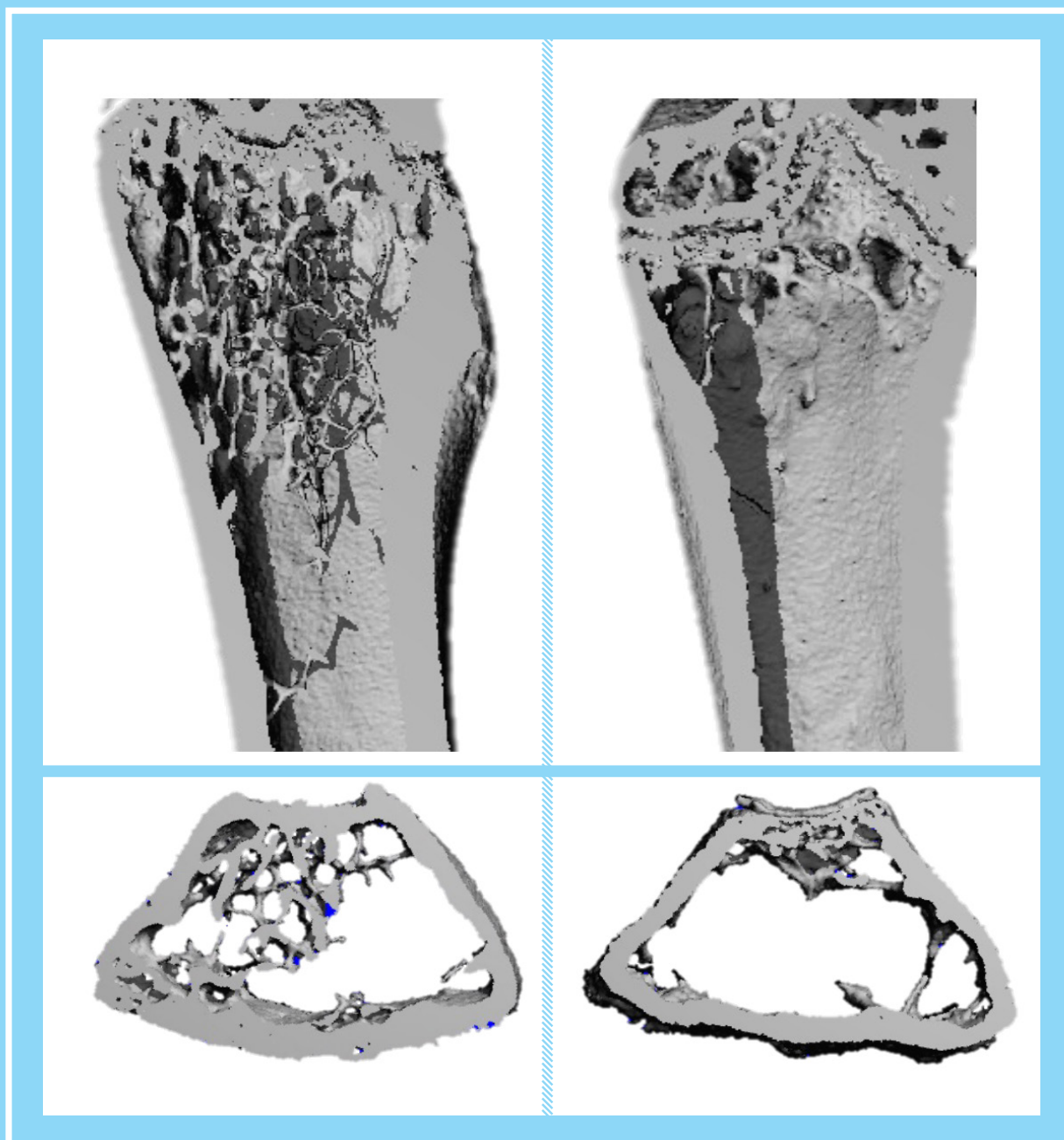




Revista de Osteoporosis  
y Metabolismo Mineral

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

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





## Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

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

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

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

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

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

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

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



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

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

ARÁN EDICIONES, S.L.

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



Revista de Osteoporosis  
y Metabolismo Mineral

---



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

---

**Presidente**

Guillermo Martínez Díaz-Guerra

**Vicepresidente**

Mercedes Giner García

**Secretaría**

Marta Martín Millán

**Tesorero**

Manel Ciria Recasens

**Vocales**

Enric Duaso Magaña  
María Pilar Aguado Acín

---



## Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

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

### DIRECTORAS

**Dra. Arancha Rodríguez de Gortázar**  
(Co-directora)

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

Correo electrónico: [argortazar@ceu.es](mailto:argortazar@ceu.es)

**Dra. Marta Martín Millán**  
(Co-directora)

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

Correo electrónico: [marta.martinm@scsalud.es](mailto:marta.martinm@scsalud.es)

### COMITÉ EDITORIAL

**Dra. Teresita Bellido**

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

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

Correo electrónico: [tmbellido@uams.edu](mailto:tmbellido@uams.edu)

**Dr. Jesús Delgado Calle**

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

Correo electrónico: [JDelgadocalle@uams.edu](mailto:JDelgadocalle@uams.edu)

**Dr. Manuel Díaz Curiel**

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

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

**Dr. Adolfo Díez Pérez**

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

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

Correo electrónico: [Adiez@parcdosalutmar.cat](mailto:Adiez@parcdosalutmar.cat)

**Dr. Luis Fernández de Castro**

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

Correo electrónico: [luis.fernandezdecastro@nih.gov](mailto:luis.fernandezdecastro@nih.gov)

**Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero**

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

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

**Dr. Oswaldo Daniel Messina**

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

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

Correo electrónico: [drosvaldodanielmessina@gmail.com](mailto:drosvaldodanielmessina@gmail.com)

