaciones Metabólicas.

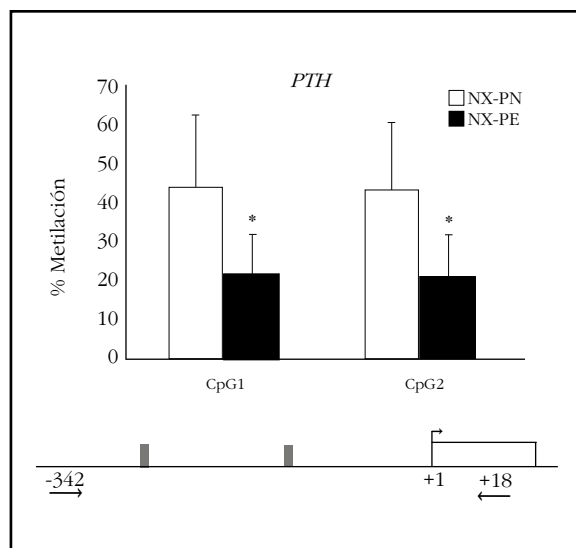
Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Las manipulaciones de los animales de experimentación se han realizado según lo dispuesto en la normativa legal vigente (Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE y Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero).

Bibliografía

1. Eckardt KU, Coresh J, Levin A. Evolving important of

Figura 2. Grado de metilación en los sitios CpGs de la región -342 a +18 del promotor de PTH que precede el inicio de la transcripción en glándulas paratiroides provenientes de ratas nefrectomizadas (NX) alimentadas con una dieta con contenido en fósforo normal (NX-PN) o elevado (NX-PE) durante 20 semanas. (*p<0,05 respecto al NX-PN). En la parte inferior del gen se representa gráficamente la zona analizada del promotor y el número de sitios CpG existentes en dicho fragmento



kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*. 2013;382:158-69.

2. Silver J, Levi R. Cellular and molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Clin Nephrol*. 2005;63:119-26.

3. Rodríguez M, Cañadillas S, Lopez I, Aguilera-Tejero E, Almaden Y. Regulation of parathyroid function in chronic renal failure. *J Bone Miner Metab*. 2006;24:164-8.

4. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. The emerging role of Klotho in clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27:2650-7.

5. Korkor AB. Reduced binding of [3H]1,25-dihydroxyvitamin D3 in the parathyroid glands of patients with renal failure. *N Engl J Med*. 1987;316:1573-7.

6. Ritter CS, Finch JL, Brown AJ. Parathyroid hyperplasia in uremic rats precedes down-regulation of the calcium receptor. *Kidney Int*. 2001;60:1737-44.

7. Carmona FJ, Esteller M. Epigenomics of human colon cancer. *Mutat Res*. 2010;693:53-60.

8. Kim MS, Lee J, Sidransky D. DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29:181-206.

9. Ng JM, Yu J. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16:2472-96.

10. Kim Y, Kim DH. CpG island hypermethylation as a biomarker for the early detection of lung cancer. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:141-71.

11. King GD, Rosene DL, Abraham CR. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. *AGE*. 2012;34:1405-19.

12. Sun CY, Chang SC, Wu MS. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int*. 2012;81:640-50.

13. Levine MA, Morrow PP, Kronenberg HM, Phillips III JA. Tissue and gene specific hypomethylation of the human parathyroid hormone gene: association with parathyroid hormone gene expression in parathyroid glands. *Endocrinology*. 1986;119:1618-24.

14. Naves Díaz M, Carrillo-López N, Rodríguez-Rodríguez A, Braga S, Fernández-Coto MT, López-Novoa JM, et al. Differential effects of 17 β - estradiol and raloxifene on bone and lipid metabolism in rats with chronic kidney disease and estrogen insufficiency. *Menopause*. 2010;17:766-71.
15. Varshney S, Bhadada SK, Sachdeva N, Arya AK, Saikia UN, Behera A, et al. Methylation status of the CpG islands in vitamin D and calcium-sensing receptor gene promoters does not explain the reduced gene expressions in parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:E1631-5.
16. Hofman-Bang J, Gravesen E, Olgaard K, Lewin E. Epigenetic methylation of parathyroid CaR and VDR promoters in experimental secondary hyperparathyroidism. *Int J Nephrol*. 2012;2012:123576.
17. Uchiyama T, Tatsumi N, Kamejima S, Waku T, Ohkido I, Yokoyama K, et al. Hypermethylation of the CaSR and VDR genes in the parathyroid glands in chronic kidney disease rats with high-phosphate diet. *Human Cell*. 2016;29:155-61.
18. Azuma M, Koyama D, Kikuchi J, Yoshizawa H, Thasinas D, Shiizaki K, et al. Promoter methylation confers kidney-specific expression of the Klotho gene. *FASEB J*. 2012;26:4264-74.
19. Almaden Y, Hernandez A, Torregrosa V, Canalejo A, Sabate L, Fernandez Cruz L, et al. High phosphate level directly stimulates parathyroid hormone secretion and synthesis by human parathyroid tissue in vitro. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:1845-52.
20. Moallem E, Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. RNA-protein binding and post-transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate. *J Biol Chem*. 1998;273:5253-9.
21. Silver J, Kilav R, Naveh-Many T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283:F367-76.
22. Takahashi F, Denda M, Finch JL, Brown AJ, Slatopolsky E. Hyperplasia of the parathyroid gland without secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 2002;61:1332-8.

Montoya MJ¹, Vázquez MA¹, Miranda C², Miranda MJ², Pérez-Cano R^{1,2}, Giner M^{1,3}

¹ Departamento de Medicina - Facultad Medicina - Universidad de Sevilla - Sevilla (España)

² Unidad de Osteoporosis - Servicio Medicina Interna - Hospital Universitario Virgen Macarena - Sevilla (España)

³ Departamento de Citología Normal y Patológica - Facultad de Medicina - Universidad de Sevilla - Sevilla (España)

Influencia de la vitamina D sobre la microestructura y propiedades biomecánicas de pacientes con fractura de cadera

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000400004>

Correspondencia: M^a José Montoya - Avda. Dr. Fedriani, s/n - 41009 Sevilla (España)

Correo electrónico: pmontoya@us.es

Fecha de recepción: 31/03/2017

Fecha de aceptación: 21/05/2017

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

Resumen

Introducción: Valorar niveles séricos de 25-hidroxivitamina D -25(OH)D-, hormonas con influencia sobre el metabolismo óseo (parathormona -PTH- y factor de crecimiento insulínico -IGF-I-), marcadores de remodelado óseo (MRO) (telopéptido carboxilo-terminal del colágeno tipo I - β -CTX- y propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I -PINP-), densidad mineral ósea (DMO), microestructura y biomecánica de cuello de fémur, en pacientes con fractura de cadera osteoporótica (OP) *vs.* pacientes artrósicos (OA).

Material y métodos: Estudio observacional transversal de 29 pacientes OP y 14 OA, edad ≥ 50 años. Cuantificamos niveles séricos hormonales y MRO (inmunoensayo), DMO de cadera (DXA), microestructura (micro-CT) y biomecánica (ensayos de compresión uniaxial, sistema IGFA). Análisis estadístico (SPSS 20.0.)

Resultados: Los pacientes OP presentaron niveles inferiores de 25(OH)D ($p=0,02$) y DMO de cadera ($p<0,05$), y superiores de PTH ($p=0,029$) y de β -CTX ($p=0,04$). Los niveles de 25(OH)D se correlacionaron positivamente con IGF-I ($p=0,04$) y negativamente con β -CTX ($p=0,003$). Los valores de PTH se correlacionaron negativamente con DMO de cadera ($p=0,0005$) y positivamente con la separación trabecular (Tb.Th) ($p=0,006$). Los pacientes con niveles de 25(OH)D <20 ng/mL presentaron niveles mayores de β -CTX ($p=0,006$), menores de IGF-I ($p=0,007$) y Tb.Th ($p=0,04$).

Conclusiones: Los niveles de vitamina D son bajos en población anciana, sobre todo en pacientes con fractura de cadera osteoporótica. Además, en estos pacientes existen niveles elevados de PTH y MRO y descendidos de DMO. Los pacientes cuyos niveles de 25(OH)D son inferiores a 20 ng/mL presentan un remodelado óseo más elevado, con menores niveles de IGF-I y alteraciones de la estructura ósea (Tb.Th) que puedan estar en relación con un mayor riesgo de fracturas.

Palabras clave: *vitamina D, osteoporosis, fractura de cadera, densidad mineral ósea, microestructura y biomecánica.*

Influence of vitamin D on biomechanical microstructure and properties of patients with hip fracture

Summary

Introduction: To assess serum levels of 25-hydroxyvitamin D-25 (OH) D-hormones with influence on bone metabolism (parathormone -PTH- and insulin-like growth factor (IGF)-I), bone remodeling markers (BRM) (carboxy-terminal telopeptide of collagen type I- β -CTX- and amino-peptide pro-peptide of procollagen type I -PINP), bone mineral density (BMD), microstructure and biomechanics of the femoral neck, in patients with osteoporotic hip fracture (OH) versus arthritic patients (OA).

Material and methods: A cross-sectional observational study of 29 OH and 14 OA, age ≥ 50 years. We quantified hormonal serum levels and BRM (immunoassay), hip BMD (DXA), microstructure (micro-CT) and biomechanics (uniaxial compression tests, IGFA system). Analysis (SPSS 20.0.)

Results: OH patients had lower levels of 25(OH)D ($p=0.02$) and hip BMD ($p<0.05$), and higher PTH ($p=0.029$) and β -CTX ($p=0.04$). Levels of 25(OH)D correlated positively with IGF-I ($p=0.04$) and negatively with β -CTX ($p=0.003$). The PTH values were correlated negatively with hip BMD ($p=0.0005$) and positively with trabecular thickness (TbTh) ($p=0.006$). Patients with 25(OH)D <20 ng/mL presented higher levels of β -CTX ($p=0.006$), lower IGF-I ($p=0.007$) and TbTh ($p=0.04$).

Conclusions: Vitamin D levels are low in the elderly population, especially in patients with osteoporotic hip fracture. These patients also presented raised levels of PTH and BRM and descended from BMD. Patients whose 25(OH)D levels are below 20 ng/mL present higher bone remodeling, with lower levels of IGF-I and alterations of the bone structure (TbTh) that may be linked to a greater risk of fractures.

Key words: vitamin D, osteoporosis, hip fracture, bone mineral density, microstructure and biomechanics.

Introducción

La fractura de cadera es una de las principales y la más temida complicación de la enfermedad osteoporótica. Entre los factores de riesgo favorecedores de este tipo de fractura se incluyen una mayor tendencia a la caída y una disminución de la resistencia ósea. Las propiedades que se relacionan con la resistencia ósea son fundamentalmente la densidad mineral ósea (DMO), la tasa de remodelado óseo, la geometría, la microestructura y la mineralización del tejido óseo¹.

Como es sabido, la vitamina D es esencial, entre otras, para mantener la salud músculo-esquelética. Niveles adecuados de 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) son necesarios para mantener la homeostasis del metabolismo cálcico y una insuficiencia de los mismos conlleva a una menor absorción intestinal de calcio, niveles disminuidos de calcio sérico, mayor secreción de PTH, tasa de remodelado óseo excesiva y, por tanto, una menor cantidad y calidad ósea². Además, se ha comprobado que niveles inferiores a 30 ng/mL se asocian a defectos importantes de la mineralización ósea e incremento en la sustancia osteoide³. Todas estas alteraciones descritas producen una disminución de la resistencia ósea y, por ello, mayor riesgo de fracturas. Sobre el músculo, varios estudios han manifestado la relación positiva entre niveles de 25(OH)D y fuerza muscular, sobre todo en las extremidades inferiores en personas de edad avanzada^{4,5}. Otros muestran la debilidad y dolor muscular, como síntoma característico de los síndromes deficitarios en vitamina D⁶, así como el incremento en la fuerza muscular y el balance y la reducción al riesgo de caídas⁷⁻¹⁰ tras la administración de suplementos adecuados de vitamina D.

Dos meta-análisis en los que se evalúan estudios controlados, doble ciego y aleatorizados, concluyen el efecto beneficioso de la administración de suplementos de vitamina D, comprobándose una reducción de un 19% en las caídas, un 18% de riesgo de fractura de cadera y un 20% del riesgo de cualquier tipo de fractura no vertebral^{11,12}. En estos mismos estudios se señala que la eficacia anticáidas y anti-fractura de la 25(OH)D se consigue cuando sus niveles se sitúan por encima de 24 y 30 ng/mL, respectivamente.

En la población adulta, se ha descrito una alta frecuencia de niveles inadecuados de vitamina D, inferiores a un umbral variable que se sitúa entre 20-40 ng/mL de 25(OH)D, según los distintos autores, en diversos estudios llevados a cabo en múltiples comunidades de Europa y EE.UU.¹³⁻¹⁵. En España, este hecho también se ha podido constatar en la población anciana con diferentes características en distintas regiones, describiéndose valores inferiores a 15 ng/mL en el 68% de personas de edad media de 77 años, que vivían en su domicilio, frente al 100% de los que estaban institucionalizados en Andalucía¹⁶, una frecuencia algo inferior en Cantabria¹⁷, y niveles aún más bajos (4,6 ng/mL como valores medios) en pacientes con fractura de cadera en Madrid¹⁸.

Estos datos nos revelan, por una parte, la importancia de la vitamina D sobre la salud muscular y la integridad del esqueleto y, por otro lado, la frecuencia de niveles insuficientes de la hormona que existe entre la población adulta en general. No obstante, hasta el momento actual no se conoce la repercusión de los niveles séricos de vitamina D sobre las características microestructurales y biomecánicas del

tejido óseo en pacientes con fractura de cadera. Por ello, el objetivo principal de nuestro estudio es conocer si los niveles de vitamina D influyen sobre la microarquitectura y las propiedades biomecánicas del tejido óseo. En segundo lugar, queremos también analizar la asociación de dichos niveles con marcadores bioquímicos de remodelado óseo y con hormonas que influyen sobre la formación y reabsorción ósea (parathormona -PTH-, y factor de crecimiento insulínico -IGF-I-, respectivamente); parámetros, todos, que contribuyen a la calidad ósea y, por tanto, al riesgo de fractura osteoporótica.

Material y métodos

1. Pacientes

Estudio observacional transversal constituido por 43 pacientes de edades comprendidas entre 50-93 años que iban a someterse a artroplastia de cadera. El primer grupo constituido por 29 (6 hombres y 23 mujeres) pacientes con fractura de cadera no traumática (OP), considerada como osteoporosis idiopática (involuntiva). El segundo, como grupo comparativo, formado por 14 pacientes (6 hombres y 8 mujeres) con artrosis (OA) y valores de masa ósea, a nivel de cadera, $T\text{-score} >(-2,5)$, sin antecedentes personales de fractura osteoporótica ni enfermedad con influencia sobre el metabolismo óseo. A todos se les exigió función renal normal.

Todos los pacientes fueron reclutados en el Servicio de Traumatología y Ortopedia, durante el periodo comprendido entre junio 2014-junio 2015. Las muestras de sangre para determinaciones bioquímicas fueron recogidas de forma pareadas con casos y controles, con objeto de evitar el sesgo estacional en los resultados. El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité Ético del Centro y todos los pacientes dieron su consentimiento informado.

A todos ellos se les recogieron los siguientes datos: edad, peso, índice de masa corporal (IMC), hábitos tóxicos (ingesta alcohólica y tabaquismo), ingesta semicuantitativa de calcio (1 vaso de leche=200 mg/día, 1 derivado lácteo=200 mg/día, 1 porción de queso=200 mg/día), antecedentes familiares de primer grado con fractura osteoporótica, tratamiento con suplemento de vitamina D y/o fármacos antirresortivos u osteoformadores. Se valoró masa ósea en cadera contralateral en el periodo comprendido entre los 15-30 días tras la intervención quirúrgica.

Se recogieron muestras óseas de la cabeza de fémur extraída, para análisis microestructural y estudio de propiedades de biomecánica ósea tras test de comprensión.

2. Parámetros bioquímicos

Para realizar las determinaciones bioquímicas se tomaron muestras de sangre de los pacientes, en ayunas, en las primeras 48 h tras la intervención quirúrgica. Se analizaron los siguientes parámetros relacionados con el metabolismo óseo: calcio corregido por los niveles de proteínas, fósforo, marcadores de remodelado óseo de reabsorción (telopéptido carboxilo-terminal del colágeno tipo I o $\beta\text{-CTX}$) y de formación (propéptido aminoter-

minal del procolágeno tipo I o PINP, parathormona (PTH), 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) y factor de crecimiento insulínico (IGF-I).

Los niveles séricos de calcio corregido y fósforo fueron valorados mediante autoanalizador DAX-96. Los niveles de $\beta\text{-CTX}$ y PINP se analizaron por inmunoensayo (electroquimioluminiscencia), con el autoanalizador COBAS e 601 (Roche, España), siendo los coeficientes de variación (CV) interensayo $<7,6\%$ y $<4,2\%$ respectivamente. La PTH sérica fue medida por test de inmunoensayo (electroquimioluminiscencia), con autoanalizador ADVIA Centaur (Siemens, Alemania), siendo el CV interensayo $<5,8\%$. La 25(OH)D sérica se analizó por inmunoensayo competitivo directo (electroquimioluminiscencia), con el autoanalizador LIAISON (DiaSorin, Italia), siendo el CV interensayo $<5,5\%$. Por último, IGF-I sérico se cuantificó por inmunoensayo (electroquimioluminiscencia), con el autoanalizador IMMULITE (Siemens, Alemania), siendo el CV interensayo $<3,9\%$.

3. Valoración masa ósea

Se cuantificó la densidad mineral ósea de cadera y cuello de fémur contralateral mediante densitometría dual de rayos X (DXA), con un densitómetro Hologic-Discovery (Hologic Inc.). El CV *in vivo* fue del 1% (total DMO).

