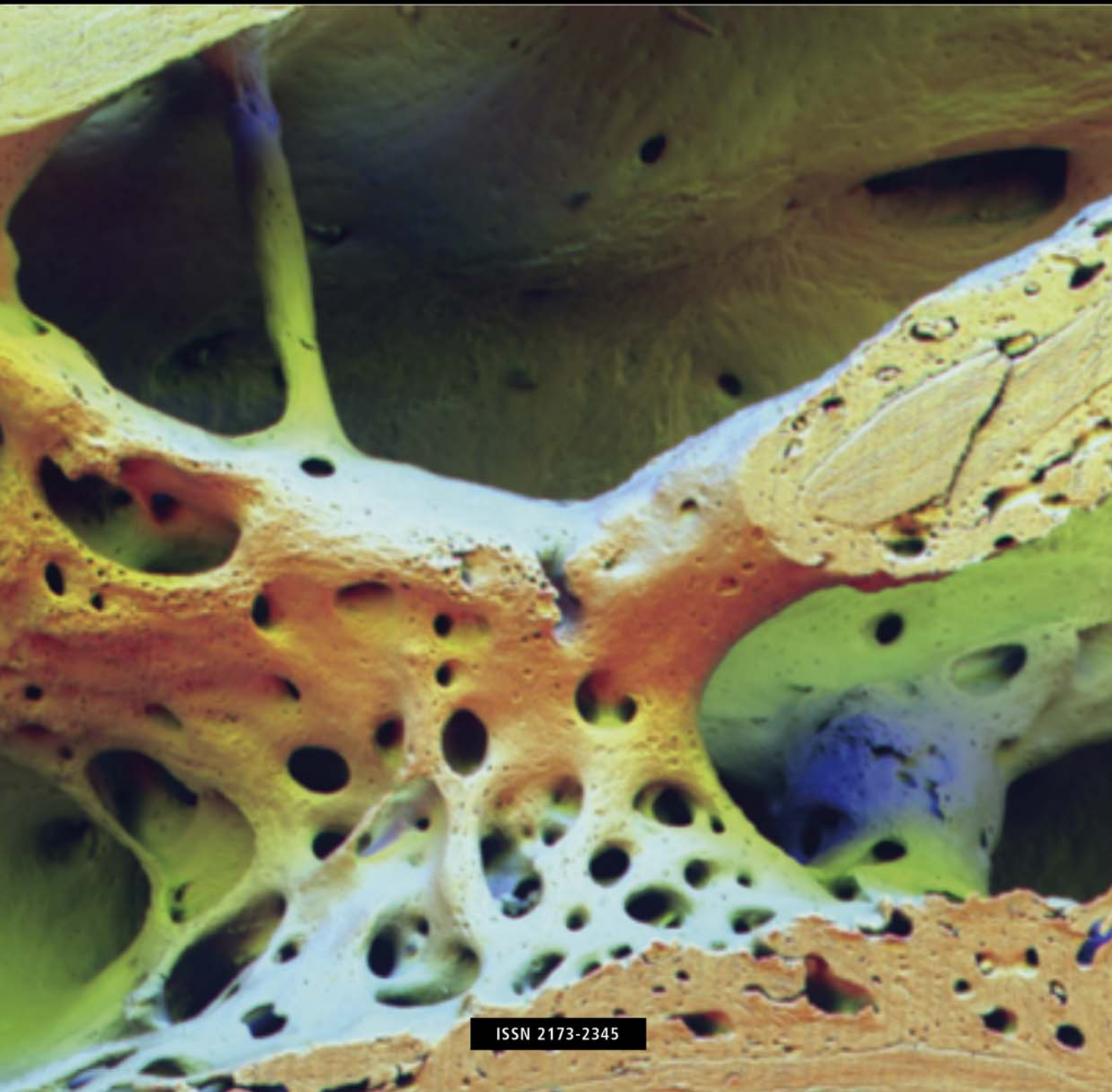


Volumen 8 · Número 4 · Noviembre-Diciembre 2016

# Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

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



ISSN 2173-2345

# Programa de gobierno: 2016-2019 SEIOMM/FEIOMM



Hacia una Sociedad más competitiva y eficiente:  
*"Navegando con mal tiempo"*

En el contexto actual, las sociedades científicas tienen el ineludible reto de estimular, impulsar e influir en el entorno social, profesional y científico, y proporcionar las mejores condiciones para mantener una innovación permanente en sus áreas de interés y de quienes las desarrollan y representan.

Vivimos en un mundo cada vez más globalizado, con crecientes niveles de especialización, con ciudadanos más exigentes y con una sensibilidad cada vez mayor por la obtención de la máxima seguridad y calidad. La SEIOMM no debe ser ajena en absoluto a esta realidad, y debe apostar por ser una entidad preocupada, proactiva, dinámica, innovadora, en busca de la excelencia. La SEIOMM debe conseguir una posición de liderazgo en este marco, y consolidarse en el referente nacional en osteoporosis y metabolismo óseo y mineral, tanto para los profesionales de la salud, como para los ciudadanos y agentes sociales.

El entorno general actual caracterizado por una situación de crisis económica permanente, con repercusión directa en el sector sanitario también ha afectado el campo de la osteoporosis. La "caída" de fármacos, la aparición de efectos adversos que limitan la duración de los tratamientos, la escasez de nuevas moléculas entre otros, condiciona el presente y el futuro próximo. A ello se le añade el pobre conocimiento que desde la administración se tiene de la osteoporosis y las fracturas, infravalorando la importancia de las mismas. Así que el entorno actual y el futuro cercano parece estar cargado de "nubarrones".

A pesar de ello y gracias al compromiso humano y al conocimiento científico de que disponemos, tenemos el deber de hacer una Sociedad más competitiva y eficiente en el campo de las enfermedades óseas y del metabolismo mineral. Para ello se hace imprescindible mantener políticas de contención del gasto, sin menoscabo de la necesidad de continuar con la "inversión" en proyectos de calidad en investigación básica y clínica y en proyectos de formación continuada; en definitiva, en proyectos que aporten valor al socio. Vamos a esforzarnos en aunar iniciativas y generar alianzas con otras sociedades y entidades que también tienen interés en este campo.

Somos conscientes de que vamos a tener que "navegar con mal tiempo". Para no naufragar tenemos que conocer muy bien la previsión meteorológica, disponer de un buen y pertrechado barco, disponer de una tripulación bien entrenada y de un capitán que dirija con pulso firme el rumbo de la nave. Trasladada esta metáfora marinera a nuestra Sociedad, implica conocer bien el futuro cercano, disponer de una sociedad con pocos gastos recurrentes y con una tripulación (Junta directiva, asociados y personal que trabaja para la SEIOMM) competitiva y competente, que muestre prudencia, firmeza y visión estratégica. Es lo que durante nuestro mandato vamos a intentar realizar, y para ello necesitamos contar con vuestra inestimable ayuda.

A continuación, os informamos de cuales van a ser las principales acciones que pretendemos llevar a cabo desde las diferentes áreas de la Sociedad: Secretaría, Formación continuada, Investigación clínica y básica, Congreso anual, Comunicación, Tesorería y Relaciones externas.

## Secretaría y Formación continuada

Canal prioritario de comunicación con el socio. Donde todos podamos comunicarnos con facilidad con todos. Hacer una SEIOMM abierta, participativa, transversal.

- Ágil y dinámica: Uso de correo electrónico, página web, twitter,...
- Nuevos canales de comunicación: Foros o debates.
- Acciones dirigidas a abrirnos a otros especialistas no muy representados en la actualidad como, traumatólogos, geriatras, rehabilitadores, ginecólogos y pediatras.
- Potenciar el Proyecto de Unidades de Fractura y la herramienta RHUFO para facilitar la creación de Unidades de Fractura de calidad por todo el territorio nacional.
- Formación continuada: Cursos de calidad, acreditados y libres de sesgos de la industria; tanto presenciales como "on line", con un carácter moderno y atractivo.
- Potenciar la formación de nuestros jóvenes: residentes, jóvenes investigadores, mediante cursos de formación dirigidos específicamente a ellos.
- Edición de un Manual de Enfermedades metabólicas óseas a fin de crear un cuerpo de doctrina propio.
- Impulsar la creación de un Máster "on line" de enfermedades óseas metabólicas, en colaboración con la Universidad.

## Tesorería

La Tesorería de la Sociedad y de la Fundación ha de ser necesariamente una de las piezas claves de esta Junta Directiva.

- Impulsar desde la misma, y con criterios de rigor y transparencia, intentaremos gestionar en este trienio el control de los recursos societarios mediante una adecuada y ordenada contabilidad, además de buscar opciones comerciales y de gestión que optimicen los recursos de la Asociación.

## Investigación clínica básica

Nuestro objetivo principal es promover y liderar la investigación básica, clínica y traslacional de excelencia en el campo de las enfermedades que afectan al metabolismo óseo.

De forma particular:

- Identificar y priorizar programas de investigación relevantes entre los grupos activos de investigación en nuestro país. Identificar grupos emergentes y fomentar la movilidad de los investigadores.
- Impulsar el programa de becas para proyectos de investigación de excelencia y para movilidad del personal investigador.
- Establecer nuevas alianzas con sociedades científicas afines con interés en todos los aspectos relacionados con el metabolismo del calcio (Nutrición clínica y básica, pediatría, entre otras), y consolidar las ya existentes a nivel nacional e internacional.
- Asegurar una adecuada difusión de resultados mediante la organización de Congresos y jornadas de actualización que supongan un estímulo para los socios, y en general todos los profesionales interesados en el metabolismo mineral.

## Congreso anual

Es sin duda el máximo evento de nuestra Sociedad. Debemos mantener y, en lo posible, aumentar su nivel científico, contando con la participación de expertos nacionales y extranjeros. El Congreso anual debe continuar siendo nuestro foro de reunión, donde podamos intercambiar ideas y opiniones con nuestros colegas; pero a la vez debemos abrirlo a otros colectivos y sociedades afines. No olvidemos que el Congreso nacional anual es la principal fuente de ingresos, por lo que, aunque debe organizarse con los criterios de máxima eficiencia económica, en ningún caso debe ir en menoscabo del contenido científico y aspecto social del mismo.

## Comunicación

"Lo que no está presente en los medios, no existe".

- Posicionar a SEIOMM como la Sociedad de referencia de osteoporosis y demás enfermedades óseas metabólicas en nuestro país, mediante una campaña de comunicación que nos haga presentes en los medios tanto especializados como generales.
- Elaborar un plan de comunicación que contemple un acercamiento a los profesionales de la comunicación científica líderes.
- Mejorar la página web: [www.seiommm.org](http://www.seiommm.org)
- Presencia de SEIOMM en las redes sociales.
- Desarrollo de una aplicación app para dispositivos móviles Android e iOS, dirigida a profesionales sanitarios relacionados con el campo de la osteoporosis.
- Fomentar nuevas vías de comunicación, divulgación y amplitud de influencia entre la SEIOMM y las administraciones sanitarias, como por ejemplo mediante asesorías y guías clínicas.

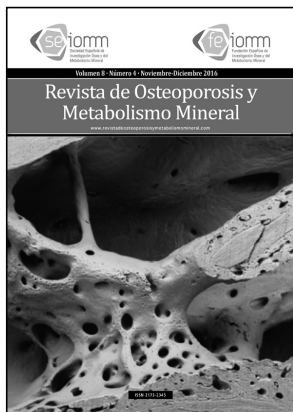
## Relaciones exteriores

Desde la perspectiva de las Relaciones exteriores, intentaremos fomentar, desarrollar y mejorar las relaciones institucionales y societarias, en un intento de implementar relaciones que favorezcan a los agentes implicados.

- Trabajaremos así en la línea de impulsar y desarrollar programas de colaboración con Sociedades Científicas Internacionales (ASBMR, IOF, IBMS-IFMRS, FFN, etc.) y Nacionales (FHOEMO, SER, SECOT, SEFRAOS, SERME, SEGG, SEMFYC, etc.) con las que la SEIOMM-FEIOMM tienen ya sólidos vínculos de relación, además de abrir nuevas vías con otras Sociedades afines.

Amigos como veis el trabajo que tenemos por delante es ingente. Por nuestra parte, nos comprometemos a dedicar lo mejor de todos nosotros para que este proyecto llegue a buen puerto. Evidentemente, sin vuestra participación activa, consejo, y crítica constructiva cuando corresponda, estos objetivos no podrán alcanzarse por lo que os pedimos una colaboración activa, a fin de que la SEIOMM sea aún más, una Sociedad competitiva y competente.

La Junta Directiva  
Madrid, noviembre de 2016



**Nuestra portada**  
Cáncer de próstata.  
Metástasis en un cuerpo vertebral

**Autor:**  
Cortesía del Profesor Alan Boyde. Londres. Reino Unido

*Director*  
**Manuel Sosa Henríquez**  
*Redactora*  
**M<sup>a</sup> Jesús Gómez de Tejada Romero**

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

*Presidente*  
**Josep Blanch Rubió**  
*Vicepresidenta*  
**M<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> planta)  
28006 Madrid

Tel: +34-625 680 737  
Fax: +34-917 817 020

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

<http://www.seiomm.org>

*Edición*



**Ibañez & Plaza** Asociación, S. L.  
EDITORIAL TÉCNICA Y COMUNICACIÓN  
Avda. Reina Victoria, 47 (6<sup>o</sup> D)  
28003 Madrid

Tel. +34-915 538 297

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

<http://www.ibanezyplaza.com>

*Maquetación*

**Concha García García**

*Traducción inglés*

**David Shea**

ISSN: 2173-2345

Envío de originales: [romm@ibanezyplaza.com](mailto:romm@ibanezyplaza.com)

© Copyright SEIOMM

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

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.

## SUMARIO

Vol. 8 - Nº 4 - Octubre-Diciembre 2016

**101 EDITORIAL**  
**Insuficiencia renal crónica, calcificación vascular y sistema RNK/RANKL/OPG**  
Olmos JM, Hernández JL

**105 ORIGINALES**  
**Efecto del sistema RANK/RANKL/OPG sobre la des-mineralización ósea y la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica**  
Martínez Arias L, Solache Berrocal G, Panizo García S, Carrillo López N, Avello Llano N, Quirós Caso C, Naves Díaz M, Cannata Andía JB

**115 Asociación del polimorfismo 1G>2G de la MMP1 con calcificación de la válvula aórtica**  
Solache-Berrocal G, Barral A, Martín M, Román-García P, Llosa JC, Naves-Díaz M, Cannata-Andía JB, Rodríguez I

**121 Estudio funcional de los polimorfismos del promotor del gen de la esclerostina**  
Pérez-Campo FM, Sañudo C, Krebssova R, Delgado-Calle J, Riancho JA

**127 Prevalencia de niveles bajos de vitamina D en pacientes con cáncer de mama que viven en latitudes 21-22º Norte**  
González-Fisher RF, Pérez-Jaime S, Buz K, Sotelo-Félix E, Álvarez Ordorica O, González Riestra HJ, Rolon Padilla A

**134 NOTA CLÍNICA**  
**Hemocromatosis y osteoporosis, a propósito de 4 casos**  
Montaño Jaramillo D, Díaz Curiel M

**138 REVISIÓN**  
**El estrés oxidativo como posible diana terapéutica en la osteoporosis asociada al envejecimiento**  
Portal-Núñez S, de la Fuente M, Díez A, Esbrit P

### Revisores Volumen 8 (2016)

M <sup>a</sup> José Américo García	Diego Hernández Hernández
Josep Blanch i Rubió	José Luis Hernández Hernández
José Ramón Caeiro Rey	Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca
Javier Calvo Catalá	Jorge Malouf Sierra
Antonio Cano Sánchez	M <sup>a</sup> Elena Martínez Rodríguez
Cristina Carbonell Abella	M <sup>a</sup> José Montoya García
Enrique Casado Burgos	Laura Navarro Casado
Bernardino Díaz López	Xavier Nogués i Solán
Adolfo Díez Pérez	Santiago Palacios Gil-Antuñano
Jesús Delgado Calle	José Luis Pérez Castrillón
Casimira Domínguez Cabrera	Concha de la Piedra Gordo
José Filgueira Rubio	Lilian Plotkin
Jordi Fiter Areste	José Manuel Quesada Gómez
Carlos Gómez Alonso	Luis del Río Barquero
M <sup>a</sup> Jesús Gómez de Tejada Romero	Minerva Rodríguez García
Jesús González Macías	Manuel Sosa Henríquez
Emilio González Reimers	Carmen Valdés y Llorca
Daniel Grinberg Vaisman	Carmen Valero Díaz de la Madrid
Nuria Guañabens Gay	

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

**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****Teresita Bellido. PhD**

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

**Ernesto Canalis. MD, PhD**

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

**Dr. Oswaldo Daniel Messina**

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

**Patricia Clark Peralta. MD, PhD**

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

**Dr. Carlos Mautalen**

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

**Lilian I Plotkin. PhD**

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

**Dr. Manuel Díaz Curiel**

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

**Dr. Adolfo Díez Pérez**

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

**Dr. Josep Blanch Rubió**

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

**Dr. Manuel Sosa Henríquez (Director)**

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

**Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero (Redactora)**

Universidad de Sevilla. Departamento de Medicina. Sevilla. España

**Comité de Expertos**

Pilar Aguado Acín

María José Américo García

Miguel Arias Paciencia

Emilia Aznar Villacampa

Chesús Beltrán Audera

Pere Benito Ruiz

Santiago Benito Urbina

Miguel Bernard Pineda

Josep Blanch i Rubió

José Antonio Blázquez Cabrera

José Ramón Caeiro Rey

Javier Calvo Catalá

M<sup>º</sup> Jesús Cancelo Hidalgo

Jorge Cannata Andía

Antonio Cano Sánchez

Cristina Carbonell Abella

Jordi Carbonell Abelló

Pedro Carpintero Benítez

Enrique Casado Burgos

Santos Castañeda Sanz

Jesús Delgado Calle

Bernardino Díaz López

Casimira Domínguez Cabrera

Fernando Escobar Jiménez

José Filgueira Rubio

Jordi Fiter Areste

Juan José García Borrás

Juan Alberto García Vadillo

Eduardo Girona Quesada

Carlos Gómez Alonso

Milagros González Béjar

Jesús González Macías

Emilio González Reimers

Jenaro Graña Gil

Silvana di Gregorio

Daniel Grinberg Vaisman

Nuria Guañabens Gay

Roberto Güerri Fernández

Federico Hawkins Carranza

Diego Hernández Hernández

José Luis Hernández Hernández

Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Esteban Jódar Gimeno

Pau lluch Mezquida

M<sup>º</sup> Luisa Mariñoso Barba

Guillermo Martínez Díaz-Guerra

María Elena Martínez Rodríguez

Leonardo Mellivobsky Saldier

Manuel Mesa Ramos

Ana Monegal Brancos

Josefa Montoya García

María Jesús Moro Álvarez

Manuel Muñoz Torres

Laura Navarro Casado

Manuel Naves García

José Luis Neyro Bilbao

Xavier Nogués Solán

Joan Miquel Nolla Solé

José Antonio Olmos Martínez

Norberto Ortego Centeno

Santiago Palacios Gil-Antuñano

Esteban Pérez Alonso

Ramón Pérez Cano

José Luis Pérez Castrillón

Pilar Peris Bernal

Concepción de la Piedra Gordo

José Manuel Quesada Gómez

Enrique Raya Álvarez

Rebeca Reyes García

José Antonio Riancho Moral

Luis de Río Barquero

Luis Rodríguez Arbolea

Arancha Rodríguez de Gortázar

Alonso-Villalobos

Minerva Rodríguez García

Antonia Rodríguez Hernández

Manuel Rodríguez Pérez

Inmaculada Ros Villamajó

Rafael Sánchez Borrego

Oscar Torregrosa Suau

Antonio Torrijos Eslava

Carmen Valdés y Llorca

Carmen Valero Díaz de Lamadrid

Ana Weruaga Rey

**METODOLOGÍA Y DISEÑO DE DATOS**

Pedro Saavedra Santana

José María Limiñana Cañal

**SUMMARY Vol. 8 - Nº 4 - October-December 2016****101 EDITORIAL****Chronic renal failure, vascular calcification and the RNK/RANKL/OPG system**

Olmos JM, Hernández JL

**105 ORIGINAL ARTICLES****Effect of RANK/RANKL/OPG pathway on bone demineralization and vascular calcification in chronic kidney disease**

Martínez Arias L, Solache Berrocal G, Panizo García S, Carrillo López N, Avello Llano N, Quirós Caso C, Naves Díaz M, Cannata Andía JB

**115 The association of MMP1 1G>2G polymorphism with aortic valve calcification**

Solache-Berrocal G, Barral A, Martín M, Román-García P, Llosa JC, Naves-Díaz M, Cannata-Andía JB, Rodríguez I

**121 Functional study of promoter gene polymorphisms of sclerostin**

Pérez-Campo FM, Sañudo C, Krebesova R, Delgado-Calle J, Riancho JA

**127 Prevalence of low levels of vitamin D in patients with breast cancer who live in Northern latitudes 21-22º**

González-Fisher RF, Pérez-Jaime S, Buz K, Sotelo-Félix E, Álvarez Ordorica O, González Riestra HJ, Rolon Padilla A

**134 CLINICAL NOTE****Hemochromatosis and osteoporosis, in reference to 4 cases**

Montaño Jaramillo D, Díaz Curiel M

**138 REVIEW****Oxidative stress as a possible therapeutic target for osteoporosis associated with aging**

Portal-Núñez S, de la Fuente M, Díez A, Esbrit P

# Insuficiencia renal crónica, calcificación vascular y sistema RANK/RANKL/OPG

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000400001>

**Olmos JM\*, Hernández JL**

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

\*Correo electrónico: [miromj@humv.es](mailto:miromj@humv.es)

**L**as complicaciones cardiovasculares constituyen uno de los problemas clínicos más importantes de los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). Se trata de procesos frecuentes que presentan una elevada morbilidad y mortalidad. Valga como ejemplo señalar que alrededor del 50% de los pacientes con ERC terminal fallecen por este motivo<sup>1</sup>.

Los pacientes renales presentan dos tipos de calcificaciones vasculares: la calcificación de la túnica media, también denominada esclerosis de Mönckeberg, en la que el mineral se deposita dentro de la capa de músculo liso, y la calcificación de la íntima, en la que el depósito de calcio se produce tras el acúmulo de colesterol bajo la monocapa endotelial dañada<sup>2</sup>. La calcificación de la túnica media, en donde se encuentran células del músculo liso vascular (CMLV) y fibras elásticas, no guarda relación con los niveles de colesterol ni con la existencia de placas de ateroma y provoca el endurecimiento y la disminución en la distensibilidad de las arterias. La calcificación aterosclerótica de la íntima puede darse también en pacientes con ERC. En estos casos, la calcificación de la íntima se asocia con el depósito subintimal de lípidos y lipoproteínas, que pueden estimular el desarrollo de respuestas inmunes, tanto innatas como adaptativas, induciendo a las células endoteliales y CMLV a expresar moléculas inflamatorias, lo que estimula la infiltración de monocitos/macrófagos. Como resultado, el aumento de la inflamación, los lípidos oxidados y la secreción de la matriz fibrosa en las lesiones ateroscleróticas aceleran aún más la calcificación vascular, que eventualmente conduce a la ruptura de la placa aterosclerótica<sup>1-3</sup>. En pacientes con ERC, tanto la calcificación intimal aterosclerótica como la calcificación de la túnica media, independiente de la aterosclerosis, se asocian con un aumento de la mortalidad cardiovascular en comparación con la de los pacientes con ERC que no la presentan<sup>4</sup>.

Inicialmente se consideró como un trastorno secundario al depósito pasivo de calcio y fósforo en la pared vascular. Sin embargo, más recientemente se ha señalado que la calcificación vascular sería un proceso perfectamente regulado mediante el cual las células del músculo liso vascular (CMLV) experimentan cambios moleculares y

fenotípicos por los que adquieren algunas de las funciones que caracterizan a las células de estirpe osteo-condrocitaria<sup>1,2</sup>, y que conducen a la liberación por las CMLV de estructuras vesiculares que contienen hidroxiapatita<sup>5</sup>. En este proceso de “transdiferenciación osteo-condrocitaria” intervenirían distintos factores implicados en la diferenciación de las células óseas, como el Runx2, las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), el sistema RANK/RANKL/OPG o la vía Wnt. Por otra parte, en pacientes con ERC y en modelos animales de esta enfermedad, el aumento de la calcificación vascular se acompaña de una reducción de la masa ósea, lo que sugiere que las señales que intervienen en la mineralización del hueso y de la pared vascular podrían comportarse de modo distinto en función del microambiente tisular en donde actúen<sup>6,7</sup>.

La ERC se caracteriza por producir cambios en el metabolismo óseo que, además de ser perjudiciales para el esqueleto –osteodistrofia renal–, favorecen la calcificación de los tejidos blandos y de los vasos. La hipercalcemia e hiperfosfatemia, el hiperparatiroidismo, el aumento del factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), el aumento del estrés oxidativo y la disminución de los inhibidores de la calcificación como fetuina-A y pirofosfatos podrían desempeñar un papel en el proceso de calcificación vascular<sup>1,2,6,7</sup>.

La hiperfosfatemia, y también la hipercalcemia, son dos de los principales factores asociados con el desarrollo de la calcificación vascular en la ERC<sup>8</sup>. La dieta con alto contenido de fósforo aumenta la calcificación vascular y reduce la masa ósea en ratas con insuficiencia renal crónica. Por otra parte, los tratamientos con alto contenido de calcio y/o fosfato inducen la calcificación de las CMLV en animales de experimentación. A pesar de que todavía no se conocen con exactitud los mecanismos implicados en este proceso, se ha señalado que la hiperfosfatemia induce la calcificación vascular favoreciendo en las CMLV la expresión de factores osteogénicos como el Runx2 o la BMP2<sup>9,10</sup>. Algunos autores han demostrado que, a diferencia de los vasos normales, las arterias de los pacientes con ERC expresan Runx2<sup>1,2,9,10</sup>. Por otra parte, el suero urémico aumenta la expresión de Runx2 y la calcificación de las CVML. Además, la hiperfosfatemia activa la

vía Wnt, favoreciendo la translocación de  $\beta$ -catenina en el núcleo de las células del músculo liso, estimulando con ello la expresión de genes diana directos tales como ciclina D1, axina 2 y VCAN/versican<sup>10</sup>. Finalmente, la hiperfosfatemia también aumenta los niveles de FGF23, que, junto con su co-receptor klotho, podrían desempeñar un papel patogénico en la calcificación arterial y en la alteración de la mineralización esquelética<sup>11</sup>. El papel de la PTH también es complejo. En los pacientes sometidos a hemodiálisis, el aumento de PTH se asocia con la existencia de calcificación vascular y, en ratas con insuficiencia renal, tanto la calcificación aórtica como la pérdida de masa ósea se asocia con el aumento de fósforo y PTH<sup>12</sup>. Sin embargo, en otros estudios se ha señalado que la PTH no es capaz de inducir directamente la calcificación vascular, sino que tendría un efecto sinérgico con el fosfato, que guardaría relación con el aumento de la actividad osteoclástica y del remodelado óseo que esta hormona determina. Este aumento del remodelado óseo favorece la salida de calcio y fósforo desde el hueso, estimulando por tanto la calcificación vascular, y es uno de los factores determinantes de una de las formas más frecuentes de osteodistrofia renal, la osteopatía con alto remodelado o hiperparatiroidismo secundario. En otras ocasiones, como sucede con el hueso adinámico, el bajo remodelado óseo determina una alteración en la formación y mineralización ósea, con la consiguiente menor utilización del exceso de calcio y fósforo, lo que favorece también la calcificación vascular<sup>13,14</sup>.

El incremento del estrés oxidativo que se observa en los pacientes con ERC, también estaría estrechamente asociado con el desarrollo de la calcificación vascular. Al igual que sucede con la hiperfosfatemia, este efecto estaría mediado a través de la expresión de Runx2 en las CMLV<sup>15</sup>. Además, en un reciente estudio llevado a cabo en mujeres postmenopáusicas, se comprobó que el aumento del estrés oxidativo se asociaba con un mayor riesgo de fractura de cadera, lo que sugiere que, existiría una relación inversa entre el estrés oxidativo y el metabolismo mineral<sup>15</sup>.

Junto con el aumento de los niveles de calcio y fósforo, la disminución de algunos de los inhibidores de la calcificación, como la fetuina-A y el pirofosfato, que se observa en la ERC, puede contribuir al aumento de la calcificación vascular en estos pacientes<sup>1,2,6</sup>.

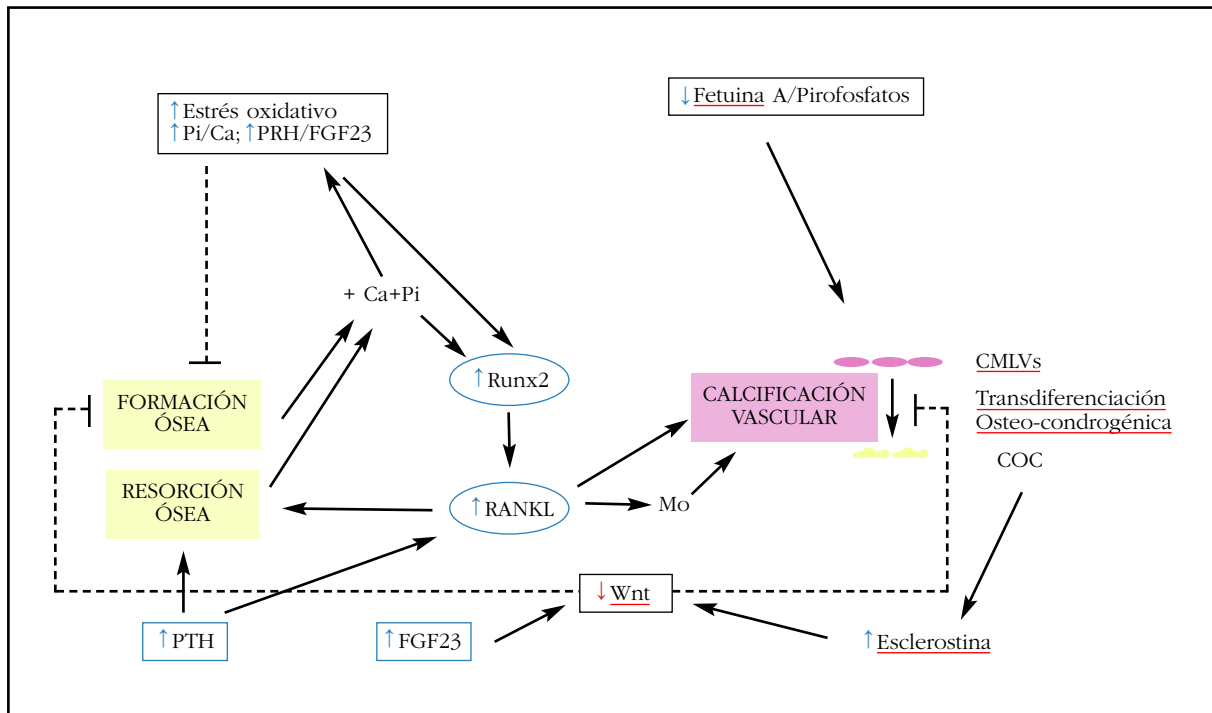
En este número de la Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral, Martínez Arias y cols.<sup>16</sup> analizan los efectos del sistema RANK/RANKL/OPG sobre la desmineralización ósea y la calcificación vascular en la ERC. Estos autores, utilizando dos modelos de calcificación vascular *-in vivo* e *in vitro*, comprueban que las ratas con insuficiencia renal crónica y dieta alta en fósforo presentan un descenso en la densidad mineral ósea, junto con calcificaciones aórticas que se acompañan de un aumento en la expresión génica de RANKL y una disminución de OPG. En la tibia de estos animales aumentó tanto la expresión de RANKL como

de OPG, aunque el aumento de OPG ocurrió en fases más tempranas. En las CMLV, la adición de suero urémico y medio calcificante indujo un incremento del contenido de calcio y de la expresión de RANKL y OPG, mientras que la adición de OPG y el silenciamiento de RANK inhibieron este fenómeno. Por tanto, los resultados de estos autores confirman la participación del eje RANK/RANKL/OPG en el proceso de calcificación vascular, y probablemente también en la pérdida de masa ósea que acompaña a la ERC, y abre las puertas a nuevas vías de investigación en esta área.