**Dr. Manuel Naves Díaz**

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

Correo electrónico: [mnaves.huca@gmail.com](mailto:mnaves.huca@gmail.com)

**Dra. Lilian I. Plotkin**

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

Correo electrónico: [lplotkin@iupui.edu](mailto:lplotkin@iupui.edu)

**Dr. José Antonio Riancho Moral**

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

Correo electrónico: [rianchoj@unican.es](mailto:rianchoj@unican.es)

**Dr. Manuel Sosa Henríquez**

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

Correo electrónico: [manuel.sosa@ulpgc.es](mailto:manuel.sosa@ulpgc.es)

## Sumario

Vol. 16 ■ Julio-Septiembre ■ N.º 3

### Originales

#### Adherence to denosumab during the COVID-19 pandemic

Á. Pérez-Martín, J. R. López-Lanza, J. Bustamante-Odriozola, J. I. Gutiérrez-Revilla, M. J. Agüeros-Fernández, A. Pérez-Guijarro, J. M. Olmos, V. Martínez-Taboada, J. L. Hernández ..... 71

#### Preferencias de los pacientes de habla hispana para la comunicación del riesgo de fractura por osteoporosis. Un subestudio del *Risk Communication in Osteoporosis Study* (Estudio RICO)

X. Nogués, D. Ovejero, C. Giménez-Argente, J. Rodríguez-Morera, A. Rial-Villavecchia, E. García-Vives, M. L. Cos, J. Soldado-Folgado, M. Llaberia, A. Brasé, I. Petit, R. A. Sabaté, J. M. Mora-Luján, C. Beaudart, S. Silverman, M. Hilgsmann, N. García-Giralt y Grupo de Investigadores del Estudio RICO. .... 79

#### El efecto de las caídas sobre la salud percibida en población general y sus consecuencias clínicas

C. Gómez Alonso, M. Rodríguez García, C. Palomo Antequera, J. Montero Muñoz, N. Avello Llano, C. García Gil-Albert, L. Naves Mendivil, M. Llanea Faedo, T. Naves López, M. Naves Díaz ..... 88

#### Exploring NF- $\kappa$ B silencing biosafety in mesenchymal stem cells as a possible strategy for osteogenic augmentation

J. Cabello-Sanz, I. Álvarez-Iglesias, V. Lomele, D. García-Sánchez, A. González-González, F. M. Pérez-Campo ..... 97

### Artículo Especial

#### The most interesting papers on vitamin D published in 2023

J. L. Mansur ..... 108

#### Imagen de portada:

Imágenes de micro-TAC de secciones longitudinales y transversales de fémur de ratones CD1 controles y osteoporóticos.

Cedidos por Flor María Pérez-Campo. Universidad de Cantabria

## Original

# Adherence to denosumab during the COVID-19 pandemic

Álvaro Pérez-Martín<sup>1</sup>, José Ramón López-Lanza<sup>2</sup>, Javier Bustamante-Odriozola<sup>1</sup>, José Ignacio Gutiérrez-Revilla<sup>3</sup>, María José Agüeros-Fernández<sup>4</sup>, Alejandro Pérez-Guijarro<sup>1</sup>, José Manuel Olmos<sup>5</sup>, Víctor Martínez-Taboada<sup>6</sup>, José Luis Hernández<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Centro de Salud Isabel II. Santander, Spain. <sup>2</sup>Centro de Salud Vargas. Santander, Spain. <sup>3</sup>Division of Pharmacy. Hospital Sierrallana. Torrelavega, Santander. Spain. <sup>4</sup>Centro de Salud Zapatón. Torrelavega, Santander. Spain. <sup>5</sup>Bone Metabolism Unit. Internal Medicine Department. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL. Universidad de Cantabria. Santander, Spain. <sup>6</sup>Rheumatology Division. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL. Universidad de Cantabria. Santander, Spain

### Abstract

**Introduction:** we aimed to analyze whether the SARS-CoV-2 pandemic has led to a decrease in denosumab (Dmab) adherence in the population, and assess the incidence of subsequent fractures in non-adherent patients.

**Methods:** we assessed all patients who should have required the administration of a dose of Dmab in Cantabria (Spain), during the lockdown Sociodemographic variables, risk factors for osteoporosis, data on Dmab administration, and the reason for drug discontinuation were collected. Furthermore, the development of a subsequent clinical fracture during the following year was also analyzed.

**Results:** a total of 2948 patients should have received a new dose of Dmab during the lockdown months, but 546 (18.5 %) discontinued the drug. The main reason for withdrawal was the patient's own doing (65 %). The incidence of clinical fractures in the overall group was low (n = 45; 1.46 %) with only 4 vertebral and 3 hip fractures being reported. When the group that did not receive more doses of Dmab or an alternate antiosteoporotic agent was analyzed (n = 147), it was revealed that 2 patients (1.36 %) sustained a vertebral fracture and another one (0.68 %) a hip fracture during the year following the last dose of the drug.

**Conclusions:** there was a non-negligible percentage of patients who did not receive the dose of Dmab on time during the lockdown period. However, the incidence of clinical vertebral and non-vertebral fractures was low, even in the non-compliant subjects who did not receive a different antiosteoporotic agent. None of the patients sustained multiple vertebral fractures at the 1-year follow-up.

**Keywords:**  
Denosumab.  
Adherence.  
Osteoporosis.  
Fractures.

Received: 31/05/2024 • Accepted: 30/08/2024

*Funding:* some of the patients included who participated in the Camargo Cohort Study received a grant from Instituto de Salud Carlos III (PI21/00532) co-funded by FEDER funds provided by the European Union.