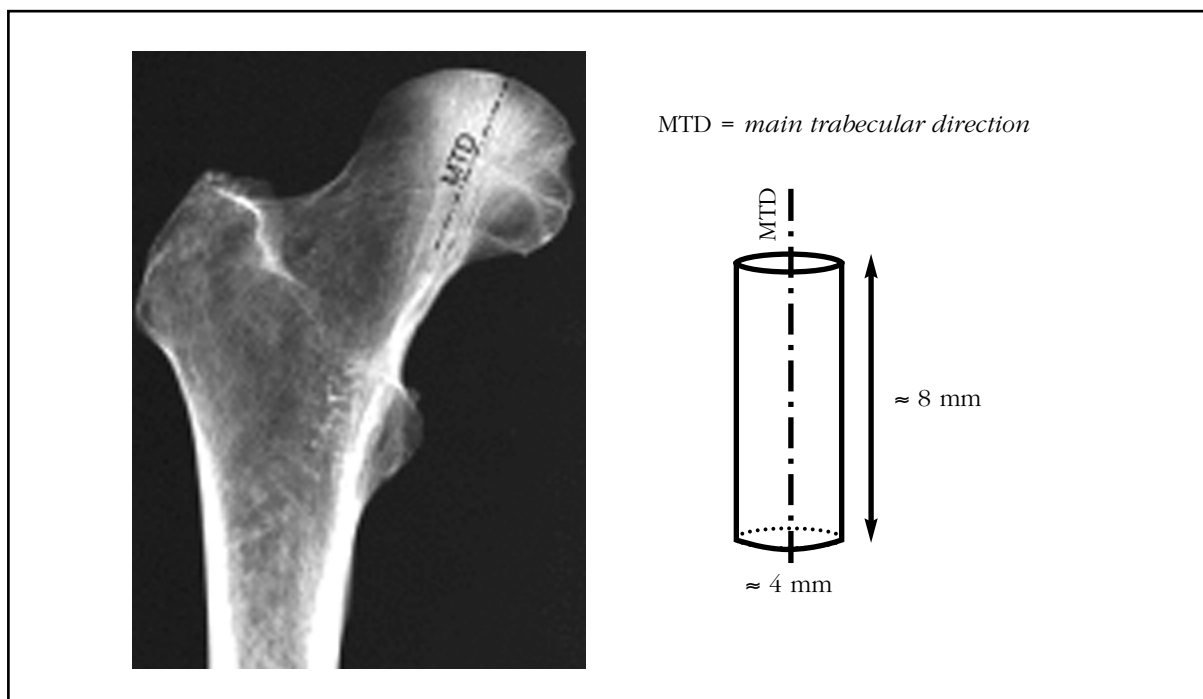
4. Estudio microestructural y biomecánico de tejido óseo

El análisis de la microestructura y de las propiedades biomecánicas se ha realizado a partir de las muestras óseas tomadas en el momento de la intervención quirúrgica para la colocación de la prótesis. De cada cabeza femoral se ha extraído un cilindro de hueso trabecular, de la región primaria de compresión, con el eje longitudinal del cilindro alineado con la dirección trabecular principal (*main trabecular direction*, MTD, en dirección superior-inferior) (Figura 1).

El análisis microestructural de las biopsias se ha llevado a cabo mediante microtomografía computarizada (micro-TC) empleando el equipo comercial SkyScan 1172 (Bruker, Bélgica). El escaneado de la muestra se ha realizado a una resolución de 11 μm tomando 2 imágenes por cada paso de rotación de la muestra ($0,40^\circ/\text{paso}$, 180° totales de rotación). Las imágenes obtenidas se han reconstruido empleando el algoritmo modificado de Feldkamp y posteriormente se han empleado para el análisis cuantitativo y cualitativo de la microestructura ósea trabecular.

Las variables cuantitativas determinadas han sido: fracción volumétrica ósea (BV/TV), grosor trabecular (Tb.Th), número trabecular (Tb.N), separación trabecular (Tb.Sp), grado de anisotropía (DA), que es una medida de la simetría del objeto, o de la presencia/ausencia de estructuras alineadas en una determinada dirección, índice de estructura del modelo (SMI), que indica la prevalencia relativa de trabéculas en forma de placas o en forma de tubocilindro y conectividad trabecular (como *trabecular pattern factor*, Tb.Pf), que es un índice de conectividad inverso, de manera que cuanto más alto es el valor menos conectadas están las trabéculas.

Figura 1. Localización de la extracción de cilindro de hueso trabecular para el análisis de la microestructura y propiedades biomecánicas



Para la valoración de las propiedades biomecánicas se han llevado a cabo ensayos de compresión uniaxial mediante el sistema IGFA (*image-guided failure analysis*), aplicándose una fuerza máxima, de 200 N, sin llegar al límite de resistencia elástica de la muestra. Las variables que se cuantificaron para describir el comportamiento mecánico del tejido óseo fueron la tensión máxima (σ), o resistencia interna máxima del objeto a una fuerza que actúa sobre él; la deformación máxima (ϵ), que representa los cambios en las dimensiones del objeto sometido a la acción de la fuerza, a partir del cual se producen microfrazuras y el módulo de Young (E), o módulo elástico, que representa la pendiente de la región elástica.

5. Estudio estadístico

Se ha utilizado el paquete estadístico SPSS versión 20.0 (IBM, EE.UU.). Para el análisis estadístico de los resultados de variables cuantitativas, hemos llevado a cabo análisis de comparación de medias t de Student para muestras independientes. Hemos realizado análisis lineal univariante (ANCOVA), para tener en cuenta posibles factores de confusión como la edad e IMC. Para valorar la asociación entre variables se ha utilizado el test de correlación de Pearson. Para estudiar las variables cualitativas hemos analizado tablas de contingencia, χ^2 . En todos los casos se exigió un nivel de $p < 0,05$ para considerar diferencias significativas.

Resultados

Las características de los pacientes estudiados de cada uno de los grupos se encuentran en la tabla 1. Como era de esperar, los pacientes con fractura de

cadera presentaban una edad significativamente mayor, 81 ± 8 vs. 68 ± 9 años, $p = 0,001$, un IMC menor $28,2 \pm 5,8$ vs. $31,9 \pm 4,4$, $p = 0,043$ y valores de masa ósea, a nivel de cadera, inferiores ($p < 0,05$ para todas las localizaciones). Dado que el grupo de pacientes con fractura y osteoartrósicos eran diferentes en cuanto a edad e IMC, los parámetros analizados fueron ajustados por estas variables. En cuanto a los hábitos, antecedentes familiares de osteoporosis de primer grado, tratamiento con fármacos antirresortivos y suplemento con vitamina D y calcio eran semejantes en ambos grupos.

1. Valores séricos de parámetros relacionados con el metabolismo óseo

Los parámetros bioquímicos de los pacientes estudiados se muestran en la tabla 2. Los niveles séricos de 25(OH)D fueron significativamente inferiores en pacientes con fractura respecto al grupo de pacientes con osteoartritis ($10,9 \pm 6,9$ vs. $18,1 \pm 10,7$ ng/mL, $p = 0,02$). Los valores de PTH ($60 \pm 41,1$ vs. $38,2 \pm 17,3$ pg/mL, $p = 0,029$) y del marcador de reabsorción ósea β -CTX ($0,61 \pm 0,26$ vs. $0,36 \pm 0,19$ ng/mL, $p = 0,04$) fueron significativamente superiores en el primer grupo. Los niveles de calcio sérico corregido, fósforo, marcador de formación ósea PINP e IGF-I fueron comparables en ambos grupos. Tras el ajuste por la edad y el IMC, comprobamos que las diferencias que habíamos encontrado para 25(OH)D y β -CTX se mantenían significativas. Los valores ajustados para la 25(OH)D fueron $10,7 \pm$ (IC 95% $6,6$ - $14,7$) ng/mL, para el grupo de pacientes de fractura de cadera y $19,6 \pm$ (IC 95% $13,7$ - $25,5$) ng/mL, para el de pacientes artrósicos, ($p = 0,027$). Los niveles de β -CTX ajustados por las mismas variables

Tabla 1. Características de la población de estudio. Valores expresados como media ± DS

	OA (n=14)	OP (n=29)	p
Edad (años)	68±9	81±8	p=0,0001
Peso (kg)	77,8±17,9	68,7±13,5	n.s.
IMC (kg/m ²)	31,92±4,41	28,22±5,8	p=0,043
DMO cuello (g/cm ²)	0,733±0,15	0,577±0,09	p=0,008
DMO cadera (g/cm ²)	0,905±0,14	0,774±0,12	p=0,029
T-score cuello	-1,3±1,1	-2,5±0,8	p=0,008
T-score cadera	0,7±0,8	-1,5±0,9	p=0,034
Fumadores	14,3%	11,5%	n.s.
Antecedentes familiares en 1º grado de osteoporosis	23,1%	30,8%	n.s.
Tratamiento vitamina D	23,1%	10,5%	n.s.
Ingesta de calcio (mg/día)	770,4±444,8	725,1±252,6	n.s.

n.s.: no significativo.

Tabla 2. Valores séricos de parámetros bioquímicos de la población de estudio. Valores expresados como media ± DS

	OA (n=14)	OP (n=29)	p
25(OH)D (ng/mL)	18,1±10,7	10,9±6,9	p=0,02
PTH (pg/mL)	38,2±17,3	60±41,1	p=0,029
PINP (ng/mL)	55,8±37,6	57,6±38,0	n.s.
β-CTX (ng/mL)	0,36±0,19	0,61±0,26	p=0,04
Fósforo (mg/dL)	3,1±0,5	3,1±0,8	n.s.
Calcio corregido (mg/dL)	9,5±0,6	9,4±0,4	n.s.
IGF-I (ng/mL)	66,3±36,6	51,7±29,0	n.s.

n.s.: no significativo.

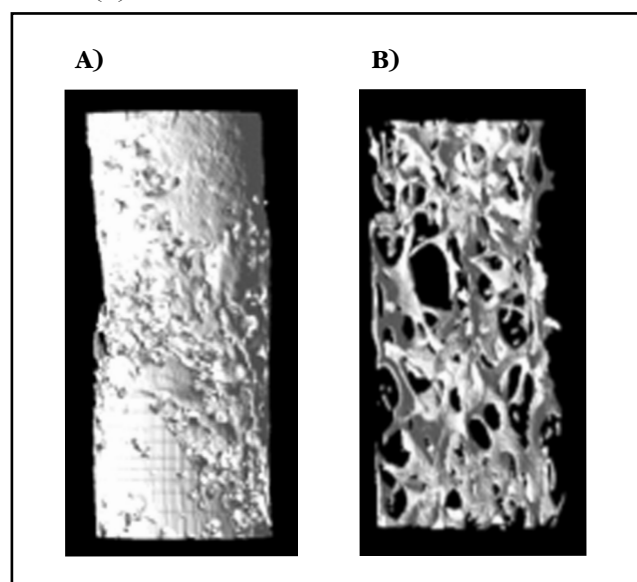
fueron 0,63±(IC 95% 0,51-0,7) ng/mL, en el grupo de pacientes de fractura de cadera y 0,30±(IC 95% 0,1-0,5) ng/ml, en el grupo artrósico (p=0,012).

Los niveles de 25(OH)D mostraron una correlación significativa y positiva con los valores séricos de IGF-I (r=0,338, p=0,044) y negativa con los de β-CTX (r=-0,483, p=0,003). Los niveles de PTH se correlacionaron significativamente de forma negativa con la DMO-cadera (r=-0,617, p=0,005) y positivamente con la separación de las trabéculas (r=0,530, p=0,006).

2. Microestructura y biomecánica del tejido óseo

Los índices microestructurales muestran una menor calidad ósea en el grupo de pacientes con fractura de cadera respecto al grupo artrósico. En la figura 2, mostramos el resultado de imágenes escaneadas de dos pacientes, cada una perteneciente a un grupo de estudio.

Figura 2. Reconstrucción de imágenes escaneadas de biopsias de paciente con artrosis (A) y con fractura de cadera (B)



Si bien ningún parámetro mostró diferencia estadísticamente significativa, comprobamos que los valores de porcentaje de volumen óseo, así como el grosor y número de trabéculas eran menores en los pacientes con fractura, mientras que la separación entre ellas era mayor (Tabla 3).

El índice de patrón trabecular (índice inverso de conectividad) presentó valores superiores en el grupo de pacientes fracturados. El índice de estructura del modelo, que implica una prevalencia relativa de trabéculas en forma de tubo-cilindro respecto a las de forma de placa, fue superior en el grupo de pacientes con fractura de cadera, indicando un mayor número de trabéculas en forma de tubo-cilindro, menos resistentes, en estos pacientes.

Los estudios de biomecánica demostraron que los valores de módulo de Young, tensión máxima y deformación máxima, tras aplicar los test de compresión, fueron inferiores en los pacientes con fractura de cadera respecto a los pacientes con artrosis, aunque estas diferencias no llegaron a ser significativas (Tabla 3).

3. Resultados DMO y estructura ósea en pacientes con niveles insuficientes de 25(OH)D (<20 ng/mL)

Los niveles séricos de 25(OH)D en la población estudiada han mostrado valores muy bajos, en un rango de 4,0-41,6 ng/mL. Al dividir los pacientes en dos grupos, atendiendo a que dichos niveles fueran inferiores o iguales a 20 ng/mL o bien superiores, hemos encontrado los siguientes resultados: las dos poblaciones eran semejantes en cuanto a edad, peso, IMC, valores de masa ósea y características biomecánicas del tejido óseo. Sin embargo, aquellos con niveles inferiores a 20 ng/mL presentaron valores séricos más altos de β -CTX ($0,58 \pm 0,25$ vs. $0,30 \pm 0,15$ ng/mL, $p=0,006$), más bajos de IGF-I ($49,8 \pm 27,0$ vs. $83,5 \pm 35,6$ ng/mL, $p=0,007$) y la estruc-

tura ósea mostró menor anchura trabecular ($0,34 \pm 0,17$ vs. $0,50 \pm 0,1$ mm, $p=0,04$) (Figura 3).

Discusión

Este estudio nos ha permitido comparar los niveles séricos de vitamina D en pacientes con y sin fractura de cadera osteoporótica y la asociación de estos niveles con marcadores de remodelado óseo, hormonas reguladoras del metabolismo óseo, DMO, índices microestructurales y propiedades biomecánicas del cuello de fémur de estos pacientes.

Hemos comprobado que los pacientes con fractura de cadera osteoporótica presentaban niveles séricos de 25(OH)D significativamente menores que los no fracturados. Además hemos encontrado una elevada prevalencia en personas mayores con niveles deficientes (<20 ng/mL), sobre todo en el grupo de pacientes del grupo OP, en consonancia con lo observado por otros autores¹³⁻¹⁸, a pesar de contar en nuestro entorno con aproximadamente 3.000 horas solares anuales. Como es sabido, los niveles insuficientes de vitamina D están asociados a un mayor riesgo de caídas y de fracturas osteoporóticas^{11,12}. En nuestro trabajo comprobamos, además, que los pacientes con fractura de cadera osteoporótica también muestran niveles séricos superiores de β -CTX y PTH, junto con valores inferiores de DMO en todas las localizaciones medidas en cadera, en relación a los pacientes sin fractura. Junto a ello, demostramos una correlación negativa significativa entre los niveles de 25(OH)D y de β -CTX, así como entre los niveles de PTH y DMO. Estos datos tomados en conjunto explican, una vez más, que los niveles bajos de 25(OH)D se asocian a altos niveles de PTH, que induciendo un mayor recambio óseo explicaría los valores más elevados de los marcadores de remodelado óseo. El desequilibrio en los niveles de estos parámetros provocan deterioro tra-

Tabla 3. Microestructura y propiedades biomecánicas óseas del grupo de estudio. Valores expresados como media \pm DS

	OA (n=14)	OP (n=29)
BV/TV (%)	36,2 \pm 12,1	30,5 \pm 12,9
Tb.th (mm)	0,39 \pm 0,2	0,34 \pm 0,2
Tb.Sp (mm)	1,02 \pm 0,6	1,04 \pm 0,5
Tb.N (mm-1)	0,98 \pm 0,9	0,83 \pm 0,7
Tb.Pf (mm-1)	-0,08 \pm 4,2	2,81 \pm 5,0
SMI	0,44 \pm 1,3	1,07 \pm 0,8
AD	2,96 \pm 0,67	3,43 \pm 0,98
Módulo de Young (Mpa)	460 \pm 276	397 \pm 173
σ (Mpa)	9,1 \pm 4,9	8,2 \pm 3,6
ϵ	0,045 \pm 0,04	0,039 \pm 0,02

BV/TV: fracción volumétrica ósea; Tb.th: grosor trabecular; Tb.Sp: separación trabecular; Tb.N: nº trabéculas; Tb.Pf: conectividad trabecular; SMI: índice de modelo estructural; AD: grado de anisotropía; σ : tensión máxima; ϵ : deformación máxima.

becular que conduce al hueso a tener un mayor riesgo de fractura. Una tasa elevada de remodelado óseo incrementa el número de cavidades de reabsorción. Estas cavidades actúan como áreas “de acumulación de estrés”, focos de debilidad que pueden incrementar el riesgo de microfracturas y macrofracturas¹⁹. La excesiva reabsorción puede también conducir a la perforación de las trabéculas y a la pérdida permanente de conectividad. Todas estas alteraciones descritas a nivel microestructural del hueso trabecular lo hacen menos resistente a la carga y, por tanto, con mayor riesgo de fractura²⁰. En nuestro estudio, todas las personas con fractura de cadera no traumática y con osteoartritis, salvo una de este último grupo, presentaban niveles de 25(OH)D <40 ng/mL. Hay autores que han señalado que los hombres con osteoartritis radiológica de cadera tienen niveles más bajos de 25(OH)D y una prevalencia de insuficiencia y deficiencia más alta que la población control²¹. Como es sabido, es justo hasta este valor de 40 ng/mL para el que se describe una relación inversa entre vitamina D y PTH¹⁶. A pesar de que una escasa ingesta de calcio puede ser también responsable de incrementar los niveles de PTH, en nuestro caso hemos comprobado que la ingesta cálcica era baja pero semejante en ambos grupos de estudio (<800 mg/día). Aunque este es un factor a tener en cuenta, conocemos que niveles insuficientes de vitamina D llevan a niveles elevados de PTH, a pesar de una ingesta de calcio adecuada, y a la inversa, niveles suficientes de vitamina D mantienen niveles normales de PTH a pesar de un ingesta de calcio <800 mg/día²².

Aunque los pacientes con fractura de cadera presentaban menores valores de DMO que los pacientes con artrosis, en todas las localizaciones medidas en la cadera, no hemos encontrado una asociación entre estos valores y los niveles séricos de 25(OH)D, que sí ha sido descrita por otros autores²³. No obstante, queremos resaltar que al agrupar todos los pacientes estudiados según sus niveles de 25(OH)D fueran <20 ng/mL o superior a esta cantidad, el grupo de pacientes con menores niveles también presentaron niveles inferiores de DMO de cadera, del orden de 0,06 gHA/cm². Este dato puede no ser importante a nivel individual, pero sí a nivel poblacional, teniendo en cuenta que por cada descenso de 1 desviación estándar (DS) se incrementa el riesgo de fractura de cadera en un promedio de 2,6 veces^{24,25}. Ello implicaría que, con la menor masa ósea encontrada, el riesgo de fractura puede verse incrementado hasta en 1,5 veces.