Tal y como comentan los autores<sup>16</sup>, existen numerosas evidencias científicas que relacionan el sistema RANK/RANKL/OPG con las calcificaciones vasculares<sup>1,2,7,16-20</sup>. La primera deriva del estudio con ratones nulos para OPG llevado a cabo hace algunos años por Bucay y cols.<sup>17</sup>, quienes demostraron que los ratones deficientes en OPG presentaban calcificaciones vasculares, así como una disminución intensa de la densidad mineral ósea (DMO) y una alta incidencia de fracturas. Posteriormente se observó que el tratamiento con OPG recombinante reducía significativamente la calcificación vascular en ratones deficientes en receptores de LDL<sup>18</sup>. Por otra parte, los estudios llevados a cabo en pacientes con ERC indican que los niveles de RANKL y OPG aumentan conforme lo hacen los de PTH y fosfato, habiéndose señalado a su vez, que el aumento de Runx2 aumenta la expresión de RANKL en las CMLV. En modelos animales, el aumento del RANKL induce una pérdida de masa ósea y calcificación vascular, mientras que la adición de OPG ejerce el efecto contrario. La vía por la que el RAKL promovería la calcificación sería a través de la unión a su receptor RANK, con la consecuente activación de la vía alternativa de NF- $\kappa$ B y de las proteínas morfogénicas óseas 2 y 4 (BMP2 y BMP4), favoreciendo de esta forma la transición osteogénica de las células musculares lisas<sup>1,2,19,20</sup>. Por otra parte, el RANKL podría actuar también de un modo indirecto al estimular la liberación de citoquinas procalcificantes por los macrófagos.

Finalmente, y como cabría esperar, la vía Wnt también parece estar implicada en este proceso. Ya hemos comentado que la hiperfosfatemia activaría esta vía en las CMLV<sup>10</sup>. Por otra parte, la expresión de esclerostina aumenta en las arterias con calcificación vascular. Los niveles de esclerostina y de otros inhibidores de la vía Wnt, como el Dickkopf-1 (DKK1) o el receptor soluble del Frizzled (SFR), aumentan conforme se deteriora la función renal y se correlacionan inversamente con los parámetros histológicos de remodelado óseo y con el número y función de los osteoblastos<sup>21,22</sup>. Recientemente se ha señalado que el aumento de FGF23, que acompaña al deterioro de la función renal, también podría actuar inhibiendo este sistema<sup>11</sup>. Por tanto, la esclerostina y otros inhibidores del sistema Wnt, liberados al medio desde los vasos podría actuar deteriorando la estructura ósea y retardando el proceso de mineralización.

Figura 1. Regulación de la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica



Pi: fósforo; Ca: calcio; Mo: monocitos-macrófagos; CMLVs: células musculares lisas vasculares; COC: células osteo-condrociarias.

Estas alteraciones, junto con las del sistema RANK/RANKL/OPG, la hiperfosfatemia y otros factores que hemos comentado, podrían ayudarnos a comprender la compleja relación que existe entre la calcificación vascular y la pérdida de masa ósea y aumento de fracturas que presentan los pacientes con ERC (Figura 1).

### Bibliografía

- Byon CH, Chen Y. Molecular Mechanisms of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: The Link between Bone and the Vasculature. *Curr Osteoporos Rep.* 2015;13:206-15.
- Lu KC, Wu CC, Yen JF, Liu WC. Vascular calcification and renal bone disorders. *ScientificWorldJournal.* 2014; 2014:637065.
- Harper E, Forde H, Davenport C, Rochfort KD, Smith D, Cummins PM. Vascular calcification in type-2 diabetes and cardiovascular disease: Integrative roles for OPG, RANKL and TRAIL. *Vascul Pharmacol.* 2016; 82:30-40.
- London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(9): 1731-40.
- Reynolds JL, Joannides AJ, ↑ JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2857-67.
- Zheng CM, Zheng JQ, Wu CC, Lu CL, Shyu JF, Yung-Ho H, et al. Bone loss in chronic kidney disease: Quantity or quality?. *Bone.* 2016;87:57-70.
- Cannata-Andía JB, Roman-García P, Hruska K. The connections between vascular calcification and bone health. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26:3429-36.
- Mathew S, Tustison KS, Sugatani T, Chaudhary LR, Rifas L, Hruska KA. The mechanism of phosphorus as a cardiovascular risk factor in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:1092-105.
- Mikhaylova L, Malmquist J, Murminkaya M. Regulation of in vitro vascular calcification by BMP4, VEGF and Wnt3a. *Calcif Tissue Int.* 2007;81:372-81.
- Martínez-Moreno JM, Muñoz-Castañeda JR, Herencia C, Oca AM, Estepa JC, Canalejo R, et al. In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/β-catenin activation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303:F1136-44.
- Carrillo-López 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.
- Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res.* 2004;19:235-244.
- Coen G, Ballanti C, Mantella D, Manni M, Lippi B, Pierantozzi A, et al. Bone turnover, osteopenia and vascular calcifications in hemodialysis patients. A histomorphometric and multislice CT study. *Am J Nephrol.* 2009;29:145-52.
- Gracioli FG, Neves KR, dos Reis LM, Gracioli RG, Noronha IL, Moysés RM, et al. Phosphorus overload and PTH induce aortic expression of Runx2 in experimental uraemia. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:1416-21.
- 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.
- Martínez-Arias L, Solache Berrocal G, Panizo García S, Carrillo López N, Avello Llano N, Quirós Caso C, et al.

- Efecto del sistema RANK/RANKL/OPG sobre la desmineralización ósea y la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2016;8(4):105-114.
17. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12:1260-8.
  18. Orita Y, Yamamoto H, Kohno N, Sugihara M, Honda H, Kawamata S, et al. Role of osteoprotegerin in arterial calcification: development of new animal model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2058-64.
  19. 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.
  20. Osako MK, Nakagami H, Shimamura M, Koriyama H, Nakagami F, Shimizu H, et al. Cross-talk of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand signaling with renin-angiotensin system in vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:1287-96.
  21. Cejka D, Herberth J, Branscum AJ, Fardo DW, Monier-Faugere MC, Diarra D, et al. Sclerostin and Dickkopf-1 in renal osteodystrophy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6:877-82.
  22. Ferreira JC, Ferrari GO, Neves KR, Cavallari RT, Dominguez WV, Dos Reis LM, et al. Effects of dietary phosphate on adynamic bone disease in rats with chronic kidney disease--role of sclerostin?. *PLoS One.* 2013;8(11):e79721.



**Martínez Arias L<sup>1</sup>, Solache Berrocal G<sup>1</sup>, Panizo García S<sup>1</sup>, Carrillo López N<sup>1</sup>, Avello Llano N<sup>2</sup>, Quirós Caso C<sup>2</sup>, Naves Díaz M<sup>1</sup>, Cannata Andía JB<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup> Laboratorio de Medicina - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

## Efecto del sistema RANK/RANKL/OPG sobre la desmineralización ósea y la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000400002>

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

Fecha de recepción: 07/10/2016

Fecha de aceptación: 18/10/2016

*Trabajo premiado con la beca de Investigación AMGEN-SEIOMM 2010.*

### Resumen

**Introducción:** En la enfermedad renal crónica (ERC) se producen alteraciones del metabolismo óseo y mineral que favorecen la calcificación de tejidos blandos. Alteraciones del sistema RANK/RANKL/OPG podrían estar favoreciendo la calcificación vascular, importante causa de morbimortalidad en la ERC.

**Objetivo:** Valorar en un modelo experimental *in vivo* de insuficiencia renal crónica el efecto de la progresión de la misma sobre la calcificación vascular y sobre la pérdida de hueso correlacionando estos cambios con alteraciones en el sistema RANK/RANKL/OPG, utilizando un sistema *in vitro* para confirmar los hallazgos encontrados.

**Material y métodos:** Se utilizaron dos modelos de calcificación vascular: un modelo *in vivo* en ratas con insuficiencia renal crónica alimentadas con dieta con diferente contenido en fósforo, y un modelo *in vitro* en células de músculo liso vascular (CMLV) sometidas a diferentes estímulos calcificantes.

**Resultados:** A las 20 semanas, un 50% de los animales con dieta alta en fósforo presentó calcificaciones aórticas que se acompañó de aumento en la expresión aórtica de RANKL. Por el contrario, la OPG disminuyó como consecuencia probablemente del componente inflamatorio.

A las 20 semanas en la tibia aumentó la expresión de RANKL y OPG, mientras que el aumento de OPG ocurrió en fases más tempranas.

En CMLV la adición de suero urémico y medio calcificante indujo un incremento del contenido de calcio y de la expresión de RANKL y OPG. La adición de OPG y el silenciamiento de RANK inhibieron este aumento.

**Conclusiones:** Nuestros resultados confirman la participación del eje RANK/RANKL/OPG en el proceso de calcificación vascular.

**Palabras clave:** RANK, RANKL, OPG, enfermedad renal crónica, calcificación vascular.

## Effect of RANK/RANKL/OPG pathway on bone demineralization and vascular calcification in chronic kidney disease

### Summary

**Introduction:** In cases of chronic kidney disease (CKD), bone and mineral metabolism changes occur which favor soft tissue calcification. Alterations in the RANK/RANKL/OPG system could also favor vascular calcification, a major cause of morbidity and mortality in CKD.

**Objective:** In an *in vivo* experimental model of chronic renal failure progression, we assess the effect of CKD on vascular calcification and bone loss correlating these changes in the RANK/RANKL/OPG pathway. An *in vitro* system was used to confirm findings.

**Material and methods:** Two models of vascular calcification were used: an *in vivo* rat model with chronic renal failure fed on a diet with different phosphorus content, and an *in vitro* model in vascular smooth muscle cells (VSMC) subjected to different calcifying stimuli.

**Results:** At 20 weeks, 50% of animals with a diet high in phosphorus presented aortic calcification accompanied by increased aortic expression of RANKL. In contrast, OPG decreased probably as a consequence of an inflammatory component.

At 20 weeks, expression of RANKL and OPG in the tibia increased, while the increase in OPG occurred at earlier stages.

In VSMC, the addition of uremic serum and calcification medium increased calcium content and expression of RANKL and OPG. The addition of OPG and silencing of RANK inhibited this increase.

**Conclusions:** Our results confirm RANK/RANKL/OPG system involvement in the vascular calcification process.

**Key words:** RANK, RANKL, OPG, chronic kidney disease, vascular calcification.

### Introducción

La calcificación vascular es un proceso en el que las células del músculo liso vascular (CMLV) y otras poblaciones de células del vaso sanguíneo sufren una transformación y comienzan a asemejarse a osteoblastos<sup>1</sup>. Este proceso está regulado de manera semejante a la mineralización del hueso, encontrándose implicadas diversas proteínas óseas<sup>2-4</sup>. Los osteoblastos son células responsables de la formación de hueso que además regulan la actividad de los osteoclastos y, por tanto, juegan un papel importante en la homeostasis del calcio (Ca) y del fósforo (P)<sup>5</sup>. Los osteoblastos secretan el ligando del receptor activador de NF-κB (RANKL) que se une a su receptor (RANK) en los precursores osteoclasticos promoviendo su formación, activación y supervivencia<sup>6,7</sup>. Además, los osteoblastos secretan osteoprotegerina (OPG), que actúa como un receptor soluble señuelo de RANKL e inhibe la unión de este ligando a su receptor transmembrana RANK. Existen numerosas evidencias científicas que relacionan el sistema RANK/RANKL/OPG con las calcificaciones vasculares, pudiendo tratarse de un importante sistema autocrino/paracino implicado en el proceso. La vía por la que RANKL promovería la calcificación sería a través de la unión a su receptor RANK con la consecuente activación de la vía alternativa de NF-κB y de la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4)<sup>8</sup>, la cual ha sido implicada en la transición osteogénica de las CMLV<sup>9,10</sup>.

La enfermedad renal crónica (ERC) se caracteriza por producir cambios en el metabolismo óseo y mineral que favorecen la calcificación de tejidos blandos y vasos. Alteraciones en la expresión génica del sistema RANK/RANKL/OPG podrían estar favoreciendo la calcificación vascular, una de las principales causas de mortalidad en la ERC.

Resulta de interés investigar las diferencias en la regulación del sistema RANK/RANKL/OPG en hueso y vaso para poder así diseñar estrategias dirigidas a proteger el hueso sin tener efectos negativos sobre la calcificación vascular.

Por tanto, los objetivos de este trabajo fueron: a) valorar en un modelo de rata el efecto de la ERC y dietas con diferente contenido en P sobre la calcificación vascular, cuantificada mediante análisis de contenido de Ca, y sobre la densidad mineral ósea (DMO), cuantificada mediante densitometría ósea; b) correlacionar estos cambios con alteraciones en la expresión génica del sistema RANK/RANKL/OPG en arterias y huesos de estos animales; y c) utilizar un sistema *in vitro* para confirmar los hallazgos encontrados *in vivo*.

### Materiales y métodos

#### Estudios *in vivo*:

##### 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=55) de 4 meses de edad (350-400 g). La intervención quirúrgica, previa anestesia con isoflurano por vía inhalatoria, consistió en la inducción de insuficiencia renal crónica (IRC) (7/8) en un solo acto quirúrgico. Se realizó nefrectomía completa del riñón derecho y a continuación nefrectomía subtotal del riñón izquierdo, mediante incisión lateral. Con este procedimiento se conserva aproximadamente la cuarta parte de la masa renal. Las ratas con IRC se dividieron en dos grupos: uno, IRC C, alimentado con dieta para roedores estándar con un contenido normal de P (0,6% P, 0,6% de Ca, y contenido de pro-

teína 20%; Panlab, Barcelona, España), y el otro, IRC P, alimentado con una dieta con alto contenido en P (0,9% P, 0,6% de Ca, y contenido de proteína 20%; Panlab). El estudio duró 20 semanas (IRC 20C e IRC 20P), tiempo necesario para inducir calcificaciones vasculares. Se incluyó igualmente un grupo Sham (n=10) que fue seguido hasta la semana 20. También se realizaron evaluaciones intermedias a lo largo del estudio, con sacrificios a las 8 y 12 semanas (IRC 8C, IRC 12C, IRC 8P e IRC 12P). Veinticuatro horas antes del sacrificio, las ratas se alojaron en jaulas metabólicas y recibieron dieta y agua *ad libitum*. Se sacrificaron usando como anestesia CO<sub>2</sub>, y se extrajeron muestras de suero para su análisis. De cada rata se extrajo la aorta abdominal descendente hasta la bifurcación de las crestas ilíacas y se dividió en tres porciones: el primer fragmento se utilizó para la extracción de RNA, el segundo fragmento para determinar el contenido de Ca, 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 hasta su procesamiento para el estudio de la expresión génica.

#### Marcadores bioquímicos

Urea, creatinina, Ca y P séricos 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.

#### Densitometría ósea

La DMO se midió en tibia a tres niveles: octavo proximal, siete/octavos distal 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 dos métodos: el contenido total de Ca y tinción de von Kossa.

Para determinar el contenido total de Ca, un fragmento de la aorta abdominal (el cm próximo a la bifurcación ilíaca) 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 complejona (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.

Para llevar a cabo la tinción de von Kossa, otro fragmento de la aorta abdominal se incluyó en metacrilato de metilo (Sigma-Aldrich). Cinco secciones de 5 mm de espesor se obtuvieron utilizando un Polycut S Micrótopo (Reicher-Jung, Heidelberg, Alemania) y se tiñeron siguiendo el método de von Kossa.

#### Estudio de expresión génica

La extracción de RNA se realizó mediante el método del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo. El DNA copia (cDNA) se sintetizó usando el kit "High capacity" (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). La expresión génica de RANK, RANKL y OPG se analizó por PCR en tiempo real (qPCR) en el equipo ABI Prism 7000 de Applied Biosystems. Para cada una de las PCRs se utilizaron ensayos *assay on-demand* diseñados por Applied Biosystems que emplean oligos específicos y sondas Taqman fluorescentes. Para la cuantificación y normalización se utilizó la expresión del gen constitutivo GAPDH.

#### Estudios *in vitro*:

##### Cultivo primario de células de músculo liso vascular (CMLV)

Se utilizaron CMLV procedentes de cultivo primario de explantes de aortas de ratas Wistar sanas de 2 meses de edad, sacrificando a 12 ratas y usando como anestesia CO<sub>2</sub>. Se extrajeron las aortas abdominales y se introdujeron en PBS frío con 100 unidades/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina (Biochrom AG, Berlín, Alemania). Después de lavar abundantemente con PBS frío, las aortas se cortaron longitudinalmente; se eliminó la capa endotelial cuidadosamente y posteriormente se cortaron en fragmentos (explantes) de 2 a 3 mm<sup>2</sup>. Los explantes se colocaron en placas de cultivo de seis pocillos (Sigma-Aldrich) pretratadas con fibronectina (10 mg/cm<sup>2</sup>; Sigma-Aldrich). Una vez colocados los explantes, se les añadió 1 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biochrom AG) suplementado con 20% suero bovino fetal (FBS) (Biochrom AG). El medio se renovó cada 2 días. Cuando las células alcanzaron la subconfluencia, los fragmentos de tejido se eliminaron y las células se separaron enzimáticamente (0,25% de tripsina y EDTA 1 mM).

Las células se sembraron con una densidad de 10<sup>5</sup> células por placa de cultivo (Sigma-Aldrich) con DMEM suplementado con FBS (10%). Las células obtenidas por este método se identificaron como CMLV por los siguientes criterios: (1) las células crecen en el patrón característico de valle y colina; y (2) la inmunotinción fue positiva para alfa actina (mAb de Sigma-Aldrich).

Se utilizaron células entre los pases 2 y 8, utilizando tres pocillos por condición y realizándose los experimentos por triplicado.

##### Inducción de la calcificación en CMLV

Para analizar la calcificación inducida por la uremia y conocer la implicación del sistema RANK/RANKL/OPG, se utilizaron dos condiciones diferentes.

Para la primera condición, los cultivos de CMLV se trataron con DMEM suplementado con 15% de suero de rata urémico (un conjunto de sueros de ratas con IRC de 8 semanas que contiene 10,8 mg/dL de Ca, 6,7 mg/dL de P, y 898 pg/mL de PTH). Como condición control se usó DMEM con 15% de suero de ratas sanas (un grupo de sueros que contiene 10,4 mg/dL de Ca, 3,6 mg/dL de P y 25 pg/mL de PTH).

En una segunda condición, para confirmar el efecto del P, las CMLV se cultivaron con medio calcificante: DMEM F12+0,1% de albúmina bovina sérica (BSA) con 2 mM de Ca y 3 mM de P. Se utilizó como condición control DMEM F12+0,1% de BSA. En ambos casos, la deposición de Ca se determinó a 4 y 8 días después de la adición de los estímulos.

El efecto de OPG (100 pM), del silenciamiento del receptor RANK (concentraciones crecientes entre 100 pM y 100 nM) se testó en CMLV en las que se indujo calcificación con DMEM F12+0,1% de BSA con 2mM de Ca y 3 mM de P.

### Estudio de expresión génica

Se procedió de la misma manera que se detalló en el apartado de estudios *in vivo*.

### Producción e infección lentiviral/Silenciamiento de RANK mediante shRNA

El gen RANK se silenció en las CMLV mediante horquillas pequeñas de RNA (shRNA), las cuales se clonaron en un vector basado en lentivirus (FSVsi). En él se introdujeron shRNAs cuya diana era TTAGCTGAGGATGCTGAGGAT y secuencias *scramble*. Todos ellos se cotransfectaron con los elementos de embalaje del virión (VDV-G) en un cultivo de células 293T mediante polietilenimina. Se produjeron partículas infecciosas cultivando las células 3-4 días en medio para CMLV. A continuación, el medio se centrifugó a 1.000 g durante 5 min y el sobrenadante se adicionó a un cultivo de CMLV, sustituyéndose por el medio convencional tras una noche de incubación. Por último, las CMLV se recogieron tras 4 días y se comprobó el silenciamiento de RANK con qPCR y Western Blot.

### Western Blot

Después de la transferencia, las membranas se incubaron durante 12 horas con anticuerpos anti-RANK (1:1.000, Cells Signaling Technology,

Danvers, EE.UU.), y anti-tubulina (01:10.000, Sigma-Aldrich). 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 ANOVA con el test de Bonferroni. En el caso de variables con distribución no normal, se utilizó el test Kruskal-Wallis.

## Resultados

### 1. Bioquímica

En los grupos que recibieron la dieta con alto contenido en P (IRC 8P, IRC 12P, IRC 20P) se observó un discreto empeoramiento de la función renal con respecto a sus controles (IRC 8C, IRC 12C, IRC 20C), el cual se agravó a las 20 semanas (Tabla 1). En el grupo de dieta con P alto el Ca sérico disminuyó significativamente sólo en la semana 20 (IRC 20P), mientras el P sérico se incrementó en todos los grupos con dieta alta en P, particularmente a las 20 semanas de tratamiento. De forma paralela al P, la PTH se incrementó a medida que aumentó el tiempo de tratamiento, siendo estadísticamente significativa a partir de la semana 12 y en particular en la semana 20, donde se observó un hiperparatiroidismo secundario severo (Tabla 1).

### 2. Estudio densitométrico

Si bien hubo un discreto descenso en la DMO de los grupos de animales con dieta alta en P respecto a sus controles en todos los sectores estudiados, éste sólo fue significativo a las 20 semanas (Tabla 2). Predominaron las pérdidas a nivel distal, donde hay mayor contenido de hueso cortical, sobre las pérdidas a nivel proximal (Tabla 2).

Tabla 1. Bioquímica general en los distintos grupos de tratamiento

	SHAM (n=10)	IRC 8C (n=9)	IRC 8P (n=9)	IRC 12C (n=7)	IRC 12P (n=10)	IRC 20C (n=10)	IRC 20P (n=10)
Urea (mg/dL)	34±9	108±27	137±45	119±29	143±51	100±70	200±70
Creatinina (mg/dL)	0,4±0,1	1,0±0,3	1,4±0,5	1,3±0,4	1,3±0,6	1,5±1,3	2,2±0,8*
Calcio (mg/dL)	11,4±0,6	11,8±0,9	11,4±0,8	12,4±0,6	11,4±2,0	12,5±0,6	11,1±0,4*
Fósforo (mg/dL)	4,8±1,0	5,7±1,1	10,0±3,7*	6,0±1,9	9,4±3,4*	5,6±0,8	12,1±2,8*
PTH (pg/mL)	22 (4-74)	28 (19-55)	139 (59-933)	62 (27-121)	236 (128-1.113)*	80 (54-115)	1.901 (1.117-2.517)*

IRC 8C, IRC 12C, IRC 20 C: grupos de ratas alimentadas con dieta con contenido normal en fósforo sacrificadas a las 8, 12 y 20 semanas, respectivamente; IRC 8P, IRC 12P, IRC 20 P: grupos de ratas alimentadas con dieta con alto contenido en fósforo sacrificadas a las 8, 12 y 20 semanas, respectivamente; \*p<0,005 respecto a su grupo control con dieta normal en P.

Tabla 2. Valores de DMO en la tibia en los distintos grupos de tratamiento

	SHAM (n=10)	IRC 8C (n=9)	IRC 8P (n=9)	IRC 12C (n=7)	IRC 12P (n=10)	IRC 20C (n=10)	IRC 20P (n=10)
T. proximal (mg/cm <sup>2</sup> )	335±22	307±13	303±24	318±19	302±19	332±18	311±29
T. distal (mg/cm <sup>2</sup> )	276±10	243±12	236±15	247±12	239±9	263±13	236±20*
T. total (mg/cm <sup>2</sup> )	288±12	256±11	250±14	261±13	252±11	277±12	251±21*

IRC 8C, IRC 12C, IRC 20 C: grupos de ratas alimentadas con dieta con contenido normal en fósforo sacrificadas a las 8, 12 y 20 semanas, respectivamente; IRC 8P, IRC 12P, IRC 20 P: grupos de ratas alimentadas con dieta con alto contenido en fósforo sacrificadas a las 8, 12 y 20 semanas, respectivamente; \*p=0,001 respecto a su grupo control con dieta normal en P.

**3. Efecto *in vivo* de la uremia y la sobrecarga de P sobre calcificación vascular, actividad ósea y sistema RANK-RANKL-OPG**

Si bien el contenido en Ca de las aortas de los animales alimentados con dieta con contenido en P normal se vio ligeramente afectado por la uremia, a partir de la semana 12 de IRC la administración de una dieta con alto contenido en P aumentó el contenido en Ca de forma significativa de forma tiempo-dependiente respecto al grupo Sham. Los animales que recibieron la dieta con P elevado incrementaron el contenido aórtico de Ca respecto a sus respectivos controles a partir de la semana 12, magnificándose este efecto en la semana 20. A pesar del incremento generalizado del contenido en Ca aórtico, la tinción de von Kossa reveló calcificaciones visibles en la aorta en solo el 50% de los animales con dieta con alto contenido en P (Figura 1).

Paralelamente al incremento del contenido de Ca se produjo una elevación de la expresión de RANKL en la aorta (Figura 2A). La expresión de RANK no mostró diferencias a lo largo de la evolución de la IRC (Figura 2B), mientras que la OPG disminuyó en todos los grupos urémicos, particularmente en los que recibieron dieta con P elevado (Figura 2C).

En las tibias se observó un incremento de la expresión de RANKL y OPG en la semana 20 del grupo que recibió dieta con P elevado (Figuras 3A, 3C). La expresión de OPG también se incrementó en todos los grupos que recibieron dieta con P elevado, destacando el aumento observado en la semana 20. Por el contrario, la expresión de RANK se mantuvo similar en todos los grupos.

**4. Efecto *in vitro* de la uremia y la sobrecarga de P sobre la calcificación vascular y el sistema RANK-RANKL-OPG**

El suero urémico indujo un incremento significativo del contenido de Ca a los 4 y 8 días (Figura 4A). Se produjo un incremento significativo de la expresión de RANKL (a los 4 y 8 días) y OPG (a los 8 días de tratamiento) (Figuras 4B, 4C y 4D).

Las CMLV tratadas con medio calcificante (DMEM F12, 2 mM de Ca, 3 mM de P) mostraron un incremento significativo del contenido de Ca tiempo dependiente (Figura 5A). De manera paralela aumentó la expresión de RANKL y OPG (Figuras 5B, 5C y 5D).