*Conflicts of interest:* Dr. Álvaro Pérez Martín declared to have received speaker's fees from Amgen. Dr. Javier Bustamante declared to have received speaker's fees from Amgen. Prof. José M. Olmos declared to have received speaker's fees from Amgen. Prof. José L. Hernández declared to have received research grants from Amgen and speaker's fees from Amgen, Servier, Daichi-Sankyo, and Organon. The remaining authors did not declare any conflicts of interest whatsoever.

*Artificial intelligence:* the authors declare not to have used artificial intelligence (AI) or any AI-assisted technologies in the elaboration of the article.

Pérez-Martín Á, López-Lanza JR, Bustamante-Odriozola J, Gutiérrez-Revilla JI, Agüeros-Fernández MJ, Pérez-Guijarro A, Olmos JM, Martínez-Taboada V, Hernández JL. Adherence to denosumab during the COVID-19 pandemic. Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(3):71-78

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00045

### Correspondence:

Álvaro Pérez Martín. Centro de Salud Isabel II.  
C/ Isabel II, n.º 17. 39002 Santander, Spain  
e-mail: alvaro.perez@scsalud.es

## INTRODUCTION

---

Osteoporosis is the most frequent metabolic bone disease and fragility fractures represent a major health problem (1,2). Among the available therapeutic schemes, denosumab (Dmab), a monoclonal antibody that acts as an inhibitor of the RANK ligand (RANKL), is usually administered via subcutaneous injection every 6 months, frequently in primary care centers. Dmab discontinuation without subsequent antiosteoporotic therapy leads to significant changes in bone remodeling, the so-called “rebound phenomenon”, and is associated with an increased risk of vertebral fractures (3,4).

The SARS-CoV-2 pandemic, which hit Spain with extraordinary virulence, has had a huge impact on the management of chronic diseases, including osteoporosis. The strict lockdown imposed by the Spanish government within the first months of the pandemic, changed the classic health care model, leading to an increase in telemedicine, delays in performing densitometric studies, and interruptions in drug supply and administration of parenteral drugs (5). Moreover, the potential risk of a flu-like reaction that could be mistaken for a COVID-19 infection after IV zoledronic acid administration (6) or fear of visiting the primary care center in association with the administration of Dmab represented an important dilemma for both clinicians and patients with osteoporosis (7).

Taking into account the above-mentioned considerations, we aimed to analyze whether the lockdown period has led to a decrease in adherence to Dmab and to study the features of non-adherent subjects. Besides, we also studied the potential development of subsequent clinical fractures in non-adherent patients vs those fully compliant with this monoclonal antibody.

## PATIENTS AND METHODS

---

All patients from our region (Cantabria, Spain) who should have required the administration of a dose of Dmab during the COVID-19 lockdown period in Spain, from March through June 2020 were included in the study. Nine patients were excluded because of incomplete data on the clinical chart. To detect non-compliant subjects, drug withdrawal in the pharmacy was analyzed and later checked in the patient's health history.

The study was conducted in Cantabria, a region in northern Spain, with a population of 581,641 inhabitants, an area of 5321 km<sup>2</sup>, and a population density of 109 inhabitants per km<sup>2</sup>. As Dmab is administered biannually, the data of those who received the last

dose from September to December 2019 were collected. The study was approved by Cantabria Ethics Committee (No. 2022.004).

## STUDY VARIABLES

Age, sex, the financial contribution of the patient to pharmacy costs, and the place of residence were collected as sociodemographic variables. An urban area was considered if the size of the population size exceeded 10,000 inhabitants.

Risk factors for osteoporosis including smoking, alcohol consumption, diseases or drugs affecting bone metabolism, previous drug use, history of fractures, and use of calcium and/or vitamin D supplements were also collected, as well as serum 25-hydroxyvitamin D levels (ng/mL) and bone densitometry parameters. Dmab onset and last dose date, the initial prescribing physician, and the reason for drug withdrawal were also gathered from the clinical charts.

The number and characteristics of the patients who did not receive the corresponding dose of Dmab or who received it with a delay of more than 1 month, as well as the variation in Dmab pick-up in pharmacies vs the previous year were also assessed. Finally, we analyzed the occurrence of subsequent clinical fractures at the 1-year follow-up. Data were obtained from the patients' health history. A total of 9 patients from the non-compliant group were excluded from the analysis because they did not present sufficient valid data on their clinical charts.

## STATISTICAL ANALYSIS

Results were expressed as numbers and percentages, mean  $\pm$  standard deviation (SD), or median and interquartile range (IQR), as appropriate. To compare quantitative and qualitative variables Student t-test and the chi-square test or Fisher's exact test were used, when appropriate. A two-tailed *p*-value < 0.05 was considered significant in all calculations.

## RESULTS

---

During the study period, a total of 2948 patients with osteoporosis should have received their correspondent dose of Dmab. Of these, 546 patients did not receive the subcutaneous injection (18.5 % of the entire sample).



The sociodemographic and clinical variables of the compliant and non-compliant groups are summarized in table I. The mean age was 76 years, female sex was predominant ( $n = 2732$ ; 92.7 %), as well as the urban residence ( $n = 2165$ ; 73.4 %) and a financial contribution < 10 % to the cost of the drug ( $n = 2639$ ; 89.5 %). Significant differences were found regarding the contribution to the cost of Dmab in pharmacy ( $p = 0.009$ ).

Figure 1 shows the distribution reason-wise of the non-compliant group. As can be seen, most patients discontinued their therapy on their own doing. Characteristics of Dmab prescription and reason for withdrawal in the group of patients who did not receive the drug at the scheduled time are shown in table II. Regarding pick-up Dmab data in pharmacies, -12.4%, -7.2%, -4.1%, and +10.8% were reported in March, April, May, and June 2020 vs the same months of the previous year. These figures represent a 12.9 % decrease in the entire study period. Table III shows the risk factors for osteoporosis and fragility fractures of the non-compliant group.