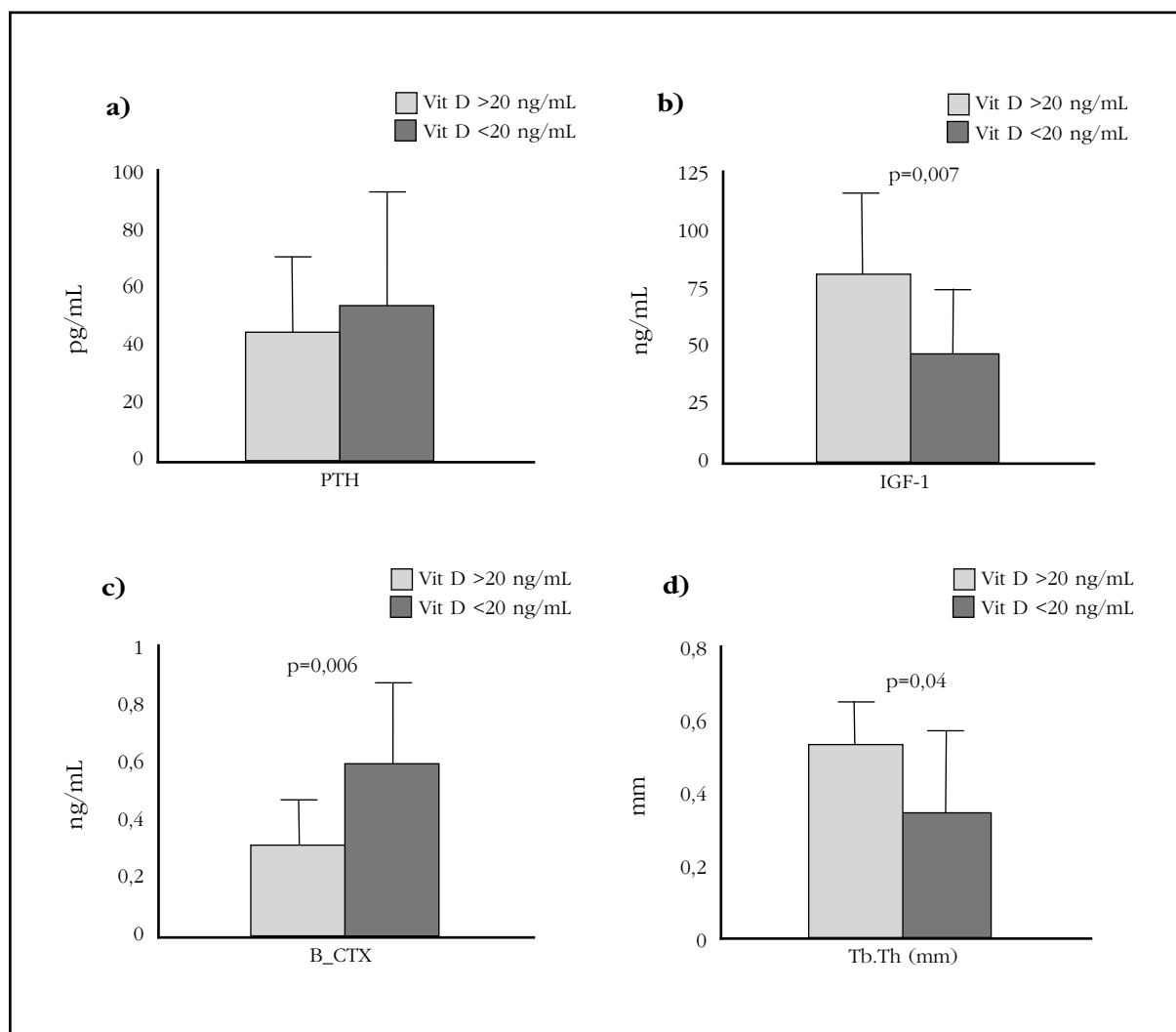
Son muchos los expertos que, reunidos en comité y basándose en estudios poblacionales amplios, han señalado que para mantener la integridad de la salud general, y la ósea en particular, son deseables niveles mínimos de 25(OH)D de al menos 20-30 ng/mL (50-75 nM)²⁶⁻²⁹. El efecto negativo de los niveles insuficientes de vitamina D sobre el hueso se ha valorado por factores subrogados tales como la PTH, la DMO y los marcadores de remodelado óseo, pero también ha sido analizado directamente a través de su asociación con propiedades óseas involucradas en la resistencia ósea y, por tanto, en el riesgo de

fracturas. En este sentido se ha comprobado, por estudios histomorfométricos de cresta iliaca, que la insuficiencia en vitamina D se asocia a defectos de mineralización, mostrando mayores niveles de superficie y de volumen de osteoide, y concluyendo que se requieren niveles de la hormona superiores a 30 ng/mL para evitar un acúmulo patológico de osteoide⁵. Uno de los aspectos fundamentales de nuestro estudio es la valoración de la microarquitectura y propiedades biomecánicas del cuello de fémur de pacientes con y sin fractura de cadera osteoporótica. A pesar de que las diferencias en los distintos parámetros no llegó a ser significativa en ninguno de los casos, como sí ha sido señalado por otros autores^{30,31}, hemos podido comprobar que los pacientes con fractura de cadera presentaban un porcentaje de volumen óseo (BV/TV), un número de trabéculas (Tb.N) y una anchura de éstas (Tb.th) un 16%, 15% y 13% menores, respectivamente, a los de los pacientes con artrosis. Además, las trabéculas estaban menos conectadas y predominaban las que presentaban forma de cilindro-tubo en el grupo fracturado, lo que se relaciona con una menor resistencia ósea³². Junto a ello, los parámetros biomecánicos también mostraban resultados entre el 10-14% menores en los pacientes con fractura de cadera. Queremos reseñar, como punto más importante de este estudio, que en él se analiza por primera vez los niveles séricos de vitamina D, relacionándose directamente con las propiedades microestructurales del tejido óseo en personas con fractura de cadera. Al comparar los niveles de la hormona entre los pacientes, comprobamos que niveles inferiores a 20 ng/mL se asocian a una reducción significativa en la anchura trabecular, además de mayores niveles de β -CTX, indicando una mayor actividad de reabsorción ósea, junto con niveles inferiores de IGF-I. Se ha señalado que el estado de vitamina D contribuye a determinar los niveles séricos de IGF-I³³, a su vez se ha comprobado que la IGF-I estimula la actividad de la 1α -hidroxilasa renal, contribuyendo al metabolismo fosfo-cálcico, además de beneficiar a la masa ósea³⁴, asociándose su reducción a una disminución de la formación ósea que contribuye a la pérdida de hueso en la osteoporosis senil³⁵.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones, la principal es el tamaño de la muestra, que es relativamente pequeño y en segundo lugar, la dispersión de resultados de los parámetros estructurales y mecánicos que podría subsanarse, al menos en parte, con estudios de mayor tamaño.

En conjunto, con los resultados obtenidos, podemos concluir que la población anciana cuenta con un estado de vitamina D deficiente, que estos niveles son aún más bajos entre pacientes con fractura de cadera osteoporótica y que concentraciones séricas inferiores a 20 ng/mL de la hormona pueden, directa o indirectamente a través de la PTH e IGF-I, condicionar una alteración del remodelado óseo (elevación de β -CTX) y la DMO, con la consiguiente repercusión a nivel microestructural (Tb.Th, entre otros) que le lleven a ser un hueso de baja resistencia donde las fracturas ocurran fácilmente.

Figura 3. Niveles séricos de PTH (a), IGF-I (b), β -CTX (c) y Tb.th -anchura trabecular- (d), de pacientes con niveles séricos de 25(OH)D >20 ng/mL (n=10) ó \leq 20 ng/mL (n=33)



Conclusiones

Estos resultados señalan que los pacientes con fractura de cadera presentan niveles inferiores de 25(OH)D, respecto a los pacientes con artrosis, y que estos inducen a una elevación de PTH y un aumento de la reabsorción ósea (con el consiguiente incremento en los niveles de β -CTX) que lleva a una menor masa ósea, una disminución de la calidad y un aumento en el riesgo de fractura. Estas alteraciones se hacen más acusadas en los pacientes con niveles séricos de 25(OH)D <20 ng/mL, en los que además se comprueba una disminución de IGF-I y de la anchura trabecular, a nivel estructural del hueso trabecular de cuello de fémur.

Agradecimientos: Nuestro más profundo agradecimiento a todos los participantes en el estudio y para el personal de la Unidad de Gestión de Ortopedia y Traumatología del HUV Macarena Ortopedia y Traumatología (España). Agradecemos también la financiación del Proyecto PI13/00702, al Instituto de Salud Carlos III, al Plan Nacional 2013-2016 y a los fondos FEDER y por el ISCIII 2013-

RED 12-0043 (RETICEF), que han hecho posible que este estudio se llevara a cabo.

Conflictos de interés: Ninguno de los autores presenta conflicto de intereses que declarar.

Ética: El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional (HUV Macarena, Sevilla, España) y el consentimiento informado se obtuvo de cada participante.

Bibliografía

- Veldurthy V, Wei R, Oz L, Dhawan P, Jeon YH, Christakos S. Vitamin D, calcium homeostasis and aging. *Bone Res.* [Internet]. 2016;4:16041.
- Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ, Recker RR, Cannata Andía JB, Del Pino Montes J, Díaz Curiel M, et al. Papel del calcio y la vitamina D en el tratamiento de la osteoporosis. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2010;2(1):61-72.
- Priemel M, von Domarus C, Klatter TO, Kessler S, Schlie J, Meier S, et al. Bone mineralization defects and vitamin

- D deficiency: histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients. *J Bone Miner Res.* 2010;25(2):305-12.
4. Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke a JP, Visser M, Deeg DJH, Smit J, et al. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(6):2058-65.
 5. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Hu FB, Zhang Y, Karlson EW, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with better lower-extremity function in both active and inactive persons aged 60 y. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(3):752-8.
 6. Schott GD, Wills MR. Muscle weakness in osteomalacia. *Lancet.* 1976;307(7960):626-9.
 7. Annweiler C, Beauchet O. Questioning vitamin D status of elderly fallers and nonfallers: a meta-analysis to address a 'forgotten step'. *J Intern Med.* 2015;277(1):16-44.
 8. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Suppan K, Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H. Effects of a long-term vitamin D and calcium supplementation on falls and parameters of muscle function in community-dwelling older individuals. *Osteoporos Int.* 2009;20(2):315-22.
 9. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Abrams C, Nachtigall D HC. Effects of a short-term vitamin D and calcium supplementation on body sway and secondary hyperparathyroidism in elderly women. *J Bone Min Res.* 2000;15(6):1113-8.
 10. Broe KE, Chen TC, Weinberg J, Bischoff-Ferrari HA, Holick MF KD. A higher dose of vitamin d reduces the risk of falls in nursing home residents: a randomized, multiple-dose study. *J Am Geriatr Soc.* 2007;55(2):234-9.
 11. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, Orav JE, Stuck AE, Theiler R, et al. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2009;339:b3692.
 12. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Stuck AE, Staehelin HB, Orav EJ, et al. Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2009;169(6):551-61.
 13. Kuchuk NO, van Schoor NM, Pluijm SM, Chines A, Lips P. Vitamin D status, parathyroid function, bone turnover, and BMD in postmenopausal women with osteoporosis: global perspective. *J Bone Miner Res.* 2009;24(4):693-701.
 14. Bandeira F, Griz L, Dreyer P, Eufrazino C, Bandeira C, Freese E. Vitamin D deficiency: A global perspective. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(4):640-6.
 15. Holick MF. The vitamin D epidemic and its health consequences. *J Nutr.* 2005;135(11):2739S-48S.
 16. Quesada JM, Jans I, Benito P, Jimenez JA, Bouillon R. Vitamin D status of elderly people in Spain. *Age Ageing.* 1989;18(6):392-7.
 17. Castillo Suárez M, Sosa Henríquez M. Modificación de las hormonas calciotropas y los marcadores bioquímicos de remodelamiento óseo, en función de la edad y el sexo, en una población anciana institucionalizada. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 1998;33:349-56.
 18. Alarcón T, González-Montalvo JI, Hoyos R, Diez-Sebastián J, Otero A, Mauleon JL. Parathyroid hormone response to two levels of Vitamin D deficiency is associated with high risk of medical problems during hospitalization in patients with hip fracture. *J Endocrinol Invest.* 2015;38(10):1129-35.
 19. Geissler JR, Bajaj D, Fritton JC. American Society of Biomechanics Journal of Biomechanics Award 2013: cortical bone tissue mechanical quality and biological mechanisms possibly underlying atypical fractures. *J Biomech.* 2015;48(6):883-94.
 20. van der Linden JC, Weinans H. Effects of microarchitecture on bone strength. *Curr Osteoporos Rep.* 2007;5(2):56-61.
 21. Chaganti RK, Parimi N, Cawthon P, Dam TL, Nevitt MC, Lane NE. Association of 25-hydroxyvitamin D with prevalent osteoarthritis of the hip in elderly men: The osteoporotic fractures in men study. *Arthritis Rheum.* 2010;62(2):511-4.
 22. Steingrimsdottir L, Gunnarsson O, Indridason OS, Franzson L, Sigurdsson G. Relationship between serum parathyroid hormone levels, vitamin D sufficiency, and calcium intake. *JAMA.* 2005;294(18):2336-41.
 23. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B. Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am J Med.* 2004;116(9):634-9.
 24. Cummings SR, Browner W, Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, Browner W, et al. Bone density at various sites for prediction of hip fractures. *Lancet.* 1993;341(8837):72-5.
 25. Ensrud KE, Taylor BC, Paudel ML, Cauley JA, Cawthon PM, Cummings SR, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and rate of hip bone loss in older men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(8):2773-80.
 26. Dawson-Hughes B, Mithal A, Bonjour JP, Boonen S, Burckhardt P, Fuleihan GEH, et al. IOF position statement: Vitamin D recommendations for older adults. *Osteoporos Int.* 2010;21(7):1151-4.
 27. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911-30.
 28. Gómez de Tejada Romero MJ, Sosa Henríquez M, Del Pino Montes J, Jódar Gimeno E, Quesada Gómez JM, Cancelo Hidalgo MJ, et al. Documento de posición sobre las necesidades y niveles óptimos de vitamina D. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2011;3(1):53-64.
 29. Atkinson SA. The new dietary reference intakes from the Institute of Medicine for calcium and vitamin D. *Perspect Infirm.* 2011;8(5):5.
 30. Blain H, Chavassieux P, Portero-Muzy N, Bonnel F, Canovas F, Chammas M, et al. Cortical and trabecular bone distribution in the femoral neck in osteoporosis and osteoarthritis. *Bone.* 2008;43(5):862-8.
 31. Zhang ZM, Li ZC, Jiang LS, Jiang SD DL. Micro-CT and mechanical evaluation of subchondral trabecular bone structure between postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2010;21(8):1383-90.
 32. Cohen A, Liu XS, Stein EM, McMahon DJ, Rogers HF, LeMaster J, et al. Bone microarchitecture and stiffness in premenopausal women with idiopathic osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4351-60.
 33. Bogazzi F, Rossi G, Lombardi M, Tomisti L, Sardella C, Manetti L, et al. Vitamin D status may contribute to serum insulin-like growth factor I concentrations in healthy subjects. *J Endocrinol Invest.* 2010;34(8):200-3.
 34. Bex M, Bouillon R. Growth hormone and bone health. *Horm Res.* 2003;60 Suppl 3:80-6.
 35. Riggs BL. Endocrine causes of age-related bone loss and osteoporosis. *Novartis Found Symp.* 2002;242:244-7.

Carrillo López N¹, Tuñón LePoultel D^{1,2}, Quirós Caso C^{1,3}, Rodríguez I¹, Cannata Andía JB¹, Naves Díaz M¹

¹ Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica - Red de Investigación Renal del Instituto de Salud Carlos III (REDinREN del ISCIII) - Universidad de Oviedo - Oviedo (España)

² Laboratorio de Bioquímica - Hospital 12 de Octubre - Madrid (España)

³ Laboratorio de Medicina - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

Efecto de dosis suprafisiológicas de calcitriol sobre la expresión proteica de células de músculo liso vascular

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000400005>

Correspondencia: Jorge Cannata Andía - Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Hospital Universitario Central de Asturias - Avenida de Roma, s/n - 33011 Oviedo (España)

Correo electrónico: cannata@hca.es

Fecha de recepción: 31/03/2017

Fecha de aceptación: 16/05/2017

Trabajo premiado con una beca FEIOMM de Investigación Básica 2010.

Resumen

Introducción: El calcitriol, fundamental para mantener la homeostasis del calcio y el fósforo en el organismo, puede perjudicar al sistema vascular a dosis elevadas, aumentando el riesgo de calcificación.

Objetivo: Evaluar la expresión diferencial de proteínas en células de músculo liso vascular sometidas a una dosis suprafisiológica de calcitriol.

Material y métodos: Se cultivaron células de músculo liso vascular de rata (SMAC-R) en presencia de 10^{-7} M de calcitriol durante 10 días. Se valoró el cambio de fenotipo muscular a óseo mediante actividad fosfatasa alcalina, inmunocitoquímica, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qPCR) y Western blot. Mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas se evaluó el patrón diferencial de proteínas en presencia y ausencia de 10^{-7} M de calcitriol.

Resultados: La exposición a una dosis alta de calcitriol disminuyó significativamente la expresión génica de elastina y la expresión génica y proteica de α -actina, aumentado la expresión génica de osteocalcina y Runx2 y la proteica de osteoprotegerina.

A nivel proteómico se identificaron 10 proteínas diferencialmente expresadas, destacando el aumento en superóxido dismutasa mitocondrial, proteínas del citoesqueleto, de formación de vesículas y del inflammasoma. Por el contrario, hubo 4 proteínas que disminuyeron su expresión, destacando alguna de tipo muscular.

Conclusiones: En un modelo de células de músculo liso vascular sometidas a una dosis suprafisiológica de calcitriol se observó un aumento de expresión de proteínas del citoesqueleto, que forman vesículas de matriz y que participan en depurar radicales libres y en la respuesta inflamatoria. La pérdida de fenotipo muscular se vio representada por descensos en la expresión de proteínas típicamente musculares.