Figura 1. A) Contenido de Ca en las aortas de ratas con nefrectomía 7/8 alimentadas con dieta con contenido normal en P (0,6%) (barras grises) y alto contenido en P (0,9%) (barras negras), sacrificadas a las 8 y 20 semanas. Los datos representan la media ± desviación estándar. \*p<0,05 vs. misma semana con P normal (0,6%). B) Tinciones de von Kossa de las aortas en los distintos grupos de tratamiento

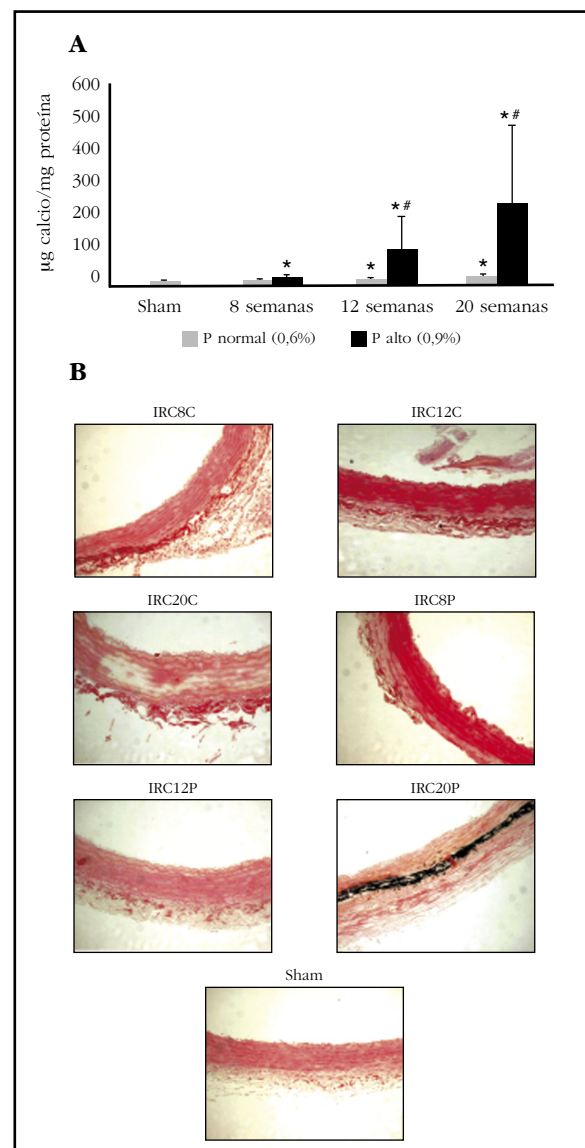


Figura 2. Expresión de RANKL (A), RANK (B) y OPG (C) en las aortas de ratas con nefrectomía 7/8 alimentadas con dieta con contenido normal en P (0,6%) (barras grises) y alto contenido en P (0,9%) (barras negras), sacrificadas a las 8 y 20 semanas, determinado por q-PCR. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0,05$  vs. grupo Sham # $p < 0,05$  vs. mismas semanas con P normal (0,6%)

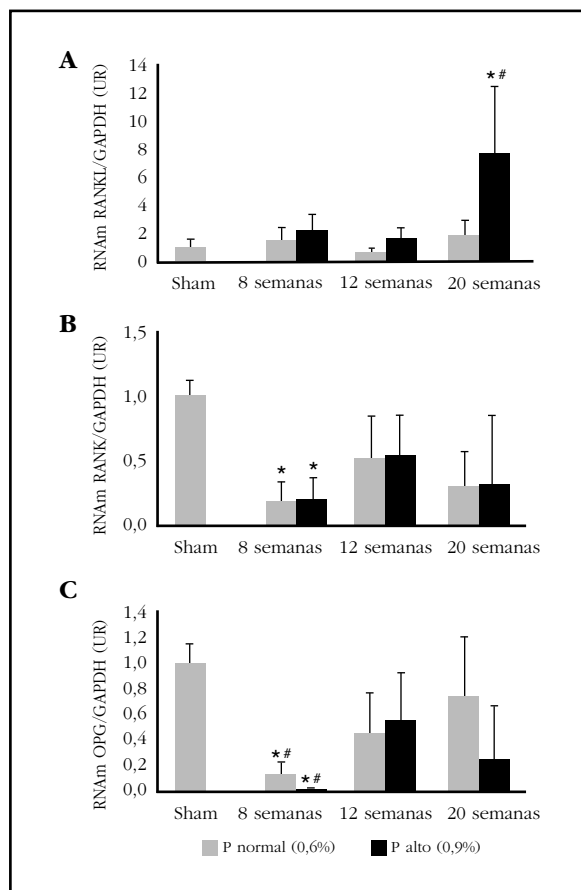
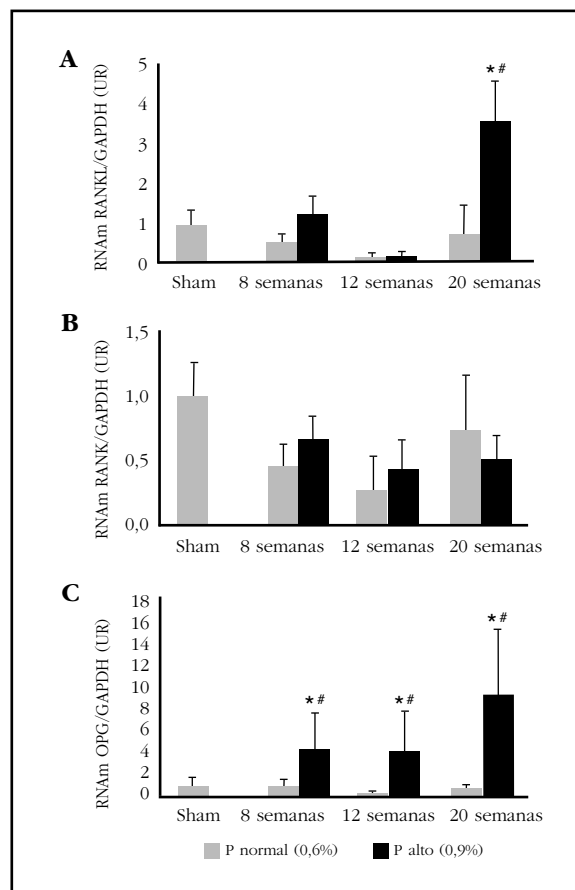


Figura 3. Expresión de RANKL (A), RANK (B) y OPG (C) en las tibias de ratas con nefrectomía 7/8 alimentadas con dieta con contenido normal en P (0,6%) (barras grises) y alto contenido en P (0,9%) (barras negras), sacrificadas a las 8 y 20 semanas, determinado por q-PCR. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0,05$  vs. grupo Sham # $p < 0,05$  vs. mismas semanas con P normal (0,6%)



### 5. Efecto *in vitro* de la adición de OPG sobre la calcificación inducida por el suero urémico

Para confirmar la idea de que el incremento de la expresión de RANKL es responsable del aumento contenido en Ca en CMLV tratadas con suero urémico, se adicionó al medio de cultivo 100 pM de OPG, lo que produjo un descenso significativo de la misma (Figura 6).

### 6. Efecto *in vitro* del silenciamiento de RANK sobre la calcificación inducida por el suero urémico

Del mismo modo, el silenciamiento del receptor RANK mediante la técnica de shRNA redujo de manera significativa el contenido de Ca de las CMLV tratadas con suero urémico (Figura 7).

### Discusión

La ERC, una enfermedad caracterizada por una pérdida progresiva de la función renal, conlleva la aparición de múltiples complicaciones y alteraciones del sistema cardiovascular. Para simular la ERC hemos utilizado el modelo animal con IRC habitual de nuestro laboratorio.

De acuerdo con lo observado en los marcadores bioquímicos analizados, el desarrollo de IRC se acompañó de alteraciones en el metabolismo óseo y mineral que se agravaron con la hiperfosforemia y el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario. Es bien reconocido que este último aumenta el recambio óseo, afectando negativamente primero y de forma más severa al hueso cortical (siete/octavos de la tibia o zona distal) que al trabecular (octavo de la tibia o zona proximal), hecho corroborado en nuestros animales. Si bien la PTH es capaz de estimular la expresión de OPG, como se demuestra en las tibias de los animales con IRC con hiperfosforemia severa, esta hormona es también capaz de inducir la expresión de RANKL en los osteoblastos<sup>11</sup>, pudiendo ser este gen responsable del descenso en la DMO registrado en el estudio densitométrico.

El sistema RANK/RANKL/OPG también se ha asociado a la calcificación vascular. La primera evidencia de su implicación en este proceso deriva del estudio con ratones nulos para OPG que presentaban, además de una severa disminución de DMO y alta incidencia de fracturas, calcificaciones de las arterias aorta y renales<sup>12</sup>.

Figura 4. Contenido en Ca (A) y expresión de RANKL, RANK y OPG en las CMLV de ratas tratadas con DMEM suplementado con 15% de suero control (barras grises) o urémico (barras negras) a tiempo basal (0), 4 y 8 días, determinado por q-PCR. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0,05$  vs. basal; # $p < 0,05$  vs. mismo tiempo con DMEM y suero control

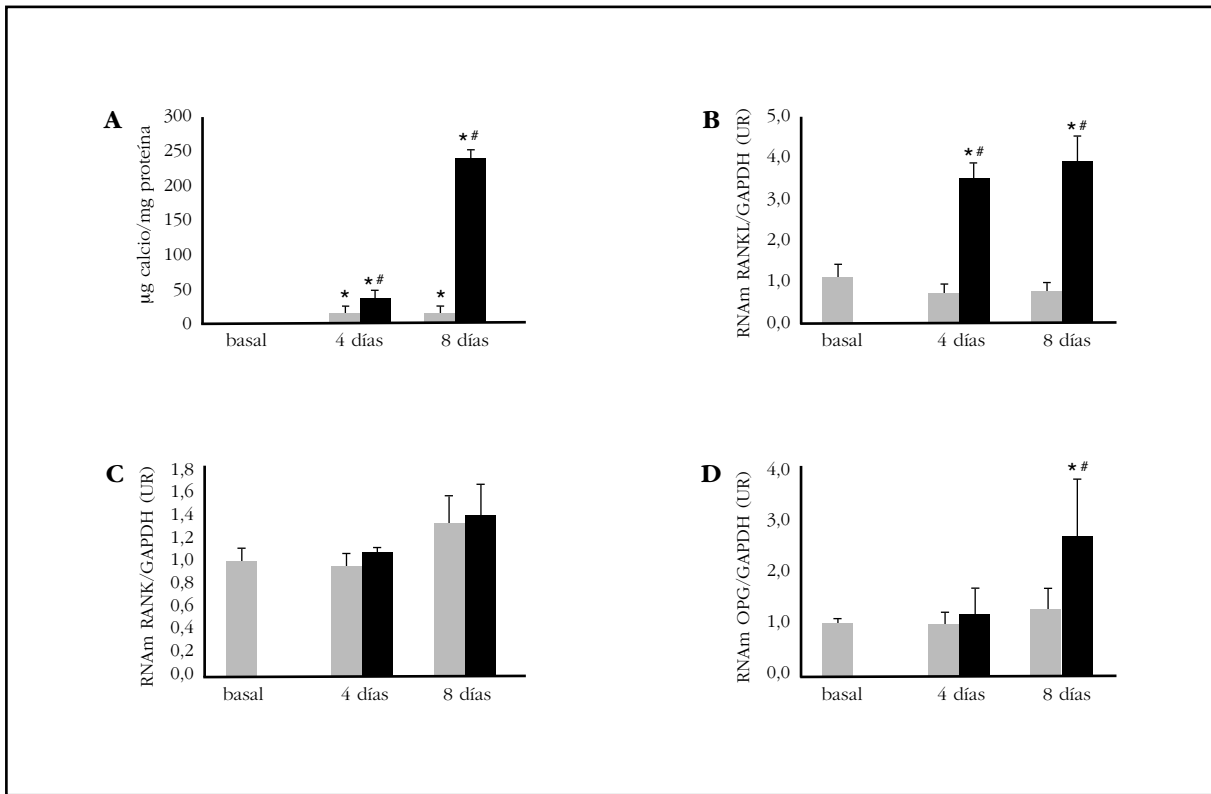


Figura 5. Contenido en Ca (A) y expresión de RANKL (B), RANK (C) y OPG (D) en las CMLV de ratas tratadas con DMEM control (1mM Ca 1mM P) (barras grises) o calcificante (2mM Ca 3mM P) (barras negras). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0,05$  vs. basal; # $p < 0,05$  vs. mismo tiempo con DMEM control

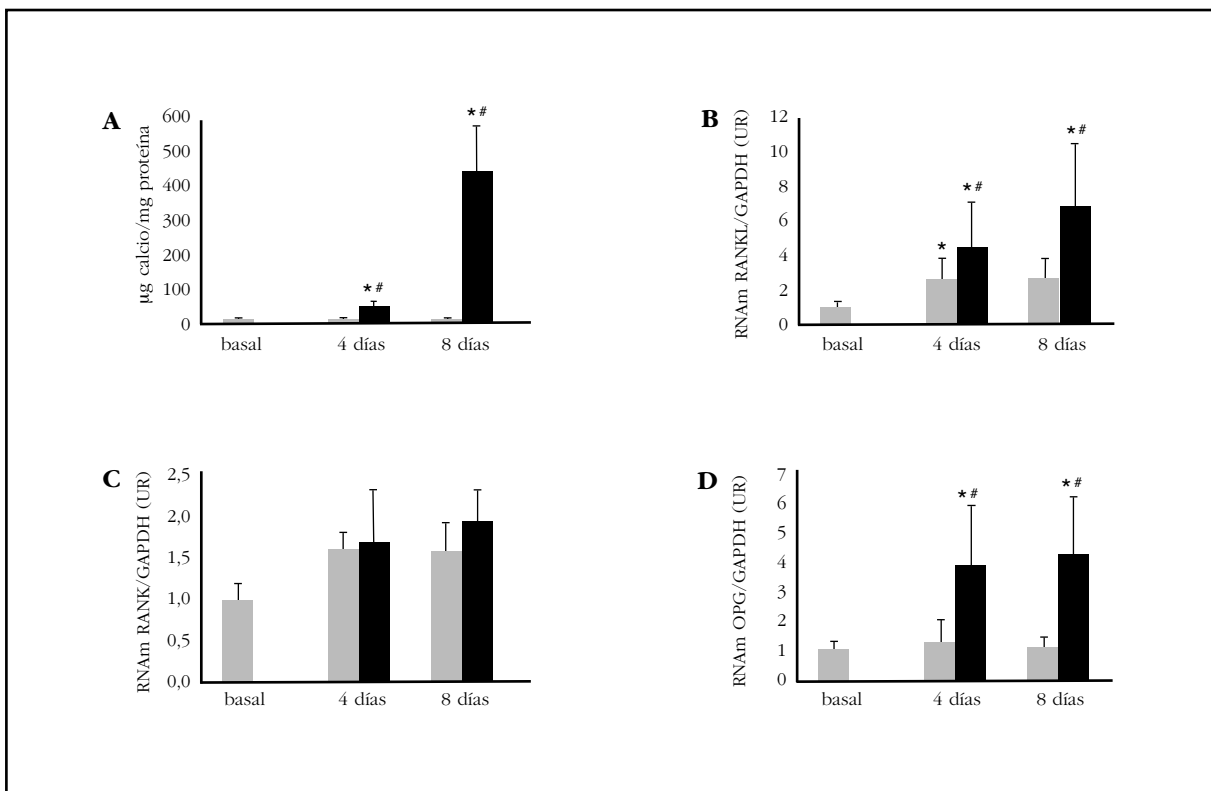
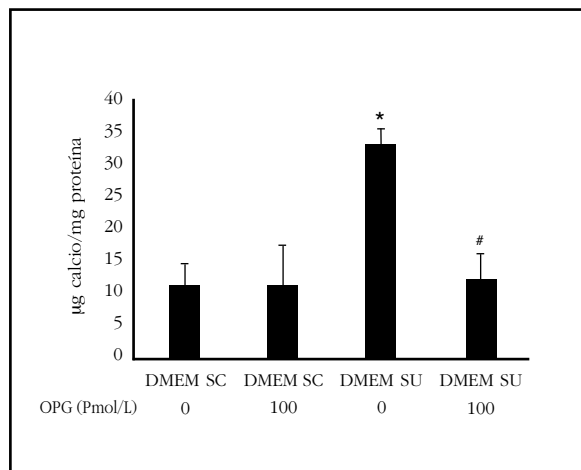


Figura 6. Contenido en Ca en CMLV de ratas tratadas con DMEM + 15% suero control (DMEM SC) o DMEM + 15% suero urémico (DMEM SU) con o sin 100 pM OPG. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0,05$  vs. DMEM SC; # $p < 0,05$  vs. DMEM SU

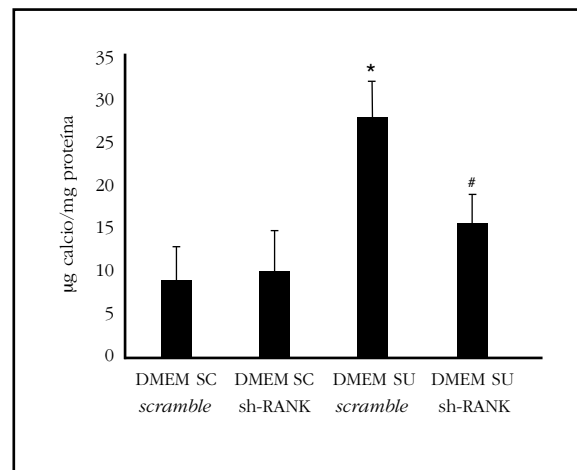


La OPG tiene la habilidad de inhibir la actividad osteoclástica y por tanto de prevenir la aparición de calcificación vascular. De hecho, en nuestro modelo *in vitro*, la calcificación vascular inducida por suero urémico se vio atenuada al añadir OPG.

Como han descrito algunos autores, se ha observado una relación directa entre la calcificación y el aumento de RANK/RANKL/OPG a nivel óseo. La bajada de OPG en tejido aórtico inducida en nuestro modelo animal por la uremia está en consonancia con lo referido por otros autores. Mientras RANKL fue claramente detectable en pacientes con estenosis aórtica calcificada, los niveles de OPG no eran detectables<sup>13</sup>. Estos descensos de OPG a nivel aórtico por la uremia podrían deberse al proceso de inflamación durante la calcificación que cursa con descensos en OPG<sup>14,15</sup>.

Algunos autores han descrito la calcificación vascular como un proceso activo y regulado por diversos factores. Las CMLV en las primeras etapas del proceso de calcificación sufren un cambio de su fenotipo y empiezan a expresar marcadores osteogénicos, que permitirían la mineralización de la matriz extracelular. Una de estas proteínas es RANKL, cuya expresión es abundante en osteoblastos. Tanto en las aortas y tibias de las ratas como en las CMLV se ha producido un aumento en la expresión de RANKL, agravado por el aumento de P en la dieta. En nuestro trabajo se muestra la relación directa existente entre el aumento en la calcificación y el incremento de RANKL. Los osteoblastos secretan RANKL, proceso que puede revertirse por acción de OPG, proteína que secuestra RANKL inhibiendo así la formación de osteoclastos al impedir que RANKL se una a su receptor RANK. El silenciamiento de RANK en nuestro modelo *in vitro* de calcificación con suero urémico inhibió el proceso de calcificación al impedir la unión del RANKL al RANK.

Figura 7. Contenido en Ca CMLV de ratas transfectadas con *scramble* (control) o con sh-RANK con DMEM + 15% suero control (DMEM SC) o DMEM + 15% suero urémico (DMEM SU). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0,05$  *scramble* con DMEM SC; # $p < 0,05$  vs. *scramble* con DMEM SU



Otros estudios también han demostrado que la expresión de RANKL se incrementa en áreas calcificadas<sup>16-18</sup>, como sucedió en las aortas de los animales estudiados. Mientras que en hueso un incremento de RANKL favorece la desmineralización por un aumento de la actividad osteoclástica, en los vasos estimula la osteogénesis y, por tanto, la calcificación<sup>19</sup>. De hecho, Kindle L y cols. sugieren que las células endoteliales del vaso producen un microambiente favorable a la formación de tejido calcificado, estimulando la migración y adhesión de monocitos a través del endotelio que pueden diferenciarse en osteoclastos en presencia de RANKL<sup>20</sup>. Recientemente se ha demostrado que CMLV incubadas en medio calcificante al que se añade RANKL incrementan su contenido de Ca y la actividad fosfatasa alcalina, mientras que la coincubación con OPG es capaz de inhibir la calcificación inducida por RANKL<sup>5</sup>.

La hipótesis de que el sistema RANK/RANKL/OPG podría explicar parte de la relación existente entre osteoporosis y calcificación vascular se basa en múltiples estudios epidemiológicos que han puesto de manifiesto la asociación entre metabolismo óseo y vascular, constatando que la disminución de masa ósea y aumento de las fracturas se asocia con mayor prevalencia y progresión de calcificaciones vasculares en población general y en poblaciones de riesgo<sup>21-26</sup>, encontrándose entre estas últimas los enfermos con ERC.

La vía de Wnt es una vía de señalización intracelular que participa en la formación de hueso. Debido a las similitudes entre la formación ósea y la calcificación, se ha sugerido que la inactivación de la vía de Wnt podría atenuar el proceso de la calcificación, como así ha sido descrito por varios autores<sup>27-29</sup>. Datos de nuestro grupo, en el mismo modelo experimental, han mostrado un incremento en la expresión génica de inhibidores de la vía de Wnt en el grupo de animales con calcificación



vascular, sugiriendo un mecanismo protector de la progresión de la calcificación<sup>30</sup>. Por otro lado, no debemos olvidar que un balance negativo de los inhibidores de la calcificación, como la fetuina A, podría igualmente favorecer el proceso de calcificación<sup>31,32</sup>.

Nuestros resultados *in vivo* indican la participación del eje RANK/RANKL/OPG en la calcificación vascular y en cambios en DMO como consecuencia de la ERC y de estímulos que favorecen la primera. Además, en nuestro modelo *in vitro*, la adición de OPG así como el silenciamiento de RANK redujeron la calcificación, indicando que el sistema RANK/RANKL/OPG actúa en dicho proceso, abriendo las puertas a nuevas investigaciones en esta área. Debido a su importancia en la regulación del recambio óseo, los miembros del eje RANK/RANKL/OPG podrían ser utilizados en un futuro como biomarcadores útiles en la evaluación de la función ósea en pacientes con ERC.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida por la beca AMGEN-SEIOMM 2010 para promover la investigación. 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, PI 10/0896 y 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), por la Sociedad Asturiana Fomento Investigaciones Metabólicas.

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

### Bibliografía

- Jono S, Shioi A, Ikari Y, Nishizawa Y. Vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Metab.* 2006;24:176-81.
- Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1993;91:1800-9.
- Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1993;92:1686-96.
- Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;93:2393-402.
- Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(Suppl.1):S1.
- Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 1999;402:304-9.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998;93:165-76.
- 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.
- Hayashi K, Nakamura S, Nishida W, Sobue K. Bone morphogenetic protein-induced MSX1 and MSX2 inhibit myocardin-dependent smooth muscle gene transcription. *Mol Cell Biol.* 2006;26:9456-70.
- Mikhailova L, Malmquist J, Nurminskaya M. Regulation of in vitro vascular calcification by BMP4, VEGF and Wnt3a. *Calcif Tissue Int.* 2007;81:372-81.
- Heckt T, Keller J, Peters S, Streichert T, Chalaris A, Rose-John S, et al. Parathyroid hormone induced expression and proteolytic processing of Rankl in primary murine osteoblasts. *Bone.* 2016;92:85-93.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12:1260-8.
- Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoç A, Kiliç R, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36:57-66.
- Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontol Res.* 2003;38:380-7.
- Haynes DR, Barg E, Crotti TN, Holding C, Weedon H, Atkins GJ, et al. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology (Oxford).* 2003;42:123-34.
- Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2000;192:463-74.
- Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1998-2003.
- 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.
- Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res.* 2004;95:1046-57.
- Kindle L, Rothe L, Kriss M, Osdoby P, Collin-Osdoby P. Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14+ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2006;21:193-206.
- Naves M, Rodriguez-Garcia M, Diaz-Lopez JB, Gomez-Alonso C, Cannata-Andia JB. Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteoporos Int.* 2008;19:1161-6.
- Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, Hofman A, Witteman JC. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1926-31.
- Kado DM, Browner WS, Blackwell T, Gore R, Cummings SR. Rate of bone loss is associated with mortality in older women: a prospective study. *J Bone Miner Res.* 2000;15:1974-80.
- Boukhris R, Becker KL. Calcification of the aorta and osteoporosis. A roentgenographic study. *JAMA.* 1972;219:1307-11.

25. Schulz E, Arfai K, Liu X, Sayre J, Gilsanz V. Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:4246-53.
26. Rodriguez-Garcia M, Gomez-Alonso C, Naves-Diaz M, Diaz-Lopez JB, Diaz-Corte C, Cannata-Andia JB. Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:239-46.
27. Shalhoub V, Shatzen E, Henley C, Boedigheimer M, McNinch J, Manoukian R, et al. Calcification inhibitors and Wnt signaling proteins are implicated in bovine artery smooth muscle cell calcification in the presence of phosphate and vitamin D sterols. *Calcif Tissue Int.* 2006;79:431-42.
28. Woldt E, Terrand J, Mlih M, Matz RL, Bruban V, Coudane F, et al. The nuclear hormone receptor PPARgamma counteracts vascular calcification by inhibiting Wnt5a signalling in vascular smooth muscle cells. *Nat Commun.* 2012;3:1077.
29. Deng D, Diao Z, Han X, Liu W. Secreted frizzled-related protein 5 attenuates high phosphate-induced calcification in vascular smooth muscle cells by inhibiting the wnt/ss-catenin pathway. *Calcif Tissue Int.* 2016;99:66-75.
30. Roman-Garcia P, Carrillo-Lopez N, Fernandez-Martin JL, Naves-Diaz M, Ruiz-Torres MP, Cannata-Andia 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.
31. Westenfeld R, Schafer C, Smeets R, Brandenburg VM, Floege J, Ketteler M, et al. Fetuin-A (AHSG) prevents extraosseous calcification induced by uraemia and phosphate challenge in mice. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22:1537-46.
32. Rattazzi M, Bertacco E, Del Vecchio A, Puato M, Faggini E, Pauletto P. Aortic valve calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28:2968-76.

**Solache-Berrocal G<sup>1</sup>, Barral A<sup>2,4</sup>, Martín M<sup>3</sup>, Román-García P<sup>1</sup>, Llosa JC<sup>2</sup>, Naves-Díaz M<sup>1</sup>, Cannata-Andía JB<sup>1</sup>, Rodríguez I<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Instituto Reina Sofía de Investigación - Hospital Universitario Central de Asturias - Universidad de Oviedo - REDinREN del Instituto de Salud Carlos III - Oviedo (España)

<sup>2</sup> Servicio de Cirugía Cardíaca - Área del Corazón - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

<sup>3</sup> Servicio de Cardiología - Área del Corazón - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

<sup>4</sup> Servicio de Cirugía Cardiovascular - Hospital Universitario Miguel Servet - Zaragoza (España)

## Asociación del polimorfismo 1G>2G de la MMP1 con calcificación de la válvula aórtica

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000400003>

Correspondencia: M<sup>a</sup> Isabel Rodríguez García - Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Hospital Universitario Central de Asturias - Edificio FINBA - Avda. de Roma, s/n - 33011 Oviedo (España)

Correo electrónico: [irodriguez@hca.es](mailto:irodriguez@hca.es)

Fecha de recepción: 29/01/2016

Fecha de aceptación: 06/06/2016

*Trabajo premiado con una beca de Investigación Básica FEIOMM 2013.*

### Resumen

**Introducción:** La causa más frecuente de estenosis aórtica es la acumulación activa de calcio en los velos valvulares, lo que conlleva graves consecuencias clínicas. Diversas metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) han sido implicadas en el desarrollo de esta enfermedad. Por ello, se estudió la posible asociación entre un polimorfismo funcional de MMP1 y la cantidad de calcio depositado en la válvula aórtica.

**Pacientes y métodos:** Se incluyeron en el estudio 45 pacientes sometidos a reemplazo valvular. El contenido en calcio de los velos de las válvulas extraídas en la cirugía se determinó mediante microtomografía computarizada. De muestras de sangre periférica se extrajo ADN para genotipar el polimorfismo -1607 1G>2G de MMP1 por PCR y posterior digestión.

**Resultados:** Se observaron diferencias significativas en el contenido en calcio de las válvulas aórticas en individuos con distintos genotipos de -1607 1G>2G ( $p=0,042$ ). Así, los portadores del alelo 2G (en homocigosis o heterocigosis) presentan valores más altos de calcio medido tanto como DMO ( $p=0,004$ ) como BV/TV ( $p=0,002$ ). La asociación con BV/TV fue independiente del sexo, la edad, el grado de función renal y la anatomía de la válvula ( $p=0,02$ ), y se observó también una tendencia con la DMO ( $p=0,07$ ).

**Conclusión:** La asociación entre el polimorfismo 1G>2G de MMP1 y el contenido en calcio de la válvula aórtica sugiere que el alelo 1G tendría un efecto protector ante el depósito de calcio. Estos resultados apoyarían la importancia de ampliar el estudio para confirmar si este polimorfismo se podría usar como un posible predictor del desarrollo de estenosis aórtica.

**Palabras clave:** *valvulopatía aórtica, metaloproteasa de matriz extracelular, polimorfismos, microCT, contenido en calcio.*

# The association of MMP1 1G>2G polymorphism with aortic valve calcification

## Summary

**Introduction:** The most common cause of aortic stenosis is active calcium accumulation in the valve cusps, which implies serious clinical consequences. Various extracellular matrix metalloproteases (MMPs) have been implicated in the development of this disease. Therefore, the possible association between a functional MMP1 polymorphism and the amount of calcium deposited on the aortic valve is studied.

**Patients and methods:** 45 patients undergoing valve replacement were included in the study. The calcium content in valve cusps removed during surgery was determined by computed micro-tomography. DNA was extracted from peripheral blood samples for genotyping the -1607 1G>2G polymorphism of MMP1 by PCR and subsequent digestion.

**Results:** Significant differences were observed in the calcium content in aortic valves in individuals with different -1607 1G>2G genotypes ( $p=0.042$ ). Thus, 2G allele carriers (homozygous or heterozygous) present higher calcium levels measured as BMD ( $p=0.004$ ) as well as BV/TV ( $p=0.002$ ). The association with BV/TV was independent of sex, age, degree of renal function and anatomy of the valve ( $p=0.02$ ). BMD tendency ( $p=0.07$ ) was also observed.

**Conclusion:** The association between 1G>2G MMP1 polymorphism and calcium content of the aortic valve suggests that the 1G allele would have a protective effect against calcium deposits. These results support the importance of further study to confirm whether this polymorphism could be used as a possible predictor of aortic stenosis development.

**Key words:** aortic valve disease, matrix metalloproteinase polymorphisms, microCT, calcium content.

## Introducción

La estenosis aórtica por degeneración es la valvulopatía más frecuente en los países desarrollados<sup>1</sup>. Inicialmente considerada un proceso pasivo, en la actualidad se describe como una acumulación activa de calcio en los velos valvulares, acompañada de cambios en la morfología y función de las células valvulares, caracterizados por una marcada diferenciación osteoblástica que aumenta la rigidez valvular. Todo ello lleva a una reducción en el orificio de apertura de la válvula y un incremento en el gradiente de presión de sangre que la atraviesa, con graves consecuencias clínicas<sup>2</sup>.

Existen numerosas evidencias que implican a las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) en este proceso<sup>3</sup>. Las MMPs constituyen una amplia familia de enzimas dependientes de zinc que ejercen su función tanto en condiciones fisiológicas como patológicas<sup>4</sup>. Tradicionalmente se han agrupado según su capacidad para degradar diversos componentes de la matriz extracelular, aunque también ejercen funciones en otras localizaciones. De hecho, de manera reciente se ha sugerido que actúan también sobre proteínas no relacionadas con la matriz y se destaca su papel en procesos inflamatorios<sup>5,6</sup>. Además, se ha encontrado una mayor expresión de MMP-1, -2 y -3 en válvulas aórticas calcificadas que en válvulas aórticas normales, así como la presencia de MMP-9 exclusivamente en válvulas enfermas<sup>7</sup>.

La asociación de las MMPs con valvulopatías también se ha estudiado desde el punto de vista genético. Así, se ha descrito que el polimorfismo 1G>2G de la posición -1607 del gen MMP1 se asocia con la presencia de válvula aórtica bicúspide<sup>8</sup>. Este mismo

polimorfismo también se ha asociado con los niveles de densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas<sup>9</sup>. En función de los datos expuestos y con objeto de identificar un posible marcador precoz de enfermedad de la válvula aórtica calcificada, se estudió la asociación del polimorfismo 1G>2G con parámetros indicativos de mineralización en válvulas aórticas procedentes de reemplazo valvular.

## Pacientes y métodos

### Población

Se estudiaron las válvulas aórticas procedentes de 45 pacientes con diagnóstico de valvulopatía aórtica (91% estenosis, 9% insuficiencia) sometidos a recambio valvular aórtico entre abril de 2012 y mayo de 2014 en el Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Universitario Central de Asturias. En la tabla 1 se muestran algunas características de mayor interés clínico, incluidos factores de riesgo cardiovascular.