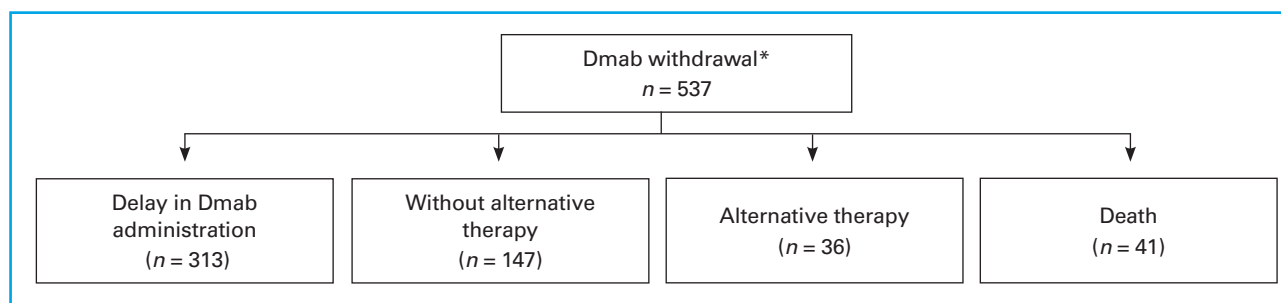
When stratifying these data by sex (Table IV), statistically significant differences were found for age, alcohol intake, and previous vertebral fractures (higher in men), and previous antiosteoporotic treatment and history of non-vertebral fractures (higher in women).

Table V summarizes the incidence of a subsequent fracture at the 1-year follow-up in the studied patients. When analyzing the group that did not receive more doses of Dmab (excluding deaths;  $n = 41$ , or 36 patients shifted to an alternate antiosteoporotic agent;  $n = 147$  [27.4 %]), 2 patients (1.36 %) sustained a vertebral fracture, and 1 (0.68 %) a hip fracture during the year following Dmab discontinuation. All fractures occurred in women. The first patient with a vertebral fracture after Dmab discontinuation was an 85-year-old woman who had sustained multiple previous vertebral fractures, and the second case was a 77-year-old woman who had sustained a previous vertebral fracture. The reason for Dmab withdrawal was mainly the patient's own doing (76.2 %;  $n = 112$ ), followed by the physician's decision (17 %;  $n = 25$ ) and the odontologist's advice (6.8 %;  $n = 10$ ).

Considering the overall group of patients on Dmab ( $n = 2402$ ), 21 patients (0.87 %) sustained a vertebral fracture, 10 (0.41 %) a hip fracture, and 4, other non-vertebral fractures (0.16) at the follow-up. One patient (2.7 %) of the non-compliant group with alternative antiosteoporotic therapy sustained a vertebral fracture within the next year, and another one (2.7 %) a hip fracture. Of note, the non-compliant group without alternative antiosteoporotic therapy was 15 older vs the group with Dmab administration delay, 11 years older vs the non-compliant group that did receive alternative therapy, and 6 years older vs the overall group.

**Table I.** Sociodemographic variables of the compliant and non-compliant groups

		Compliant group ( $n = 2402$ )	Non-compliant group ( $n = 546$ )	<i>p</i>
Age (years)		75.8 ± 9.6	76.5 ± 10.6	0.15
Sex	Female	$n = 2233$ (93 %)	$n = 499$ (91.4 %)	0.20
	Male	$n = 169$ (7 %)	$n = 47$ (8.6 %)	
Residency	Urban	$n = 1847$ (76.9 %)	$n = 318$ (76.8 %)	0.94
	Rural	$n = 555$ (23.1 %)	$n = 127$ (23.2 %)	
Financial contribution to the cost of drug	< 10 %	$n = 2167$ (90.2 %)	$n = 472$ (86.4 %)	0.009
	> 40 %	$n = 235$ (9.8 %)	$n = 74$ (13.6 %)	



**Figure 1.** Flowchart of patients who discontinued Dmab. \*A total of patients were excluded because they did not have sufficient valid data on their clinical charts.



**Table II.** Initial and final prescriber and cause of Dmab withdrawal in the non-compliant group

		<i>n</i>	%	
<b>Physician who starts treatment</b>	Rheumatology	195	36.3	
	Internal Medicine	142	26.4	
	Primary Care	123	22.9	
	Endocrinology	28	5.2	
	Traumatology	19	3.5	
	Gynecology	18	3.4	
	Other	12	2.3	
<b>Physician who withdraws</b>	<b>Primary Care</b>	16	23.9	
	<b>A different specialist</b>		41	61.2
		Rheumatologist	19	46.3
		Internist	14	34.1
		Palliative care physician	3	7.3
	Other	5	12.3	
<b>Odontologist</b>	10	14.9		
<b>Cause of withdrawal</b>	Patient's own doing	353	65.7	
	Postponed by the nurse	76	14.2	
	Primary care physician	16	3	
	A different physician	41	7.6	
	Odontologist	10	1.9	
	Death	41	7.6	

*\*A total of 9 patients were excluded because they did not have sufficient valid data on their clinical charts.*

**Table III.** Risk factors for fracture in the non-compliant group

	<i>n</i>	%
Previous osteoporosis treatment	266	49.5
Alcohol intake	39	7.3
Current smoking	42	7.8
Secondary osteoporosis	136	25.3
Corticosteroid use	69	12.8
<i>No. of previous treatment</i>		
1	164	62.4
2	53	20.2
3	24	9.1
4	5	1.9
> 4	20	6.4
Oral pharmacological calcium intake	173	32.2
Oral vitamin D intake	422	78.6
<i>Previous vertebral fracture</i>	172	32.1
1	81	47.9
2	47	27.8
3	21	12.4
4	12	7.1
> 4	8	4.7