Palabras clave: *calcificación vascular, calcitriol, proteómica.*

Effect of supra-physiological calcitriol doses on protein expression of vascular smooth muscle cells

Summary

Introduction: Calcitriol, essential for maintaining calcium and phosphorus homeostasis in the body, may damage the vascular system in high doses, increasing the risk of calcification.

Objective: To assess the differential expression of proteins in vascular smooth muscle cells subjected to a supra-physiological dose of calcitriol.

Material and methods: Rat vascular smooth muscle cells (VSMC-R) were cultured in the presence of 10^{-7} M calcitriol for 10 days. The change of muscle to bone phenotype was assessed by alkaline phosphatase activity, immunocytochemistry, quantitative polymerase chain reaction in time (QPCR) and Western blot analysis. By means of two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry was evaluated for the differential protein pattern in presence and absence of 10^{-7} M calcitriol.

Results: Exposure to a high dose of calcitriol decreased elastin gene expression and the protein and gene expression of α -actin protein, increased gene expression of osteocalcin and Runx2 and expression of osteoprotegerin protein. At the proteomic level, 10 differentially expressed proteins were identified, highlighting the increase in mitochondrial superoxide dismutase, cytoskeleton proteins, vesicle formation and inflammasome. On the contrary, there were 4 proteins that diminished expression, highlighting some of muscular type.

Conclusions: In a model of vascular smooth muscle cells submitted to a supra-physiological dose of calcitriol an increased expression of cytoskeleton proteins was observed. These proteins form matrix vesicles and participate in clearance of free radicals and in the inflammatory response. The loss of muscle phenotype was represented by decreased expression of typically muscle proteins.

Key words: vascular calcification, calcitriol, proteomics.

Introducción

La calcificación vascular (CV) es una alteración prevalente en el envejecimiento, que se correlaciona con un aumento en la rigidez de los vasos e incremento del riesgo de muerte cardiovascular¹. En la población general, la progresión y la tasa de CV se han asociado con un aumento de riesgo de fracturas y osteoporosis², precediendo las alteraciones vasculares a las alteraciones propias del hueso que se observan más tarde³. Distintos estudios epidemiológicos han mostrado la relación existente entre las alteraciones del metabolismo óseo, la CV y el aumento de la mortalidad⁴.

El mecanismo por el cual se produce la CV resulta complejo. Inicialmente, se pensaba que era un proceso pasivo consistente en una simple precipitación de calcio y fósforo en un microambiente apropiado⁵. Sin embargo, en la actualidad se sabe que, además de este proceso pasivo, hay mecanismos activos que discurren a la par que los primeros. Durante estos procesos activos, las células de músculo liso vascular (CMLV), debido a ciertos promotores de la calcificación, sufren un grado mayor de apoptosis, forman vesículas y finalmente cambian su fenotipo de células musculares lisas a células de tipo osteoblasto, induciendo formación de matriz y también atrayendo factores locales determinantes del proceso de mineralización¹.

La vitamina D, que ejerce su principal efecto fisiológico sobre la homeostasis del calcio y del fósforo, ha sido tradicionalmente usada para el tratamiento y prevención del raquitismo y de la osteomalacia⁶. Se hidroxila en el riñón por acción de la 25-hidroxivitamina D-1 α hidroxilasa dando

lugar al calcitriol, que es el metabolito fisiológico más activo de esta hormona⁷. Desde hace años se conoce que *in vitro* el calcitriol a dosis elevadas induce un incremento de la calcificación en CMLV⁸, de la actividad de la fosfatasa alcalina y una regulación a la baja del péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP)⁹. Estudios posteriores han confirmado el efecto promotor de la calcificación del calcitriol al aumentar el depósito de calcio en la aorta de ratas con función renal normal¹⁰ y al incrementar los niveles de ARN mensajero (ARNm) de las proteínas óseas: Factor de transcripción 2 relacionado con Runt (Runx2), osteocalcina, osteoprotegerina (OPG), receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) y proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) en la aorta de ratas nefrectomizadas^{11,12}.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la expresión diferencial de proteínas que se produce con el efecto calcificante de dosis supra-fisiológicas de calcitriol en un modelo *in vitro* de CMLV.

Material y métodos

Inducción de calcificación vascular por calcitriol

La línea celular de músculo liso vascular de aorta de rata, SMAC-R (*primary culture* DPK-SMAC-R; Pharmakine), fue cultivada a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Lonza) con 10% de suero fetal bovino (FBS, HyClone® Thermo Scientific), penicilina 100 UI/mL, estreptomina 100 μ g/mL y glutamina 2 mM (Biochrom AG).

Alcanzada la confluencia necesaria (60%, aproximadamente), las células se cultivaron con medio

de cultivo DMEM F-12 suplementado con 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA) en ausencia o presencia de calcitriol (10^{-7} M, Sigma-Aldrich) durante diez días, cambiando el medio de cultivo por medio fresco cada 48 horas. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y cada condición en cada experimento se hizo por triplicado.

Determinación de la actividad fosfatasa alcalina

Las CMLV cultivadas en placas de 24 pocillos con o sin calcitriol 10^{-7} M durante 10 días fueron recogidas, y se cuantificó la actividad de la fosfatasa alcalina midiendo la cantidad de para-nitrofenol fosfato hidrolizado siguiendo las instrucciones del kit utilizado para su determinación (BioAssay Systems).

Inmunocitoquímica

Para evaluar la pérdida del fenotipo vascular, se realizó la inmunocitoquímica de α -actina. Para ello, las CMLV crecieron en un soporte plástico específico para ello (Thermanox) y se expusieron posteriormente a calcitriol 10^{-7} M durante 10 días. Para ello, se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón frente a α -actina (CP-47, Calbiochem) y el kit Dako Real™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako).

Análisis de la expresión génica

Para el análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) se extrajo previamente el ARN de las células utilizando Tri Reagent (Ambion) siguiendo un protocolo estándar. A partir de 2 μ g de ARN total, se obtuvo el ADNc utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cuantificar la expresión relativa de los genes, se utilizó un termociclador modelo Stratagene Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies) y reactivos Taqman® (Taqman® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). Se utilizaron los ensayos de Applied Biosystems correspondientes a los siguientes genes: α -actina (Rn01759928_g1), elastina (Rn01499782_m1), osteocalcina (Rn01455285_g1) y Runx2 (Rn01512296_m1). Los resultados se normalizaron frente al control endógeno 18S (Eukaryotic 18S rRNA endogenous control reagent, Applied Biosystems). La interpretación de los datos se realizó mediante el método de la comparación del ciclo umbral ($\Delta\Delta Ct$)¹³.

Estudio proteico

Electroforesis bidimensional de proteínas:

Para el estudio de la expresión diferencial de proteínas por electroforesis bidimensional se cultivaron CMLV durante 10 días en ausencia o presencia de calcitriol 10^{-7} M. La extracción de las proteínas totales se realizó homogeneizando las células en un tampón de lisis compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS 2%. Las proteínas fueron purificadas y desaladas empleando el kit *Ready Prep Clean-up* (Bio-Rad) y cuantificadas mediante el ensayo de Bradford¹⁴.

El isoelectroenfoque (separación de las proteínas según su punto isoelectroico) o primera dimensión, se realizó por triplicado con 150 μ g de proteínas de cada condición en tiras de poliacrilamida deshidratada de 24 cm con un rango de pH 3-10 no lineal (IPG-Strips, GE Healthcare). 24 horas antes del isoelectroenfoque, las tiras se rehidrataron con *DeStreak Rehydration Solution* y anfolitos al 0,5% (ambos de GE Healthcare). El isoelectroenfoque fue realizado en un Ettan IPGphor3 (GE Healthcare), y posteriormente las tiras se lavaron con tampón de equilibrado (urea 6 M, Tris-HCL 75 mM, glicerol 30% y SDS 2%) con dos lavados de 15 minutos, el primero con dithiothreitol (DTT) 1% y el segundo con iodoacetamida 2,5%, para la reducción-alquilación de las proteínas.

La segunda dimensión se realizó mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% en una cubeta múltiple (GE Healthcare). Una vez terminada la electroforesis, los geles fueron teñidos con nitrato de plata 0,1% y digitalizados con un densitómetro calibrado GS-800, analizando la diferente intensidad de los *spots* mediante el programa informático PDQuest, ambos de Bio-Rad.

Análisis de la expresión diferencial de proteínas mediante espectrometría de masas:

Los *spots* expresados de manera diferencial en las dos condiciones de cultivo (ausencia o presencia de calcitriol) fueron recortados del gel, troceados y desteñidos en incubación durante 10 minutos con ferrocianuro potásico 30 mM y tiosulfato sódico 100 mM, y deshidratados en acetonitrilo. Finalmente, fueron digeridos con tripsina 13 ng/ μ L en bicarbonato amónico 10 mM/ acetonitrilo 10% durante 24 horas a 37°C. Los péptidos obtenidos de la digestión con tripsina se identificaron mediante cromatografía de líquidos (nanoHPLC, Applied Biosystems) y espectrometría de masas por trampa iónica (Q-TRAP, Applied Biosystems) (LC-MS/MS). Los espectros de masas de las proteínas expresadas diferencialmente fueron identificados usando la base de datos UniProtKB/Swissprot (www.uniprot.org) y el motor de búsqueda Mascot.

Análisis proteico mediante Western blot:

Para la confirmación de los resultados obtenidos en la electroforesis bidimensional se utilizó el análisis Western blot. Para ello se extrajeron las proteínas totales de los cultivos en tampón de lisis RIPA y se cuantificaron mediante el método estándar de Bradford (Bio-Rad).

Los diferentes extractos proteicos (30 μ g) se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)¹⁵. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Difluoruro de polivinilideno) (Hybond™ P, GE Healthcare) que se incubó con el anticuerpo primario correspondiente en la dilución adecuada: frente a OPG (sc-8468, Santa Cruz Biotechnology, dilución 1:1.000); frente a α -actina (CP-47, Calbiochem, dilución 1:1.000) y frente a GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) (sc25778, Santa Cruz Biotechnology, 1:5.000). Los

anticuerpos secundarios ligados a peroxidasa fueron los específicos para cada anticuerpo primario (sc-2023, Santa Cruz Biotechnology; y 401215, Calbiochem). Por último, se llevó a cabo la detección mediante el kit *ECL Western Blotting Detection* (Amersham Biosciences). El revelado se llevó a cabo usando el equipo Chemidoc XRS+ (Bio-Rad). La determinación de la intensidad de las bandas obtenidas en el Western blot se realizó con el programa informático Image Lab (Bio-Rad).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS para Windows 17.0 (SPSS Inc) y se consideraron diferencias significativas aquellas con un p valor menor de 0,05. Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar. Las diferencias en la actividad de la fosfatasa alcalina y expresión génica y proteica entre las distintas condiciones de cultivo se evaluaron mediante la t de Student después de comprobar la normalidad de las variables. En el caso de la identificación de proteínas con el programa de búsqueda Mascot, la asunción por el mismo de normalidad de las variables ha impedido evaluar la normalidad o no de las proteínas identificadas.

Resultados

Se analizaron en las CMLV los cambios a nivel fenotípico hacia célula tipo osteoblasto tras mantenerlas en cultivo en presencia o ausencia de calcitriol 10⁻⁷ M durante 10 días. Se observó un incremento significativo de la actividad de la fosfatasa alcalina de dos veces en las células expuestas a calcitriol (Figura 1A). A su vez, se observó mediante inmunocitoquímica un descenso en α-actina en las células expuestas a calci-

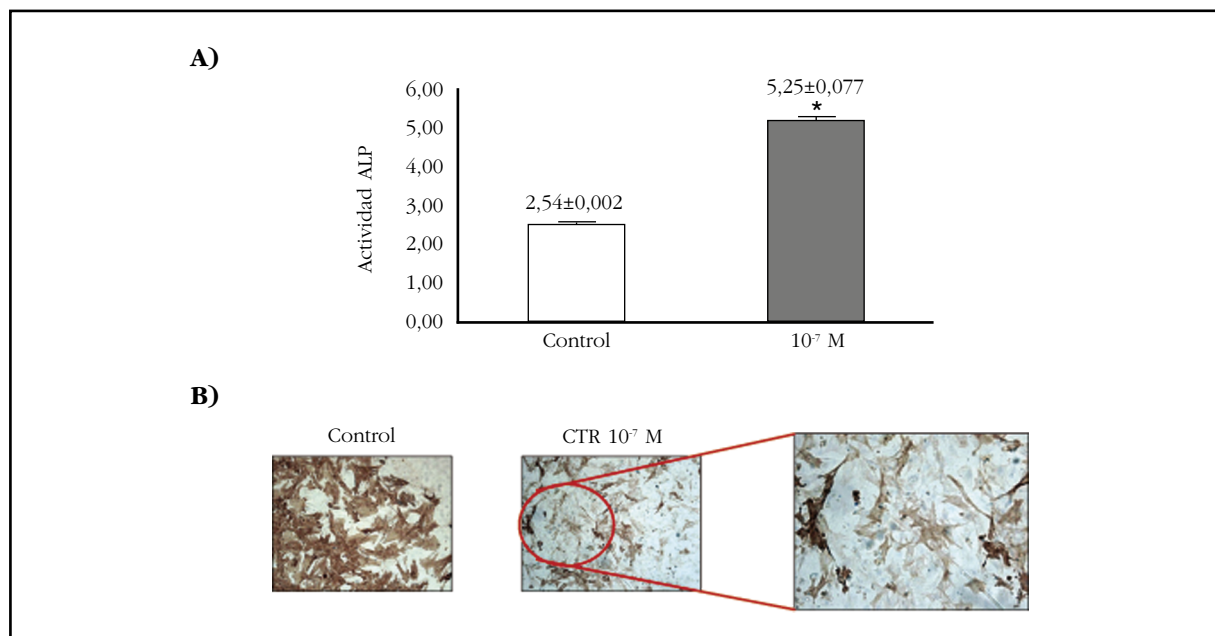
triol, lo que confirma la pérdida del fenotipo muscular con el calcitriol a dosis elevadas (Figura 1B).

El estudio por qPCR de genes musculares y óseos mostró que la exposición a una dosis alta de calcitriol disminuyó significativamente un 35% la expresión génica de α-actina, mientras que para la elastina la supresión fue casi total (99%) (Figuras 2A y 2B). En el caso de los genes típicamente óseos, se observó que la exposición a calcitriol incrementó de manera significativa (13 veces) la expresión génica de osteocalcina, siendo este aumento menor, aunque también significativo, en el caso del Runx2 (2,5 veces) (Figuras 2C y 2D).

Con el fin de comparar el espectro de proteínas expresadas diferencialmente por la exposición de CMLV a calcitriol 10⁻⁷ M durante 10 días (grupo CTR 10⁻⁷ M) con respecto a CMLV en ausencia de calcitriol (grupo Control), se llevó a cabo un análisis proteómico. Se obtuvieron 334 spots localizados en cada uno de los 6 geles teñidos con nitrato de plata (3 Control y 3 CTR 10⁻⁷ M), de entre los cuales 22 presentaron diferencias significativas de expresión (p<0,05). De estos, se identificaron por el buscador Mascot 10 spots que se muestran en la figura 3.

De las 10 proteínas que fueron identificadas (Figura 3 y Tabla 1), cabe destacar el aumento de expresión en 6 de ellas, entre las que destaca la superóxido dismutasa mitocondrial, marcador de estrés oxidativo, que experimentó un mayor incremento. El resto de proteínas que aumentó su expresión fueron proteínas del citoesqueleto o relacionadas con él (proteína ácida fibrilar glicar y treonina/serina quinasa tipo Ste20), proteínas que participan en la formación de vesículas (dinaminas), proteínas de membrana (ceramida glucosiltransferasa) y proteínas del inflammasoma (pirinas). Por el contrario, se iden-

Figura 1. A) Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), medida como nmoles de p-nitrofenol fosfato/μg proteína hidrolizados por minuto, en CMLV expuestas a calcitriol durante 10 días. B) Inmunocitoquímica de α-actina en CMLV en ausencia (control) o presencia de calcitriol 10⁻⁷ M (CTR 10⁻⁷ M) durante 10 días. El círculo rojo se representa a mayor aumento a la derecha para ver la diferencia de tinción. *p<0,05 respecto al control



tificaron 4 proteínas que tras la exposición a calcitriol disminuyeron su expresión, destacando por su mayor descenso la actina citoplasmática 2. El otro marcador muscular cuya expresión se vio también disminuida fue la α -actina de músculo liso aórtico. Las otras dos proteínas cuyas expresiones se vieron disminuidas fueron la prolil-4-hidroxilasa, que participa en la maduración de las fibras de colágeno, y la

dipeptidil peptidasa 10 inactiva (DPP10), que forma parte de canales de potasio.

Para confirmar los resultados obtenidos por proteómica se analizó por Western blot la expresión proteica de α -actina, proteína muscular, y de OPG de estirpe ósea. El Western blot mostró que la exposición al calcitriol indujo un descenso en la expresión proteica de α -actina y un incremento de OPG (Figura 4).