Se consideró fumador actual a cualquier individuo fumador activo durante el último año, ex-fumador a aquel individuo que haya abandonado el hábito tabáquico en un periodo mayor a un año y no fumador a aquella persona que nunca haya adquirido el hábito tabáquico. La dislipemia se definió de acuerdo al cumplimiento de alguno de los siguientes criterios: historia de hiperlipidemia diagnosticada y/o tratada con medicación, dieta y/o ejercicio, cifras de colesterol total superior a 200 mg/dl, colesterol-LDL superior o igual a 130 mg/dl, colesterol-HDL inferior a 40 mg/dl o tratamiento hipolipemiente. La hipertensión arterial se definió como el cumplimiento de alguno de los siguientes criterios: historia de hipertensión diagnosticada o

tratada con medicación, dieta y/o ejercicio; presión arterial sistólica igual o superior a 140 mmHg o diastólica igual o superior a 90 mmHg, al menos en dos determinaciones; o tratamiento antihipertensivo que no es administrado como terapia a otra alteración distinta a la hipertensión arterial. Se consideró la existencia de diabetes *mellitus* en función de la presencia de alguna de las siguientes premisas: historia de diabetes *mellitus* acreditada en un informe médico, glucemia en ayunas superior o igual a 200 mg/dl en cualquier situación y síntomas de diabetes *mellitus*, al menos dos determinaciones de glucemia en ayunas superiores o iguales a 126 mg/dl (entendiéndose como ayunas un periodo sin ingesta de al menos 8 horas) o utilización actual de tratamientos hipoglucemiantes orales y/o insulina. La estimación del filtrado glomerular se realizó mediante la ecuación MDRD-4. La clasificación de la anatomía valvular se realizó en base a los hallazgos intraoperatorios, además de la descripción ecocardiográfica previa a la cirugía.

Los tejidos extraídos durante la intervención fueron tratados durante 24 h con formol al 4% y, tras varios lavados con agua, conservados en etanol 70% a 4°C en el Biobanco del Principado de Asturias. También se extrajo una muestra de sangre periférica en tubo con EDTA, que fue procesada en el Biobanco para la extracción del ADN genómico, que fue almacenado a -20° C hasta su utilización. Los pacientes firmaron un consentimiento informado para la utilización de sus muestras biológicas y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias.

Genotipado

El polimorfismo 1G>2G en la posición -1607 del gen MMP1 (rs1799750) fue genotipado por reacción en cadena de la polimerasa y posterior digestión con un enzima de restricción (PCR-RFLP), siguiendo un procedimiento descrito previamente<sup>10</sup>.

Cuantificación del contenido en calcio del velo aórtico

Las muestras de tejido valvular conservadas en etanol fueron analizadas mediante microtomografía computarizada (microCT) en un equipo SkyScan 1174 (Bruker, Kontich, Bélgica) disponible en el Bioterio de la Universidad de Oviedo. Las imágenes fueron obtenidas utilizando unos parámetros de 50 kV y 800 µA. Se obtuvieron unas 1.300 imágenes de cada una de las muestras con un paso de rotación de 0,3° y un promedio de marco de 2 para un escaneo de 180°. El escaneo de cada una de ellas duró

Tabla 1. Características clínicas y antropométricas de la población estudiada

Características	Valores
Edad <sup>a</sup> (años)	69±11
Hombres	63%
Fumadores	17,4%
Dislipemia	43,5%
Hipertensión	67,4%
Diabetes	21,7%
MDRD-4 <sup>b</sup> (ml/min)	82±28
Válvula aórtica bicúspide	20%

<sup>a</sup> media ± desviación estándar.

<sup>b</sup> filtrado glomerular en ml/min/1,73 m<sup>2</sup> (media ± desviación estándar).

entre 10 y 20 minutos (dependiendo del tamaño de la válvula) usando un tiempo de exposición de 6.200 ms. Se realizó la corrección de campo plano al principio de cada escaneo.

Las imágenes obtenidas fueron reconstruidas con el programa informático NRecon (Bruker) (Figura 1). Los valores de corrección del coeficiente de atenuación, dureza del rayo, suavizado y artefactos de anillo fueron los mismos en todas las muestras.

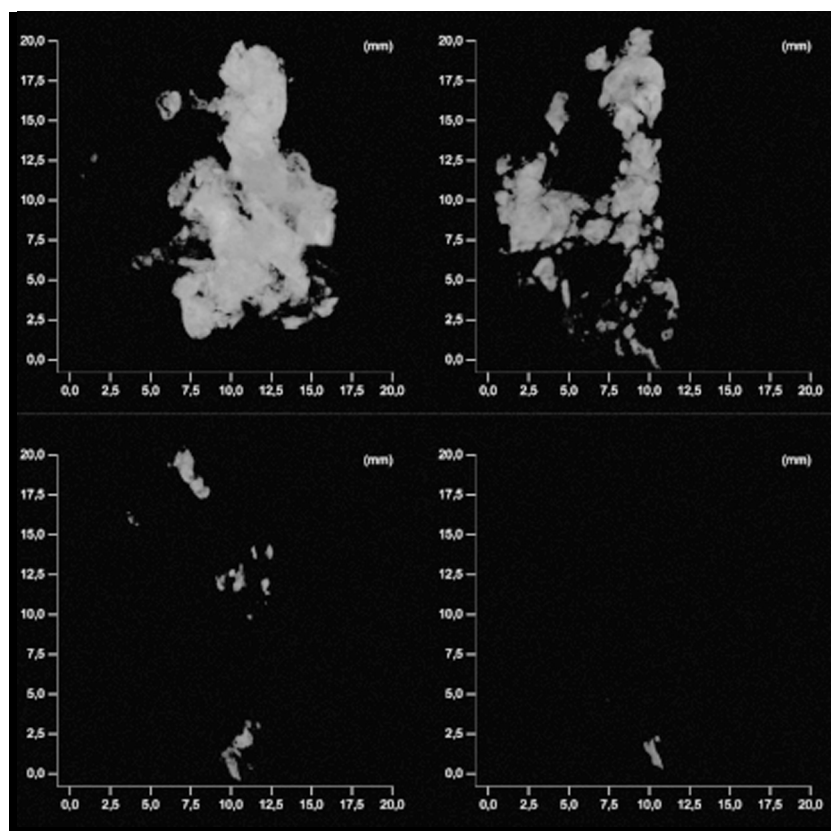
El análisis morfométrico en 3D fue realizado mediante el programa informático CTAn (Bruker). El volumen de interés fue delimitado manualmente en cada una de las muestras. El umbral que se usó para todas ellas fue de 0,74-3,39 g/cm<sup>3</sup> de densidad mineral ósea (DMO).

Se consideraron los parámetros de DMO y el cociente volumen óseo/volumen total (BV/TV) como medidas de la cantidad de calcio depositado.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa informático SPSS versión 15.0. En primer lugar se confirmó que las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo estuviesen en equilibrio de Hardy-Weinberg mediante una prueba  $\chi^2$ . Se utilizó una prueba ANOVA para comparar los valores medios de los parámetros estudiados en los diferentes genotipos y, posteriormente, un test de Bonferroni para discriminar a qué parejas de genotipos se debía la significación estadística. Seguidamente, en función de estos resultados, se agruparon los genotipos en dos categorías cuyos valores medios para la DMO y el BV/TV se compararon mediante una prueba T. Por último, se realizó un análisis de regresión lineal corregido por las variables sexo, edad, filtrado glomerular medido utilizando la fórmula MDRD-4 y presencia de válvula aórtica bicúspide. Un p-valor <0,05 fue considerado como estadísticamente significativo.

Figura 1. Imágenes obtenidas tras el análisis mediante microtomografía computarizada (microCT) de los velos valvulares aórticos. Se muestran 4 ejemplos de velos valvulares con distintos grados de calcificación



## Resultados

Los individuos analizados se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo -1607 1G>2G, con una frecuencia de 0,49 para el alelo minoritario (1G en nuestra población), similar a la de otras poblaciones europeas (dbSNP).

Se calcularon los valores medios de DMO y BV/TV en los grupos de población definidos por los distintos genotipos para el polimorfismo -1607 de MMP1 y se encontraron diferencias en ambas variables, aunque éstas eran estadísticamente significativas sólo en el caso del BV/TV (Tabla 2).

Mediante un análisis *post hoc* se comprobó que presentaban diferencias significativas los individuos homocigotos para el alelo 2G frente a los homocigotos para 1G ( $p=0,042$ ), con valores de contenido en calcio en los individuos heterocigotos similares a los de los homocigotos para el alelo 2G. Así, aplicando un modelo de herencia recesiva para el efecto del alelo 1G, se comprobó que los portadores del alelo 2G presentaban valores significativamente más altos de contenido en calcio en la válvula aórtica (3 veces en la DMO y 2 veces en el BV/TV) que los no portadores (valores de DMO de  $62,52 \pm 10,99$  mg/cm<sup>3</sup> en portadores del alelo 2G frente a  $20,08 \pm 8,54$  mg/cm<sup>3</sup> en homocigotos para el alelo 1G; y valores de BV/TV de  $5,44 \pm 0,62\%$  en portadores del alelo 2G frente a  $2,52 \pm 0,59\%$  en homocigotos para el alelo 1G) (Figura 2). Estas diferencias significativas se mantuvieron para los niveles de

BV/TV tras el ajuste por sexo, edad, presencia de válvula aórtica bicúspide y filtrado glomerular ( $p=0,021$ ), manteniendo la tendencia, aunque sin llegar a ser significativa, para los niveles de DMO ( $p=0,073$ ).

## Discusión

Este estudio es el primero en el que se describe una asociación entre un polimorfismo del gen MMP1 y la cantidad de calcio presente en las válvulas aórticas. La literatura recoge diversas asociaciones de variantes de este gen con otras afecciones cardiovasculares<sup>11-13</sup>. Entre estas variantes, una de las más estudiadas es el polimorfismo 1G>2G en la región promotora del gen, pues el alelo de la inserción confiere una mayor actividad transcripcional<sup>14</sup> que puede tener efectos en la célula y, por tanto, en el organismo. Así, se observó un incremento significativo del riesgo de padecer aterosclerosis en la arteria carótida en individuos portadores del alelo 2G<sup>15</sup> y una mayor presencia de este alelo en pacientes que habían sufrido ictus isquémico<sup>16</sup>.

Sin embargo, hasta ahora no se habían descrito asociaciones de este polimorfismo y la enfermedad de la válvula aórtica calcificada, a pesar de que las MMPs juegan un papel importante en su fisiopatología<sup>17,18</sup>.

Dos aspectos importantes en el desarrollo de la enfermedad de la válvula aórtica calcificada son la inflamación y el remodelado de la matriz extracelular<sup>5</sup>. Ambos son modulados por las células intersticiales de la válvula (VIC), las cuales pasan de un estado de reposo en el que conservan la homeostasis tisular, a un estado activado en el que toman características de miofibroblastos<sup>19</sup>. Las VIC activadas responden a la inflamación secretando, entre otros muchos factores, MMPs, lo que contribuirá a la acumulación de tejido fibroso desorganizado, a mantener las válvulas en un estado de inflamación crónica e inducirá la diferenciación osteoblástica de las VIC. Este último acontecimiento favorecería y aceleraría el depósito de calcio, que tendría como consecuencia la reducción de la función valvular<sup>20</sup>.

La interacción entre las células y la matriz extracelular que las contiene es fundamental en la fisiología y funcionalidad del tejido valvular y puede afectar al fenotipo de las VIC<sup>3</sup>. La matriz extracelular de las válvulas cardiacas está constituida hasta en un 90% por colágeno y, de hecho,

un depósito excesivo de la proteína, acompañado de un alineamiento alterado de sus fibras, incrementa la rigidez del tejido<sup>21</sup>. Existen diversos estudios en los que se ha demostrado el papel crucial del colágeno en la calcificación de las válvulas aórticas<sup>22-24</sup>. En concreto, en cultivo *in vitro* de velos de válvula aórtica porcina tratados con colagenasa se observó un aumento en la cantidad de colágeno y, simultáneamente, una disminución en

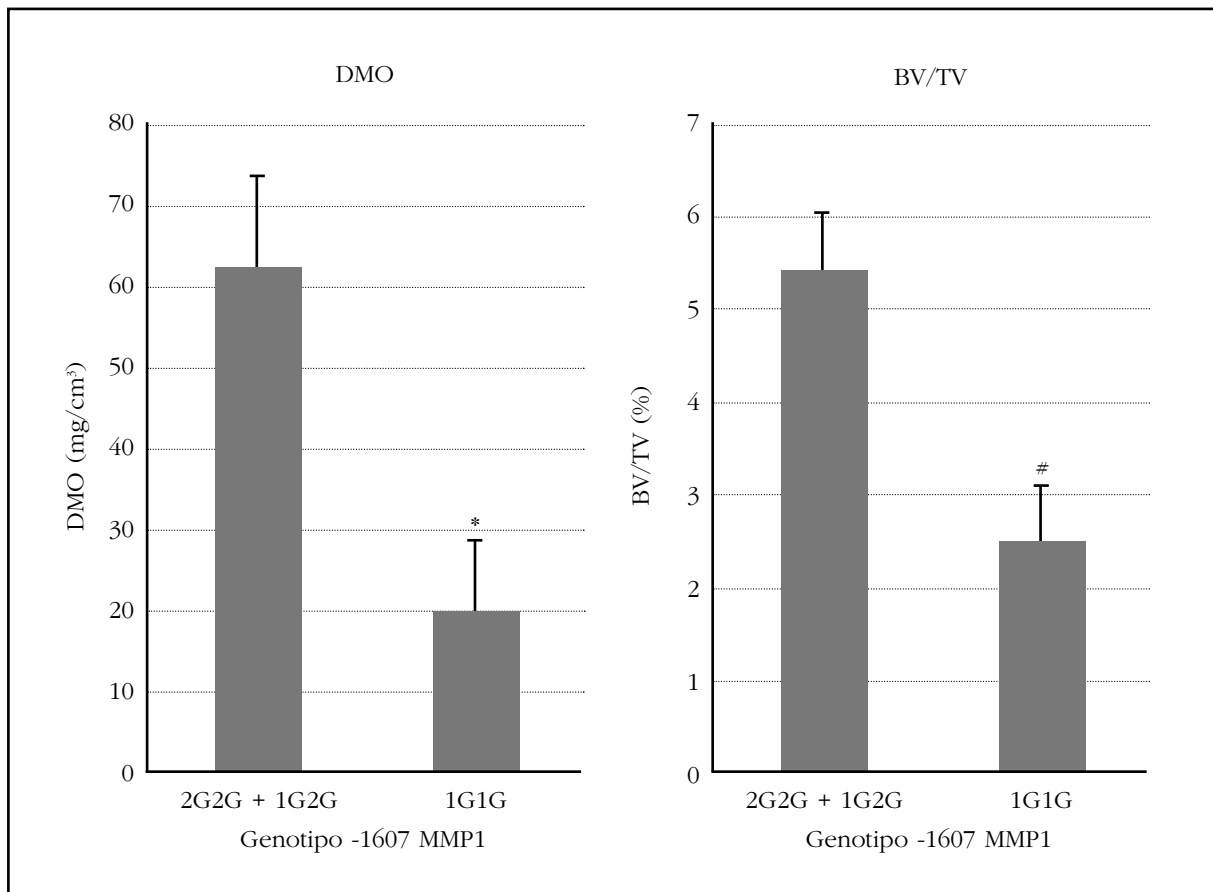
la cantidad de otros componentes de la matriz extracelular como el ácido hialurónico<sup>25</sup>. Asimismo, se detectó un incremento tanto en la proliferación como en la apoptosis de las VIC, las cuales expresaron marcadores asociados a un fenotipo de miofibroblasto (alfa-actina de músculo liso) y de osteoblasto (fosfatasa alcalina, osteocalcina y sialoproteína ósea) resultando en un aumento de la mineralización del tejido<sup>23</sup>.

Tabla 2. Valores de DMO y BV/TV para cada genotipo del polimorfismo -1607 de MMP1

Genotipo -1607 MMP1	DMO (mg/cm <sup>3</sup> )	BV/TV (%)
<b>2G2G</b> (N=13)	66,72±65,31	5,87±3,76
<b>1G2G</b> (N=20)	59,79±63,22	5,16±3,51
<b>1G1G</b> (N=12)	20,08±29,59	2,52±2,03
<b>Total</b> (N=45)	51,20±58,96	4,66±3,46
<b>p-valor</b>	0,095	0,033

Los datos se representan como media ± desviación estándar. P-valor obtenido mediante ANOVA.

Figura 2. Valores de DMO y BV/TV para los genotipos de -1607 de MMP1 según un modelo de herencia recesiva para el alelo 1G. Se representa media ± error estándar. \*p=0,004; #p=0,002



La MMP-1, también conocida como colagenasa de fibroblastos, degrada los tipos de colágeno intersticial I, II y III. En consecuencia, el incremento de su actividad favorecería la destrucción de colágeno, la diferenciación osteoblástica y la calcificación. Los resultados experimentales obtenidos en este estudio sustentan este razonamiento, asociándose las mayores cantidades de calcio en las válvulas a aquellos individuos portadores del alelo que produce una mayor transcripción del gen y, consecuentemente, una mayor cantidad de proteína MMP-1. Visto de otro modo, la falta del efecto protector que ejercería en los pacientes una menor transcripción (proporcionada por el alelo menos activo) facilitaría el desarrollo de calcificación en la válvula aórtica.

Una limitación de este trabajo es que el número de pacientes estudiados es reducido y además se trata de un estudio transversal. No obstante, se ha constatado la asociación con el polimorfismo 1G>2G, sugiriendo un efecto protector del alelo 1G que será necesario comprobar en muestras de mayor tamaño y en otras poblaciones con objeto de comprobar si este hallazgo podría utilizarse en el futuro como predictor de calcificación y estenosis valvular aórtica.

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

**Financiación:** Trabajo financiado en parte por el proyecto del Instituto de Salud Carlos III PI10/00173-Fondos FEDER.

### Bibliografía

1. Jung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:162-72.
2. Towler DA. Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease. *Circ Res.* 2013;113:198-208.
3. Wang H, Leinwand LA, Anseth KS. Cardiac valve cells and their microenvironment--insights from in vitro studies. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11:715-27.
4. Apte SS, Parks WC. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol.* 2015;44-46:1-6.
5. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:617-29.
6. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kiliç R, et al. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14:80-7.
7. Edep ME, Shirani J, Wolf P, Brown DL. Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol.* 2000;9:281-6.
8. Martín M, Pichel IA, Florez Muñoz JP, Naves-Díaz M, Palacín M, Cannata-Andía JB, et al. Low transcriptional activity haplotype of matrix metalloproteinase 1 is less frequent in bicuspid aortic valve patients. *Gene.* 2013;524:304-8.
9. Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H. Association of a polymorphism of the matrix metalloproteinase-1 gene with bone mineral density. *Matrix Biol.* 2002;21:389-92.
10. Roman-García P, Coto E, Reguero JR, Cannata-Andía JB, Lozano I, Avanzas P, et al. Matrix metalloproteinase 1 promoter polymorphisms and risk of myocardial infarction: a case-control study in a Spanish population. *Coron Artery Dis.* 2009;20:383-6.
11. Han Y, Wu Z, Zhang X, Yan C, Xi S, Yang Y, et al. Impact of matrix metalloproteinase-1 gene variations on risk of acute coronary syndrome. *Coron Artery Dis.* 2008;19:227-30.
12. Ye S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovasc Res.* 2006;69:636-45.
13. Pearce E, Tregouet DA, Samnegard A, Morgan AR, Cox C, Hamsten A, et al. Haplotype effect of the matrix metalloproteinase-1 gene on risk of myocardial infarction. *Circ Res.* 2005;97:1070-6.
14. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res.* 1998;58:5321-5.
15. Djuric T, Stojkovic L, Zivkovic M, Končar I, Stanković A, Djordjević A, et al. Matrix metalloproteinase-1 promoter genotypes and haplotypes are associated with carotid plaque presence. *Clin Biochem.* 2012;45:1353-6.
16. Chehaibi K, Hrira MY, Nouria S, Maatouk F, Ben Hamda K, Slimane MN. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and the risk of ischemic stroke in a Tunisian population. *J Neurol Sci.* 2014;342:107-13.
17. Fondard O, Detaint D, Jung B, Choqueux C, Adle-Biasette H, Jarraya M, et al. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J.* 2005;26:1333-41.
18. Soini Y, Satta J, Maatta M, Autio-Harmainen H. Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. *J Pathol.* 2001;194:225-31.
19. Chen JH, Yip CY, Sone ED, Simmons CA. Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential. *Am J Pathol.* 2009;174:1109-19.
20. Li C, Xu S, Godlieb AI. The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops. *Cardiovasc Pathol.* 2013;22:1-8.
21. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation.* 2011;124:1783-91.
22. Rodriguez KJ, Masters KS. Regulation of valvular interstitial cell calcification by components of the extracellular matrix. *J Biomed Mater Res A.* 2009;90:1043-53.
23. Rodriguez KJ, Piechura LM, Porras AM, Masters KS. Manipulation of valve composition to elucidate the role of collagen in aortic valve calcification. *BMC Cardiovasc Disord.* 2014;14:29.
24. Eriksen HA, Satta J, Risteli J, Veijola M, Väre P, Soini Y. Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis. *Atherosclerosis.* 2006;189:91-8.



**Pérez-Campo FM<sup>2</sup>, Sañudo C<sup>1</sup>, Krebsova R<sup>1</sup>, Delgado-Calle J<sup>3</sup>, Riancho JA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Interna - Hospital U.M. Valdecilla - Universidad de Cantabria - IDIVAL - Santander (España)

<sup>2</sup> Departamento de Biología Molecular - Universidad de Cantabria - Santander (España)

<sup>3</sup> Departamento de Anatomía y Biología Celular - Facultad de Medicina de la Universidad de Indiana - Centro Médico de Administración de Veteranos Roubush - Indianápolis - Indiana (EE.UU.)

## Estudio funcional de los polimorfismos del promotor del gen de la esclerostina

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000400004>

Correspondencia: José A. Riancho - Departamento de Medicina Interna - Hospital U.M. Valdecilla - Avda. Valdecilla, sn - 39008 Santander (España)

Correo electrónico: rianchoj@unican.es

Fecha de recepción: 16/07/2016

Fecha de aceptación: 25/09/2016

*Trabajo premiado con una beca de Investigación de Biología Molecular Ósea FEIOMM 2013.*

### Resumen

La esclerostina, codificada por el gen *SOST*, es un inhibidor de la vía Wnt, y por ello tiene una influencia negativa sobre la masa ósea. Algunos polimorfismos del promotor de *SOST* se han asociado a diferencias en la densidad mineral ósea (DMO) en varios estudios, pero se desconocen cuáles son los mecanismos moleculares implicados. El objetivo de este estudio fue comprobar las consecuencias funcionales de uno de esos polimorfismos *in vitro*. Para ello se clonó la región promotora proximal del gen *SOST*, con diferentes alelos del polimorfismo rs851054, y se transfectaron en células HEK-293T, SAOS-2 y HOS-TE85. En ningún caso se observaron diferencias significativas en la actividad transcripcional entre los vectores con el alelo A y los vectores con el alelo G. La co-transfección de vectores de expresión de los factores de transcripción RUNX2 y OSX estimuló claramente la actividad transcripcional ( $2,5 \pm 0,9$  veces sobre el valor basal para el alelo A y  $1,9 \pm 0,8$  veces para el alelo G; en ambos casos,  $p < 0,05$ ), sin que hubiera, sin embargo, diferencias entre los alelos. Tampoco se hallaron diferencias en la fijación a proteínas nucleares analizadas en experimentos de retardo de la movilidad electroforética.

En conclusión, la región situada antes del inicio de la traducción del gen *SOST* tiene una potente actividad promotora, que es aumentada por los factores RUNX2 y OSX. Las variantes frecuentes de esta región se han asociado con la DMO, pero los mecanismos implicados son aún desconocidos, puesto que los alelos analizados no muestran diferencias en la actividad transcripcional *in vitro*.

**Palabras clave:** esclerostina, regulación génica, polimorfismos, transfección.

# Functional study of promoter gene polymorphisms of sclerostin

## Summary

Sclerostin, encoded by the SOST gene, inhibits the Wnt pathway and, consequently, tends to decrease bone mass. Some polymorphisms of the SOST promoter have been associated with bone mineral density (BMD), but the molecular mechanisms involved are unknown. The aim of this study was to study the functional role of one polymorphism *in vitro*. We cloned the proximal promoter region of SOST gene, containing different alleles at the rs851054 SNP, in luciferase reporter vectors and transfected them into the cell lines HEK-293T, SAOS-2 and HOS-TE85. We did not find significant differences in the transcriptional activity of vectors with either the A or the G allele of the SNP. The co-transfection of vectors expressing RUNX2 and OSX markedly increased the transcriptional activity of the SOST promoter constructs (A allele, 2.5±0.9 fold, p<0.05; G allele, 1.9±0.8 fold, p<0.05), without significant differences between the rs851054 alleles. Moreover, no allele differences were detected in EMSAs.

In conclusion, the DNA region upstream of the TSS of the SOST gene has a strong promoter activity that is enhanced by RUNX2 and OSX. Frequent allelic variants in this region have been associated with BMD, but the mechanisms involved remain to be elucidated because no functional differences between alleles were detected *in vitro*.

**Key words:** *sclerostin, gene regulation, polymorphisms, transfection.*

## Introducción

La evolución de la masa ósea a largo plazo viene determinada por el balance entre la resorción y la formación de hueso, de manera que una actividad formadora de hueso insuficiente para sustituir el destruido durante la resorción inevitablemente conduce a la disminución del tejido óseo, característica propia de la osteoporosis. Los osteoblastos, encargados de la formación ósea, derivan de células troncales mesenquimales que pueden dar lugar también a otros tipos celulares, como adipocitos o condrocitos. La proliferación y la diferenciación de los precursores osteoblásticos está controlada por diferentes factores, intracrinos, paracrinos y endocrinos. Así, algunos factores de transcripción, como RUNX2 y Osterix (OSX), se consideran esenciales en las primeras etapas de la diferenciación osteoblástica. La vía Wnt desempeña también un papel importante<sup>1</sup>. Los ligandos Wnt se unen a sus receptores presentes en la membrana celular y, a través de diversos mediadores intracelulares, modifican la expresión de sus genes diana que, en general, actúan favoreciendo la formación ósea y aumentando la expresión de OPG, lo que secundariamente resulta en una disminución de la resorción. Los receptores de los ligandos Wnt son complejos moleculares que incluyen al menos dos proteínas: Frizzled y LRP, de las cuales existen varias formas<sup>2,3</sup>. Como en el caso de muchos otros sistemas reguladores, también existen inhibidores de la vía Wnt. Uno de los más estudiados es la esclerostina, codificada por el gen SOST. Este gen se expresa de manera preferente en los osteocitos<sup>4,8</sup>. Siendo un inhibidor de la vía Wnt, la esclerostina ejerce una influencia negativa sobre la masa ósea. Su papel en la biología esquelética parece importante. De hecho, los anticuerpos neutralizantes de la esclerostina ejercen un potente efecto anabólico sobre el esqueleto, y las mutaciones inactivadoras del gen SOST provocan un aumento exagerado de la masa ósea<sup>9-11</sup>.

En consonancia con el papel biológico de la esclerostina, las variantes alélicas del gen SOST parecen influir en la masa ósea. Así, en algunos estudios de barrido genómico (GWAS) y en otros estudios de asociación genética, se ha encontrado una relación entre algunos polimorfismos frecuentes del gen SOST y la densidad mineral ósea (DMO). De hecho, nuestro grupo encontró una asociación entre unos polimorfismos situados en la región promotora de SOST y la DMO en mujeres postmenopáusicas<sup>12</sup>. El objetivo del presente estudio fue explorar la capacidad reguladora de uno de esos polimorfismos mediante estudios funcionales *in vitro*. Para ello hemos utilizado vectores en los que el promotor de SOST se ha insertado delante de un gen reportero que codifica una proteína (luciferasa) cuya actividad es fácilmente medible, y hemos realizado experimentos para comprobar la capacidad de fijación de proteínas nucleares a esas regiones valorando el retardo de la movilidad electroforética.

## Material y métodos

### Construcción de vectores reporteros

El promotor de SOST (1-1440) se clonó a partir de ADN genómico de dos individuos con genotipo conocido, homocigotos para los alelos A y G, respectivamente, del polimorfismo rs851054 (Figura 1). Ambos fragmentos tenían, por lo demás, secuencias idénticas e iguales a la secuencia de referencia del genoma humano. La extracción de ADN se produjo tras el consentimiento informado, en el seno de un estudio de factores genéticos implicados en la osteoporosis, autorizado por el Comité de Ética en Investigación Clínica. Para la amplificación de los correspondientes fragmentos genómicos por PCR se utilizaron cebadores diseñados con el programa Primer3 que incluían secuencias para las enzimas de restricción SmaI y XhoI, a fin de facilitar su posterior clonaje. Se cortaron con

estas enzimas los amplicones y el vector PGL2 y se unieron los fragmentos mediante T4 DNA Ligasa (NE Biolabs). Los vectores se transfectaron en células competentes DH5α (Invitrogen), las cuales se cultivaron después en placas con agar y medio suplementado con ampicilina. Las colonias seleccionadas se expandieron en cultivo líquido, y posteriormente se extrajeron los plásmidos y se comprobó que contenían los insertos correctos, sin mutaciones, mediante secuenciación convencional. Por tanto, en estos vectores se encontraba la secuencia promotora de SOST dirigiendo la transcripción del gen reportero, codificador de luciferasa. Así, la medida de la actividad luciferasa era reflejo de la actividad promotora de la transcripción de la secuencia del alelo del promotor SOST que se clonó en el vector.

**Transfección y análisis de la actividad transcripcional**

Las células HEK-293T (una línea derivada de riñón humano) y las líneas osteoblásticas humanas SaOS-2 y HOS-TE85 se transfectaron con los vectores conteniendo las secuencias promotoras de SOST y un vector control RSV-βGAL, que expresa constitutivamente el gen LacZ, que codifica para la β-galactosidasa, a fin de normalizar los resultados en función de la eficiencia de la transfección. Como control negativo y en paralelo se realizó también la transfección con el vector vacío. Para la transfección se sembraron 125.000 células HEK-293T (o 50.000 SAOS-2 o HOS-TE85) en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Una vez alcanzada una confluencia del 80% se transfectaron 500 ng de los vectores, utilizando Lipofectamina 3000, según las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). A las 48 horas se aspiró el medio y se lisaron las células con 70 µl de tampón, tras lo que se midió la actividad de galactosidasa (Galacto-Light Plus™ β-Galactosidase Reporter Gene Assay System, Applied Biosystems) y de luciferasa (Luciferase Assay System, Promega) mediante luminometría. La co-transfección con vectores de expresión de RUNX2 y de OSX<sup>13</sup> se realizó siguiendo un procedimiento similar, pero asegurando que la cantidad total de ADN exóge-

no a transfectar se mantenía constante en todos los pocillos.