(Continues on next page)

Table III (cont.). Risk factors for fracture in the non-compliant group

	<i>n</i>	%
Previous non-vertebral fracture	146	27.2
Hip	43	29.9
Distal forearm	36	24.7
Rib	10	24.7
Humerus	5	3.4
Other	52	13.7
Serum 25OH D level ( <i>n</i> = 317); mean ± SD (ng/mL)	27.9 ± 14.2	

Table IV. Sex-related sociodemographic and clinical variables of the non-compliant group

		Male ( <i>n</i> = 48)	Female ( <i>n</i> = 489)	<i>p</i>
Age (years), mean ± SD		79.0 ± 11.2	75.5 ± 10.4	0.03
Residence (%)	Urban	52.1 ( <i>n</i> = 25)	54.4 ( <i>n</i> = 266)	0.88
Financial contribution to the cost of the drug (%)	Reduced (< 10 %)	93.8 ( <i>n</i> = 45)	87.3 ( <i>n</i> = 427)	0.28
Current alcohol intake (%)		18.8 ( <i>n</i> = 9)	6.1 ( <i>n</i> = 30)	0.004
Current smoking (%)		10.4 ( <i>n</i> = 5)	7.6 ( <i>n</i> = 37)	0.67
Secondary osteoporosis (%)*		18.8 ( <i>n</i> = 9)	25.9 ( <i>n</i> = 127)	0.36
Corticosteroid use (%)		12.5 ( <i>n</i> = 6)	12.9 ( <i>n</i> = 63)	0.88
Previous osteoporosis treatment (%)		22.9 ( <i>n</i> = 11)	52.1 ( <i>n</i> = 255)	0.0002
No. of previous antiosteoporotic agents (%)	1	12.5 ( <i>n</i> = 6)	32.3 ( <i>n</i> = 158)	0.007
	2	4.2 ( <i>n</i> = 2)	10.4 ( <i>n</i> = 51)	0.26
	3	2.1 ( <i>n</i> = 1)	4.7 ( <i>n</i> = 23)	0.64
	4	4.2 ( <i>n</i> = 2)	0.6 ( <i>n</i> = 3)	0.09
	> 4	0 ( <i>n</i> = 0)	3.5 ( <i>n</i> = 17)	0.38
Pharmacological calcium intake (%)		35.4 ( <i>n</i> = 17)	31.9 ( <i>n</i> = 156)	0.74
Pharmacological vitamin D intake (%)		72.9 ( <i>n</i> = 35)	79.1 ( <i>n</i> = 387)	0.42
Serum 25OH D level (ng/mL), (mean ± SD)		28.9±14.1	27.9±14.2	0.10
Presence of previous vertebral fracture (%)		50.0 ( <i>n</i> = 24)	30.3 ( <i>n</i> = 148)	0.008
No. of previous vertebral fractures (%)	1	14.6 ( <i>n</i> = 7)	15.1 ( <i>n</i> = 74)	0.91
	2	27.1 ( <i>n</i> = 13)	6.9 ( <i>n</i> = 34)	0.0001
	3	4.2 ( <i>n</i> = 2)	3.9 ( <i>n</i> = 19)	0.76
	4	4.2 ( <i>n</i> = 2)	2.0 ( <i>n</i> = 10)	0.66
	5	0 ( <i>n</i> = 0)	1.6 ( <i>n</i> = 8)	0.49
Previous non-vertebral fracture (%)		12.5 ( <i>n</i> = 6)	28.6 ( <i>n</i> = 140)	0.02
Site of previous non-vertebral fracture (%)	Hip	2.1 ( <i>n</i> = 1)	8.6 ( <i>n</i> = 42)	0.19
	Distal forearm	0 ( <i>n</i> = 0)	7.4 ( <i>n</i> = 36)	0.10
	Rib	0 ( <i>n</i> = 0)	2.0 ( <i>n</i> = 10)	0.66
	Humerus	0 ( <i>n</i> = 0)	1.0 ( <i>n</i> = 5)	0.93
	Ankle	2.1 ( <i>n</i> = 1)	0.8 ( <i>n</i> = 4)	0.93
	Knee	0 ( <i>n</i> = 0)	0.4 ( <i>n</i> = 2)	0.43
	Foot	0 ( <i>n</i> = 0)	0.2 ( <i>n</i> = 1)	0.15

\*Secondary osteoporosis: hypogonadism, endocrine disorder (hyperparathyroidism, hyperthyroidism), GI, rheumatologic (rheumatoid arthritis), or organ transplantation.

**Table V.** Occurrence of a subsequent fractures at the 1-year follow-up

	Overall (n = 2939)*	Compliant group (n = 2402)	Delay in Dmab administration (n = 313)	Non-compliant group with alternative therapy (n = 36)	Non-compliant group without alternative therapy (n = 147)
Age (years; mean $\pm$ SD)	78.9 $\pm$ 8.2	79.3 $\pm$ 7.6**	70.5 $\pm$ 19.1**	74.0 $\pm$ 11.9**	85.0 $\pm$ 2.8
Total fractures (n)	43	35	2	3	3
Clinical vertebral fracture (n)	25	21	1	1	2
Overall clinical vertebral fractures (%)	0.85	0.87	0.31	2.7	1.36
Hip fractures (n)	13	10	1	1	1
Overall hip fractures (%)	0.44	0.41	0.31	2.7	0.68
Non-vertebral fractures (n)	5	4	0	1	0
Overall non-vertebral fractures (%)	0.17	0.16	0	2.7	0

\*A total of 9 patients were excluded because they did not present sufficient valid data on the clinical chart. \*\*p < 0.0001 vs the non-compliant group without alternative therapy.