Figura 2. Niveles relativos de ARNm de A) α -actina, B) elastina, C) osteocalcina y D) Runx2 en CMLV en ausencia (control) o presencia de calcitriol 10^{-7} M (CTR 10^{-7} M) durante 10 días. * $p < 0,05$ frente a control

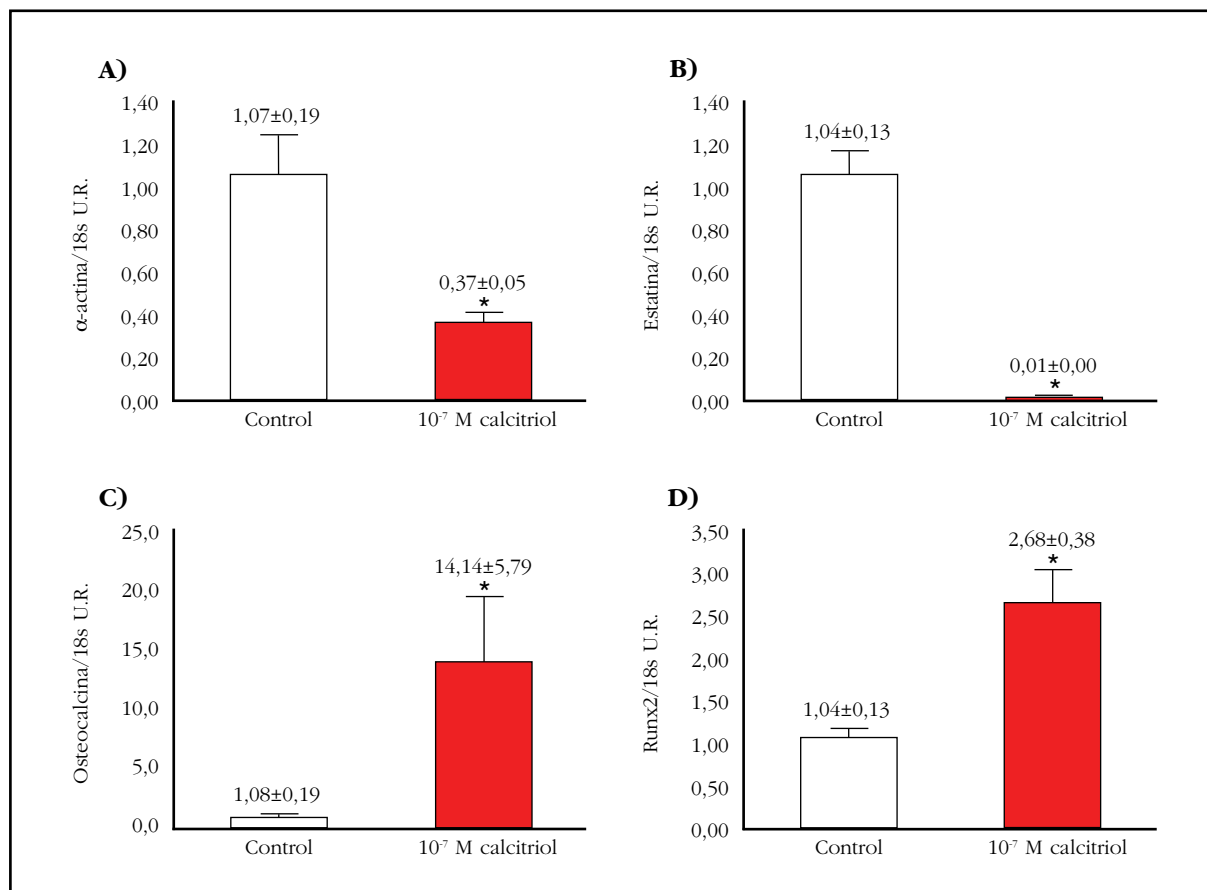


Figura 3. Geles bidimensionales de extractos proteicos de CMLV cultivadas en ausencia (control) o presencia de calcitriol 10^{-7} M (CTR 10^{-7} M) durante 10 días. Se señalan aquellas proteínas expresadas diferencialmente respecto a las células control: en rojo las que muestran aumento y en verde las que disminuyen

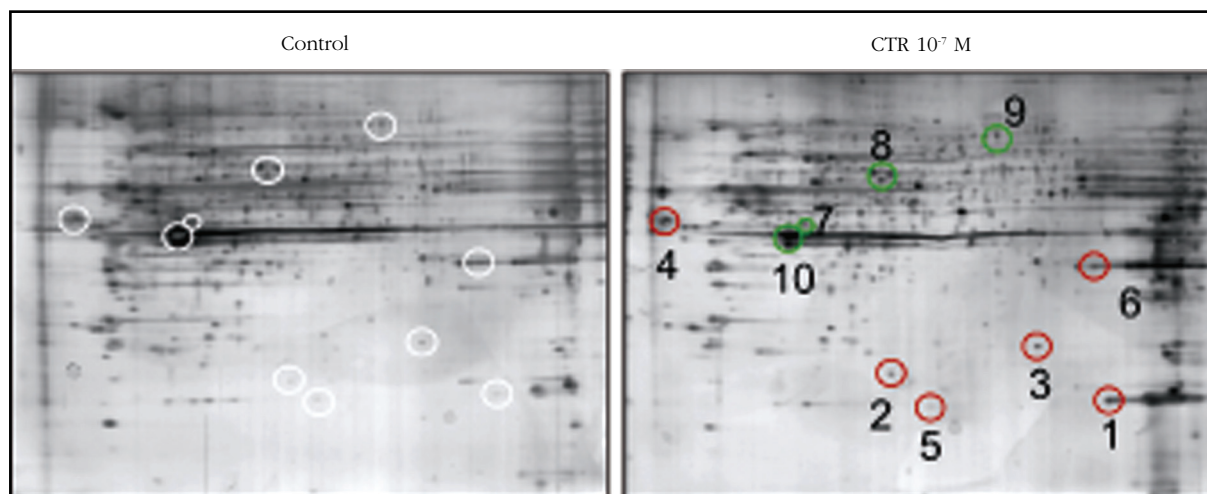


Tabla 1. Listado de proteínas identificadas por el buscador Mascot expresadas diferencialmente en CMLV cultivadas en ausencia (control) o presencia de calcitriol 10⁻⁷ M (CTR 10⁻⁷ M) durante 10 días

Nombre de la proteína	Nº acc.	Nº péptidos	Control	CTR 10 ⁻⁷ M	Tasa de cambio CTR/Control	Valor p
1: Superóxido dismutasa mitocondrial [Mn]	P07895	2	5,5±5,8	15,5±4,2	2,82	0,027
2: Proteína ácida fibrilar glial	Q9UFD0	2	5,1±2,2	13,2±0,8	2,59	0,006
3: Proteína tipo dinamina	O00429	2	6,9±3,5	16,2±6,5	2,35	0,024
4: Serina/treonina quinasa tipo Ste20	Q9H2G2	2	23,4±9,3	54,3±9,4	2,32	0,008
5: Ceramida glucosiltransferasa	Q16739	3	7,6±1,1	14,9±6,6	1,96	0,029
6: Pirina	O15553	1	2,8±4,2	4,5±7,3	1,61	0,041
7: α-actina de músculo liso aórtico	P62738	1	14,1±1,4	6,2±2,1	0,44	0,004
8: Subunidad α1 de la prolil-4-hidroxilasa	P54001	2	23,2±8,1	9,2±2,7	0,39	0,041
9: Dipeptidil peptidasa 10 inactiva	Q8N608	2	33,7±8,1	12,9±8,8	0,38	0,019
10: Actina citoplasmática 2	P63259	8	763±33	208±11	0,27	0,004

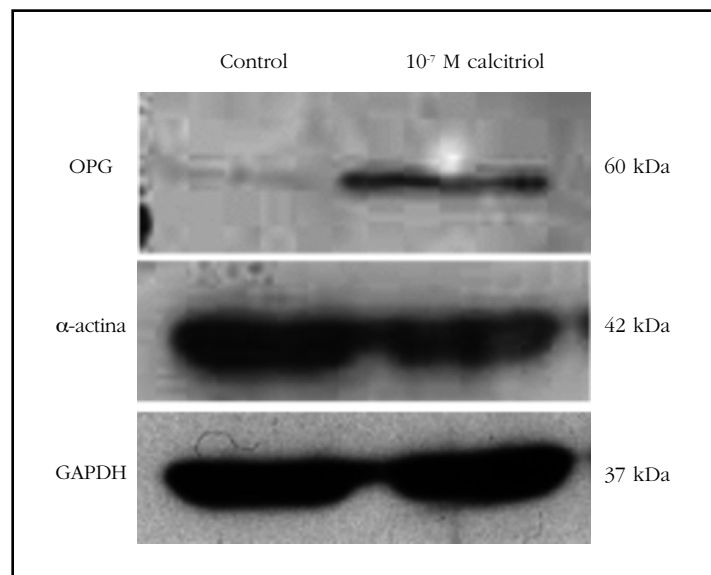
Se muestran los números de acceso de Swissprot (Nº acc.) y el número de péptidos identificados mediante espectrometría de masas (Nº péptidos). Se representa la media de intensidad de los spots ± desviación estándar de los 3 geles control y de los 3 geles CTR 10⁻⁷ M y la tasa de cambio entre ellas (CTR/Control). P calculada mediante t de Student para variables independientes.

Discusión

La investigación en el área de la CV ha despertado un interés creciente debido a su asociación con morbilidad y mortalidad cardiovascular¹⁶. El efecto de la vitamina D como promotor de la CV merece una particular atención, ya que dosis altas de calcitriol se han asociado experimentalmente con un incremento de la CV^{9,17}. Por ello, se ha analizado *in vitro* el perfil de expresión diferencial de proteínas de CMLV sometidas a una dosis suprafisiológica de calcitriol, encontrando por vez primera proteínas que no se habían identificado en este proceso de calcificación mediado por calcitriol.

En el presente estudio y de acuerdo con trabajos previos^{9,18}, se observó un incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y un descenso de la proteína α-actina en las células expuestas a calcitriol. Este efecto puede ser explicado por el aumento de la expresión del factor de transcripción Runx2, el cual ejerce un papel determinante en el cambio fenotípico asociado a la CV¹⁹. También se ha observado un aumento en la transcripción del gen óseo osteocalcina en respuesta al calcitriol y un aumento en la expresión proteica de OPG²⁰, ambas típicamente óseas. De hecho, la administración de dosis elevadas de calcitriol, similares a las utilizadas en nuestro

Figura 4. Sobreexpresión de osteoprotegerina (OPG) y descenso de α-actina por Western blot en CMLV expuestas a calcitriol 10⁻⁷ M durante 10 días



estudio^{9,21}, se ha asociado con CV tanto en ratas nefrectomizadas como en ratas con función renal normal^{10,21}. Por el contrario, dosis bajas de calcitriol y de sus análogos no inducen CV, e incluso pueden tener un efecto protector sobre su desarrollo^{22,23}.

Paralelamente al aumento en la expresión de factores óseos, se ha observado no solo el descenso en

los niveles de proteína α -actina, sino además una disminución en la expresión génica tanto de α -actina como de elastina, ambos marcadores musculares. Dado que las CMLV presentan una elevada plasticidad²⁴, los promotores de la CV pueden inducir una disminución en la expresión de genes musculares y producir una diferenciación hacia fenotipo óseo, acompañado de un aumento de factores que promueven la calcificación²⁵.

Tras el análisis por espectrometría de masas de los extractos proteicos obtenidos, se identificaron 10 proteínas. Según donde ejercen su función, las proteínas identificadas se clasificaron en: proteínas del citoesqueleto, que participan en la formación de vesículas, proteínas de membrana, proteínas de matriz extracelular, proteínas del inflammasoma y proteínas relacionadas con el estrés oxidativo. Las proteínas identificadas se distribuyeron mayoritariamente en el citoplasma, pero también en otros orgánulos intracelulares como el retículo endoplasmático (RE), aparato de Golgi y mitocondria.

De las proteínas expresadas diferencialmente e identificadas por LC-MS/MS, seis vieron aumentada su expresión tras el tratamiento con calcitriol respecto al control. La que presentó mayor sobreexpresión fue la superóxido dismutasa o SOD mitocondrial, que es una óxido-reductasa y una de las enzimas antioxidantes más importantes. Dicho aumento podría representar un mecanismo compensador para contrarrestar el daño inducido por el aumento de especies reactivas de oxígeno en el proceso de calcificación²⁶⁻²⁸.

Otra proteína que se observa aumentada en las CMLV expuestas a calcitriol es la proteína ácida fibrilar gliar, una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular²⁹. Esta proteína se encuentra en ciertas células estrechamente relacionada con filamentos de vimentina, desmina y periferina, los cuales están implicados en la estructura y función del citoesqueleto. No hay datos que relacionen a la proteína ácida fibrilar gliar con la CV, pero su aumento podría también representar un mecanismo compensador para evitar la desorganización del citoesqueleto que ocurre en el proceso de CV.

En el presente estudio también se observó un aumento en dinamina, que es una GTPasa responsable de la endocitosis en las células eucariotas. Las dinaminas están involucradas principalmente en la escisión de las vesículas recién formadas de la membrana de un compartimento celular. Este hecho las podría implicar en un fenómeno común e inductor de la CV como es la aparición de vesículas matriz, que se forman a partir de células donde se origina mineralización o son el resultado del proceso de apoptosis celular (cuerpos apoptóticos)³⁰. De hecho, Kashiwakura y cols. han observado que la dinamina es capaz de regular al menos parcialmente la apoptosis inducida por las lipoproteínas de baja densidad oxidadas regulando su endocitosis³¹. Un reciente artículo las ha implicado como un mediador del estrés oxidativo en cardiomiocitos, ayudando a frenar la producción de especies reactivas de oxígeno y de apoptosis³².

Otro grupo de proteínas que aumentó su expresión en CMLV por su exposición a calcitriol fue la treonina/serina quinasa tipo Ste20. Se trata de enzimas implicadas en la orientación y organización de los microtúbulos del huso durante la mitosis³³. Se conoce que esta proteína es un regulador transcripcional de la quinasa poloide Plk1 en el músculo liso³⁴. Un reciente estudio ha observado un incremento de la expresión de esta proteína en aortas de individuos de edad avanzada, sugiriendo que promueve la inestabilidad de los microtúbulos y filamentos de actina³⁵.

La glucosilceramida transferasa (GlcT-1) también aumentó su expresión proteica. Esta proteína se integra en el metabolismo de los esfingolípidos, interviniendo dentro de este en la transferencia de una molécula de glucosa para la glicosilación de la ceramida (acilesfingosina), dando lugar a los compuestos glicolipídicos denominados cerebrósidos y que son importantes componentes de la membrana celular del tejido muscular. Si bien no hay datos en la literatura que relacionen estas enzimas con el proceso de calcificación vascular, existe un trabajo clásico que encuentra la acumulación de glicoesfingolípidos en pacientes fallecidos con placa aterosclerótica, lo que podría sugerir un mecanismo patogénico de alteración del tejido vascular³⁶.

Cabe destacar el aumento de una proteína denominada pirina que forma parte del inflammasoma. El inflammasoma es un conjunto de multiproteínas citosólicas que permite la activación de las caspasas proinflamatorias, las cuales transforman el precursor de la interleukina-1 β (pro-IL-1 β) a la forma activa (IL-1 β), lo que conduce a una poderosa respuesta inflamatoria³⁷. Recientemente, Wen y cols. han descrito que, para que se produzca la calcificación de las CMLV, se requiere que el inflammasoma se active³⁸.

Asimismo, en concordancia con trabajos previos publicados llevados a cabo en modelos *in vitro* de disfunción endotelial y proteómica³⁹, nuestros resultados mostraron un descenso en la expresión de proteínas estructurales y una desregulación de las proteínas del citoesqueleto en las CMLV expuestas a calcitriol a dosis suprafisiológicas. La actina del músculo liso aórtico y la actina citoplasmática 2 son proteínas que juegan un papel fundamental en la arquitectura y motilidad celular. Este hecho podría interpretarse como una pérdida del fenotipo muscular de las CMLV como consecuencia de la exposición a altas concentraciones de calcitriol.

La CV es un proceso patológico regulado que se asemeja a la osteogénesis. Cuando las CMLV de la media se exponen a un estímulo calcificante mantienen su capacidad para diferenciarse en células tipo osteoblasto o condrocito, expresando distintas proteínas óseas, produciendo vesículas de matriz y componentes de la matriz extracelular con propensión a la mineralización⁴⁰.

En nuestros experimentos, además de componentes de la matriz extracelular, se detectó un descenso en proteínas del retículo endoplasmático

rugoso (RER) implicadas en la maduración del colágeno. La prolil-4-hidroxilasa es una enzima que participa en la hidroxilación post-traslacional de la prolina del procolágeno y cuyo descenso inhibe la formación de la triple hélice. Si bien no hay datos de esta enzima sobre la CV, la ausencia de prolil-3-hidroxilasa con la que comparte el mecanismo de hidroxilación de la prolina en el colágeno da lugar a una hipermineralización de la matriz ósea⁴¹.

Por último, una proteína que ha mostrado un descenso es la dipeptidil peptidasa 10 inactiva (DPP10). Esta proteína, que es un importante componente neuronal de los canales de potasio, puede actuar como una chaperona interactuando con otras importantes moléculas de señalización, como hsp90 y proteínas asociadas, pudiendo modular la apoptosis⁴². Por lo tanto, el descenso observado en nuestro estudio en las células expuestas a calcitriol podría ser una consecuencia del cambio en el fenotipo celular observado.

Los resultados de este estudio experimental *in vitro* tienen la limitación de no ser aplicables directamente a humanos, pero sí que deberían alertar del efecto que dosis elevadas de calcitriol, empleadas como tratamiento del hiperparatiroidismo secundario en la enfermedad renal crónica, podrían tener sobre el proceso de calcificación vascular. Aunque en la población normal el riñón tendría capacidad para eliminar los excesos de calcitriol, en su mayoría derivados del tratamiento con 25-hidroxivitamina D y de su conversión renal y extra-renal a calcitriol, cuando el deterioro de la función renal se agrava por el envejecimiento se debería alertar a los clínicos de seguir un control muy estricto, para evitar efectos nocivos que podría tener un calcitriol elevado, aumentando la hipercalcemia e hiperfosforemia y su posterior depósito en el tejido vascular.

La identificación de los *spots* de proteínas está limitada por la cantidad y la calidad (poca concentración de sales, ácidos nucleicos, lípidos, etc.) del extracto proteínico obtenido, lo cual depende directamente de la eficacia del método de extracción⁴³. En nuestro trabajo, además de las proteínas descritas anteriormente identificadas con una alta fiabilidad, según la puntuación obtenida en las diferentes bases de datos de identificación de proteínas, se identificaron también otras proteínas con una baja puntuación que podría ser explicada atendiendo a diferentes razones⁴⁴. Por un lado, la concentración de algunas moléculas puede ser muy inferior respecto a otras mayoritarias en los *spots* cortados. Por otro lado, algunas proteínas pueden haber experimentado modificaciones post-traduccionales o proteólisis, pudiendo alterar la disponibilidad de los péptidos para su identificación. Por último, hay que tener en cuenta que la caracterización del perfil proteico de las células se ha llevado a cabo en un modelo de calcificación que se prolongó hasta los 10 días. Es posible que, en modelos donde la calcificación se establezca en periodos de hasta 3 semanas, los niveles de algunas proteínas pudieran ser más altos y observarse mayores diferencias.

Por tanto, y a modo de resumen, podemos afirmar que hemos objetivado una disminución del fenotipo vascular y un aumento del óseo en CMLV sometidas a una dosis suprafisiológica de calcitriol. Estos cambios fenotípicos dan lugar a un perfil diferencial de proteínas, con aumento de la expresión de proteínas que participan en la depuración de radicales libres y que forman parte del citoesqueleto como un posible mecanismo compensador al proceso de calcificación. También se observó un aumento de proteínas que participan en la formación de vesículas de matriz, así como en un aumento en la respuesta inflamatoria, ambos procesos inherentes a la calcificación vascular. La pérdida de fenotipo muscular se vio representada por descensos en la expresión de proteínas típicamente musculares. Estos resultados deberían ser ratificados en modelos animales con vistas a su utilidad clínica en la prevención de calcificaciones vasculares en población general.