De cada transfección se realizaron duplicados y triplicados técnicos. Además cada experimento se repitió en al menos tres ocasiones diferentes para obtener triplicados biológicos. Los resultados se expresaron como el cociente entre la actividad luciferasa y la actividad galactosidasa en los lisados celulares.

**Análisis de la fijación de proteínas nucleares**

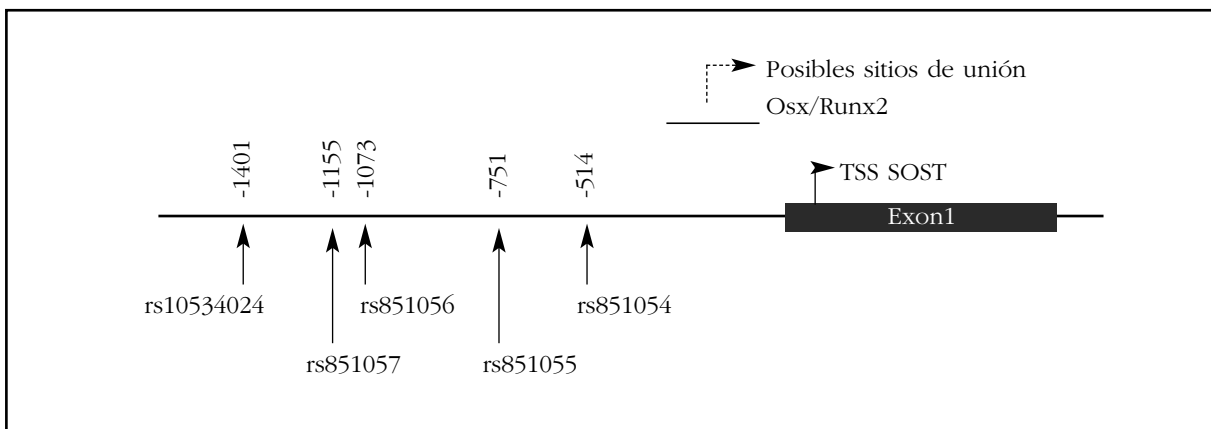
Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de 50x10<sup>6</sup> células HOS-TE85. Para ello, se lisaron en un tampón conteniendo inhibidores de proteasas (50 mM KCl, 0,5% NP-40, 25 mM HEPES, 1,5 pM Leupeptina, 46,88 µM Aprotinina, 125 µM DTT, 1 mM PMSF), y se centrifugaron durante 1 minuto a 10.000 rpm a 4°C. Tras lavarlos, se resuspendieron las células en 100 µl de tampón de extracción (500 mM KCl, 25 mM HEPES, 10% glicerol, 1,5 pM Leupeptina, 46,88 µM Aprotinina, 125 µM DTT, 1 mM PMSF) y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se cuantificó la concentración de proteínas y se ajustó a 5 µg/µl.

Para el ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) se utilizaron parejas de oligonucleótidos, incluyendo marcaje con IR dye 700 en el extremo 5' del componente "forward" de cada pareja (Biolegio). La secuencias fueron las siguientes:

rs851054 alelo A Fwd: AACAGAAACACCTTGGGCCA  
 rs851054 alelo A Rev: TGGCCCAAGCGTTTCTGTT  
 rs851054 alelo G Fwd: AACAGAAACGCCTTGGGCCA  
 rs851054 alelo G Rev: TGGCCCAAGCGTTTCTGTT

Para el retardo se utilizaron geles prefabricados de poliacrilamida al 6% (Invitrogen) y el kit Odyssey Infrared EMSA. Tras anillar los oligonucleótidos se incubaron con el extracto proteico durante 20 minutos, se cargaron en el gel y se corrieron a 70 V durante 60 minutos, tras lo que se capturaron las imágenes de los geles. En estos experimentos, si las sondas fijan proteínas nucleares se produce un retardo en su movilidad electroforética en comparación con la migración experimentada por la sonda aislada.

Figura 1. Esquema de la región promotora del gen SOST y localización de algunos polimorfismos frecuentes (frecuencia del alelo menor mayor del 5%)



## Resultados

Las construcciones con la secuencia promotora de SOST mostraron una elevada capacidad activadora de la transcripción, aumentando los niveles de expresión de luciferasa hasta 1.000 veces en comparación con los vectores vacíos. La actividad fue aparentemente mayor en las células HEK-293T que en las otras líneas (Figura 2).

Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los dos alelos del promotor de SOST en ninguna de las líneas celulares analizadas. De hecho, la relación entre la actividad transcripcional de los alelos A y G (cocientes A/G) en las células SAOS-2, HOS-TE85 y 293T fueron de  $1,3 \pm 0,7$ ,  $1,0 \pm 0,4$  y  $0,8 \pm 0,7$ , respectivamente. En ninguno de los tres resultó significativamente diferente de la unidad (Figura 2).

La co-transfección de vectores que expresan constitutivamente RUNX2 y OSX aumentó la actividad transcripcional del promotor de SOST (en promedio,  $2,5 \pm 0,9$  veces sobre el valor basal para el alelo A y  $1,9 \pm 0,8$  veces para el alelo G; en ambos casos  $p < 0,05$ ). Este aumento también resultó ser independiente de qué alelo estaba presente en el promotor de SOST (Figura 3).

Por otro lado, en los experimentos de retardo de la movilidad electroforética comprobamos que la región donde radica ese polimorfismo era capaz de fijar proteínas nucleares, presumiblemente con función reguladora, sin que observáramos diferencias entre ambos alelos (Figura 4). Por ello, no se efectuaron estudios posteriores para identificar la naturaleza de esas proteínas.

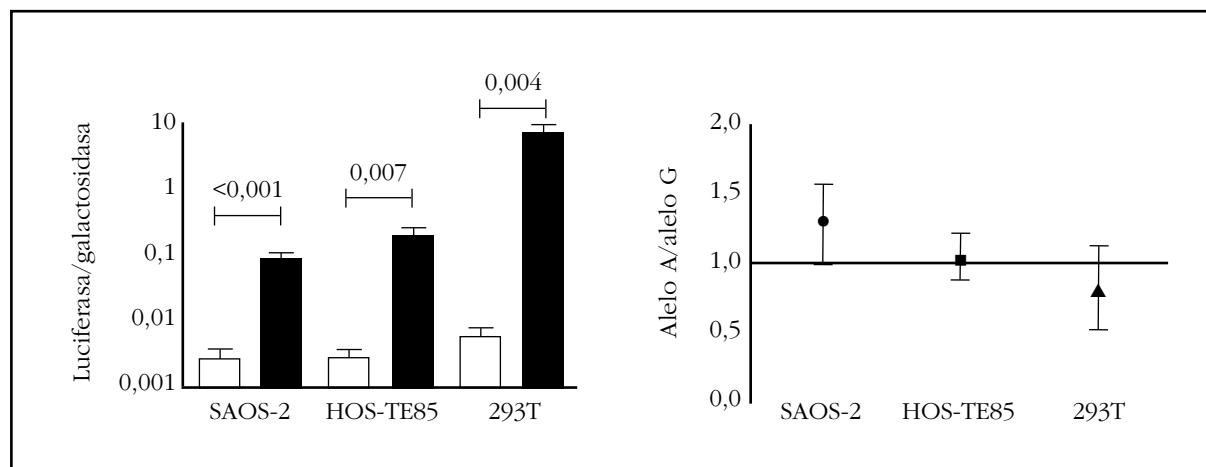
## Discusión

El papel de la esclerostina en la biología ósea es indudable, como lo revelan el marcado aumento de la DMO que se observa tras la administración de romosozumab, un anticuerpo monoclonal que bloquea la acción de la esclerostina, y la masa

ósea excesiva que presentan los pacientes con esclerosteosis o con enfermedad de Van Buchem, portadores de mutaciones poco frecuentes que inducen una pérdida de función del gen SOST, poco frecuentes<sup>14</sup>. Aunque la evidencia es menor, varios estudios sugieren que las variantes alélicas frecuentes del gen pueden influir también, en menor grado, sobre la DMO y el riesgo de sufrir fracturas osteoporóticas. De hecho, en un estudio de barrido genómico con un elevado tamaño muestral se encontró una asociación del polimorfismo rs4792909 con la DMO<sup>15</sup>. Este polimorfismo se encuentra en una región intergénica, siendo SOST el gen más cercano, situado a unas 40 kb. Por otro lado, varios grupos, incluido el nuestro, han analizado la relación de algunos polimorfismos frecuentes de la región promotora de SOST con la DMO. Así, nosotros hallamos una asociación significativa de los polimorfismos rs851054 y rs851056, separados sólo por 560 pb e integrantes de un mismo bloque haplotípico con la DMO de columna en mujeres<sup>12</sup>. Algunos autores han confirmado la asociación de los polimorfismos del promotor de SOST con la DMO en otras poblaciones<sup>16-20</sup>. Por otro lado, en un estudio reciente que incluyó un pequeño grupo de pacientes, se encontró una asociación de los alelos de rs851054 con la expresión de SOST en el tejido óseo<sup>21</sup>.

El objetivo principal de este estudio fue explorar la posible repercusión funcional de uno de esos polimorfismos, en concreto se trató de analizar su influencia sobre la actividad transcripcional del promotor del gen SOST. Los experimentos de transfección con vectores reporteros y los de retardo de la movilidad electroforética no han revelado diferencias entre las variantes alélicas estudiadas. Son diversas las limitaciones de los modelos utilizados y por ello hay varios motivos que podrían explicar estos resultados negativos. En primer lugar, podría plantearse que el modelo *in vitro* no

Figura 2. Actividad transcripcional de la secuencia promotora de SOST tras su transfección en células de tipo osteoblástico (SAOS y HOS-TE85) y la línea HEK-293T. En el panel izquierdo se representa el conjunto de los experimentos (barras blancas, vector vacío; barras negras, vectores con las secuencias promotoras de SOST); en el de la derecha, la relación de la actividad de las construcciones con los alelos A y G en cada uno de los experimentos. Se representan los valores promedios de 5-6 experimentos independientes realizados en duplicado o triplicado. Las líneas verticales indican el error estándar



refleja adecuadamente la situación *in vivo*. Por ejemplo, no puede excluirse la posibilidad de que la actividad reguladora requiera de regiones genómicas con actividad *enhancer*, alejadas del promotor y no incluidas, por tanto, en la región clonada en los vectores. Por otro lado, al menos teóricamente podría pensarse que la diferencia en la actividad de los alelos sólo se manifiesta en respuesta a factores reguladores que únicamente se expresan en determinados tipos celulares, como los osteocitos, mientras que están ausentes en los tipos celulares utilizados en nuestros experimentos. En segundo lugar, cabe pensar que la asociación con la DMO pudiese depender de otros polimorfismos frecuentes, en desequilibrio de unión con los aquí estudiados. De ser así, deberían encontrarse en regiones lejanas, alejadas del promotor, puesto que en esta región existe un fuerte ligamiento. En este sentido, cabe señalar que hay una región reguladora de SOST situada a unas 50 kb, que contiene algunos polimorfismos que se han relacionado de manera inconsistente con la DMO<sup>20,22</sup>. Esa región es capaz de fijar el factor de transcripción MEF2C y desempeña un papel importante en la regulación de SOST, porque su falta ocasiona el fenotipo de la enfermedad de Van Buchem en humanos y un incremento de la masa ósea en modelos murinos<sup>23,24</sup>. Una tercera posibilidad es que la asociación con la DMO dependa de algunos polimorfismos de baja frecuencia, situados en la región promotora. Finalmente, los polimorfismos podrían actuar a través de mediadores epigenéticos que no pueden ser recapitulados adecuadamente en los modelos *in vitro*. Por tanto, se precisan otros estudios, incluyendo el análisis sistemático de las variantes de las regiones 5' y 3' del gen y de otras que se encuentren asociadas a él teniendo en cuenta la estructura tridimensional de la cromatina, así como estudios de mutagénesis *in vivo* para esclarecer los mecanismos por los que estas variantes alélicas pueden modular la actividad de la esclerostina y asociarse a diferencias en la masa ósea<sup>25</sup>.

En este estudio hemos corroborado los resultados previos que indican que RUNX2 y OSX aumentan la expresión de SOST en humanos<sup>13</sup>. Eso indica que estos factores de transcripción tienen un papel com-

Figura 3. Comparación de la actividad transcripcional de los vectores con alelos A y G en células HEK-293T, en condiciones basales y tras la co-transfección de vectores de expresión de RUNX2 y OSX

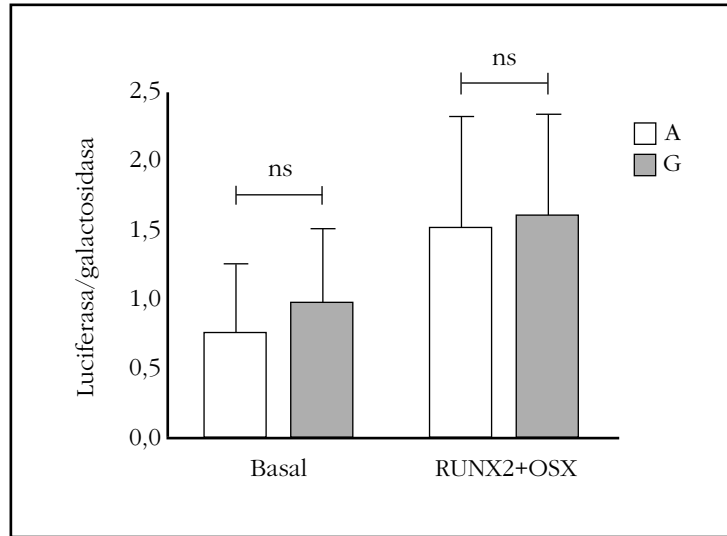
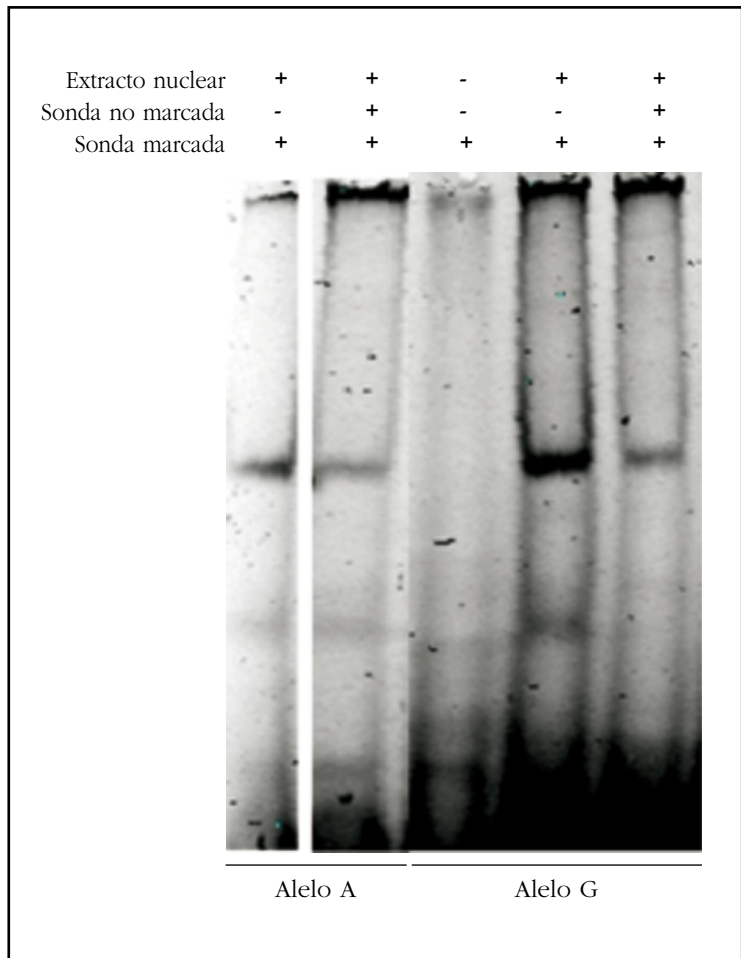


Figura 4. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética. Se observa la aparición de una banda retardada cuando se añade el extracto proteico nuclear, cuya intensidad disminuye al añadir sonda no marcada. Existe alguna diferencia en la intensidad de las bandas entre los alelos A y G, paralelas a la intensidad de la señal de la sonda no retardada. Sin embargo, en varios experimentos no se observaron diferencias consistentes entre la sonda con el alelo A y la sonda con el alelo G



plejo sobre la línea osteoblástica. Por un lado, está bien establecido su papel como determinantes de las etapas iniciales de diferenciación de las células mesenquimales hacia osteoblastos, lo que posibilita que haya un número adecuado de osteoblastos formadores de hueso. Por otro, promueven la actividad del promotor de SOST. Por tanto, en células capaces de expresar este gen, como los osteocitos, podrían promover la secreción de esclerostina y así contribuir a evitar una formación ósea exagerada. En todo caso, las variantes del promotor de SOST no parecen influir en la respuesta a estos factores.

En conclusión, en este estudio hemos confirmado que la región situada antes del inicio de la traducción del gen SOST tiene una potente actividad promotora, que es además inducida por los factores de transcripción RUNX2 y OSX. Las variantes frecuentes de esta región se han asociado con la masa ósea, pero los mecanismos implicados son aún desconocidos, puesto que los alelos no muestran diferencias en la actividad transcripcional *in vitro*.

**Agradecimientos:** Este trabajo se realizó gracias a una beca de la FEIOMM 2013 "Interacción entre Osterix, Runx2 y Esclerostina: mecanismos moleculares y repercusión sobre la masa ósea" y del Instituto de Salud Carlos III (PI12-615), la cual puede ser cofinanciada con fondos FEDER de la Unión Europea.

Los autores agradecen al Dr. Svante Paabo el generoso suministro del plásmido de expresión de RUNX2.

**Declaración de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

### Bibliografía

- Riancho JA, Hernandez JL. Pharmacogenomics of osteoporosis: a pathway approach. *Pharmacogenomics*. 2012;13(7):815-29.
- Baron R, Rawadi G. Wnt signaling and the regulation of bone mass. *Curr Osteoporos Rep*. 2007;5:73-80.
- Bodine PV, Komm BS. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006;7:33-9.
- Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem*. 2005;280(29):26770-5.
- Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*. 2005;280:19883-7.
- Moester MJ, Papapoulos SE, Lowik CW, van Bezooijen RL. Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int*. 2010;87:99-107.
- Ott SM. Sclerostin and Wnt signaling--the pathway to bone strength. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:6741-3.
- Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Lowik CW, et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J*. 2005;19:1842-4.
- Loots GG, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, et al. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res*. 2005;15:928-35.
- Balemans W, Van Hul W. Identification of the disease-causing gene in sclerosteosis--discovery of a novel bone anabolic target? *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2004;4:139-42.
- Kim CA, Honjo R, Bertola D, Albano L, Oliveira L, Jales S, et al. A known SOST gene mutation causes sclerosteosis in a familial and an isolated case from Brazilian origin. *Genet Test*. 2008;12:475-9.
- Valero C, Zarrabeitia MT, Hernandez JL, Pineda B, Cano A, Garcia-Perez MA, et al. Relationship of sclerostin and secreted frizzled protein polymorphisms with bone mineral density: an association study with replication in postmenopausal women. *Menopause*. 2011;18:802-7.
- Perez-Campo FM, Santurtun A, Garcia-Ibarbia C, Pascual MA, Valero C, Garces C, et al. Osterix and RUNX2 are Transcriptional Regulators of Sclerostin in Human Bone. *Calcif Tissue Int*. 2016;99(3):302-9.
- Balemans W, Van Hul W. Human genetics of SOST. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006;6:355-6.
- Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet*. 2012;44:491-501.
- Kuipers AL, Zhang Y, Yu S, Kammerer CM, Nestlerode CS, Chu Y, et al. Relative influence of heritability, environment and genetics on serum sclerostin. *Osteoporos Int*. 2014;25(3):905-12.
- Sims AM, Shephard N, Carter K, Doan T, Dowling A, Duncan EL, et al. Genetic analyses in a sample of individuals with high or low bone density demonstrates association with multiple Wnt pathway genes. *J Bone Miner Res*. 2008;23:499-506.
- Yerges LM, Klei L, Cauley JA, Roeder K, Kammerer CM, Moffett SP, et al. High-density association study of 383 candidate genes for volumetric BMD at the femoral neck and lumbar spine among older men. *J Bone Miner Res*. 2009;24:2039-49.
- Mencej-Bedrac S, Prezelj J, Kocjan T, Komadina R, Marc J. Analysis of association of LRP5, LRP6, SOST, DKK1, and CTNNB1 genes with bone mineral density in a Slovenian population. *Calcif Tissue Int*. 2009;85:501-6.
- Uitterlinden AG, Arp PP, Paeper BW, Charmley P, Proll S, Rivadeneira F, et al. Polymorphisms in the sclerosteosis/van Buchem disease gene (SOST) region are associated with bone-mineral density in elderly whites. *Am J Hum Genet*. 2004;75:1032-45.
- Lhaneche L, Hald JD, Domingues A, Hannouche D, Delepine M, Zelenika D, et al. Variations of SOST mRNA expression in human bone are associated with DNA polymorphism and DNA methylation in the SOST gene. *Bone*. 2016;92:107-15.
- Balemans W, Foerzler D, Parsons C, Ebeling M, Thompson A, Reid DM, et al. Lack of association between the SOST gene and bone mineral density in perimenopausal women: analysis of five polymorphisms. *Bone*. 2002;31:515-9.
- Collette NM, Genetos DC, Economides AN, Xie L, Shahnazari M, Yao W, et al. Targeted deletion of Sost distal enhancer increases bone formation and bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(35):14092-7.
- Balemans W, Cleiren E, Siebers U, Horst J, Van Hul W. A generalized skeletal hyperostosis in two siblings caused by a novel mutation in the SOST gene. *Bone*. 2005;36:943-7.
- Huang Q. Genetic study of complex diseases in the post-GWAS era. *J Genet Genomics*. 2015;42(3):87-98.

González-Fisher RF<sup>1</sup>, Pérez-Jaime S<sup>2</sup>, Buz K<sup>3</sup>, Sotelo-Félix E<sup>1</sup>, Álvarez Ordorica O<sup>1</sup>, González Riestra HJ<sup>1</sup>, Rolon Padilla A<sup>4</sup>

1 Grupo Oncológico - Hospital Médica Avanzada Contigo - Central Médico-Quirúrgica de Aguascalientes (México)

2 Servicio de Nutrición Clínica - Hospital Miguel Hidalgo - Instituto de Salud del Estado de Aguascalientes (México)

3 Servicio de Nutrición Clínica - Hospital Médica Avanzada Contigo - Central Médico-Quirúrgica de Aguascalientes (México)

4 Biopath - Aguascalientes (México)

## Prevalencia de niveles bajos de vitamina D en pacientes con cáncer de mama que viven en latitudes 21–22° Norte

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000400005>

Correspondencia: Ricardo F. González-Fisher - 6998 South Riverwood Way - Aurora - Colorado 80016 (Estados Unidos)  
Correo electrónico: Ricardo.F.Gonzalez@ucdenver.edu

Fecha de recepción: 28/01/2016

Fecha de aceptación: 13/07/2016

### Resumen

**Introducción:** La vitamina D ha sido implicada en diversas patologías, entre las que se encuentra el cáncer. Diversos estudios han relacionado los niveles de vitamina D con el cáncer de mama. El objetivo de este estudio fue establecer la importancia de concentraciones adecuadas de vitamina D en la prevención del cáncer de mama.

**Materiales y métodos:** Estudio transversal de casos/controles que incluyó a 76 mujeres: 24 eran pacientes con cáncer de mama (grupo de casos), mientras que 52 mujeres sin cáncer de mama fueron asignadas al grupo control. En todas ellas se evaluaron los hábitos alimenticios, la exposición solar, el índice de masa corporal (IMC) y el tipo de piel. Se midió la vitamina D mediante cromatografía de líquidos. Se analizó el pleomorfismo del receptor de vitamina D mediante inmunohistoquímica.

**Resultados:** La ingesta de vitamina D fue deficiente en 18 pacientes y 22 controles, y suficiente en 6 pacientes y 30 controles (*odds ratio*=4,09, intervalo de confianza (IC) 95%: 1,04-11,0;  $p=0,016$ ). La exposición solar estuvo presente en 9 pacientes y 15 controles; 15 pacientes y 37 controles estuvieron menos expuestas a la radiación solar y usaban protección. Dos pacientes y 13 controles tuvieron niveles normales de vitamina D (30-60 ng/mL); dos pacientes y 26 controles tuvieron niveles bajos (20-30 ng/mL); y 18 pacientes y 12 controles tuvieron niveles muy bajos (<20 ng/mL). La *odds ratio* entre las pacientes con niveles séricos de vitamina D  $\leq 20$  ng/mL o mayores fue 9, IC 95%: 2,95-27,5, ( $p<0,001$ ). Estos niveles fueron independientes del IMC.

**Conclusión:** Existe una estrecha relación entre bajas concentraciones de vitamina D y desarrollo de cáncer de mama en una región con alta exposición solar. Se requieren otros estudios para confirmar esta observación.

**Palabras clave:** *cáncer de mama, vitamina D, factor de riesgo, exposición solar, dieta, tipo de piel.*

## Prevalence of low levels of vitamin D in patients with breast cancer who live in Northern latitudes 21-22°

### Summary

**Objective:** Vitamin D has been involved in various diseases, including cancer. Several studies have linked vitamin D levels with breast cancer. The aim of our study was to establish the importance of adequate vitamin D concentrations to prevent breast cancer.

**Materials and methods:** The study included 76 patients. Dietary habits, sun exposure, body mass index (BMI), and skin type were evaluated. Vitamin D determination in serum was measured by liquid chromatography. Vitamin D receptor polymorphism was analyzed by immunohistochemistry.

**Results:** Vitamin D ingestion was deficient in 18 patients and 22 controls; and sufficient in 6 patients and 30 controls, odds ratio of 4.09, confidence interval 95% 1.04-11.0, ( $p=0.016$ ). Sun exposure was present in 9 patients and 15 controls; 15 patients and 37 controls had less sun exposure or used protection. Two patients and 13 controls had normal levels of vitamin D (30-60), two patients and 26 controls had low levels (20-30), and 18 patients and 12 controls had very low levels ( $<20$ ). Odds ratio for patients with vitamin D serum levels of 20 ng/mL or less, or higher was 9, CI 95% 2.95-27.5, ( $p<0.001$ ). These levels were independent from BMI.

**Conclusion:** Low concentrations of vitamin D are strongly related to breast cancer in a region with high solar exposure. More studies are needed to confirm this relationship.

**Key words:** breast cancer, vitamin D, risk factor, sun exposure, diet, skin type.

### Introducción

La importancia de la vitamina D en el mantenimiento de la mineralización ósea ha sido reconocida por décadas. Actualmente, concentraciones plasmáticas entre 30 a 60 ng/mL de esta vitamina se han relacionado con mejoría en otras condiciones de salud como hipertensión, enfermedad cardiovascular, diabetes, enfermedades autoinmunes y cáncer<sup>1</sup>.

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en el mundo<sup>2</sup>. Se calcula que en 2012 se diagnosticaron 1,67 millones de nuevos casos a nivel mundial<sup>3</sup>, aumento significativo si se compara con 12.433 nuevos casos de cáncer de mama en mujeres de 40 a 59 años del Registro Nacional de Neoplasias Malignas en México de 2003. La frecuencia de esta enfermedad en México es de 18,7 por 100.000 mujeres de 25 años, lo cual significa un incremento del 49,5% en los últimos 20 años<sup>4</sup>.

Debido al impacto global del cáncer de mama, se han dedicado numerosos esfuerzos para identificar factores de riesgo hacia los cuales dirigir medidas preventivas.

Un estudio reciente de 44.778 pares de gemelos con cáncer identificó una contribución de aproximadamente el 5% de factores genéticos heredables para el desarrollo de cáncer. Este estudio sugirió que entre uno y dos tercios de los casos de cáncer podrían prevenirse con factores dietéticos<sup>5</sup>. De modo que se ha tratado de relacionar niveles bajos de vitamina D con baja exposición solar y, particularmente, con cáncer de mama en mujeres que viven en latitudes altas<sup>6-8</sup>. Incluso, otros estudios epidemiológicos han demostrado que niveles altos de metabolitos de la vitamina D se asocian consistentemente con disminución del riesgo de cáncer

de mama<sup>9</sup>, mientras que concentraciones bajas se han asociado significativamente con características negativas de tumores mamarios, tales como mayor tamaño tumoral o mayor grado<sup>1</sup>. Además de la evidencia epidemiológica, se ha demostrado que el tejido mamario contiene receptores para la vitamina D, y varios polimorfismos del gen que codifica dicho receptor se han relacionado con peor pronóstico<sup>10,11</sup>.

Para la mayor parte de las personas, entre el 80 y el 90% de las reservas circulantes de vitamina D se derivan de la exposición casual a la radiación solar<sup>12</sup>, la cual es limitada en áreas en las que dicha radiación es baja. Esa escasa exposición solar también se debe a hábitos culturales, vestimenta y a recomendaciones de salud pública que se difunden para no desarrollar otro tipo de neoplasias como las dermatológicas, por ejemplo<sup>13</sup>. Igualmente, es menester considerar que, pese a la existencia de leche fortificada con vitamina D, pescados grasos y aceite de hígado de bacalao, las fuentes alimentarias que contienen dicha vitamina son limitadas, y en muchos países los productos lácteos no son fortificados con vitamina D<sup>13</sup>.

Con el objetivo de confirmar la relación entre niveles bajos de vitamina D con el cáncer de mama realizamos un estudio de casos y controles en mujeres que viven en una región que recibe altas dosis de radiación UVB a lo largo del año. Tratamos de eliminar variables de confusión mediante la evaluación de la ingesta de vitamina D, el índice de masa corporal, los antecedentes familiares, la historia hormonal y el nivel circulante de receptor de vitamina D. Nuestra hipótesis fue que las concentraciones de vitamina D serían significativamente menores en mujeres con diagnóstico de cáncer de mama que las del grupo control.