Given the high risk of age-related fracture related in the non-compliant group without alternative treatment and the incidence of fracture in this group vs the other ones, it seems reasonable to suggest that there is no increased risk of fractures.

## DISCUSSION

Our study found that there was a non-negligible percentage of patients (18.5 %) who did not receive the correspondent dose of Dmab during the lockdown due to the COVID-19 pandemic in Cantabria, Spain.

Kocijan et al. (8) found a decrease in the prescription of this monoclonal antibody in Austria from March (22 %) and April (23 %) 2020 vs the previous 6 months. The same trend was noted in this period regarding IV zoledronate (36 % and 49 % decrease vs the previous year).

Fuggle et al. (5) noted that 43% of 209 health professionals from different parts of the world reported difficulties in treating osteoporosis during the COVID-19 pandemic. The main issues were problems obtaining the drug, delays in the administration of parenteral agents, and the reluctance of patients to go to their health center. In the specific case of parenteral drugs, 46% were administered appropriately, 3% had to switch these treatments to an alternative area, 21% delayed treatment until there was a lower risk of COVID-19, 13% switched to an oral drug, 8% were administered at home and 9% had some other issues such as self-administration of the dose by the patient at home. Primary care physicians prescribed Dmab in 15% of the cases, which involves shorter delays in drug administration than the one we found in the

present study (59.6%) (5). Additionally, these authors also found a lower percentage of switching to a different antiosteoporotic treatment (4.2 %), although they saw a greater percentage of change to an oral bisphosphonate (2.2 %) (5).

Peeters et al. (11) surveyed a total of 77 health care professionals in The Netherlands and found that 49% of patients on Dmab were properly treated by their family physician, and 33.4% were followed in the hospital outpatient clinics or at home via self-injection. Some 6.3% of patients reported a delay in Dmab administration, 8.3% were taught via video conference to self-administer the drug, and 1% discontinued treatment without starting another antiosteoporotic agent. These data indicate a lower percentage of withdrawal or Dmab administration delay than the one we found (5.0% and 10.6%, respectively).

Dmab discontinuation causes rebound high bone turnover and rapid bone loss within the first year, increasing the risk of major osteoporotic fractures, especially multiple vertebral fractures, particularly among subjects with previous vertebral fractures (3). Besides, the delayed administration of subsequent Dmab doses by more than 16 weeks has been associated with an increased risk for vertebral fractures vs on-time dosing. Nevertheless, evidence for an increased risk of fractures at different anatomical sites with long delays is insufficient (9).

Based on all this, Dmab should not be discontinued without switching to an alternative agent, usually bisphosphonates (4). This approach was very important during the SARS-CoV-2 pandemic, and the Joint Guidance on Osteoporosis Management in the Era of COVID-19 from the ASBMR, AACE, Endocrine Society, ECTS & NOF recommended that "for patients in whom

continued treatment with denosumab is not feasible within 7 months of prior denosumab injection, strongly consider transition to oral bisphosphonate if possible" ([www.asbmr.org](http://www.asbmr.org)).

Although we found no differences in the rate of clinical vertebral or nonvertebral fractures after Dmab discontinuation, we observed a crude higher percentage of vertebral fractures in the group of patients who discontinued Dmab and switched to other alternative therapy (2.7%) vs the compliant group (0.87%). The differences reported were not statistically significant, mainly because only 1 patient sustained a vertebral fracture in the latter group. There was also a slight, albeit non-significant increase in the group of withdrawal patients without alternative therapy (1.36%) while in those who delayed the dose the incidence of fractures was very similar to that of patients who received the scheduled dose of Dmab. It may be that the low frequency of fractures following the non-administration of Dmab at the scheduled time may be due, in most cases, to switching to a different drug. Indeed, in many cases, a delayed administration was reported (exceeding 2 months from the indicated time) but not an abrupt discontinuation without an alternative anti-osteoporotic agent. Another possible explanation could be the reduced physical activity, changes in lifestyle habits, and lower number of falls associated with the lockdown. However, we do not have collected these data to adequately analyze its influence on this outcome.

Regarding non-vertebral fractures, specifically hip fractures, the incidence of this type of fractures was also very low and non-significant across the study groups.

Noteworthy, in the placebo group of the FREEDOM study, the risk of new clinical vertebral fractures was 2.6% (1.6% with 2 or more vertebral fractures), 1.2% for hip fractures, and 8% for non-vertebral fractures (12). Furthermore, in a post-hoc analysis of the FREEDOM study of 1001 patients who discontinued Dmab during the study, 5.6% sustained vertebral fractures and 2.3% non-vertebral fractures (13). The rate of fractures in both studies was quite similar to that observed in our study.

In the FREEDOM extension study, Cosman found in the discontinuation group a crude annualized incidence of vertebral fracture of 11.8% ( $n = 56$ ) and 7.2% ( $n = 34$ ) in multiple vertebral fractures [9.5% ( $n = 31$ ) in the placebo group for vertebral fractures and 3.7% ( $n = 12$ ) for multiple vertebral fracture (14)].

In the COVID-19 era, we should reconsider the management strategies of patients with osteoporosis, highlighting and implementing therapeutic compliance. To achieve this, the methods of providing medical care must also be adapted, either by increasing virtual follow-up consultations or by facilitating a multidisciplinary ap-

proach with other health professionals. Although telemedicine reduces costs, waiting times, or trips, it also increases the uncertainty of physicians and patient and a possible medical and legal vulnerability (5).