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

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida por la beca FEIOMM de investigación básica 2010. Este trabajo ha sido también parcialmente financiado con ayuda del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (PI13/00014), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028), Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo, RETIC RedInRen del ISCIII – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (RD06/0016/1013, RD12/0021/1023 y RD16/0009/0017), por la Sociedad Asturiana Fomento Investigaciones Metabólicas.

Bibliografía

1. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2959-64.
2. Naves M, Rodríguez-García M, Díaz-Lopez JB, Gomez-Alonso C, Cannata-Andía JB. Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteoporos Int.* 2008; 19:1161-6.
3. Szulc P, Kiel DP, Delmas PD. Calcifications in the abdominal aorta predict fractures in men: MINOS study. *J Bone Miner Res.* 2008;23:95-102.
4. Rodríguez García M, Naves Díaz M, Cannata Andía JB. Bone metabolism, vascular calcifications and mortality: associations beyond mere coincidence. *J Nephrol.* 2005;4:458-63.
5. Schinke T, Karsenty G. Vascular calcification—a passive process in need of inhibitors. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:1272-4.
6. Hollick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest.* 2006;116:2062-72.
7. Cannata-Andía JB, Gomez Alonso C. Vitamin D deficiency: a neglected aspect of disturbed calcium meta-

- bolism in renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17:1875-8.
8. Inoue T, Kawashima H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake by cultured vascular smooth muscle cells derived from rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;152:1388-94.
 9. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation*. 1998;98:1302-6.
 10. Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res*. 2006;21:484-90.
 11. Mizobuchi M, Finch JL, Martin DR, Slatopolsky E. Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int*. 2007;72:709-15.
 12. Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, López-Ongil S, et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res*. 2009;104:1041-8.
 13. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Method. *Methods*. 2001;25:402-8.
 14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
 15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1990;227:680-5.
 16. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension*. 2001;38:938-42.
 17. Rebsamen MC, Sun J, Norman AW, Liao JK. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res*. 2000;91:17-24.
 18. Shalhoub V, Shatzen EM, Ward SC, Young JI, Boedigheimer M, Twehues L, et al. Chondro/osteoblastic and cardiovascular gene modulation in human artery smooth muscle cells that calcify in the presence of phosphate and calcitriol or paricalcitol. *J Cell Biochem*. 2010;111:911-21.
 19. Sun Y, Byon CH, Yuan K, Chen J, Mao X, Heath JM, et al. Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification. *Circ Res*. 2012;111:543-52.
 20. Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology*. 2000;141:4768-76.
 21. Wu-Wong JR, Noonan W, Ma J, Dixon D, Nakane M, Bolin AL, et al. Role of phosphorus and vitamin D analogs in the pathogenesis of vascular calcification. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318:90-8.
 22. Li X, Speer MY, Yang H, Bergen J, Giachelli CM. Vitamin D receptor activators induce an anticalcific paracrine program in macrophages: requirement of osteopontin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:321-6.
 23. Aoshima Y, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Nakazawa A, Kondo F, et al. Vitamin D receptor activators inhibit vascular smooth muscle cell mineralization induced by phosphate and TNF- α . *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27:1800-6.
 24. Katoh Y, Periasamy M. Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development. *Trends Cardiovasc Med*. 1996;6:100-6.
 25. Tukaj C, Kubasik-Juraniec J, Kraszpulski M. Morphological changes of aortal smooth muscle cells exposed to calcitriol in culture. *Med Sci Monit*. 2000;6:668-74.
 26. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem*. 2008;283:15319-27.
 27. Sutra T, Morena M, Bargnoux AS, Caporiccio B, Canaud B, Cristol JP. Superoxide production: a procalcifying cell signalling event in osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells exposed to calcification media. *Free Radic Res*. 2008;42:789-97.
 28. Roman-Garcia P, Barrio-Vazquez S, Fernandez-Martin JL, Ruiz-Torres MP, Cannata-Andia, JB. Natural antioxidants and vascular calcification: a possible benefit. *J Nephrol*. 2011;24:669-72.
 29. Lewis GP, Matsumoto B, Fisher SK. Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:2404-16.
 30. Kapustin AN, Chatrou MLL, Drozdov I, Zheng Y, Davidson SM, Soong D, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res*. 2015;116:1312-23.
 31. Kashiwakura Y, Watanabe M, Kusumi N, Sumiyoshi K, Nasu Y, Yamada H, et al. Dynamin-2 regulates oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of vascular smooth muscle cell. *Circulation*. 2004;110:3329-34.
 32. Gao D, Yang J, Wu Y, Wang Q, Wang Q, Lai EY, et al. Targeting dynamin 2 as a novel pathway to inhibit cardiomyocyte apoptosis following oxidative stress. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39:2121-34.
 33. Zhapparova ON, Fokin AI, Vorobyeva NE, Bryantseva SA, Nadezhdina ES. Ste20-like protein kinase SLK (LOSK) regulates microtubule organization by targeting dynactin to the centrosome. *Mol Biol Cell*. 2013;24:3205-14.
 34. Li J, Wang R, Gannon OJ, Rezey AC, Jiang S, Gerlach BD, et al. Polo-like kinase 1 regulates vimentin phosphorylation at Ser-56 and contraction in smooth muscle. *J Biol Chem*. 2016;291:23693-703.
 35. Fu Z, Wang M, Everett A, Lakatta E, Van Eyk J. Can proteomics yield insight into aging aorta? *Proteomics Clin Appl*. 2013;7:477-89.
 36. Chatterjee SB, Dey S, Shi WY, Thomas K, Hutchins GM. Accumulation of glycosphingolipids in human atherosclerotic plaque and unaffected aorta tissues. *Glycobiology*. 1997;7:57-65.
 37. Drenth JPH, van der Meer JWM. The Inflammasome - a linebacker of innate defense. *N Engl J Med*. 2006;355:730-2.
 38. Wen C, Yang X, Yan Z, Zhao M, Yue X, Cheng X, et al. Nalp3 inflammasome is activated and required for vascular smooth muscle cell calcification. *Int J Cardiol*. 2013;168:2242-7.
 39. Carbó C, Arderiu G, Escolar G, Fusté B, Cases A, Carrascal M, et al. Differential expression of proteins from cultured endothelial cells exposed to uremic versus normal serum. *Am J Kidney Dis*. 2008;51:603-12.
 40. Neven E, Persy V, Dauwe S, De Schutter T, De Broe ME, D'Haese PC. Chondrocyte rather than osteoblast conversion of vascular cells underlies medial calcification in uremic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:1741-50.
 41. Fratzl-Zelman N, Bächinger HP, Vranka JA, Roschger P, Klaushofer K, Rauch F. Bone matrix hypermineralization in prolyl-3 hydroxylase 1 deficient mice. *Bone*. 2016;85:15-22.
 42. Tsaprouni L, Ito K, Cookson WO, Moffatt MF, Barnes PJ, Adcock IM. Functional genomics of DPP10. Protein characterization and its association with asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:A387.
 43. Gil-Dones F, Martín-Rojas T, López-Almodóvar LF, Juárez-Tosina R, de la Cuesta F, Álvarez-Llamas G, et al. Obtención de un protocolo óptimo para el análisis proteómico de válvulas aórticas humanas sanas y estenóticas. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63:46-53.
 44. Bagnato C, Thumar J, Mayya V, Hwang SI, Zebroski H, Claffey KP, et al. Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6:1088-102.

Panizo García S, Carrillo López N, Martínez Arias L, Román García P, Cannata Andía JB, Naves Díaz M

Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias - Red de Investigación Renal (REDinREN) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Universidad de Oviedo - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

Efecto del estrés oxidativo sobre la calcificación vascular a través del microARN-377

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000400006>

Correspondencia: Manuel Naves Díaz - Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Hospital Universitario Central de Asturias - Avenida de Roma, s/n - 33011 Oviedo (España)
Correo electrónico: manuel@hca.es

Fecha de recepción: 23/06/2017

Fecha de aceptación: 22/07/2017

Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM recibida para asistir al 33º Congreso de la ASBMR (San Diego, 2011).

Resumen

Introducción: El estrés oxidativo ha sido implicado en el desarrollo y la progresión de la calcificación vascular (CV); sin embargo, aún existen interrogantes sobre esta asociación causal.

Objetivo: Analizar en un modelo experimental de insuficiencia renal crónica (IRC) el efecto del estrés oxidativo sobre el desarrollo y la progresión de la CV, evaluando la implicación del microARN-377 (miR-377).

Material y métodos: Se estudiaron 2 grupos de ratas Wistar con IRC. El grupo 1 recibió dieta normal en fósforo (IRC+PN). El grupo 2 recibió dieta con alto fósforo (IRC+PA). Se incluyó un grupo de ratas Sham. Trascurridas 20 semanas, las ratas fueron sacrificadas.

Resultados: El fósforo y la parathormona séricos no aumentaron en el grupo IRC+PA respecto al IRC+PN, pero sí los niveles de factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23). En el grupo IRC+PN aumentó tres veces el contenido aórtico de calcio respecto al grupo Sham, un aumento 17 veces superior en el grupo IRC+PA, donde la densidad mineral ósea en tibia proximal descendió significativamente. En el grupo IRC+PN la expresión del miR-377 disminuyó un 65%, sin efecto adicional de la dieta con alto contenido en fósforo. En el grupo IRC+PN aumentó 3 veces la expresión proteica de superóxido dismutasa 2 mitocondrial (SOD-2), y en el grupo IRC+PA lo hizo hasta 6 veces.

Conclusiones: La IRC con o sin alto contenido en fósforo en la dieta desencadenó el descenso del miR-377. El exceso de fósforo incrementó la SOD-2 como mecanismo compensador para frenar el estrés oxidativo y el daño vascular. Controlar el contenido en fósforo en la dieta cuando la función renal se ve comprometida permitirá aminorar el daño vascular producido como consecuencia, entre otros factores, del estrés oxidativo.

Palabras clave: calcificación vascular, miR-377, SOD-2, estrés oxidativo, DMO.

The effect of oxidative stress on vascular calcification through microRNA-377

Summary

Introduction: Oxidative stress has been implicated in the development and progression of vascular calcification (VC). However, this causal association remains a matter of controversy.

Objective: To analyze in an experimental model of chronic renal failure (CRF), the effect of oxidative stress on the development and progression of the VC, assessing the implication of microRNA-377 (miR-377).

Material and methods: Two groups of Wistar rats with CRF were studied. Group 1 received normal diet in phosphorus (CRF+NP). Group 2 received a high phosphorus (CRF+HP) diet. A group of sham rats was included. After 20 weeks, the rats were sacrificed.

Results: Serum phosphorus and parathormone did not increase in the CRF+HP group compared to CRF+NP, but fibroblast growth factor 23 (FGF23) levels significantly increased. In the CRF+NP group, aortic calcium content increased three-fold over the sham group, a 17-fold increase in the CRF+HP group, where the bone mineral density in the proximal tibia decreased significantly. In the IRC+NP group, the expression of miR-377 decreased by 65%, with no additional effect detected of the diet with high phosphorus content. In the IRC+NP group, the protein expression of mitochondrial superoxide dismutase 2 (SOD-2) increased 3-fold, and in the IRC+HP group it increased up to 6-fold.

Conclusions: CRF, with or without high phosphorus dietary content, triggered the descent of miR-377. Excess phosphorus increased SOD-2 as a compensatory mechanism to curb oxidative stress and vascular damage. Controlling phosphorus content in the diet when the renal impairment function is compromised will reduce the vascular damage produced due oxidative stress, among other factors.

Key words: vascular calcification, miR-377, SOD-2, oxidative stress, BMD.

Introducción

La calcificación vascular (CV) es una de las alteraciones más frecuentes en el envejecimiento, pero especialmente en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). El aumento de las especies reactivas de oxígeno en respuesta a sobrecargas de fósforo (P) que ocurre durante la CV, contribuye a la desdiferenciación fenotípica de las células de músculo liso vascular (CMLV) de un fenotipo propiamente muscular (contráctil) a un fenotipo osteoblástico¹⁻⁴. En concreto, se sabe que el peróxido de hidrógeno, uno de las especies reactivas de oxígeno más comunes, es capaz de inducir la expresión del factor de transcripción osteoblástico Cbfa1/RUNX2 e inducir la calcificación^{5,6}.

Los microARNs (miRs) son pequeños ARNs (~22 nucleótidos) no codificantes de cadena simple que median el silenciamiento postranscripcional de genes al unirse por complementariedad de bases a la región 3' UTR de los ARNm diana. Los miRs están implicados en procesos biológicos cruciales, incluyendo proliferación celular, diferenciación y desarrollo de tejidos^{7,8}. Estudios recientes han demostrado que varios miRs son importantes reguladores de la diferenciación de las CMLV a células semejantes a osteoblastos y, por tanto, de la calcificación vascular⁹⁻¹².

El miR-377 aparece como un importante regulador del envejecimiento al regular, entre otros, al enzima superóxido dismutasa 2 (SOD-2)^{13,14}. La SOD es el principal antioxidante del organismo, que cataliza la conversión de radical superóxido a peróxido de hidrógeno. La SOD-2 corresponde a la forma mitocondrial del enzima. Numerosos trabajos han estudiado el papel del estrés oxidativo

como inductor de la CV, por lo que en el presente estudio nos planteamos analizar en un modelo *in vivo* el posible papel del miR-377 como regulador de la mineralización de la aorta.

Materiales y métodos

Modelo de calcificación vascular

El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo.

El estudio se realizó con ratas Wistar macho (n=10) de 4 meses de edad (350-400 g) que fueron sometidas a una insuficiencia renal crónica (IRC) (7/8) en un solo acto quirúrgico, previa anestesia con isoflurano por vía inhalatoria. Se realizó nefrectomía completa del riñón derecho y a continuación nefrectomía subtotal del riñón izquierdo, mediante incisión lateral y del polo superior. Con este procedimiento se conserva aproximadamente la cuarta parte de la masa renal. Las ratas con IRC se dividieron en dos grupos: uno, PN, alimentado con dieta para roedores estándar con un contenido normal de P (0,6%) y 0,6% de calcio (Ca), y un contenido de proteína del 20% (Panlab, Barcelona, España); y el otro, PA, alimentado con una dieta con alto contenido en P (0,9%), 0,6% de Ca, y un contenido de proteína del 20% (Panlab, Barcelona, España). El estudio duró 20 semanas con el objeto de inducir calcificaciones vasculares. Se incluyó igualmente un grupo Sham (n=5) que fue seguido hasta la semana 20. Veinticuatro horas antes del sacrificio, las ratas se alojaron en jaulas metabólicas para obtener muestras de orina recibiendo en cada caso la misma dieta y agua *ad*

libitum. Se sacrificaron usando como anestesia CO₂, y se extrajeron muestras de suero para su análisis. De cada rata se extrajo la aorta abdominal descendente hasta la bifurcación de las ilíacas y se dividió en tres porciones: el primer fragmento más próximo al cayado de la aorta para determinar el contenido de Ca, el segundo fragmento se utilizó para la extracción de ARN y proteínas, y el tercer fragmento se incluyó en parafina para estudios futuros.

En el momento del sacrificio se extrajeron las dos tibias. La izquierda se conservó en alcohol para medir la densidad mineral ósea (DMO). La tibia restante se congeló a -80°C.

Marcadores bioquímicos

El Ca, el P y la creatinina séricos y la creatinina en orina se midieron usando un analizador automático multicanal Hitachi 717 (Boehringer Mannheim, Berlín, Alemania). La parathormona (PTH) sérica fue medida por ELISA (Immutopics, San Juan Capistrano, EE.UU.) siguiendo los protocolos del fabricante. El factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) se determinó por un kit de ELISA (Kainos Laboratories, Japón).

Densitometría ósea

La DMO se midió en la tibia a tres niveles: octavo proximal, séptimo/octavo distales y tibia total, con un densitómetro radiológico digital de doble energía Hologic QDR-1000 (Hologic, Bedford, EE.UU.) equipado con un programa específico para animales pequeños.

Análisis de calcificación aórtica

La calcificación de la aorta abdominal de las ratas fue analizada mediante el contenido total de Ca. Para determinar el contenido total de Ca, un fragmento de la aorta abdominal (el más próximo al cayado de la aorta) se homogeneizó con un Ultraturax (OmniHT) en HCl 0,6 N. Después de agitar a 4°C durante 24 horas las muestras se centrifugaron. El contenido de Ca se determinó en el sobrenadante por el método de la o-cresolftaleína complexona (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.), y el *pellet* se resuspendió en tampón de lisis (125 mM Tris y 2% de SDS, pH 6,8) para la extracción de proteínas y cuantificación por el método de Lowry (Bio-Rad, Hércules, EE.UU.). El contenido de Ca se normalizó expresándose como µg de Ca por mg de proteína.

Estudio de expresión génica

La extracción de ARN se realizó mediante el método del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo. El ADN copia (ADNc) se sintetizó usando *Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). La expresión génica del miR-377 se analizó por PCR a tiempo real (qPCR) en el equipo Stratagene Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.). Para la PCR se utilizó un ensayo "assay on-demand" diseñado por Applied Biosystems que emplean oligos específicos y son-

das Taqman fluorescentes. Para la cuantificación y normalización se utilizó la expresión del ARN nuclear U6.

Western Blot

Después de la transferencia, las membranas se incubaron durante 12 horas con anticuerpos anti SOD-2 (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, EE.UU.), y anti-GAPDH (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EE.UU.). La unión del anticuerpo secundario se detectó con el kit de detección para *Western Blot* ECL Advance (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, Reino Unido) y con el sistema de modelo de imágenes VersaDoc 4000 (Bio-Rad).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el programa SPSS 17.0. En el caso de variables con distribución normal la comparación de los grupos de tratamiento se realizó por medio del análisis de la varianza (ANOVA) con el test de Bonferroni. En el caso de variables con distribución no normal, se utilizó el test de Kruskal-Wallis.