## Material y métodos

### *Población de estudio*

Diseñamos un estudio de casos y controles con información de la población de Aguascalientes, un estado de la República Mexicana, localizado entre los 21 y 22° de latitud Norte con temperatura promedio de 19,2°C y que recibe una dosis diaria de entre 6 a 7 kWh/m<sup>2</sup> de energía solar<sup>14</sup>. En 2010, la población de Aguascalientes era de 1.184.996 habitantes (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Historia de México, INEGI), y en 2012 se diagnosticaron y trataron 150 nuevos casos de cáncer de mama<sup>15</sup>.

El protocolo fue presentado al Comité de Ética Institucional el 22 de diciembre de 2011, aprobado el 26 de enero de 2012 y registrado en la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios de la Secretaría de Salud de México (COFEPRIS) el 19 de diciembre de 2012 (CAS/OR/01/CAS/123300410D0034-3789/2012). Todos los procedimientos del estudio se llevaron a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Todas las participantes del estudio firmaron el consentimiento informado.

Las pacientes del grupo de casos fueron incluidas si tenían diagnóstico confirmado de cáncer de mama mediante histopatología, previo a cualquier terapia sistémica entre marzo de 2012 y marzo de 2013. Incluimos dos mujeres controles por cada paciente, las cuales tenían mastografía negativa (BIRADS 0-2, confirmada por un radiólogo central) o un informe de biopsia benigna, y se les emparejó por la edad y lugar de residencia en los últimos tres años. Las pacientes y las mujeres del grupo control fueron referidas por los Servicios de Oncología del Hospital Médica Avanzada Contigo-Central Médico-Quirúrgica; del Hospital General de Zona Número 1 de la Delegación Aguascalientes del Instituto Mexicano del Seguro Social; del Hospital General del Instituto de Salubridad y Seguridad Social de los Trabajadores del Estado en Aguascalientes; y del Hospital de la Mujer. Todas las pacientes participantes en el estudio fueron evaluadas entre 7 y 15 días después del diagnóstico de cáncer mediante una historia clínica completa, incluidos los hábitos alimenticios, exposición solar y tipo de piel. A todas se les tomó registro de vitamina D (25 OH) en suero. Dos pacientes declinaron la invitación a participar en el estudio. Ninguna de las controles se negó a participar en el estudio.

Los criterios de exclusión para ambos grupos fueron: el diagnóstico previo de hiperparatiroidismo, la ingestión de suplementos de vitamina D prescritos o de venta libre, existencia de herida previa por quemadura que haya necesitado de un injerto de piel, malabsorción intestinal, terapia de reemplazo hormonal tiroideo, cualquier otra neoplasia, así como pacientes con alteración de los niveles de calcio sérico, fósforo o magnesio.

Todos los casos y controles fueron sometidos a dos interrogatorios separados, uno para evaluar los factores de riesgo de cáncer de mama y los hábitos de exposición solar, y el segundo para una encuesta nutricional de ingesta de vitamina D. Los

factores de riesgo para cáncer de mama son los comprendidos en la Breast Cancer Risk Assessment Tool<sup>16</sup>, pero en nuestro estudio excluimos la raza porque dicho modelo sólo está diseñado para mujeres anglosajonas.

Los hábitos de radiación solar fueron evaluados mediante un cuestionario sobre el uso de bloqueadores solares, de ropa con manga larga, la exposición a radiación por ocupación o recreación (o ambas), y el horario y la duración de exposición a la radiación solar.

En nuestro estudio determinamos los niveles séricos de calcio, fósforo y magnesio, así como de vitamina D (25 hidroxivitamina D<sub>3</sub>) y del receptor de la vitamina D (RVD).

La función de la vitamina D en la homeostasis del calcio fue evaluada mediante biomarcadores como los niveles de hormona paratiroidea, la absorción de calcio y la densidad mineral ósea<sup>17</sup>.

Debido a que se ha demostrado que una ingesta adecuada de calcio y vitamina D reduce de manera importante la pérdida ósea<sup>18</sup>, hicimos una densitometría ósea mediante DXA en columna lumbar y fémur proximal en todas las pacientes para tratar de determinar la cronicidad en la deficiencia de vitamina D.

Se tomaron muestras de tejido tumoral de las pacientes con cáncer para ser examinadas por un mismo patólogo (ARP).

Todas las mujeres participantes (casos y controles) tuvieron una entrevista directa con uno de los investigadores (RGF/SPJ) en la que se revelaron sus resultados. Las que tuvieron concentraciones anormales de vitamina D o densitometría ósea con diagnóstico de osteopenia u osteoporosis fueron referidas a su médico de Atención Primaria para que les prescribiera tratamiento.

### *Determinación de vitamina D y su receptor*

La 25(OH) vitamina D fue medida mediante cromatografía de líquidos. El pleomorfismo del receptor de la vitamina D fue analizado por inmunohistoquímica. Los polimorfismos del gen del RVD (Bsm-1, Fork-1) se conformaron por ADN genómico tomados de células de sangre venosa periférica (5 ml de sangre almacenada en tubos cuyo contenido fue ácido etilenediaminetetra-acético-EDTA-).

El ADN fue extraído mediante el método Lahiri y Numberger<sup>19</sup>. El ADN genómico (100 ng) fue amplificado por una técnica de PCR en condiciones estándar: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 µM dNTPs, 1 UI Taq DNA polimerasa, volumen final de 50 µl.

### *Análisis estadístico*

Para estimar la asociación entre niveles bajos de vitamina D y cáncer de mama utilizamos la *odds ratio*, debido a que las participantes del estudio fueron seleccionadas en base a la presencia o ausencia de cáncer de mama, y no por sus niveles de vitamina D. Para cuantificar la precisión de la asociación se calculó un intervalo de confianza del 95%, y para evaluar el riesgo ponderado ante la presencia de variables confusas utilizamos el método de Cochran-Mantel-Hanzenel.

## Resultados

Entre marzo de 2012 y marzo de 2013 se incluyeron un total de 76 mujeres en el estudio. Todas ellas cumplieron con los criterios de inclusión y ninguna fue excluida a causa de anomalías de electrolitos en suero.

De ellas, 24 tuvieron diagnóstico confirmado de cáncer de mama con edades de 22 a 79 años (mediana de 50,5 y media de 53,6), siendo incluidas en el grupo de casos. Las 52 mujeres restantes, cuyas edades oscilaban entre 24 y 67 años (mediana de 51 y media de 51,09), fueron asignadas al grupo control.

El riesgo de cáncer de mama fue analizado mediante modificación de la Breast Cancer Risk Assessment Tool (a la que se eliminó el factor de etnicidad); dicho riesgo a 5 años fue similar en ambos grupos.

La exposición solar, de al menos 30 minutos al día, estuvo presente en 9 pacientes y 15 controles; mientras que 15 pacientes y 37 controles tuvieron menos exposición solar o usaron protección adecuada (*odds ratio*=1,48; intervalo de confianza (IC) 95%: 0,53-4,11;  $p=0,625$ ) (Tabla 1).

La ingesta de vitamina D fue evaluada y clasificada como deficiente en 18 pacientes y 22 controles, y suficiente en 6 pacientes y 30 controles (*odds ratio*=4,09; IC 95%: 1,04-11,0;  $p=0,016$ ) (Tabla 1).

Seis pacientes y 20 controles tuvieron IMC normal (18,5 a 24,9), 6 pacientes y 21 controles tenían sobrepeso (IMC 25-29,9); 12 pacientes y 10 controles fueron clasificadas como obesas (IMC de 30 o más) (*odds ratio*=4,42; IC 95%: 1,51-13,1;  $p=0,01$ ) (Tabla 1).

Dos pacientes y 13 controles tuvieron niveles normales de vitamina D (30-60 ng/mL); 2 pacientes y 26 controles tuvieron niveles bajos (20-30 ng/mL); y 18 pacientes y 12 controles tuvieron niveles muy bajos (<20 ng/mL) (Figura 1). Al observar la distribución, calculamos la *odds ratio* para las pacientes con niveles séricos de vitamina D de  $\leq 20$  ng/mL con respecto a aquéllas con niveles superiores a 20 ng/mL, siendo de 9 (IC 95%: 2,95-27,5;  $p<0,001$ ) (Tabla 1).

Las densitometrías óseas fueron normales en el 40,4% de las mujeres del grupo control, mientras que únicamente lo fueron en el 20,8% de las pacientes con cáncer de mama; el 16,7% de las pacientes con cáncer y sólo el 9,6% de las del grupo control fueron clasificadas como osteoporóticas. Estos hallazgos sugieren que hubo niveles bajos de vitamina D durante un largo período de tiempo; sin embargo, la densidad mineral ósea no se relacionó con los niveles de vitamina D actuales.

El polimorfismo Bsm-1 del receptor de la vitamina D circulante en sangre fue positivo en 4 casos y 5 controles, pero no se relacionó con los niveles de vitamina D circulantes; mientras que el polimorfismo Fork-1 fue positivo en 3 controles y en 1 caso, y tampoco se relacionó con los niveles circulantes de vitamina D.

Al evaluar los factores de riesgo analizados y el cáncer de mama en nuestras pacientes encontramos una asociación positiva. Dicho de otro modo, el riesgo de padecer cáncer de mama es 1,48 veces mayor en mujeres con exposición solar menor a 30 minutos

diarios, comparado con mujeres con exposición solar de 30 minutos o más. De la misma manera, el riesgo de cáncer de mama es 4,09 veces mayor en mujeres con ingesta deficiente de vitamina D, en comparación con aquéllas en quienes se determinó que la ingesta de vitamina D era suficiente. El riesgo fue 4,42 veces mayor en mujeres con obesidad o sobrepeso y 9 veces mayor en pacientes con niveles séricos de vitamina D menor o igual a 20 ng/mL. Todas estas asociaciones, excepto la exposición solar menor 30 minutos al día, fueron estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Chi-cuadrado.

Con el fin de evitar confusiones, realizamos un análisis multivariado con el método de Cochran-Mantel-Haenszel. La Chi-cuadrado con un grado de libertad fue significativa con un valor de 18,863 ( $p=0,000014$ ), lo cual indica que la asociación de cáncer de mama con niveles bajos de vitamina D fue independiente de las otras variables analizadas.

## Discusión

La evidencia de la relación entre vitamina D y cáncer de mama ha crecido notablemente en los últimos años. Garland y Garland sugirieron la importancia de la exposición a la radiación solar para explicar la variación geográfica en la frecuencia de cáncer de mama<sup>20</sup>. Aunque varios estudios más recientes identificaron una relación baja o nula entre la exposición solar y el cáncer de mama en mujeres que viven en regiones con baja exposición solar, también encontraron que la disminución del riesgo es mayor en regiones con alta irradiación solar e intermedia en áreas de exposición solar intermedia<sup>8</sup>. De igual manera, Ingraham enfatiza que en Noruega se ha encontrado un efecto positivo en la supervivencia en mujeres con cáncer de mama diagnosticado en verano u otoño, cuando los niveles de vitamina D son más altos<sup>21</sup>.

Estos hallazgos coinciden con aquellos que han demostrado disminución en la síntesis de vitamina D en el invierno en regiones con baja exposición solar en los Estados Unidos<sup>8</sup>. Por lo tanto, es trascendente que en nuestra población encontramos que niveles muy bajos de vitamina D (<20 ng/mL) están estrechamente relacionados con cáncer de mama en una región con elevada exposición solar a lo largo del año, lo que contrasta notablemente con el grupo control. En nuestra población, dicha asociación fue independiente del IMC, el tipo de piel, los hábitos de exposición/protección solar o la ingesta de vitamina D.

Este hallazgo confirma la hipótesis de que niveles muy bajos de vitamina D se asocian con desarrollo de cáncer de mama, pero no explica la causa de estos niveles séricos<sup>22</sup>. Otro estudio realizado en mujeres mexicanas, que encontró una reducción de 47% en el riesgo de desarrollar cáncer de mama en aquéllas con concentraciones séricas de vitamina D superiores a 30 mg/mL, dio como explicación que los niveles bajos de vitamina D fueron debidos a la baja exposición al sol por actividad laboral bajo techo, por poca actividad recreativa al aire libre, por hiperpigmentación de la piel y porque evitaban activamente la exposición solar<sup>23</sup>.

Tabla 1. Resumen de los resultados

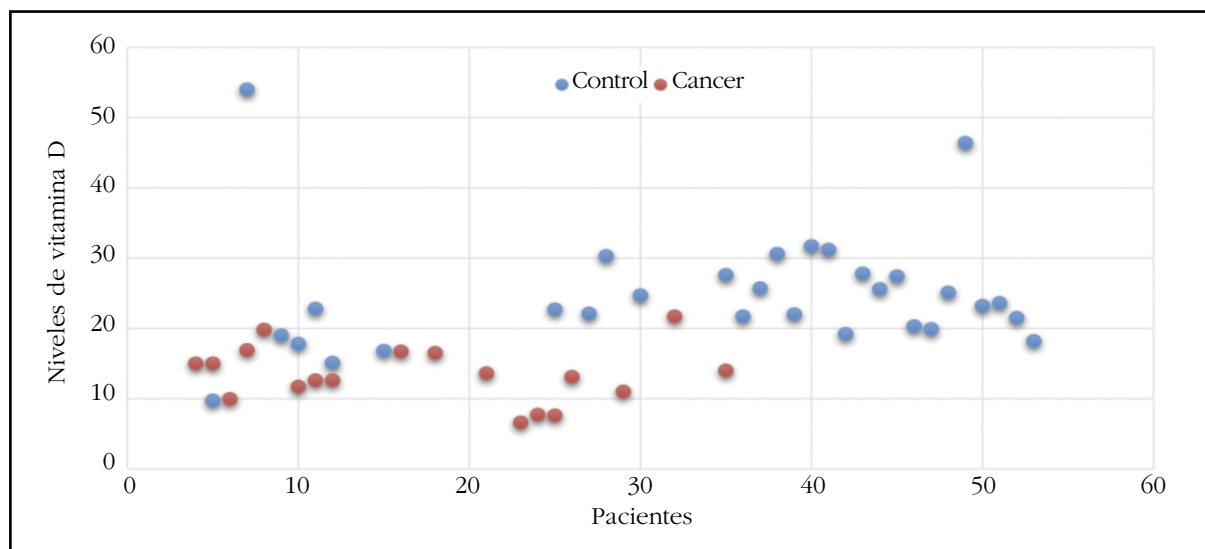
<b>Exposición solar menor a 30 minutos al día</b>				
	<30 min/día	>30 min/día		
Cáncer de mama	9	15	Prevalencia en casos	0,63
Controles	15	37	Prevalencia en controles	0,71
			Chi-cuadrado=0,24	p=0,625
			<b>Odds ratio</b>	<b>1,48</b>
			<b>IC 95%</b>	<b>0,53-4,11</b>
			Riesgo atribuible poblacional	0,12
			Riesgo atribuible en las expuestas	0,81
<b>Ingesta deficiente de vitamina D</b>				
	Deficiente	Suficiente		
Cáncer de mama	18	6	Prevalencia en casos	0,75
Controles	22	30	Prevalencia en controles	0,42
			Chi-cuadrado=5,79	p=0,016
			<b>Odds ratio</b>	<b>4,09</b>
			<b>IC 95%</b>	<b>1,04-11,9</b>
			Riesgo atribuible poblacional	2,81
			Riesgo atribuible en las expuestas	3,33
<b>Sobrepeso/obesidad</b>				
	IMC >25	IMC 18-24,9		
Cáncer de mama	18	6	Prevalencia en casos	0,75
Controles	21	31	Prevalencia en controles	0,59
			Chi-cuadrado=6,55	p=0,01
			<b>Odds ratio</b>	<b>4,42</b>
			<b>IC 95%</b>	<b>1,51-13,1</b>
			Riesgo atribuible poblacional	3,09
			Riesgo atribuible en las expuestas	4,12
<b>Niveles muy bajos de vitamina D</b>				
	≤20 ng/mL	>20 ng/mL		
Cáncer de mama	18	6	Prevalencia en casos	0,75
Controles	13	39	Prevalencia en controles	0,25
			Chi-cuadrado=14,99	p=<0,001
			<b>Odds ratio</b>	<b>9,0</b>
			<b>IC 95%</b>	<b>2,95-27,5</b>
			Riesgo atribuible poblacional	6,64
			Riesgo atribuible en las expuestas	0,88

IMC: índice de masa corporal; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

Un aspecto de importancia relevante para confirmar el papel potencial de la vitamina D en el desarrollo de cáncer de mama es que el envejecimiento y la deficiencia estrogénica también se asocian a niveles bajos de vitamina D. El primero reduce la producción de colecalciferol en la piel, mientras que la segunda disminuye la activación

metabólica de la vitamina D. Por lo tanto, las mujeres postmenopáusicas, blanco predominante del cáncer de mama, tienen mayor riesgo de deficiencia de vitamina D, comparadas con mujeres más jóvenes<sup>24</sup>, pero de igual forma en este estudio no encontramos diferencia significativa relacionada con el estado menopáusico.

Figura 1. Niveles de vitamina D en casos y controles



Dos hallazgos relevantes son que RVD se expresa en tejido mamario y que hay un período libre de enfermedad mayor en mujeres con tumores mamarios con RVD positivo, en comparación con aquéllas con tumores con RVD negativo<sup>25</sup>. El ligando del RVD es el metabolito 1,25 di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub> (1,25 (OH)<sub>2</sub>D), que tiene efectos importantes en el crecimiento y la diferenciación celular. Estudios de laboratorio han demostrado que la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D y sus análogos inhiben la proliferación celular y promueven la apoptosis en cultivos celulares y modelos animales de cáncer de mama, lo cual causa retraso en el desarrollo tumoral y regresión de tumores mamarios previamente diagnosticados<sup>25</sup>.

Existen varios polimorfismos del gen que codifica el RVD. Uno de ellos, identificado por la restricción de la enzima FokI, produce proteínas del RVD que difieren en tres aminoácidos. Este polimorfismo se ha asociado con incremento del riesgo de cáncer de mama en mujeres afroamericanas<sup>10</sup>.

Otras alteraciones que generan restricciones en los sitios BsmI, ApaI y TaqI se han relacionado con alteraciones en la región 3' UTR del receptor que es importante en el control de la expresión post transcripcional del gen. Polimorfismos en esta región también se han relacionado con cáncer de mama; de modo que se confirman asociaciones entre riesgo de cáncer de mama y el polimorfismo ApaI, progresión de cáncer de mama y ausencia de TaqI y genotipo BsmI con mayor riesgo de metástasis<sup>11</sup>.

En nuestro trabajo no encontramos diferencias en la detección del polimorfismo FokI entre los diferentes grupos, y tampoco contemplamos dar seguimiento al pronóstico en las pacientes en las que se demostró esta mutación porque el número de pacientes con la mutación era pequeño y las conclusiones que podrían obtenerse serían pobres.

En 2010, el Institute of Medicine de los Estados Unidos definió como niveles suficientes de vitamina D 20 ng/mL; consideró deficiencia las concentraciones de 12 ng/mL o menos e insuficiencia 12-19 ng/mL<sup>26</sup>. Si nos basamos en ello, ninguna de nues-

tras pacientes hubiera requerido intervención alguna y, ya que nosotros encontramos una correlación entre niveles de vitamina D iguales o menores a 20 ng/mL con cáncer de mama, en este aspecto coincidimos con Manson y cols. en que esta definición debería ser revisada<sup>27</sup>.

Bauer y cols.<sup>28</sup> llevaron a cabo un metanálisis de estudios prospectivos en el que analizaron esta asociación y los estratificaron por estado menopáusico. Su hipótesis fue que diferencias en la condición y una relación dosis-respuesta no lineal podrían ser responsables de las discrepancias<sup>1</sup>. El metanálisis incluyó 9 estudios prospectivos (publicados entre 1996 y 2011) con 11 bases de datos que evaluaron niveles de vitamina D circulante en pacientes con cáncer de mama. Se incluyeron 5.206 casos y 6.450 controles. Mediante un complejo análisis estadístico encontraron una relación límite entre los niveles circulantes de vitamina D y el cáncer de mama (RR por 5 ng/mL=0,99) en mujeres postmenopáusicas, pero no en premenopáusicas. También encontraron un aplanamiento en la asociación en los niveles más bajos (27 ng/mL) o más altos (35 ng/mL). La disminución de riesgo en el rango de 27 a 35 ng/mL en mujeres postmenopáusicas fue tal que incrementos de 5 ng/mL en los niveles de vitamina D se asociaron con disminución de riesgo de cáncer de mama de 12% (RR=0,88 por 5 ng/mL).

Con este estudio, los autores demostraron la posibilidad de determinar un rango óptimo de niveles plasmáticos de vitamina D (27 a 35 ng/mL) para disminuir el riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas. Estos hallazgos deberían validarse ahora en estudios que incorporen datos a nivel individual.

Otro metanálisis<sup>29</sup> evaluó una asociación dosis-respuesta. Este estudio incluyó datos de 15 publicaciones que analizaron la relación del cáncer de mama con la ingesta de calcio en la dieta. Siete estudios que analizaron la asociación del cáncer de mama con los niveles séricos de vitamina D y 11 trabajos donde se estudió la relación de esta neoplasia

con la ingesta de vitamina D demostraron una asociación lineal entre la ingesta de calcio, una relación no lineal entre niveles de vitamina D o ingesta de vitamina D con el riesgo de cáncer de mama.

Chen y cols.<sup>29</sup> sugieren que mujeres con una alta ingesta de calcio, alta ingesta de vitamina D o aquéllas con concentraciones séricas adecuadas de vitamina D tienen menor riesgo de desarrollar cáncer de mama.

Independientemente de que no existen datos concluyentes acerca de la asociación de niveles bajos de vitamina D y el cáncer de mama en todas las mujeres, los beneficios para la salud ósea y la protección contra otras enfermedades crónicas asociados a concentraciones adecuadas de vitamina D son igualmente importantes. Debemos estimular a las pacientes a practicar hábitos de un estilo de vida saludable que ayude a incrementar los niveles de vitamina D, tales como mantener un peso ideal, evitar el consumo de tabaco, incrementar la actividad física, y valorar la importancia de la suplementación con vitamina D en aquellos adultos que no observan estos cambios en el estilo de vida.

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

**Agradecimientos:** Los autores de este manuscrito agradecen a Boehringer Ingelheim México por el apoyo brindado para el análisis estadístico y edición final del texto.

### Bibliografía

1. Stearns V, Visvanathan K. Optimizing vitamin D concentration for breast cancer risk reduction. *Medicine*. 2013;92(3):132-4.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:69-90.
3. GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide in 2012. Available from URL [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).
4. Cárdenas-Sánchez J, Bargalló-Rocha E, Erazo-Valle A, Maafs-Molina E, Poitevin-Chacón A. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Quinta revisión. Colima 2013. Disponible en [http://www.consencocancermamario.com/documentos/FOLLETO\\_CONSENSO\\_DE\\_CANCER\\_DE\\_MAMA\\_5aRev2013.PDF](http://www.consencocancermamario.com/documentos/FOLLETO_CONSENSO_DE_CANCER_DE_MAMA_5aRev2013.PDF) (Fecha de consulta, junio 2015).
5. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000;343:78-85.
6. Crew KD. Vitamin D. Are we ready to supplement for breast cancer prevention and treatment? *ISRN Oncol*. 2013;2013:483687 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/483687>.
7. Sperati F, Vici P, Maugeri-Sacca M, Stanges S, Santesso N, Mariani L, et al. Vitamin D supplementation and breast cancer prevention: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS One*. 2013;8(7):e69269.
8. Freedman DM, Dosemeci M, McGlynn K. Sunlight and mortality from breast, ovarian, colon, prostate, and non-melanoma skin cancer: a composite death certificate based case-control study. *Occup Environ Med*. 2002;59:257-62.
9. Rollison DE, Cole AL, Tung K-H, Slattery ML, Baumgartner KB, Byers T, et al. Vitamin D intake, vitamin D receptor polymorphisms, and breast cancer risk among women living in the southwestern U.S. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132:683-91.
10. Ingles SA, Garcia DG, Wang W, Nieters A, Henderson BE, Kolonel LA, et al. Vitamin D receptor genotype and breast cancer in Latinas (United States). *Cancer Causes Control*. 2000;11:25-30.
11. Bretherton-Watt D, Given-Wilson R, Mansi JL, Thomas V, Carter N, Colston KW. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with breast cancer risk in a UK Caucasian population. *Br J Cancer*. 2001;85(2):171-5.
12. John EM, Schwartz GG, Dreon DM, Koo J. Vitamin D and breast cancer risk: The NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1975 to 1992. *National Health and Nutrition Examination Survey. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999;8(5):399-406.
13. Yousef FM, Jacobs ET, Kang PT, Hakim IA, Going S, Yousef JA, et al. Vitamin D status and breast cancer in Saudi Arabian women: case control study. *Am J Clin Nutr*. 2013;98:105-10.
14. Energía Solar Térmica Proyecto RES & RUE Dissemination. El potencial de la radiación solar. [Internet]. Available from: <http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/277/A5.pdf?sequence=5>.
15. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México en cifras. [Internet]. Available from: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=01>.
16. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81(24):1879-86.
17. Hollis BW. Circulating 25Hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: Implications for establishing a new effective dietary intake recommendation. *J Nutr*. 2005;135:317-22.
18. Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and Vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med*. 1997;337:670-6.
19. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(19):5444.
20. Garland F, Garland C, Gorham E, Young J. Geographic variation in breast cancer mortality in the US; a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med*. 1990;19:614-22.
21. Ingraham BA, Bragdon B, Nohe A. Molecular basis of the potential of vitamin D to prevent cancer. *Curr Med Res Opin*. 2008;24(1):139-49.
22. Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D Insuficiency. *N Engl J Med*. 2011;363(3):248-54.
23. Fedirko V, Torres-Mejia G, Ortega-Olvera G, Blessy C, Angeles-Llerenas A, Lazcano-Ponce E, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer: result of a large population-based case-control study in Mexican women. *Cancer Causes Control*. 2012;23:1149-62.
24. Welsh JE, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ. Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr*. 2003;133:2425S-33S.
25. Laundin AC, Soderkvist P, Eriksson B, Bergman-Jungstrom M, Wingren S, South East Sweden Breast Cancer Group. Association of breast cancer progression with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Re*. 1999;59(10):2332-4.
26. Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes For Calcium and Vitamin D, National Academic Press, Washington, DC, USA, 2011.
27. Manson JE, Mayne ST, Clinton SK. Vitamin D and prevention of cancer- ready for prime time? *N Engl J Med*. 2011;364(15):1385-6.
28. Bauer SR, Hankinson SE, Bertone-Johnson ER, Ding EL. Plasma vitamin D levels, menopause, and risk of breast cancer: dose-response meta-analysis of prospective studies. *Medicine*. 2013;92(3):123-31.
29. Chen P, Hu P, Xie W, Qin Y, Wang F, Wang H. Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;121(2):469-77.

**Montaño Jaramillo D, Díaz Curiel M**

Unidad de Enfermedades Metabólicas Óseas - Servicio de Medicina Interna - Fundación Jiménez Díaz/Quirón Salud Madrid - Madrid (España)

## Hemocromatosis y osteoporosis, a propósito de 4 casos

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000400006>

Correspondencia: Manuel Díaz Curiel - Fundación Jiménez Díaz - Avda. Reyes Católicos, 2 - 28040 Madrid (España)  
Correo electrónico: [mdcuriel@fjd.es](mailto:mdcuriel@fjd.es)

Fecha de recepción: 05/09/2016

Fecha de aceptación: 12/12/2016

### Resumen

Aunque la mayoría de las enfermas con osteoporosis que observamos en la práctica clínica obedecen al grupo de osteoporosis postmenopáusicas o las relacionadas con el envejecimiento, existen algunos casos de osteoporosis en cuyo desarrollo existe alguna enfermedad o factor identificable distinto a la menopausia o al envejecimiento; la mayoría de estas causas están relacionadas con la toma de esteroides, el hipogonadismo, los procesos malignos como el mieloma múltiple, la cirugía gástrica, el alcoholismo, y el tratamiento por anticonvulsivantes. La hemocromatosis hereditaria es otra situación relacionada con la aparición de osteoporosis.

Presentamos 4 casos de pacientes con osteoporosis que padecen también hemocromatosis hereditaria, describiendo sus características y la posible relación de la hemocromatosis hereditaria con la patología ósea.

**Palabras clave:** *hemocromatosis, osteoporosis, hierro.*

## Hemochromatosis and osteoporosis, in reference to 4 cases

### Summary

Although most people's osteoporotic conditions treated in clinical practice may be categorized in the postmenopausal osteoporosis group or related to aging, there are some osteoporosis cases linked to the development of some other disease or identifiable factor.

Most of these causes are associated with the taking of steroids, hypogonadism, malignant processes such as multiple myeloma, gastric surgery, alcoholism and treatment with anticonvulsant drugs. Hereditary hemochromatosis is another disorder related to the onset of osteoporosis. In this paper, we present 4 cases of patients with osteoporosis who also suffer hereditary hemochromatosis. The latter's characteristics are described and also its possible relationship with bone disease.

**Key words:** *hemochromatosis, osteoporosis, iron.*

## Introducción

La osteoporosis (OP) es una enfermedad caracterizada por una disminución de la resistencia del hueso con alteración de la calidad y cantidad de la masa ósea que conduce a fracturas patológicas o por fragilidad, siendo el antebrazo, los cuerpos vertebrales y la cadera las localizaciones más comunes.

Entre sus factores de riesgo se encuentran la edad, la menopausia precoz (y cualquier situación de baja producción de estrógenos), las fracturas por fragilidad previas personales (siendo éste el factor de riesgo más importante)<sup>2</sup> o en familiares de 1º grado, la ingesta inadecuada de derivados lácteos, la toma crónica de glucocorticoides (prednisona a dosis  $\geq 5$  mg/d o su equivalente durante más 3 meses), un bajo índice de masa corporal -IMC- ( $< 19$  mg/m<sup>2</sup>), la ingesta elevada y crónica de alcohol y cafeína, y el hábito tabáquico, así como todas aquellas enfermedades que pueden ocasionar una OP secundaria (hipogonadismo, hipertiroidismo, diabetes *mellitus*, insuficiencia renal y enfermedades hepáticas, entre otras).

La hemocromatosis hereditaria (HH), aunque poco común, es una de las enfermedades hepáticas descritas que pueden originar la aparición de OP. La forma de presentación más frecuente es la relacionada con el gen HFE (HH-HFE). Describimos a continuación la existencia de OP en 4 personas que padecen HH-HFE.

## Casos Clínicos

A la consulta de Enfermedades Metabólicas Óseas de nuestro Hospital acudieron 4 pacientes, mujeres, quienes fueron diagnosticadas de OP y que padecían HH; desconocemos la incidencia real de OP en pacientes con HH en nuestro Centro dado que aún no se realiza DXA a todos estos pacientes.