The study has several limitations. First, the study was conducted in a specific area from northern Spain and included Caucasian people. Therefore, data could not be extrapolated to other geographical areas or ethnicities. Second, data have been reviewed from clinical charts, and the overall time on Dmab or the precise reasons for Dmab withdrawal cannot be well-defined in some cases. Third, the number of fractures was small and the short period of follow-up could be a limitation of the study since the long-term incidence of fractures was not assessed. Fourth, we only have data on clinical vertebral fractures, which required radiology. Finally, we do not have data on Dmab withdrawal during other periods before or after the lockdown.

In conclusion, the lockdown of the Spanish population within the first months of the SARS-CoV-2 pandemic in our health care field of expertise led to almost an 18% rate of Dmab discontinuation due to delayed administration, switch to a different antiosteoporotic agent, or definitive withdrawal without prescribing an alternative therapy. With the limitations inherent to this kind of study design, the interruption of Dmab during this COVID-19 pandemic was not followed by a significant increase in clinical and non-vertebral fractures vs the results of the FREEDOM study. None of the patients sustained multiple vertebral fractures at the 1-year follow-up. Despite these data, we consider that current scientific recommendations should be adopted in cases of Dmab withdrawal. In the COVID-19 era, clinicians should conduct more intensive and long-term follow-ups of osteoporotic patients on Dmab to prevent the fractures associated with the discontinuation of this monoclonal antibody.

## REFERENCES

1. National Institutes of Health (USA). Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy; 2001. DOI: 10.1001/jama.285.6.785
2. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden: A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos* 2013;8:136. DOI: 10.1007/s11657-013-0136-1
3. Cummings SR, Ferrari S, Eastell R, Gilchrist N, Jensen JB, McClung M, et al. Vertebral Fractures After Discontinuation of Denosumab: A Post Hoc Analysis of the Randomized Placebo-Controlled FREEDOM Trial and Its Extension. *J Bone Miner Res* 2018;33:190-8. DOI: 10.1002/jbmr.3337

4. Tsourdi E, Langdahl B, Cohen-Solal M, Aubry-Rozier B, Eriksen EF, Guañabens N, et al. Discontinuation of Denosumab therapy for osteoporosis: A systematic review and position statement by ECTS. *Bone* 2017;105:11-7. DOI: 10.1016/j.bone.2017.08.003
5. Fuggle NR, Singer A, Gill C, Patel A, Medeiros A, Mlotek AS, et al. How has COVID-19 affected the treatment of osteoporosis? An IOF-NOF-ESCEO global survey. *Osteoporos Int* 2021;8:1-7. DOI: 10.1007/s00198-020-05793-3
6. Popp AW, Senn R, Curkovic I, Senn C, Buffat H, Popp PF, et al. Factors associated with acute-phase response of bisphosphonate-naive or pretreated women with osteoporosis receiving an intravenous first dose of zoledronate or ibandronate. *Osteoporos Int* 2017;28:1995-2002. DOI: 10.1007/s00198-017-3992-5
7. Girgis CM, Clifton-Bligh RJ. Osteoporosis in the age of COVID-19. *Osteoporos Int* 2020;31:1189-91. DOI: 10.1007/s00198-020-05413-0
8. Kocijan R, Behanova M, Reichardt B, Haschka J, Kocijan A, Zwerina J. Poor adherence to parenteral osteoporosis therapies during COVID-19 pandemic. *Arch Osteoporos* 2021;16:46. DOI: 10.1007/s11657-021-00904-x
9. Lyu H, Yoshida K, Zhao SS, Wei J, Zeng C, Tedeschi SK, et al. Delayed Denosumab Injections and Fracture Risk Among Patients With Osteoporosis: A Population-Based Cohort Study. *Ann Intern Med* 2020;173:516-26. DOI: 10.7326/M20-0882
10. Pal R, Bhadada SK. Managing common endocrine disorders amid COVID-19 pandemic. *Diabetes Metab Syndr* 2020;14:767-71. DOI: 10.1016/j.dsx.2020.05.050
11. Peeters JJM, van den Berg P, van den Bergh JP, Emmelot-Vonk MH, de Klerk G, Lems WF, et al. Osteoporosis care during the COVID-19 pandemic in the Netherlands: A national survey. *Arch Osteoporos* 2021;16:11. DOI: 10.1007/s11657-020-00856-8
12. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, et al.; FREEDOM Trial. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2009;361:756-65. DOI: 10.1056/NEJMoa0809493
13. Cummings SR, Ferrari S, Eastell R, Gilchrist N, Jensen JB, McClung M, et al. Vertebral Fractures After Discontinuation of Denosumab: A Post Hoc Analysis of the Randomized Placebo-Controlled FREEDOM Trial and Its Extension. *J Bone Miner Res* 2018;33:190-8. DOI: 10.1002/jbmr.3337
14. Cosman F, Huang S, McDermott M, Cummings SR. Multiple Vertebral Fractures After Denosumab Discontinuation: FREEDOM and FREEDOM Extension Trials Additional Post Hoc Analyses. *J Bone Miner Res* 2022;37:2112-20. DOI: 10.1002/jbmr.4705

## Original

# Preferencias de los pacientes de habla hispana para la comunicación del riesgo de fractura por osteoporosis. Un subestudio del *Risk Communication in Osteoporosis Study* (Estudio RICO)

Xavier Nogués<sup>1,2</sup>, Diana Ovejero<sup>2</sup>, Carmen Giménez-Argente<sup>1</sup>, Jaime Rodríguez-Morera<sup>1</sup>, Abora Rial-Villavecchia<sup>1</sup>, Eloi García-Vives<sup>1</sup>, María Lourdes Cos<sup>1</sup>, Jade Soldado-Folgado<sup>1,2</sup>, Mariona Llaberia<sup>1</sup>, Ariadna Brasé<sup>1</sup>, Irene Petit<sup>1</sup>, Rosa Ana Sabaté<sup>1</sup>, Jose María Mora-Luján<sup>1</sup>, Charlotte Beaudart<sup>3</sup>, Stuart Silverman<sup>3</sup>, Mickael Hiligsmann<sup>4</sup>, Natalia García-Giralt<sup>2</sup> y Grupo de Investigadores del Estudio RICO\*