Resultados

La nefrectomía disminuyó el aclaramiento de creatinina, efecto que no se agravó en los animales que recibieron la dieta con alto contenido en P (Tabla 1). Hubo un discreto, pero no significativo, aumento del P sérico en los animales nefrectomizados que se hizo más notorio en los que recibieron la dieta con alto P. Sin embargo, pequeños aumentos en P sérico se asociaron con aumentos más significativos en los niveles séricos de FGF23. Los niveles séricos de FGF23 aumentaron el doble con la nefrectomía, mientras el aumento en P sérico fue inferior al 50%. De forma similar, en los animales que recibieron la dieta alta en P (IRC+PA) los niveles de FGF23 aumentaron el doble respecto a los de la dieta normal (IRC+PN), siendo el aumento en el P sérico inferior al 25%.

La nefrectomía no tuvo efecto alguno sobre los cambios de DMO en tibia, si bien en el grupo IRC+PA la DMO en tibia proximal disminuyó significativamente respecto al grupo IRC+PN y respecto al grupo Sham (Tabla 1).

En el grupo IRC+PN, el contenido de Ca en la aorta se incrementó 3 veces con respecto al grupo Sham. El aumento con respecto al grupo Sham se incrementó hasta 17 veces en el grupo IRC+PA. La expresión del miR-377 disminuyó un 65% con la nefrectomía, sin observarse ningún efecto adicional con la dieta con alto P. De hecho, el aclaramiento de creatinina fue el parámetro bioquímico que se asoció de forma más marcada con la expresión de este miR ($r=0,83$; $p=0,001$). Por el contrario, el P sérico no se asoció con la expresión del miR-377 ($r=-0,302$; $p=0,34$).

La expresión proteica de la SOD-2 aumentó claramente con la nefrectomía (más de 3 veces), efecto que se hizo más marcado en los animales nefrectomizados con la dieta con alto contenido en P (más de 6 veces).

Tabla 1. Marcadores bioquímicos y del metabolismo óseo en los distintos grupos de tratamiento. Valores de DMO en los tres segmentos tibiales analizados en los distintos grupos de tratamiento

	Sham (n=5)	IRC+PN (n=5)	IRC+PA (n=5)
Aclaramiento creatinina (mL/min)	2,9 ± 2,9	0,8 ± 0,3 ^a	1,0 ± 0,5 ^a
Calcio (mg/dL)	10,3 ± 0,1	11,6 ± 0,4 ^a	10,8 ± 0,6
Fósforo (mg/dL)	4,1 ± 0,3	5,9 ± 0,8 ^a	7,3 ± 4,0
PTH (pg/mL)	3 (1-7)	83 (37-96) ^a	95 (52-610) ^a
FGF23 (pg/mL)	272 ± 140	589 ± 198 ^a	1013 ± 40 ^{ab}
DMO tibia proximal (mg/cm ²)	325 ± 12	327 ± 21	273 ± 26 ^{ab}
DMO tibia distal (mg/cm ²)	256 ± 15	255 ± 9	234 ± 11
DMO tibia total (mg/cm ²)	270 ± 12	269 ± 12	243 ± 15

^ap<0,05 respecto a al grupo Sham; ^bp<0,05 respecto al grupo IRC+PN.

Figura 1. Contenido de Ca en las aortas de ratas con nefrectomía 7/8 alimentadas con dieta con contenido normal en P (0,6%) (IRC+PN) y alto contenido en P (0,9%) (IRC+PA), sacrificadas a las 20 semanas. Los datos representan la media ± desviación estándar. ^ap<0,05 respecto al grupo Sham; ^bp<0,05 respecto al grupo IRC+PN

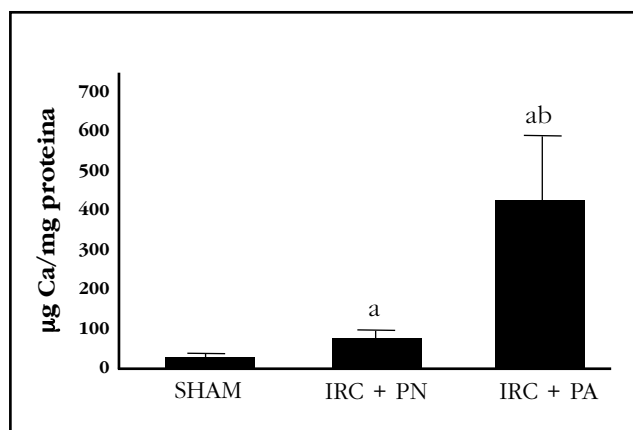
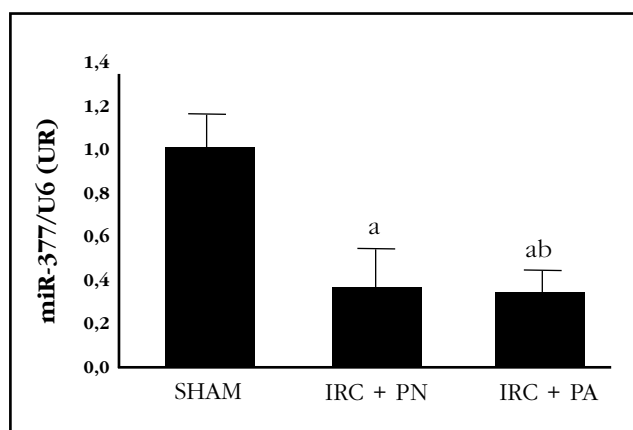


Figura 2. Niveles relativos de miR-377 en las aortas de ratas con nefrectomía 7/8 alimentadas con dieta con contenido normal en P (0,6%) (IRC+PN) y alto contenido en P (0,9%) (IRC+PA), sacrificadas a las 20 semanas. Los datos representan la media ± desviación estándar. ^ap<0,05 respecto al grupo Sham



Discusión

En este estudio se ha observado un descenso en la expresión aórtica del miR-377 con la nefrectomía paralelo al aumento de la expresión proteica de SOD-2 como un posible mecanismo compensador para eliminar radicales libres superóxido producidos como consecuencia del estrés oxidativo generado por la nefrectomía.

Hasta la fecha, varios cientos de miRs han sido identificados en el genoma humano proponiéndose que al menos el 50% de los genes que codifican para proteínas son regulados por miRs^{15,16}.

El aumento en la expresión proteica de SOD-2, como un posible efecto compensador para frenar el estrés oxidativo y la apoptosis celular en la mitocondria^{4,5,17}, lo hemos observado en otros trabajos *in vitro* de nuestro grupo exponiendo CMLV a medios calcificantes. De hecho, en un reciente artículo hemos observado por técnicas de proteómica mediante geles bidimensionales que, ante la presencia de un estímulo calcificante con altas dosis de calcitriol, la expresión de esta proteína aumenta 3 veces respecto a las células cultivadas con un medio control¹⁸. Otro estudio *in vitro* en CMLV sometidas a un estímulo calcificante por exceso de Ca y P muestra un aumento de la expresión proteica de SOD-2 mediante *Western blot*.

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en nuestros trabajos, en la mayoría de estudios de la literatura se observan descensos de la SOD-2 en presencia de un aumento del estrés oxidativo. De hecho, en un reciente estudio en ratas con IRC se ha encontrado que la administración de una dieta con alto contenido en P suplementada con calcitriol induce el descenso de la expresión proteica de SOD-2 a nivel aórtico¹⁹. Otros estudios en otros modelos tisulares (podocitos renales y células mesangiales)

han encontrado que, ante estímulos que inducen estrés oxidativo, se produce un descenso en la SOD-2 con aumentos del miR-377²⁰, aumentos que también se han implicado con el incremento de la senescencia celular^{14,21}.

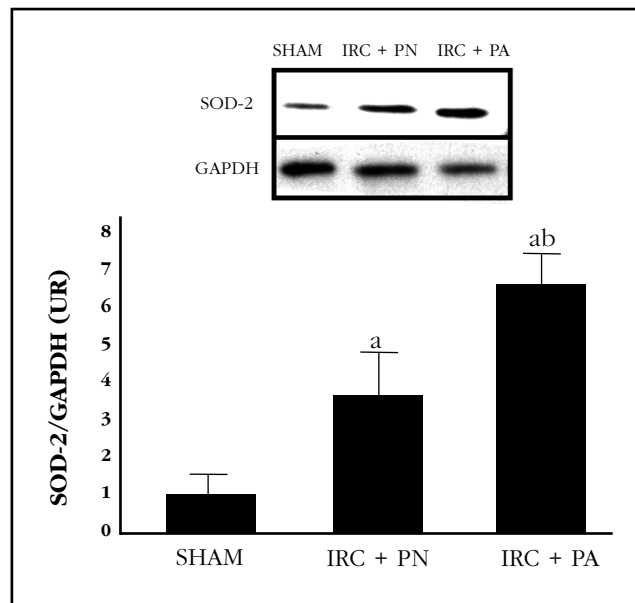
A la SOD-2 se la conoce también como superóxido dismutasa mitocondrial o manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y es la responsable de la reducción de especies reactivas de oxígeno tóxicas en la mitocondria.

El hecho de que en nuestro caso se observe un aumento de SOD-2, en un intento de la célula de defenderse al estrés oxidativo, acompañado por un descenso de la expresión del miR-377, tal vez pueda deberse a diferentes condiciones experimentales a las del resto de estudios, así como a la duración temporal del daño renal, que en nuestro caso siempre es a muy largo plazo. Lo que sí concuerda con todos los estudios publicados es el efecto opuesto entre el miR-377 y la SOD-2^{14,20,21}. Es decir, aumentos en la SOD-2 conllevan descensos en la expresión del miR-377 y viceversa, por lo que se deduce la posible utilidad del miR-377 como biomarcador de estrés oxidativo y de daño vascular.

A pesar de utilizar una dieta con alto contenido en P, los niveles séricos de P fueron muy similares en los grupos de animales nefrectomizados con dieta normal o con alto P. Una posible explicación es que la nefrectomía 7/8 no haya sido lo suficientemente agresiva y que pueda hablarse de un menor grado de nefrectomía como una 5/6 o menor. Eso indicaría el mantenimiento de una función renal residual que evitaría el agravamiento del daño renal producido por el P²². Sin embargo, es de destacar los aumentos de FGF23 con la nefrectomía y también en los animales que recibieron la dieta con alto P. Se sabe que el FGF23 es el primer parámetro bioquímico que se eleva tras instaurarse la IRC²³. El FGF23 comienza a aumentar en el plasma de los pacientes con ERC desde situaciones muy precoces, y continúa aumentando de una manera constante a medida que va descendiendo el filtrado glomerular²⁴. Durante las fases iniciales de la ERC, una sobrecarga de P estimularía la síntesis de FGF23 a nivel de los osteocitos, y actuaría en las nefronas restantes aumentando la excreción fraccional de fosfato para mantener la normofosfatemia²⁵. De hecho, en nuestro caso, aumentos inferiores al 25% en P sérico se acompañaron de variaciones de FGF23 muy superiores como un mecanismo compensador del aumento de P con el objeto de frenar su exceso.

El hecho de que la disfunción renal obtenida mediante la nefrectomía haya sido inferior a la inicialmente prevista queda reflejado en los resultados de la DMO en tibia. No hubo diferencias en la DMO entre los animales Sham y los nefrectomizados, a pesar del tiempo de evolución de la IRC (20 semanas)²⁶. En los animales nefrectomizados que recibieron la dieta

Figura 3. Expresión proteica de SOD-2 en las aortas de ratas con nefrectomía 7/8 alimentadas con dieta con contenido normal en P (0,6%) (IRC+PN) y alto contenido en P (0,9%) (IRC+PA), sacrificadas a las 20 semanas. A) Imagen de una *Western blot* representativo de una aorta de cada grupo; B) representación gráfica de la expresión proteica de la SOD-2 en los distintos grupos como media \pm desviación estándar. ^ap<0,05 respecto al grupo Sham; ^bp<0,05 respecto al grupo IRC+PN



con alto contenido en P hubo un descenso de la DMO en tibia proximal respecto a los animales nefrectomizados con dieta normal en P y respecto al grupo Sham. Sin embargo, otros estudios de nuestro grupo, con el mismo tiempo de seguimiento, muestran un efecto más negativo sobre el hueso cortical (DMO en tibia distal) que sobre el trabecular (DMO en tibia proximal) cuando la dieta administrada es rica en P²⁷. Este efecto se acompaña de un hiperparatiroidismo secundario severo que afecta fundamentalmente al hueso cortical, resultado que no se observó en el presente estudio.

A pesar del menor grado de disfunción renal observado, sí pudimos observar una relación entre el aumento de la CV y el descenso de la DMO, como ha sido descrito previamente por nuestro grupo²⁸. El grupo de animales con IRC y dieta alta en P fue en el que aumentó de forma más clara el contenido de calcio en la aorta, lo que se acompañó de las mayores pérdidas de DMO en tibia proximal.

De los resultados de este estudio se deduce que la nefrectomía, independientemente de los niveles séricos de P, es capaz de modificar la expresión del miR-377. El alto contenido en P en la dieta indujo el aumento de la expresión proteica de SOD-2, probablemente como un mecanismo protector para evitar un mayor daño vascular como consecuencia del estrés oxidativo. Estos resultados deberían alertar sobre la conveniencia de mantener niveles séricos de P cuando el deterioro renal se acentúa evitando de este modo la progresión del daño vascular. La utilización del miR-377 como biomarcador de daño vascular por estrés oxidativo necesita de estudios mecanísticos, pero abre una posible vía preventiva y terapéutica al desarrollo y progresión de las lesiones vasculares en la ERC.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida por la beca FEIOMM a favor de Natalia Carrillo López para acudir al 33º Congreso de la ASBMR 2011 (San Diego, 2011). Este trabajo ha sido también parcialmente financiado con ayuda del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (PI09/00415), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028), Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo, RETIC RedInRen del ISCIII – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (RD06/0016/1013, RD12/0021/1023 y RD16/0009/0017), por la Sociedad Asturiana Fomento Investigaciones Metabólicas.

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

Las manipulaciones de los animales de experimentación se han realizado según lo dispuesto en la normativa legal vigente (Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE y Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero).

Bibliografía

- Xie C, Ritchie RP, Huang H, Zhang J, Chen YE. Smooth muscle cell differentiation in vitro: models and underlying molecular mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:1485-94.
- House SJ, Potier M, Bisailon J, Singer HA, Trebak M. The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Arch.* 2008;456:769-85.
- Shanahan CM. Mechanisms of vascular calcification in CKD-evidence for premature ageing? *Nat Rev Nephrol.* 2013;9:661-70.
- Sutra T, Morena M, Bargnoux AS, Caporiccio B, Canaud B, Cristol JP. Superoxide production: a procalcifying cell signalling event in osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells exposed to calcification media. *Free Radic Res.* 2008;42:789-97.
- Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem.* 2008;283:15319-27.
- Roman-García P, Barrio-Vazquez S, Fernández-Martín JL, Ruiz-Torres MP, Cannata-Andía JB. Natural antioxidants and vascular calcification: a possible benefit. *J Nephrol.* 2011;24:669-72.
- Bartel PD. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116:281-97.
- Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet.* 2007;8:93-103.
- Balderman JA, Lee HY, Mahoney CE, Handy DE, White K, Annis S, et al. Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Heart Assoc.* 2012;1:e003905.
- Liao XB, Zhang ZY, Yuan K, Liu Y, Feng X, Cui RR, et al. MiR-133a modulates osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 2013;154:3344-52.
- Rangrez AY, M'Baya-Moutoula E, Metzinger-Le Meuth V, Hénaut L, Djelouat MS, Benchitrit J, et al. Inorganic phosphate accelerates the migration of vascular smooth muscle cells: evidence for the involvement of miR-223. *PLoS One.* 2012;7:e47807.
- Panizo S, Naves-Díaz M, Carrillo-López N, Martínez-Arias L, Fernández-Martín JL, Ruiz-Torres MP, et al. MicroRNAs 29b, 133b, and 211 regulate vascular smooth muscle calcification mediated by high phosphorus. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:824-34.
- Duan S, Wang Y, Wang H, Wang S, Ji L, Dai D, et al. A novel PCR-based approach to discover miRNA target genes. *Int J Med Sci.* 2014;11:1270-4.
- Wang Q, Wang Y, Minto AW, Wang J, Shi Q, Li X, et al. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy. *FASEB J.* 2008;22:4126-35.
- Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE.* 2007;367re1.
- Faller M, Matsunaga M, Yin S, Loo JA, Guo F. Heme is involved in microRNA processing. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14:23-9.
- Chen Y, Cai J, Murphy TJ, Jones DP. Overexpressed human mitochondrial thioredoxin confers resistance to oxidant-induced apoptosis in human osteosarcoma cells. *J Biol Chem.* 2002; 277: 33242-8.
- Carrillo López N, Tuñón LePoutel D, Quirós Caso C, Rodríguez I, Cannata Andía JB, Naves Díaz M. Efecto de dosis suprafiológicas de calcitriol sobre la expresión proteica de células de músculo liso vascular. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2017 [Epub ahead of print].
- Agharazii M, St-Louis R, Gautier-Bastien A, Ung RV, Mokas S, Larivière R, et al. Inflammatory cytokines and reactive oxygen species as mediators of chronic kidney disease-related vascular calcification. *Am J Hypertens.* 2015;28:746-55.
- Wang W, Ding XQ, Gu TT, Song L, Li JM, Xue QC, et al. Pterostilbene and allopurinol reduce fructose-induced podocyte oxidative stress and inflammation via microRNA-377. *Free Radic Biol Med.* 2015;83:214-26.
- Xie HF, Liu YZ, Du R, Wang B, Chen MT, Zhang YY, et al. miR-377 induces senescence in human skin fibroblasts by targeting DNA methyltransferase 1. *Cell Death Dis.* 2017;8(3):e2663.
- Voormolen N, Noordzij M, Grootendorst DC, Beetz I, Sijpkens YW, van Manen JG, et al. High plasma phosphate as a risk factor for decline in renal function and mortality in pre-dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22: 2909-16.
- Hasegawa H, Nagano N, Urakawa I, Yamazaki Y, Iijima K, Fujita T, et al. Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2010;78:975-80.
- Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, et al. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1305-15.
- Lloret MJ, Bover J, DaSilva I, Furlano M, Ruiz-García C, Ayasreh N, et al. Papel del fósforo en la enfermedad renal crónica. *Nefrología (Suplemento Extraordinario).* 2013;4:2-10.
- Naves-Díaz M, Carrillo-López N, Rodríguez-Rodríguez A, Braga S, Fernández-Coto T, Lopez-Novoa JM, et al. Differential effects of 17 α -estradiol and raloxifene on bone and lipid metabolism in rats with chronic kidney disease and estrogen insufficiency. *Bone.* 2010;17:766-71.
- Carrillo-Lopez N, Panizo S, Alonso-Montes C, Román-García P, Rodríguez I, Martínez-Salgado C, et al. Direct inhibition of osteoblastic Wnt pathway by fibroblast growth factor 23 contributes to bone loss in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2016;90:77-89.
- Román-García P, Carrillo-López N, Fernández-Martín JL, Naves-Díaz M, Ruiz-Torres MP, Cannata-Andía JB. High phosphorus diet induces vascular calcification, a related decrease in bone mass and changes in the aortic gene expression. *Bone.* 2010;46:121-8.