**1ª paciente:** Fue diagnosticada de HH-HFE e hipogonadismo hipofisario a los 25 años y de OP a los 51 años. Dado el antecedente de hipogonadismo, se inició terapia hormonal sustitutiva para la amenorrea y posteriormente se modificó a raloxifeno y suplementos de calcio y vitamina D, con seguimientos periódicos. En su última revisión, la DXA presentó una T-score de -2,1 en el cuello femoral (estable durante el tratamiento) y de -3,2 en la columna lumbar (con ligero empeoramiento desde su inicio, ya que partíamos de -2,8). No presentó fracturas durante este tiempo. Al estudiar los factores de riesgo de OP se apreció que la paciente realiza una ingesta de calcio adecuada, practica ejercicio físico regularmente, no es fumadora y tiene una adecuada función tiroidea. La HH-HFE no originaba afectación orgánica, dado que se había seguido y controlado desde su diagnóstico, y se le practicaron 2 flebotomías durante su seguimiento, con normalización de los parámetros analíticos del hierro; siempre ha presentado la fosfatasa alcalina en rango normal.

**2ª paciente:** Fue diagnosticada de OP y HH-HFE (heterocigota normal/H63D) a los 64 años, aunque tenía antecedentes de fracturas vertebrales a

los 55 años y costales a los 61 y 63 años. Ha sido tratada durante 4 años en nuestra consulta, y en la última DXA que se le ha realizado encontramos una T-score en cuello femoral de -2,6 (estable durante el seguimiento) y en la columna lumbar de -2,1 (ligera mejoría con respecto al inicio del tratamiento, -2,7). Inicialmente estaba en tratamiento con calcio y vitamina D, y se le añadió ácido ibandronico, siendo éste posteriormente sustituido por denosumab hasta la actualidad, no habiendo presentado nuevas fracturas. En cuanto a sus factores de riesgo para OP, presenta una escasa ingesta de calcio en la dieta, es fumadora de 40 cigarrillos/día y tuvo la menopausia a los 45 años. La HH-HFE no produce afectación orgánica desde que fue diagnosticada y en ningún momento ha necesitado flebotomías; en su seguimiento siempre ha presentado la fosfatasa alcalina en rango normal. Como antecedentes personales de importancia, a los 66 años la paciente fue diagnosticada e intervenida quirúrgicamente de carcinoma de colon, y, además, es portadora heterocigota de la mutación de la protrombina.

**3ª paciente:** Se diagnosticó de OP a los 69 años y a los 74 años de HH-HFE (heterocigota para C282Y) por alteraciones del perfil férrico, que ya se observaban en el momento del diagnóstico de la OP. Fue tratada con calcio y vitamina D durante los 5 años de seguimiento, y en la última DXA presentó un T-score en el cuello femoral de -1,1 (empeoramiento con respecto al momento del diagnóstico: 0,3, pero ligera mejoría con respecto a la previa: -1,5) y de -2,3 en columna lumbar (leve mejoría con respecto al inicio: -2,6). No sufrió fracturas durante estos años. En cuanto a sus factores de riesgo para OP, tiene 2 hijos con quienes practicó lactancia materna y presentó la menopausia a los 45 años, es exfumadora, tiene una ingesta escasa de alimentos ricos en calcio, no realiza ejercicio físico de manera habitual y no tiene antecedentes de fracturas. La HH-HFE está adecuadamente controlada sin alteraciones orgánicas y en ningún momento necesitó flebotomías; durante su seguimiento siempre presentó la fosfatasa alcalina en rango normal. Como antecedente patológico de importancia, fue diagnosticada de hepatitis crónica por virus C con respuesta a tratamiento antiviral, que se mantuvo 9 años después.

**4ª paciente:** Diagnosticada de HH-HFE y posteriormente de OP lumbar a los 55 años. Ha estado en seguimiento en nuestra consulta durante 8 años, y en la última DXA presentó una T-score en el cuello femoral de -1,1 (siendo la inicial de -1,6) y en columna vertebral de -2,8 (mantenida estable con respecto al inicio del tratamiento). Al inicio y durante su evolución fue tratada con calcio, vitamina D y raloxifeno, no habiendo presentado fracturas. En cuanto a sus factores de riesgo de OP, tiene 1 hijo y no practicó lactancia materna, tuvo la menopausia a los 51 años, no es fumadora, realiza una ingesta adecuada de calcio en la dieta y ejercicio de forma habitual, y no tiene anteceden-

tes de fractura. No presenta alteraciones orgánicas por la HH-HFE y no fue necesario practicarle flebotomías durante su seguimiento; siempre tuvo la fosfatasa alcalina en rango normal. Como antecedente personal de importancia, padece hepatitis crónica C tratada con adecuada respuesta.

## Discusión

La osteodistrofia hepática es un término que se refiere a las enfermedades óseas (OP principalmente y osteomalacia, aunque ésta última es muy poco común) secundarias a enfermedades hepáticas crónicas<sup>1,2,6,12</sup>, como lo es la HH-HFE.

La HH es una enfermedad en la que se produce un aumento en los depósitos tisulares de hierro secundario a la disminución de producción o resistencia a la hepcidina, hormona que en situaciones de exceso de hierro disminuye la absorción intestinal de éste por parte de los enterocitos y la liberación de hierro por parte de los macrófagos<sup>1,10</sup>; esto produce elevación del hierro sanguíneo y de las reservas del mismo en el organismo con la consiguiente formación de depósitos patológicos en diversos tejidos (hígado, corazón, páncreas, articulaciones, huesos, hipófisis, piel, entre otros), generando múltiples sintomatologías según su localización, aunque la mayoría de los pacientes están asintomáticos en las etapas tempranas de la enfermedad dado que aun no presentan estos depósitos. Cabe destacar que los pacientes con HH presentan un aumento en la incidencia de cirrosis y carcinoma hepatocelular<sup>1,3,11</sup>.

La HH es una enfermedad de predominio en población caucásica y se han descrito 5 tipos: la más común es la alteración genética heredada de forma autosómica recesiva relacionada al gen HFE, siendo la forma de presentación más severa la C282Y homocigota, y la menos relevante la H63D<sup>10</sup>. Hay que tener en cuenta que el hecho de que un paciente sea homocigoto para la mutación C282Y no es diagnóstico de HH si no tiene elevación de los depósitos de hierro<sup>1</sup>, dado que el gen HFE tiene una penetrancia muy variable y no es posible saber qué pacientes homocigotos para C282Y van a desarrollar la enfermedad<sup>3</sup>.

Dentro de las condiciones relacionadas con la sobrecarga de hierro, la HH-HFE es la más común y en la que se producen la mayoría y más significativas complicaciones clínicas, aunque también encontramos causas secundarias menos comunes, como lo son: la talasemia mayor, la anemia sideroblástica, múltiples transfusiones, hemodiálisis de larga duración, las hepatitis crónicas B y C, la enfermedad hepática alcohólica y la no alcohólica, entre otras.

El tratamiento para la sobrecarga de hierro es flebotomías periódicas hasta la normalización de los parámetros analíticos, con lo que no sólo se consigue controlar los niveles de los depósitos de hierro en el organismo, sino que también mejoran y en ocasiones desaparecen las complicaciones secundarias de esta patología<sup>1</sup>.

En cuanto al tejido óseo, se ha observado que la artritis y la OP son las principales alteraciones

óseas relacionadas a la HH-HFE, siendo la artritis la más comúnmente asociada, llegando a presentarse hasta en un 80% de los pacientes, aunque el tratamiento con flebotomías no logra revertirla completamente una vez que ya está establecida<sup>1,9</sup>. La asociación entre OP y HH se conoce desde 1960 y la incidencia de OP se encuentra alrededor de 25-45%<sup>5,7,9</sup>. En un estudio realizado en Brasil se encontró que la presencia de artropatía, carcinoma hepatocelular, osteoporosis y diabetes era más común en los pacientes con HH-HFE, comparado con pacientes con sobrecarga de hierro por otras causas<sup>3</sup>.

Los mecanismos por los cuales se produce OP en enfermedades hepáticas crónicas no son totalmente conocidos, pero en cuanto a la HH-HFE se cree que es el aumento del hierro sanguíneo y no la cirrosis la principal causa de esta asociación, aunque en pacientes cirróticos, en los que hay mayor incidencia de hipogonadismo, se sabe que aumenta el número de casos de OP comparado con pacientes sin hipogonadismo ni cirrosis<sup>2,5,7,9</sup>, en la HH avanzada se puede llegar a cirrosis (con o sin hipogonadismo), lo cual se suma al efecto deletéreo del exceso de hierro en el hueso.

En 1989 Terrence Diamond *et al.* consideraron que el exceso de hierro sérico alteraba la función de los osteoblastos al disminuir la síntesis de matriz osteoide<sup>7</sup>, lo que ha sido corroborado por otros dos estudios, ambos *in vitro*, uno de los cuales concluye que la elevación del hierro sérico disminuye la mineralización ósea al aumentar la ferritina y su actividad feroxidasa, dado que ésta altera la función de los osteoblastos al modificar la actividad de los genes de la CBF- $\alpha$ 1 (involucrada en la maduración y diferenciación de osteoblastos), la osteocalcina y la fosfatasa alcalina de forma dosis-dependiente<sup>4</sup>. En el otro estudio también concluyen que la sobrecarga de hierro produce OP al inhibir la proliferación, diferenciación y mineralización de los osteoblastos, así como también disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina<sup>8</sup>.

Esto ha sido estudiado también por Valenti *et al.*, quienes consideran que la OP en la HH está relacionada con el hipogonadismo, la severidad de la sobrecarga de hierro y el bajo peso, difiriendo en cuanto a la fosfatasa alcalina, dado que encontraron que los niveles elevados también se correlacionan con OP, lo que consideran se puede deber a su relación con el hipogonadismo (en el que se encuentra aumentada la resorción ósea, dado que ésta estimula la actividad osteoclástica)<sup>5,7,12</sup>.

Para el diagnóstico adecuado de la OP se debe realizar una DXA, que también se debe solicitar a todos los pacientes con enfermedad hepática crónica, incluyendo HH (sobre todo HH-HFE)<sup>2,5,12</sup>, aunque la determinación de la periodicidad para la realización de este estudio en el seguimiento de los pacientes no ha sido determinada<sup>2,6</sup>. La localización más común de disminución de la T-score en la DXA en pacientes con HH-HFE es la columna lumbar, seguida del cuello femoral<sup>15,9</sup>.



En cuanto al tratamiento de la OP, se recomienda seguir las mismas pautas que en pacientes sin patología hepática, ajustando según características individuales, aunque se recomienda evitar la terapia de reemplazo hormonal en enfermedad hepática severa<sup>12</sup>. Para disminuir la sobrecarga de hierro en los pacientes con HH-HFE se ha visto que las flebotomías periódicas mejoran el perfil férrico y con esto también hay una mejoría en la función osteoblástica, lo que en ocasiones se puede ver reflejado en una disminución del valor de la T-score en la DXA<sup>5,7,12</sup>.

En cuanto a las 4 pacientes que hemos presentado, el diagnóstico de la HH-HFE se realizó por las alteraciones analíticas de forma precoz, y sin que llegaran a presentar daño en órgano diana en ninguno de los casos; teniendo en cuenta que este diagnóstico ha precedido o se ha realizado simultáneamente al de la OP (salvo en la 3ª paciente, aunque las alteraciones analíticas ya estaban presentes al momento del diagnóstico de la OP), podemos considerarlo un factor de riesgo asociado a los demás datos clínicos de cada paciente y no como la causa principal de la OP, por lo que se ha realizado seguimiento y control analítico para tratarla y evitar complicaciones de la HH-HFE como se haría en cualquier paciente que no tuviera OP.

En la primera paciente el hipogonadismo también es un factor de riesgo asociado para presentar OP, aunque esta patología siempre fue controlada por el servicio de Ginecología desde su diagnóstico. La siguiente paciente presenta escasa ingesta de calcio y es fumadora, lo que también contribuye a la presencia de OP junto con la HH-HFE. Haber sido fumadora, la baja ingesta de alimentos ricos en calcio y la falta de ejercicio físico son otros factores de riesgo asociados a la OP que presenta la tercera paciente, quien también ha presentado alteraciones leves del perfil férrico sin

llegar a necesitar flebotomías para corregirlo. Finalmente la última paciente no presenta otros factores asociados salvo la hepatitis C tratada, aunque no llega a desarrollar cirrosis ni otras complicaciones.

## Bibliografía

1. Crownover BK, Covey CJ. Hereditary Hemochromatosis. *Am Fam Physician*. 2013;8(3):183-90.
2. Collier J. Bone Disorders in Chronic Liver Disease. *Hepatology*. 2007;46:1271-8.
3. Evangelista AS, Nakhle MC, de Araújo TF, Abrantes-Lemos CP, Deguti MM, Carrilho FJ, et al. HFE genotyping in patients with elevated serum iron indices and liver diseases. *Biomed Res Int*. 2015;2015:164671.
4. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Zavaczki E, Balla G, et al. Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis. *J Bone Miner Res*. 2010;25(1):164-72.
5. Valenti L, Varenna M, Fracanzani AL, Rossi V, Fargion S, Sinigaglia L. Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporos Int*. 2009;20:549-55.
6. Guañabens N, Parés A. Liver and bone. *Arch Biochem Biophys*. 2010;503:84-94.
7. Diamond T, Stiel D, Posen S. Osteoporosis in hemochromatosis: iron excess, gonadal deficiency, or other factors? *Ann Intern Med*. 1989;110:430-6.
8. Yamasaki K, Hagiwara H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicol Lett*. 2009;191:211-5.
9. Sinigaglia L, Fargion S, Fracanzani AL, Binelli L, Battafarano N, Varenna M, et al. Bone and joint involvement in genetic hemochromatosis: role of cirrhosis and iron overload. *J Rheumatol*. 1997;24:1809-13.
10. McLaren GD, Gordeuk VR. Hereditary hemochromatosis: insights from the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:195-206.
11. Stephen A. Harrison, Bruce R. Bacon. Hereditary hemochromatosis: update for 2003. *J Hepatol*. 2003;38:S14-23.
12. Handzlik-Orlik G, Holecki M, Wilczyński K, Duława J. Osteoporosis in liver disease: pathogenesis and management. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2016;7(3):128-35.

Portal-Núñez S<sup>1,4</sup>, de la Fuente M<sup>2,4</sup>, Díez A<sup>3,4</sup>, Esbrit P<sup>1,4</sup>

1 Área de Reumatología y Metabolismo Óseo - Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz - UAM - Madrid (España)

2 Departamento de Fisiología Animal II - Universidad Complutense - Madrid (España)

3 Hospital del Mar-IMIM-Universidad Autónoma de Barcelona - Barcelona (España)

4 Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) - Instituto de Salud Carlos III - Madrid (España)

# El estrés oxidativo como posible diana terapéutica en la osteoporosis asociada al envejecimiento

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000400007>

Correspondencia: Sergio Portal Núñez - Área de Reumatología y Metabolismo Óseo - Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz - Avda. Reyes Católicos, 2 - 28040 Madrid (España)

Correo electrónico: [sportal@fjd.es](mailto:sportal@fjd.es)

Fecha de recepción: 19/02/2016

Fecha de aceptación: 13/06/2016

## Resumen

La osteoporosis senil o involutiva es un problema de primera magnitud en el mundo desarrollado. Estudios recientes apuntan al aumento del estrés oxidativo asociado al envejecimiento –cronológico o biológico– como un factor importante en su desarrollo. En esta revisión nos centraremos en las alteraciones del tejido óseo con la edad, en el origen del estrés oxidativo y su influencia negativa en el tejido óseo. Finalmente, abordaremos las posibles terapias antiestrés oxidativo que actualmente se encuentran en desarrollo en esta patología.

**Palabras clave:** *estrés oxidativo, osteoporosis, envejecimiento, fragilidad.*

## Oxidative stress as a possible therapeutic target for osteoporosis associated with aging

### Summary

Senile or involutinal osteoporosis is a major problem in the developed world. Recent studies point to increased oxidative stress associated with aging, whether biological or chronological, as an important factor in its development. In this review paper, we focus on bone tissue disorders related to aging, the source of oxidative stress and negative influence on bone tissue. Finally, we consider the potential oxidative stress therapies currently being developed for this disease.

**Key words:** *oxidative stress, osteoporosis, aging, fragility.*

## Introducción

El envejecimiento de la población de los países industrializados ha dado lugar al aumento de la prevalencia e incidencia de la osteoporosis. Se estima que aproximadamente 200 millones de personas en el mundo sufren esta patología<sup>1</sup>.

La osteoporosis, definida clásicamente como una disminución de la masa y la calidad ósea que incrementa el riesgo de fractura<sup>2</sup>, está muy relacionada con el envejecimiento, aunque los factores implicados no han sido totalmente identificados. Entre los factores relacionados con la osteoporosis involutiva se incluyen: el déficit estrogénico tras la menopausia<sup>3</sup>, el tratamiento con glucocorticoides<sup>4</sup>, la diabetes *mellitus* (DM), principalmente la tipo 2<sup>5</sup>; la insuficiencia renal<sup>6</sup> (causante de hiperparatiroidismo secundario); y, más recientemente, el aumento del estrés oxidativo, asociado a muchas de las situaciones anteriores<sup>7</sup>. En esta revisión profundizaremos en el papel del estrés oxidativo en el metabolismo óseo, así como sobre las posibles alternativas farmacológicas para paliar sus efectos deletéreos en la osteoporosis.

## Alteraciones óseas asociadas al envejecimiento

El hueso es un tejido en continuo proceso de remodelado, con gran capacidad regenerativa y de adaptación a los cambios fisiológicos. Este proceso tiene lugar en las conocidas como unidades de remodelado óseo, constituidas por diferentes tipos celulares: osteoclastos, osteoblastos y osteocitos (osteoblastos completamente diferenciados embebidos en la matriz mineralizada y verdaderos orquestadores del proceso de remodelado)<sup>8</sup>. El remodelado óseo está altamente regulado por factores genéticos, mecánicos, hormonales y por factores locales del hueso, lo que determina el resultado del balance óseo.

El pico de masa ósea se alcanza durante la pubertad en mujeres y algo más tarde en varones. Estos alcanzan una masa ósea superior, presentando huesos más grandes y más anchos, mientras que en el caso de las mujeres son más pequeños y de menor diámetro y espesor cortical. A partir de la tercera década de la vida se observa en ambos sexos un balance óseo negativo (con predominio de la resorción ósea) que conlleva una pérdida paulatina de masa ósea similar en ambos sexos, inicialmente en el hueso trabecular y posteriormente en el cortical<sup>9</sup>. Este declive se acelera tras la menopausia en la mujer debido a la pérdida de estrógenos, agentes con probada capacidad antioxidante, lo que contribuye a mantener una masa ósea inferior al de los varones durante el envejecimiento. Con la edad, se producen alteraciones metabólicas que afectan al hueso: cambios neuromusculares relacionados con la falta de movilidad; aumento de la producción endógena de glucocorticoides; e insuficiencia renal, con una menor síntesis de calcitriol. Además, durante el envejecimiento las fibras de colágeno óseo sufren cambios estructurales y el hueso pierde la capacidad de reparar microfracturas<sup>9</sup>. Todo ello contribuye al aumento de incidencia de fracturas.

La mayoría de los conceptos actuales sobre el desarrollo de la osteoporosis senil se han obtenido a partir de estudios en modelos experimentales, fundamentalmente en roedores. Sin embargo, a la hora de interpretar estos resultados hay que tener en cuenta algunas particularidades óseas que presentan los roedores con respecto a los humanos, como son el continuo modelado óseo a partir de la placa de crecimiento, la ausencia de menopausia, así como la carencia de sistema haversiano en el hueso cortical. Sin embargo, al igual que en humanos, en roedores se ha demostrado una pérdida de masa ósea asociada a la edad<sup>10</sup>. Así, en ratas se ha observado un deterioro estructural y de la capacidad regenerativa de los huesos largos con la edad del animal<sup>11</sup>. La pérdida de masa ósea en ratas envejecidas tiene relación con una disminución de la maduración osteoblástica y con un aumento del número de osteoclastos frente al de osteoblastos en el hueso trabecular<sup>12</sup>. Así mismo, en ratones consanguíneos en los que la masa ósea está regulada principalmente por factores genéticos, la pérdida de masa ósea asociada a la edad puede llegar a suponer hasta el 10% de la masa ósea total, que se atribuye a un descenso del remodelado óseo<sup>13-16</sup>.

De modo similar a lo observado en roedores, en humanos predomina al principio la pérdida de hueso trabecular con la edad, sobre todo en las mujeres<sup>17</sup>, relacionada en parte con un descenso en la actividad física y, como consecuencia, de los estímulos mecánicos en el tejido óseo<sup>18</sup>. A partir de los 70 años cobra más protagonismo la disminución del espesor cortical y se produce un aumento concomitante de la porosidad intracortical del fémur, mientras aumenta el área medular, tanto en varones como en mujeres<sup>19</sup>. Estos cambios se relacionan con el incremento del riesgo de fracturas osteoporóticas. Sin embargo, tanto en ratones como en humanos las propiedades mecánicas del tejido óseo están relativamente conservadas gracias a un aumento mantenido de mineral subperiosteal, lo que aumenta el momento de inercia<sup>20</sup>.

## Mecanismos asociados al envejecimiento óseo

Los mecanismos moleculares subyacentes a la osteoporosis involutiva se han comenzado a dilucidar en los últimos años. Asociada a la edad, se ha observado una disminución del cociente osteoprotegerina (OPG)/ligando del receptor activador del factor nuclear (NF)- $\kappa$ B (RANKL), siendo dicho cociente un modulador importante del remodelado óseo<sup>21</sup>. Tanto OPG como RANKL son producidos y secretados al medio extracelular por las células osteoblásticas y osteocitos. De hecho, estudios en ratones indican que los osteocitos producen la mayoría del RANKL, influyendo así de manera directa en el remodelado óseo<sup>22,23</sup>. La OPG es un receptor señuelo soluble que capta RANKL en el medio extracelular (o en la superficie de los osteoblastos) y le impide unirse a su receptor (RANK) en las células de estirpe osteoclástica, impidiendo así la maduración y activación de los osteoclastos. Así, la relación OPG/RANKL es un factor importante en el balance anabólico/cata-

bólico durante el remodelado óseo fisiológico<sup>24</sup>. De este modo, la disminución de la relación OPG/RANKL con la edad es compatible con el aumento de precursores osteoclasticos en la médula ósea de ratones viejos<sup>25</sup>. La apoptosis osteocítica juega un papel importante en la pérdida de masa ósea asociada a la edad y a la inmovilización o la falta de estímulos mecánicos<sup>26-28</sup> y, además, se asocia a un incremento de la expresión de RANKL<sup>21</sup>. Por otra parte, en ratones viejos de la cepa C57BL/6 se ha observado un aumento de la producción de glucocorticoides endógenos —a través de la activación de la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1—, un hecho relacionado con la reducción de viabilidad de las células óseas (osteoblastos y osteoclastos) y de la angiogénesis, un proceso fundamental en la formación ósea<sup>29</sup>.

Hay diversos factores que parecen afectar la tasa de reparación de fracturas con la edad<sup>30</sup>. Durante el envejecimiento existe una disminución de osteoprogenitores en la médula ósea, que ocurre paralelamente a un incremento de la adipogénesis<sup>31</sup>. Cabe señalar que tanto osteoblastos como adipocitos comparten una misma célula mesenquimal precursora diferenciable a uno u otro linaje en función del microambiente al que se ven expuestas estas células. Además, se ha demostrado que en los osteoblastos procedentes de ratones viejos la producción de RANKL aumenta en paralelo a la disminución de la expresión de OPG y que esta alteración se traduce en una mayor osteoclastogénesis y actividad osteoclastica<sup>21,25</sup>. Es de interés resaltar que, también asociada a la edad, se produce una disminución del número de células endoteliales y de la angiogénesis, que puede contribuir negativamente al proceso de reparación ósea en sujetos de edad avanzada<sup>32</sup>.

Recientemente se ha observado un aumento de masa ósea y una disminución del riesgo de fracturas en sujetos ancianos tratados con antagonistas de los receptores de angiotensina II<sup>33</sup>. El aparente efecto beneficioso para el hueso de estos fármacos se atribuye a la acción inhibitoria de la angiotensina II sobre diversos marcadores de diferenciación osteoblástica, como el factor de transcripción relacionado con runt 2 (Runx2), indispensable para la diferenciación osteoblástica, la osteocalcina y la fosfatasa alcalina<sup>34</sup>, y al incremento del RANKL, que favorece la diferenciación osteoclastica<sup>35</sup>. Estos datos sugieren que la hipertensión arterial prevalente en los ancianos podría también contribuir a la osteoporosis involutiva.

El producto del gen *Sost*, específico de los osteocitos y conocido como esclerostina, es un potente inhibidor de la formación ósea a través de su unión a los receptores relacionados con la lipoproteína de baja densidad 5 y 6, inhibiendo así la vía canónica de Wnt. Estudios recientes han demostrado que la esclerostina circulante aumenta en mujeres post-menopáusicas y con la edad en ambos sexos, lo que podría tener una influencia negativa sobre la masa ósea<sup>36,37</sup>.

Actualmente se sabe que un importante modulador del envejecimiento celular es el producto del

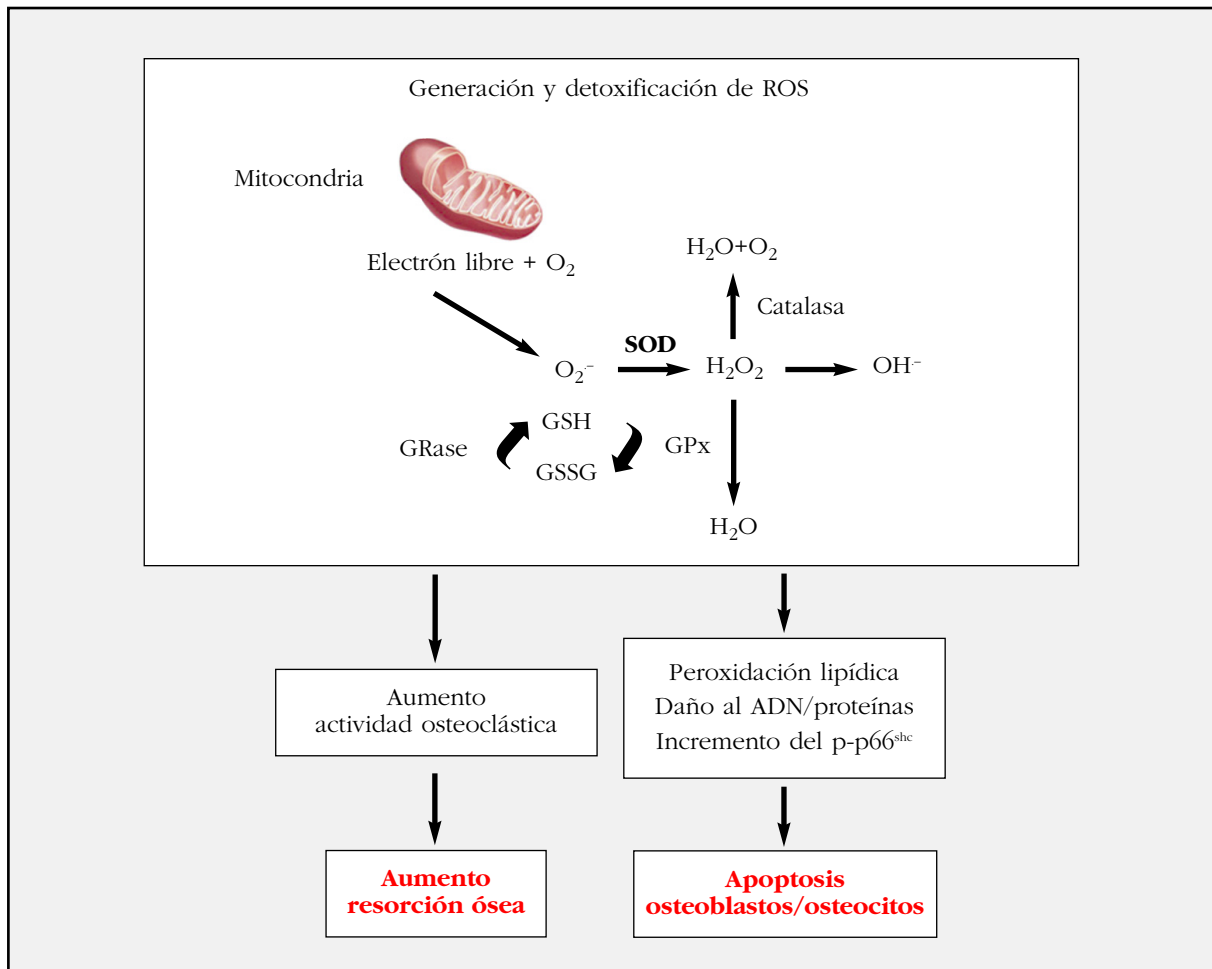
gen *Klotho*<sup>38</sup>, una proteína transmembrana que actúa como co-receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) 23 producido por los osteocitos e inductor de fosfatasa. Ratones deficientes en el gen *Klotho* sufren un envejecimiento acelerado y osteopenia, caracterizada por una reducción (20-40%) del grosor cortical en fémur, tibia y vértebras, y un bajo remodelado óseo con un descenso muy acusado de la formación ósea cortical. Las células estromales de la médula ósea de estos ratones presentan una disminución de su capacidad de formación de nódulos mineralizados y de la actividad de fosfatasa alcalina<sup>39</sup>. Paradójicamente, estos ratones deficientes en *Klotho* poseen un aumento de hueso trabecular en las vértebras y las metáfisis de los huesos largos; un efecto que los autores atribuyen a una activación selectiva de la vía Wnt sobre el componente trabecular. *Klotho* interacciona con la vía Wnt a través de su producto secretado, el cual se une a ligandos de esta vía inhibiendo su acción, de ahí que la ausencia de *Klotho* pueda dar lugar a la activación de la vía Wnt<sup>39</sup>. Por otro lado, se ha demostrado que ratones con ausencia de telomerasa presentan un aumento de la senescencia celular, así como un descenso en la masa ósea a los 3 meses del nacimiento, asociados a una reducción de formación ósea y de osteoblastogénesis<sup>40</sup>. Al parecer, esta reducción se debe a que los ratones sin telomerasa presentan osteoblastos poco diferenciados y al ambiente proinflamatorio que promueve la actividad osteoclastica.

### El estrés oxidativo como factor patogénico en la osteoporosis involutiva

El envejecimiento se puede considerar como una consecuencia del desequilibrio entre los agentes oxidantes producidos naturalmente en el metabolismo celular y las defensas antioxidantes, con predominio de los primeros. Esto se conoce como estrés oxidativo, el cual conlleva la oxidación de biomoléculas y la pérdida funcional de las células<sup>41,42</sup>. El aumento de estrés oxidativo, que se realiza fundamentalmente en la mitocondria, tiene como base el exceso de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), como el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), los radicales hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Este aumento no puede ser adecuadamente equilibrado por los sistemas antioxidantes, como la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), las enzimas del ciclo del glutatión (glutatión peroxidasa y glutatión reductasa) y la tioredoxina, entre otros. El exceso de ERO con la edad cronológica (y/o biológica), produce la oxidación de ADN, proteínas y lípidos e induce la fosforilación de la proteína mitocondrial p66<sup>shc</sup>, lo que lleva a la muerte celular<sup>7,43-45</sup> (Figura 1). Recientemente, se ha comprobado que el estrés oxidativo tiene también importantes funciones en la señalización celular<sup>46,47</sup>, y en este contexto, los ERO se pueden considerar segundos mensajeros de la respuesta inflamatoria. De hecho, oxidación e inflamación son dos procesos íntimamente relacionados que aumentan con la edad<sup>48</sup>.

Figura 1. Generación y daño celular producido por exceso de ERO. La generación de ERO es una consecuencia del metabolismo aeróbico en la cadena respiratoria mitocondrial. Enzimas como SOD, CAT y el sistema glutatión reductasa/glutatión peroxidasa se encargan de mantener los niveles fisiológicos de ERO. Sin embargo, cuando este equilibrio se descompensa por exceso de síntesis de ERO, se producen daños celulares que pueden llevar a la apoptosis de osteoblastos y osteocitos y al aumento de actividad de los osteoclastos

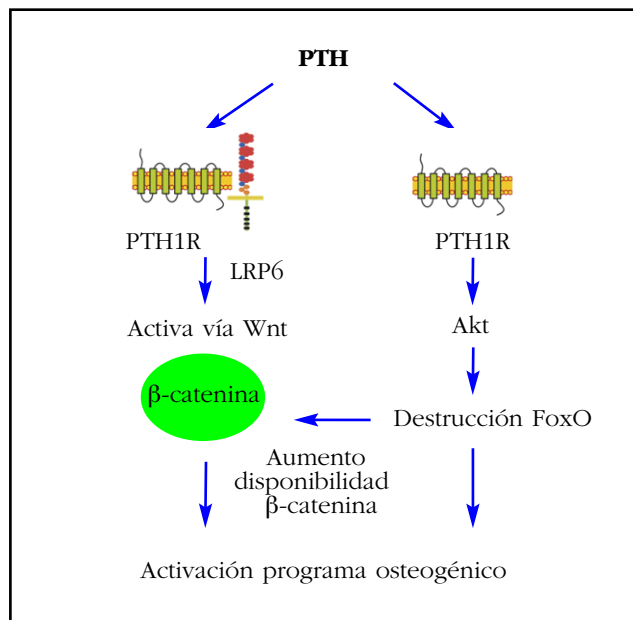


Aunque algunos investigadores han planteado dudas sobre si el estrés oxidativo es causa o consecuencia del envejecimiento, en los últimos años se ha implicado al mismo en el deterioro óseo<sup>49</sup>. En este sentido, utilizando diversos modelos animales: con envejecimiento prematuro, osteoporosis por déficit estrogénico (tras ovariectomía), o diabéticos, se constata un aumento de marcadores de estrés oxidativo en relación con una disminución de la formación ósea<sup>50-54</sup>. Los mecanismos por los que el estrés oxidativo induce efectos deletéreos en el tejido óseo no son aun bien conocidos. El aumento de ERO conduce a la estabilización de factores de transcripción *forkhead box O* (FoxO), una importante familia de factores de transcripción reguladores de multitud de genes con funciones tales como el control del metabolismo de la glucosa, la génesis tumoral y la defensa celular contra el estrés oxidativo<sup>55</sup>. FoxO 1 y 3 se expresan en hueso<sup>56</sup>, donde parecen jugar un papel clave en el mantenimiento de la formación ósea<sup>56</sup>. Se ha demostrado que la eliminación genética de FoxOs en ratones incrementa el estrés oxidativo en el hueso e induce la pérdida de masa ósea trabecular y cortical, asociada al

aumento de apoptosis osteoblástica/osteocítica y a una disminución de formación ósea<sup>57</sup>. La activación de FoxO por fosforilación conlleva su acoplamiento con la  $\beta$ -catenina<sup>57</sup>, provocando la inducción de genes de respuesta al estrés oxidativo, como GADD45 y CAT<sup>58</sup>. De hecho, la acción protectora del estrés oxidativo de la proteína Klotho citada anteriormente parece mediada por la activación de FoxOs<sup>39</sup>. Por otro lado, la activación de FoxO previene que la  $\beta$ -catenina actúe como factor de transcripción para estimular la proliferación y diferenciación de los osteoblastos<sup>56</sup>.

El aumento de ERO en las células óseas produce daños en el ADN genómico y apoptosis de los osteoblastos y osteocitos. Además, la peroxidación lipídica dependiente de lipoxigenasas activadas por el estrés oxidativo juega un papel importante en la pérdida ósea asociada al envejecimiento. Esto se evidencia al analizar la expresión de las lipoxigenasas Alox12 y Alox15 y la formación del 4-hidroxinonenal, un producto de peroxidación lipídica, aumentadas en el hueso de ratones viejos<sup>39</sup>. Además, se ha demostrado que los productos de oxidación lipídica inhiben la acción de factores osteogénicos<sup>60</sup>.

Figura 2. Acciones osteogénicas de la PTH a través de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. La PTH es capaz de activar directamente la vía Wnt gracias a la unión de su receptor tipo 1 (PTH1R) con el correceptor de las proteínas Wnt, el receptor relacionado con la lipoproteína de baja densidad 6 (LRP6). Además, la fosforilación de Akt producida por la activación de PTH1R da lugar a la degradación de FoxO, lo que favorece la estabilización de la  $\beta$ -catenina



Por otro lado, el aumento de ERO ha sido relacionado con un incremento de la osteoclastogénesis y de la actividad de los osteoclastos<sup>61,62</sup>. Recientemente se ha demostrado que la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4 (NOX 4) juega un papel fundamental en la osteoclastogénesis. Ratones deficientes para esta enzima, que produce constitutivamente ERO, tienen una elevada masa ósea y un déficit de los marcadores osteoclasticos; además, en muestras óseas humanas la actividad osteoclastica elevada se correlaciona con un aumento de actividad de NOX 4<sup>63</sup>. Por otro lado, cabe señalar que en situaciones de aumento de ERO asociado a la DM experimental, existen resultados dispares. Mientras que algunos autores han observado un aumento de la actividad osteoclastica<sup>64</sup>, se ha sugerido que podría estar en relación con la mayor severidad de la DM<sup>65</sup>, sin embargo, en otros modelos de DM se observa una actividad osteoclastica disminuida<sup>66</sup>. De hecho, estudios utilizando pre-osteoclastos murinos incubados en presencia de alta glucosa parecen confirmar su efecto inhibitorio sobre los osteoclastos<sup>67</sup>. Así pues, diferencias en el grado de la DM, la cepa y la edad del animal, podrían contribuir al diferente estado de la resorción ósea observado en diferentes modelos diabéticos<sup>65,68</sup>.

### Posibles terapias antiestrés oxidativo en la osteoporosis senil

El desarrollo de nuevas terapias anabólicas para la osteoporosis que combinen el aumento de la masa ósea con su capacidad para neutralizar los efectos perniciosos del estrés oxidativo es de sumo interés.

Una aproximación intuitiva para evitar el deterioro óseo con la edad estaría basada en la administración de agentes antioxidantes. Sin embargo, se ha apuntado que los antioxidantes clásicos, como puede ser la CAT o la N-acetilcisteína, ejercerían efectos indeseados en el tejido óseo, ya que actuarían como auténticos agentes antiosteoclastogénicos interfiriendo con el remodelado óseo<sup>69</sup>. Además, este tipo de agentes inhiben la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina cuya activación es de suma importancia para el mantenimiento de la formación ósea, en parte induciendo el secuestro de la proteína activadora *dishevelled* por la proteína reguladora del equilibrio redox, nucleoredoxina<sup>70</sup>.

Recientemente, se ha relacionado el efecto anabólico óseo asociado a la administración intermitente de la parathormona (PTH) con sus propiedades antiestrés oxidativo, como son el descenso de la cantidad de ERO, la inhibición de la fosforilación de p66<sup>shc</sup> y el aumento de la cantidad de glutatión total<sup>69</sup>. La ventaja de este tratamiento con la PTH frente a los antioxidantes clásicos la determina su acción estimuladora del remodelado óseo, con predominio de la formación ósea en parte a través de su interacción con la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina (Figura 2). En este contexto, se ha demostrado *in vitro* que los fragmentos N-terminal (1-36) (homólogo con la PTH) y C-terminal (107-109) de la proteína relacionada con la PTH (PTHrP),

son capaces de contrarrestar el estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células osteoprogenitoras en relación con su acción osteogénica<sup>52,71</sup>.

Estudios *in vitro* y en modelos animales sugieren que el resveratrol, un compuesto bifénolico del grupo de los antioxidantes polifenólicos, presente en la piel de la uva y de otros frutos<sup>72,73</sup>, podría ser un potencial agente antiosteoporótico. Este compuesto aumenta la proliferación y diferenciación de pre-osteoblastos de ratón MC3T3-E1 *in vitro*<sup>73</sup>. Además, se ha demostrado que la administración de resveratrol a células mesenquimales derivadas de células madre embrionarias humanas induce la expresión de Runx2<sup>74</sup> y su diferenciación a osteoblastos maduros<sup>75</sup>. Este mecanismo de acción del resveratrol parece estar mediado por la activación de la deacetilasa *Sirt1* que aumenta la expresión de *FoxO3a* y la formación de un complejo con el resveratrol, incrementando así la expresión de Runx2 (Figura 3). *Sirt1* podría también aumentar la actividad de Runx2 directamente al deacetilar a este factor de transcripción en células pre-osteoblásticas. En un reciente trabajo en ratas viejas se ha demostrado que la administración de resveratrol (10 mg/kg diariamente durante 10 semanas) mejora la calidad ósea y las propiedades biomecánicas del hueso osteoporótico<sup>76</sup>. Aunque estos resultados pre-clínicos son prometedores, todavía no hay datos contrastados que confirmen la eficacia del resveratrol en la osteoporosis senil en humanos. Sin embargo, cabe destacar un reciente estudio llevado a cabo en pacientes obesos y osteopénicos, en los que la administración oral de resveratrol (1 g diario durante 16 semanas) incre-

mentó la masa ósea de manera significativa, así como la cantidad de fosfatasa alcalina ósea, frente al grupo placebo<sup>77</sup>. Recientemente se ha publicado que ratones deficientes en *Sirt6*, otra deacetilasa relacionada con la respuesta al estrés oxidativo, presentan un fenotipo osteoporótico a edades tempranas. La ausencia de *Sirt6* se asocia a la sobreexpresión de Runx2, osterix y OPG, así como al aumento del inhibidor de la vía Wnt, Dickkopf 1, que conduce a un déficit de maduración osteoblástica y osteoclástica<sup>78</sup>. Estos datos apuntan a que *Sirt6* podría ser una diana terapéutica en la osteoporosis involutiva.

Por otro lado, el exceso de glucocorticoides también induce estrés oxidativo. En esta situación, el estrés oxidativo observado en el retículo plasmático puede ser revertido por la fosforilación del factor de iniciación de la traducción 2α, que interrumpe la traducción proteica. Recientemente se ha demostrado que el salubrinal, un compuesto que evita esta defosforilación, evita el déficit de mineralización de los osteoblastos tratados con glucocorticoides *in vitro*, así como la apoptosis osteoblástica y osteocítica en un modelo murino de osteoporosis por administración de prednisolona<sup>79</sup>.

Figura 3. Acción osteogénica del resveratrol por interacción con Sirt1. El resveratrol induce un aumento de actividad del factor de transcripción osteogénico Runx2 por deacetilación mediada por la deacetilasa Sirt1. Además, promueve la formación de un complejo de transcripción entre Foxo3a y Sirt1 que promueve el aumento de expresión de Runx2

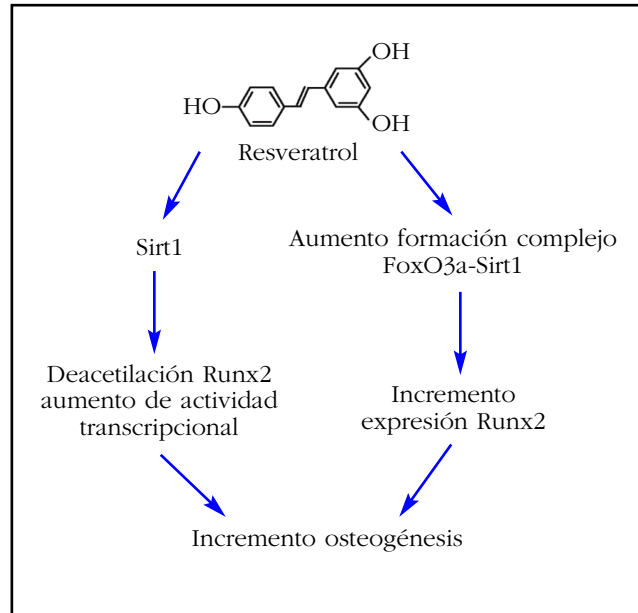
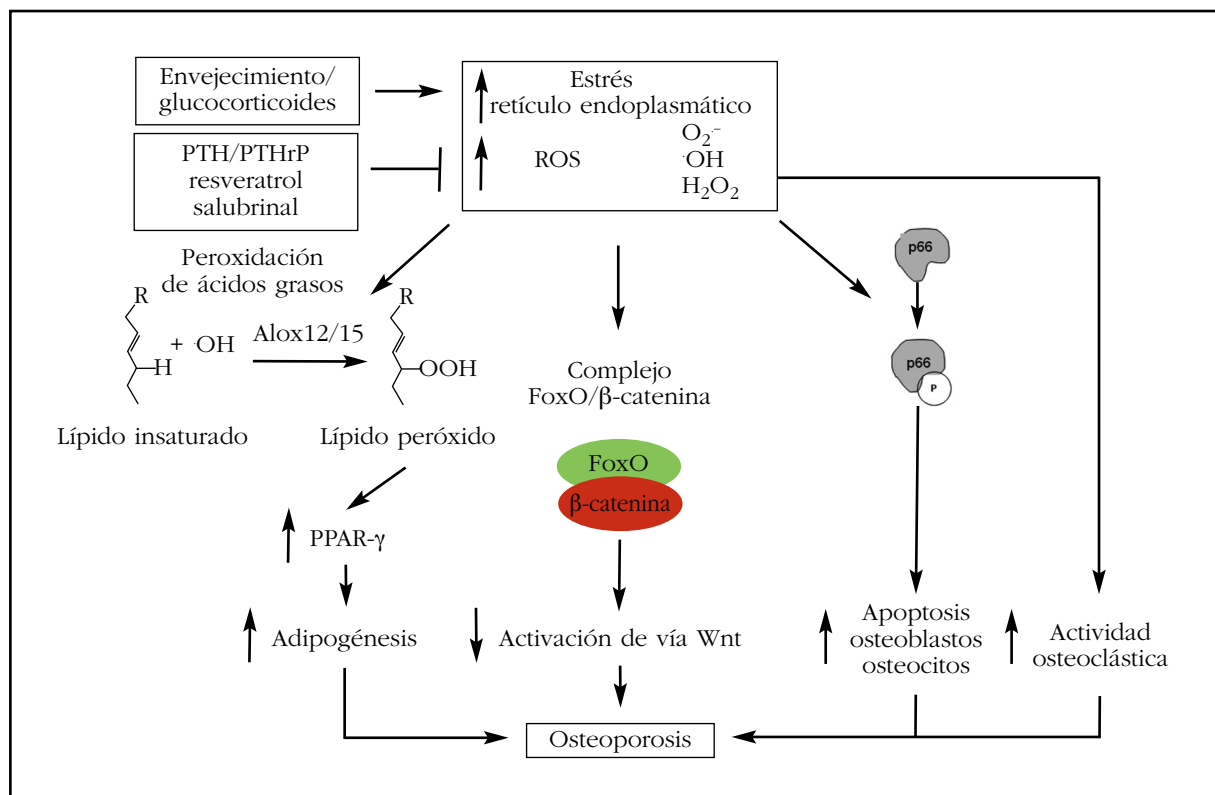


Figura 4. Papel del estrés oxidativo en el daño óseo asociado al envejecimiento. La alteración de la homeostasis mitocondrial con la edad provoca la generación de excesivas cantidades de ERO que sobrepasan la capacidad de los sistemas de detoxificación celular. En las células osteoformadoras, el exceso de ERO da lugar a: un aumento de la expresión del receptor del proliferador de peroxisoma activado gamma (PPAR-γ); el acoplamiento de FoxO con β-catenina, que inhibe la vía Wnt; y la fosforilación de la proteína p66 que induce la apoptosis. Este exceso de ERO favorece el aumento de actividad de los osteoclastos y la osteoclastogénesis. En conjunto, estos hechos alteran el remodelado óseo. La actividad antiestrés oxidativo de agentes como la PTH (y la PTHrP), el resveratrol y el salubrinal se asocia a sus acciones osteogénicas



## Conclusiones

El progresivo envejecimiento de la población en el mundo desarrollado conlleva un aumento de las patologías musculoesqueléticas, que incluyen la osteoporosis. La osteoporosis y el aumento de fragilidad de la población senil constituyen un reto socio-económico de primera magnitud. Diferentes factores contribuyen al deterioro óseo en los ancianos, entre los que destaca como elemento común el incremento de estrés oxidativo (Figura 4). Así pues, reducir el estrés oxidativo podría ser una herramienta útil para combatir la osteoporosis involutiva. Sin embargo, el hecho de que los compuestos antiestrés oxidativo podrían interferir con el remodelado óseo o con vías anabólicas claves para la formación ósea, como la vía Wnt, requiere ciertas consideraciones previas a su uso terapéutico. Hay que tener en cuenta también el papel fisiológico de las ERO, que actúan como mensajeros secundarios de muchas vías metabólicas; por tanto, su inhibición no controlada podría dar lugar a efectos secundarios no deseados en las células óseas. Así pues, son necesarias nuevas investigaciones que determinen el verdadero efecto de las terapias antioxidantes y sus pautas adecuadas de administración, evitando acciones deletéreas sobre el remodelado óseo. Teniendo en cuenta estas consideraciones, las terapias enfocadas a neutralizar el estrés oxidativo para prevenir o alterar el curso de la osteoporosis involutiva supondrían un avance sanitario evidente.

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

**Financiación:** Este trabajo ha sido financiado con Ayudas de la Fundación Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (Beca FEIOMM de Investigación Traslacional 2015), del Instituto de Salud Carlos III (RD12/0043/0022, PI11/00449, RD06/0013/1002, RD12/0043/0018 and RD12/0043/0008). SP-N disfruta un contrato RETICEF (RD06/0013/1002 y RD12/0043/0008).

## Bibliografía

- Cooper C, Campion G, Melton IJ. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int.* 1992;2:285-9.
- Reginster J-Y, Burlet N. Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone.* 2006;38:S4-9.
- Khosla S, Riggs BL. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005;34:1015-30, xi.
- Van Staa TP, Laan RF, Barton IP, Cohen S, Reid DM, Cooper C. Bone density threshold and other predictors of vertebral fracture in patients receiving oral glucocorticoid therapy. *Arthritis Rheum.* 2003;48:3224-9.
- Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes. *Calcif Tissue Int.* 2009;84:45-55.
- Miller PD. Bone disease in CKD: a focus on osteoporosis diagnosis and management. *Am J Kidney Dis.* 2014;64:290-304.
- Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2010;31:266-300.
- Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 2010;11:219-27.
- Bailey AJ, Knott L. Molecular changes in bone collagen in osteoporosis and osteoarthritis in the elderly. *Exp Gerontol.* 1999;34:337-51.
- Wang L, Banu J, McMahan CA, Kalu DN. Male rodent model of age-related bone loss in men. *Bone.* 2001;29:141-8.
- Liang CT, Barnes J, Seedor JG, Quartuccio HA, Bolander M, Jeffrey JJ, et al. Impaired bone activity in aged rats: alterations at the cellular and molecular levels. *Bone.* 1992;13:435-41.
- Roholl PJ, Blauw E, Zurcher C, Dormans JA, Theuns HM. Evidence for a diminished maturation of preosteoblasts into osteoblasts during aging in rats: an ultrastructural analysis. *J Bone Miner Res.* 1994;9:355-66.
- Kobayashi Y, Goto S, Tanno T, Yamazaki M, Moriya H. Regional variations in the progression of bone loss in two different mouse osteopenia models. *Calcif Tissue Int.* 1998;62:426-36.
- Ferguson VL, Ayers RA, Bateman TA, Simske SJ. Bone development and age-related bone loss in male C57BL/6j mice. *Bone.* 2003;33:387-98.
- Turner CH, Hsieh Y-F, Müller R, Bouxsein ML, Baylink DJ, Rosen CJ, et al. Genetic Regulation of Cortical and Trabecular Bone Strength and Microstructure in Inbred Strains of Mice. *J Bone Miner Res.* 2000;15:1126-31.
- Weiss A, Arbell I, Steinhagen-Thiessen E, Silbermann M. Structural changes in aging bone: osteopenia in the proximal femurs of female mice. *Bone.* 1991;12:165-72.
- Schaadt O, Bohr H. Different trends of age-related diminution of bone mineral content in the lumbar spine, femoral neck, and femoral shaft in women. *Calcif Tissue Int.* 1988;42:71-6.
- Hamrick MW, Ding K-H, Pennington C, Chao YJ, Wu Y-D, Howard B, et al. Age-related loss of muscle mass and bone strength in mice is associated with a decline in physical activity and serum leptin. *Bone.* 2006;39:845-53.
- Feik SA, Thomas CD, Clement JG. Age-related changes in cortical porosity of the midshaft of the human femur. *J Anat.* 1997;191:407-16.
- Stein MS, Thomas CD, Feik SA, Wark JD, Clement JG. Bone size and mechanics at the femoral diaphysis across age and sex. *J Biomech.* 1998;31:1101-10.
- Cao J, Venton L, Sakata T, Halloran BP. Expression of RANKL and OPG Correlates With Age-Related Bone Loss in Male C57BL/6 Mice. *J Bone Miner Res.* 2003;18:270-7.
- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011;17:1231-4.
- Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med.* 2011;17:1235-41.
- Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev.* 2008;29:155-92.
- Cao JJ, Wronski TJ, Iwaniec U, Phlegler L, Kurimoto P, Boudignon B, et al. Aging Increases Stromal/Osteoblastic Cell-Induced Osteoclastogenesis and Alters the Osteoclast Precursor Pool in the Mouse. *J Bone Miner Res.* 2005;20:1659-68.
- Jilka RL, O'Brien CA. The Role of Osteocytes in Age-Related Bone Loss. *Curr Osteoporos Rep.* 2016;14:16-25.
- Jilka RL, Noble B, Weinstein RS. Osteocyte apoptosis. *Bone.* 2013;54:264-71.
- Bikle DD, Sakata T, Halloran BP. The impact of skeletal unloading on bone formation. *Gravit Space Biol Bull.* 2003;16:45-54.
- Weinstein RS, Wan C, Liu Q, Wang Y, Almeida M, O'Brien CA, et al. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. *Aging Cell.* 2010;9:147-61.



30. Gruber R, Koch H, Doll BA, Tegtmeier F, Einhorn TA, Hollinger JO. Fracture healing in the elderly patient. *Exp Gerontol.* 2006;41:1080-93.
31. Gimble JM, Zvonice S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. Playing with bone and fat. *J Cell Biochem.* 2006;98:251-66.
32. Edelberg JM, Reed MJ. Aging and angiogenesis. *Front. Biosci.* 2003;8:s1199-209.
33. Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Treatment with beta-blockers, ACE inhibitors, and calcium-channel blockers is associated with a reduced fracture risk: a nationwide case-control study. *J Hypertens.* 2006;24:581-9.
34. Franceschi RT. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10:40-57.
35. Shimizu H, Nakagami H, Osako MK, Hanayama R, Kunugiza Y, Kizawa T, et al. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *FASEB J.* 2008;22:2465-75.
36. Ardawi M-SM, Al-Kadi HA, Rouzi AA, Qari MH. Determinants of serum sclerostin in healthy pre- and postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2011;26:2812-22.
37. Mödder UI, Hoey KA, Amin S, McCreedy LK, Achenbach SJ, Riggs BL, et al. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *J Bone Miner Res.* 2011;26:373-9.
38. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997;390:45-51.
39. Kuro-o M. *Klotho* and aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1790:1049-58.
40. Saeed H, Abdallah BM, Ditzel N, Catala-Lehnen P, Qiu W, Amling M, et al. Telomerase-deficient mice exhibit bone loss owing to defects in osteoblasts and increased osteoclastogenesis by inflammatory microenvironment. *J Bone Miner Res.* 2011;26:1494-505.
41. Harman D. About "Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009". *Biogerontology.* 2009;10:783.
42. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11:298-300.
43. De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des.* 2009;15:3003-26.
44. Almeida M, Ambrogini E, Han L, Manolagas SC, Jilka RL. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton. *J. Biol Chem.* 2009;284:27438-48.
45. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem.* 2007;282:27298-305.
46. Bindoli A, Rigobello MP. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18:1557-93.
47. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224:164-75.
48. Vida C, González EM, De la Fuente M. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr Pharm Des.* 2014;20:4656-78.
49. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Fujii H, Kasuga M, Fukagawa M. Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: a possible role of oxidative stress. *Bone.* 2007;40:1408-14.
50. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, et al. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem.* 2007;282:27285-97.
51. Brunet A. [Aging and the control of the insulin-FOXO signaling pathway]. *Médecine Sci. M/S.* 2012;28:316-20.
52. de Castro LF, Lozano D, Portal-Núñez S, Maycas M, De la Fuente M, Caeiro JR, et al. Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *J Cell Physiol.* 2012;227:1752-60.
53. Portal-Núñez S, Manassra R, Lozano D, Acitores A, Mulero F, Villanueva-Peñacarrillo ML, et al. Characterization of skeletal alterations in a model of prematurely aging mice. *Age (Dordr).* 2013;35:383-93.
54. Portal-Núñez S, Cruces J, Gutiérrez-Rojas I, Lozano D, Ardura JA, Villanueva-Peñacarrillo ML, et al. The vertebrae of prematurely aging mice as a skeletal model of involutional osteoporosis. *Histol Histopathol.* 2013;28:1473-81.
55. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene.* 2005;24:7410-25.
56. Ambrogini E, Almeida M, Martin-Millan M, Paik J-H, Depinho RA, Han L, et al. FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice. *Cell Metab.* 2010;11:136-46.
57. Essers MAG, de Vries-Smits LMM, Barker N, Polderman PE, Burgering BMT, Korswagen HC. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science.* 2005;308:1181-4.
58. Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol.* 2004;25:1495-500.
59. Huang MS, Morony S, Lu J, Zhang Z, Bezouglaia O, Tseng W, et al. Atherogenic phospholipids attenuate osteogenic signaling by BMP-2 and parathyroid hormone in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2007;282:21237-43.
60. Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA, et al. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest.* 2003;112:915-23.
61. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1990;85:632-9.
62. Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong D-W, Bae YS, et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood.* 2005;106:852-9.
63. Goettlich C, Babelova A, Trummer O, Erben RG, Rauner M, Rammelt S, et al. NADPH oxidase 4 limits bone mass by promoting osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 2013;123:4731-8.
64. Botolin S, Faugere M-C, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma expression in type I diabetic mice. *Endocrinology.* 2005;146:3622-31.
65. Motyl K, McCabe LR. Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. *Biol Proced Online.* 2009;11:296-315.
66. Verhaeghe J, Thomsen JS, van Bree R, van Herck E, Bouillon R, Mosekilde L. Effects of exercise and disuse on bone remodeling, bone mass, and biomechanical competence in spontaneously diabetic female rats. *Bone.* 2000;27:249-56.
67. Wittrant Y, Gorin Y, Woodruff K, Horn D, Abboud HE, Mohan S, et al. High d(+)glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bone.* 2008;42:1122-30.
68. Portal-Núñez S, Ardura JA, Lozano D, Bolívar OH, López-Herradón A, Gutiérrez-Rojas I, et al. Adverse effects of diabetes mellitus on the skeleton of aging mice. *J Gerontol A Biol Sci Med. Sci.* 2016;71:290-9.
69. Jilka RL, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Roberson PK, Weinstein RS, et al. Decreased oxidative stress and greater bone anabolism in the aged, when compared to the young, murine skeleton with parathyroid hormone administration. *Aging Cell.* 2010;9:851-67.
70. Funato Y, Michiue T, Asashima M, Miki H. The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled. *Nat Cell Biol.* 2006;8:501-8.

71. Lozano D, Fernández-de-Castro L, Portal-Núñez S, López-Herradón A, Dapía S, Gómez-Barrena E, et al. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopaenia. *Br J Pharmacol*. 2011;162:1424-38.
72. Farghali H, Kutinová Canová N, Lekić N. Resveratrol and related compounds as antioxidants with an allosteric mechanism of action in epigenetic drug targets. *Physiol Res*. 2013;62:1-13.
73. Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;253:859-63.
74. Tseng P-C, Hou S-M, Chen R-J, Peng H-W, Hsieh C-F, Kuo M-L, et al Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. *J Bone Miner Res*. 2011;26:2552-63.
75. Shakibaei M, Shayan P, Busch F, Aldinger C, Buhrmann C, Lueders C, et al. Resveratrol mediated modulation of Sirt-1/Runx2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: potential role of Runx2 deacetylation. *PLoS One*. 2012;7:e35712.
76. Tresguerres IF, Tamimi F, Eimar H, Barralet J, Torres J, Blanco L, et al. Resveratrol as anti-aging therapy for age-related bone loss. *Rejuvenation Res*. 2014;17:439-45.
77. Ornstrup MJ, Harsløf T, Kjær TN, Langdahl BL, Pedersen SB. Resveratrol increases bone mineral density and bone alkaline phosphatase in obese men: a randomized placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:4720-9.
78. Sugatani T, Agapova O, Malluche HH, Hruska KA. SIRT6 deficiency culminates in low-turnover osteopaenia. *Bone*. 2015;81:168-77.
79. Sato AY, Tu X, McAndrews KA, Plotkin LI, Bellido T. Prevention of glucocorticoid induced-apoptosis of osteoblasts and osteocytes by protecting against endoplasmic reticulum (ER) stress in vitro and in vivo in female mice. *Bone*. 2015;73:60-8.