Rodríguez Duque JC¹, Núñez Céspedes J², Montes Moreno S³, Mazorra Horts R³, del Rey Rozas A⁴, Olmos Martínez JM¹

1 Departamento de Medicina Interna - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL (Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla) - Universidad de Cantabria - Santander (España)

2 Servicio de Hematología - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL - Universidad de Cantabria - Santander (España)

3 Servicio de Anatomía Patológica - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL - Universidad de Cantabria - Santander (España)

4 Medicina Familiar y Comunitaria - Centro de Salud Puertochico - Santander (España)

Linfoma óseo primario

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000400007>

Correspondencia: José Manuel Olmos Martínez - Dpto. Medicina Interna - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Avda. Valdecilla, s/n - 39008 Santander (España)

Correo electrónico: miromj@humv.es

Fecha de recepción: 07/06/2017

Fecha de aceptación: 20/07/2017

Resumen

La afectación esquelética en los pacientes con linfoma no hodgkiniano (LNH) no es infrecuente. Suele ser una manifestación tardía, y cuando aparece lo hace generalmente de forma secundaria por linfomas en estadio avanzado y con alta carga tumoral. Sin embargo, tan solo en contadas ocasiones la afectación esquelética se debe a un linfoma óseo primario y constituye, por tanto, la forma de presentación de esta enfermedad. Se describe el caso de un paciente con un linfoma óseo primario de estirpe B que debutó con lesiones vertebrales y compresión medular secundaria.

Palabras clave: *linfoma no Hodgkin B, linfoma óseo primario, compresión medular.*

Primary bone lymphoma

Summary

Skeletal involvement in patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) is not uncommon. It tends to be a late manifestation and usually occurs secondary to lymphomas in advanced stage, with high tumor burden. However, only in a few cases has skeletal involvement been attributed to a primary bone lymphoma and constitutes, therefore, the form of presentation of this disease. We describe the case of a patient with primary B-cell lymphoma of the bone that appeared with vertebral lesions and secondary spinal compression.

Key words: *non-Hodgkin's lymphoma B, primary bone lymphoma, spinal cord compression.*

Introducción

La afectación esquelética en los linfomas no hodgkinianos (LNH) no es infrecuente, aunque cuando aparece lo hace generalmente de forma secundaria por linfomas en estadio avanzado y con alta carga tumoral. La afectación primaria ósea (Linfoma óseo primario [LOP]) representa en torno al 1-5% de los tumores malignos óseos y tan solo supone el 5% de los linfomas extranodales, y menos del 1% de los linfomas en general¹⁻³. Las lesiones, que pueden ser únicas o múltiples, se localizan preferentemente en los huesos largos, sobre todo en el fémur, y, más raramente, en la pelvis y las vértebras^{4,6}.

Recientemente hemos tenido la oportunidad de estudiar a un enfermo con un cuadro de lesiones vertebrales y compresión medular secundaria a un LNH de estirpe B. Dado que esta forma de presentación en un linfoma de esta naturaleza solo se ha descrito en contadas ocasiones en la literatura^{5,9}, nos ha parecido de interés su comunicación.

Caso Clínico

Varón de 67 años, fumador, con antecedentes de ateromatosis carotídea, que ingresó en el Hospital por presentar debilidad en extremidades inferiores. Dos años antes sufrió un infarto cerebral lacunar en corona radiada izquierda que cursó sin clínica residual. Desde hacía un año refería un cuadro de dolor lumbar, de tipo mecánico, que se irradiaba al costado derecho, que había aumentado en intensidad en la última semana, haciéndose resistente al tratamiento analgésico y dificultándole conciliar el sueño. Tres días antes de acudir al Hospital, comenzó a notar debilidad y parestesias en miembros inferiores, así como dificultad para iniciar la micción. Desde hacía tres meses refería también astenia, anorexia y pérdida no cuantificada de peso. En la exploración se apreció la existencia de una paraparesia de predominio proximal, con hiporreflexia e hipoestesia, con nivel sensitivo en T8. No se palpaban adenopatías ni visceromegalias, siendo el resto de la exploración física anodina. Entre los datos analíticos destacaba una ligera leucocitosis (11.900/ μ L) con 77% segmentados y 11% linfocitos. La hemoglobina y las plaquetas eran normales, al igual que el estudio bioquímico de rutina, incluyendo los niveles de calcio, albúmina, fosfato y LDH. Tampoco se observaron anomalías en el estudio electroforético del suero, y los marcadores tumorales (incluyendo la β 2-microglobulina) fueron normales. El estudio de la morfología de sangre periférica fue así mismo normal.

En la resonancia magnética nuclear (RMN) de columna dorso-lumbar (Figura 1A) se observó una pérdida de altura de T8, que estaba ocupada por una masa que se extendía a tejidos blandos paravertebrales, especialmente hacia los elementos posteriores vertebrales y hacia el interior del canal raquídeo, formando un manguito de infiltración epidural que llegaba cranealmente hasta T7 y caudalmente hasta T10. Todo ello condicionaba una estenosis segmentaria del canal raquídeo, con deformidad del contorno anterior del cordón medular. También se observaban captaciones parcheadas en T7 y T9, compati-

bles con afectación de ambos cuerpos vertebrales. En la tomografía computadorizada (TC) de cuerpo entero no se observaron masas ni nódulos sugestivos de malignidad ni adenopatías significativas.

La tomografía por emisión de positrones (PET/TC) mostró la existencia de una intensa captación sugestiva de malignidad en el pedículo izquierdo de T8 con destrucción del mismo, así como un ligero hipermetabolismo en los cuerpos vertebrales T7, T9 y T11 (Figura 1B). No se apreciaron otros focos patológicos de captación en el resto del organismo.

Se realizó una biopsia percutánea guiada por TC de la masa paravertebral dependiente de T8, cuyo estudio histológico e inmunohistoquímico mostró la existencia de un linfoma B difuso de célula grande (Figura 2). No se detectaron reordenamientos de MYC, BCL2 y BCL6. Tampoco se apreciaron datos de infiltración o displasia en la biopsia de médula ósea, siendo el estudio inmunofenotípico normal.

Inicialmente se planteó la posibilidad de realizar una descompresión quirúrgica, pero se desestimó tras conocer el resultado histológico, iniciándose tratamiento con quimioterapia (R-CHOP) y radioterapia. Sin embargo, el paciente falleció tras el primer ciclo por un shock séptico por *Staphylococcus Aureus*, secundario a la infección de una úlcera sacra grado III.

Discusión

El linfoma óseo primario (LOP), definido por la presencia de una o varias lesiones óseas sin evidencia de afectación ganglionar o visceral, es poco frecuente, ya que según algunos estudios representa únicamente el 0,9-5% de los tumores óseos malignos¹⁻³, menos del 1% de los linfomas, y alrededor del 5% de los linfomas con afectación extraganglionar^{4,5}. No obstante, hay que tener en cuenta que la definición de LOP es controvertida. En la mayoría de los estudios se han incluido solo pacientes con estadio I y II de Ann Arbor, aunque en otros se han incluido también a pacientes con enfermedad en estadio IV (compromiso de médula ósea). Además, con la mejora de los procedimientos de estadificación, especialmente con el uso combinado de tomografía computadorizada, resonancia magnética, y más recientemente la tomografía por emisión de positrones (PET), la proporción de pacientes con diagnóstico sistémico (Estadio IV, clasificación de Ann Arbor) ha aumentado. Se presenta habitualmente entre la sexta y séptima década de la vida y es más frecuente en los varones que en las mujeres (relación 3:2)³. Puede manifestarse como una fractura patológica, especialmente cuando asientan en huesos largos, como el fémur. Sin embargo, en los casos en que se afecta la columna, la presentación clínica más frecuente es la lumbalgia, que puede acompañarse de manifestaciones neurológicas secundarias a compresión medular, como ocurrió en nuestro paciente^{5,9}. A diferencia de otros tipos de linfomas, el LOP no suele acompañarse de afectación del estado general, síntomas B, ni alteraciones en sangre periférica. En la mayoría de los casos el examen histopatológico demuestra la existencia de un linfoma difuso B de células grandes^{3,5}.

Figura 1. RMN columna dorso-lumbar en la que se aprecia una masa paravertebral derecha dependiente de T8 que se extiende desde T7 hasta T10 (A). PET/TC en el que se observa la existencia de una lesión hipercaptante en pedículo izquierdo de T7, con ligero hipermetabolismo en cuerpos vertebrales T8, T10 y T12 y ausencia de captación patológica a otros niveles (B)

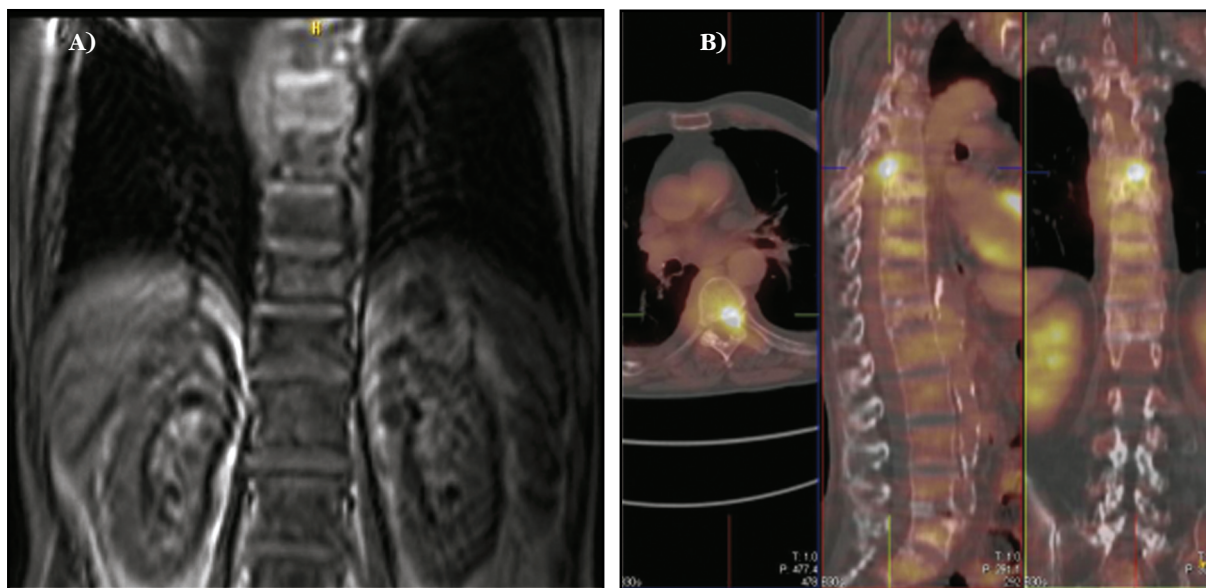
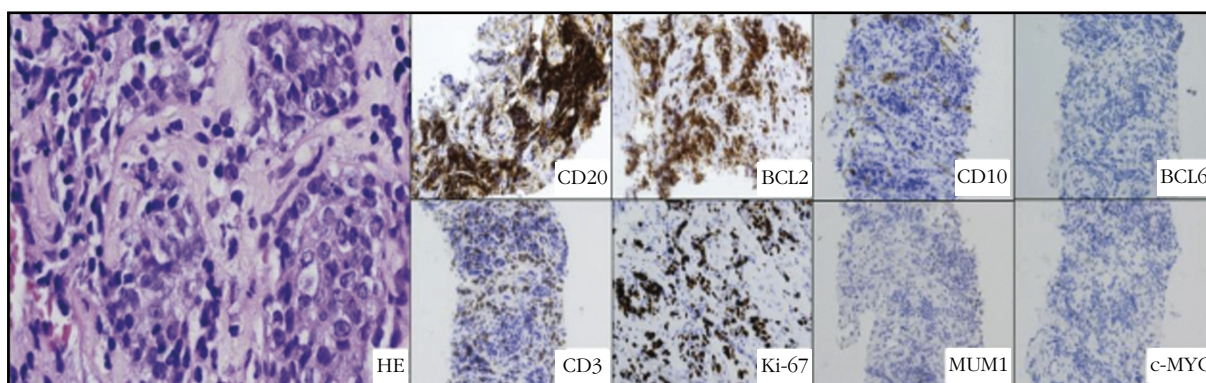


Figura 2. Masa paravertebral HE, (40x) en el que se observa una población monomorfa linfocitaria de células grandes de tipo centroblástico con aislados nucléolos eosinófilos y escotaduras nucleares (linfoma B). Estudio inmunohistoquímico (40x) en el que se observa de CD20 y BCL2, con negatividad para CD3, CD10, BCL6, MUM1 y c-MYC. El Índice proliferativo (ki-67) fue del 60%



Las lesiones óseas por el linfoma pueden adoptar distintos patrones. El aumento de densidad en un cuerpo vertebral (“vértebra en marfil”) es probablemente la lesión blástica más característica, aunque también pueden apreciarse áreas osteoescleróticas más o menos difusas, que en ocasiones se asocian a fenómenos osteolíticos¹⁰. Sin embargo, son más frecuentes las imágenes destructivas que pueden ser multifocales o aisladas. Asientan predominantemente en la pelvis, las vértebras y los huesos largos, llegando en estos casos a romper la cortical, infiltrando los tejidos blandos adyacentes¹¹.

El tratamiento de los LOP se basa en inmunoterapia y radioterapia, quedando la cirugía limitada a la obtención de muestras para diagnóstico y estabilización y fijación de las posibles fracturas^{12,13}.

Cuando hay afectación vertebral y compromiso medular, como ocurría en nuestro paciente, puede ser necesaria la resección quirúrgica en bloque, especialmente cuando el diagnóstico es incierto, pero, si la biopsia preoperatoria confirma la presencia de un LNH, la radioterapia y/o la quimioterapia por sí solas pueden solucionar la compresión espinal, no siendo necesaria la intervención quirúrgica^{5,8,14-16}.

La respuesta terapéutica y por tanto el pronóstico suele ser mejor en el LOP que en los linfomas con afectación ósea secundaria, especialmente en las personas jóvenes y con lesiones poco extensas, lo que refuerza la importancia de realizar un diagnóstico precoz de estos tumores^{17,18}.

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

Bibliografía

1. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classifications Project. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkins lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer*. 1982;49:2112-35.
2. Hogendoorn PCW, Kluin PM. Primary non-Hodgkin lymphoma of bone. In: Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. (eds). WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2013. p.316.
3. Jawad MU, Schneiderbauer MM, Min ES, Cheung MC, Koniaris LG, Scully SP. Primary lymphoma of bone in adult patients. *Cancer*. 2010;116:871-9.
4. Pettit Ck, Zukerberg LR, Gray MH, Ferry JA, Rosenberg AE, Harmon DC, et al. Primary lymphoma of bone: a B-cell neoplasm with a high frequency of multilobulated cells. *Am J Surg Pathol*. 1990;14:329-34.
5. Maruyama D, Watanabe T, Beppu Y, Kobayashi Y, Kim SW, Tanimoto K, et al. Primary bone lymphoma: a new and detailed characterization of 28 patients in a single-institution study. *Jpn J Clin Oncol*. 2007;37:216-23.
6. Székely G, Miltényi Z, Mezey G, Simon Z, Gyarmati J, Gergely L Jr, et al. Epidural malignant lymphomas of the spine: collected experiences with epidural malignant lymphomas of the spinal canal and their treatment. *Spinal Cord*. 2008;46:278-81.
7. Becker S, Babisch J, Venbrocks R, Katenkamp D, Wurdinger S. Primary non-Hodgkin lymphoma of the spine. *Arch Orthop Trauma*. 1998;117:399-401.
8. Lyons MK, O'Neill BP, Marsh WR, Kurtin PJ. Primary spinal epidural non-Hodgkin's lymphoma: report of eight patients and review of the literature. *Neurosurgery*. 1992;30:675-80.
9. Çeçen DA, Tatarlı N, Turan Süslü H, Özdoğan S, Barışık NÖ. Primary Dural Spinal Lymphoma Presentation of a Rare Spinal Tumor Case. *Case Rep Surg*. 2015;2015:639253.
10. Fishman EK, Kuhlman JE, Jones RJ. CT of lymphoma: spectrum of disease. *Radiographics*. 1991;11:647-69.
11. Hernández JL, Olmos JM, Figols J, Riancho JA, González-Macías J. Lesiones osteolíticas femorales con tumoración de partes blandas e hipercalcemia como forma de presentación de un linfoma de estirpe B. *An Med Intern*. 2000;17:264-6.
12. Messina C, Christie D, Zucca E, Gospodarowicz M, Ferreri AJM. Primary and secondary bone Lymphomas. *Cancer Treat Rev*. 2015;41:235-46.
13. Ventre MB, Ferreri AJM, Gospodarowicz M, Govi S, Messina C, Porter D, et al. Clinical features, management, and prognosis of an international series of 161 patients with limited-stage diffuse large b-cell lymphoma of the bone (the IELSG-14 Study). *Oncologist*. 2014;19:291-8.
14. Stein ME, Kuten A, Gez E, Rosenblatt KE, Drumea K, Ben-Shachar M, et al. Primary lymphoma of bone -a retrospective study. Experience at the Northern Israel Oncology Center (1979-2000). *Oncology*. 2003;64:322-7.
15. Wong E, Portlock C, O'Brien J, DeAngelis L. Chemosensitive epidural spinal cord disease in non-Hodgkins lymphoma. *Neurology*. 1996;46:1543-7.
16. Baiocchi OC, Colleoni GW, Rodrigues CA, Barton D, Kerbauy FR, Garcia RJ, et al. Importance of combined-modality therapy for primary bone lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2003;44:1837-9.
17. Beal K, Allen L, Yahalom J. Primary bone lymphoma: treatment results and prognostic factors with long-term followup of 82 patients. *Cancer*. 2006;106:2652-6.
18. Wu H, Bui MM, Leston DG, Shao H, Sokol L, Sotomayor EM, et al. Clinical characteristics and prognostic factors of bone lymphomas: focus on the clinical significance of multifocal bone involvement by primary bone large B-cell lymphomas. *BMC Cancer*. 2014;14: 900.