<sup>1</sup>Servicio de Medicina Interna. Hospital del Mar. Universidad Pompeu Fabra. Barcelona, España. <sup>2</sup>Grupo de Investigación Músculo-Esquelética. Hospital del Mar Research Institute. CIBERFES. Barcelona, España. <sup>3</sup>Departamento de Investigación en Servicios de Salud. CAPHRI Care & Public Health Research Institute. Maastricht University. Colaborador de la OMS para la Epidemiología de la Salud Musculoesquelética y el Envejecimiento, División de Salud Pública, Epidemiología y Economía de la Salud. University of Liège. Bélgica. <sup>4</sup>The OMC Research Center (Beverly Hills). USA Cedars-Sinai Medical Center. Los Angeles, California. EE. UU.

## Resumen

**Introducción:** el *Risk Communication in Osteoporosis Study* (RICO) es un estudio internacional multicéntrico que evaluaba las preferencias de las pacientes con osteoporosis sobre la comunicación del riesgo de fractura.

**Objetivo:** comparar los resultados de los países de habla hispana participantes en el estudio RICO para observar si las diferencias culturales confieren preferencias diferentes en la comunicación del riesgo de fractura.

**Métodos:** se reclutaron mujeres posmenopáusicas con diferentes riesgos de fractura y niveles de educación. Se diseñó un cuestionario estructurado en diferentes dominios, incluyendo datos sociodemográficos, conocimiento sobre la enfermedad y riesgo de fractura, preferencias gráficas, escritas y/o verbales respecto a la comunicación del riesgo de fractura, y opinión respecto a las decisiones terapéuticas una vez entendido este riesgo.

**Resultados:** de las 332 pacientes incluidas en el estudio internacional, 94 pertenecían a países de habla hispana. Entre ellas 36 eran de México, 30 de Argentina y 28 de España. Un porcentaje superior de participantes de España (78,6 %) y México (86,1 %) habían recibido información previa sobre su riesgo de fractura respecto a la media del estudio RICO internacional (56 %). Las pacientes de habla hispana prefirieron las formas visuales de comunicación impresas sobre el riesgo de fractura, pero acompañadas de una explicación verbal por parte de los profesionales sanitarios. Las pacientes de México mostraron preferencias diferentes a las pacientes de España en la mayoría de las presentaciones.

**Conclusiones:** transmitir la información sobre el riesgo de fractura de forma clara y adecuándose a las diferencias sanitarias y culturales de las pacientes contribuiría a mejorar el manejo terapéutico.

**Palabras clave:**  
Riesgo de fracturas.  
Estudio RICO.  
Comunicación pacientes.

Recibido: 20/06/2024 • Aceptado: 14/10/2024

\*Relación de coautores del Estudio RICO al final.

Natalia García-Giralt es la autora senior del artículo y Xavier Nogués el primer autor y autor autor de correspondencia.

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

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

Nogués X, Ovejero D, Giménez-Argente C, Rodríguez-Morera J, Rial-Villavecchia A, García-Vives E, Cos ML, Soldado-Folgado J, Llaberia M, Brasé A, Petit I, Sabaté RA, Mora-Luján JM, Beaudart C, Silverman S, Hiligsmann M, García-Giralt N y Grupo de Investigadores del Estudio RICO. Preferencias de los pacientes de habla hispana para la comunicación del riesgo de fractura por osteoporosis. Un subestudio del *Risk Communication in Osteoporosis Study* (Estudio RICO). *Rev Osteoporos Metab Miner* 2024;16(3):79-87

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00048

## Correspondencia:

Xavier Nogués Solán. Servicio de Medicina Interna. Hospital del Mar. Pg. Marítim de la Barceloneta, 25, 29. 08003 Barcelona e-mail: xnogues@psmar.cat



## INTRODUCCIÓN

El modelo de la toma de decisiones de forma compartida médico-paciente se fundamenta en la utilización de herramientas de información que permiten al paciente un mayor conocimiento de su enfermedad. Las herramientas de decisión compartida con respecto a la realización de pruebas diagnósticas y/o tratamientos, se iniciaron durante el siglo XX (1,2), momento en el cual la sociedad empezó a ser cada vez más exigente con la obtención de información sobre las enfermedades (3).

La prevalencia actual de osteoporosis (OP) en la mujer posmenopáusica a nivel mundial se situaría en cifras del 23,1 % y, en el hombre mayor de 50 años, en un 11,7 % (4). En una proyección situada en el año 2050, considerando el incremento de la población mayor de 60 años, la estimación del número de fracturas osteoporóticas, se situaría en un escenario a nivel mundial de 6,26 millones de fracturas de cadera (5). Es decir, la OP es una enfermedad extraordinariamente prevalente y con unas consecuencias que pueden impactar de manera muy significativa a quienes la padecen y que condicionará la sanidad de forma importante en los próximos años.

La información clara e inteligible para el paciente sobre del riesgo de fractura por parte del médico es un aspecto de comunicación médico-paciente clave en la relación que se mantiene con los pacientes diagnosticados de OP. La transmisión adecuada de información al paciente permite una mayor comprensión de la enfermedad, conocer las consecuencias de la misma, la eficacia y los efectos secundarios de los tratamientos, y es útil para compartir la decisión terapéutica final y reforzar de forma positiva la adherencia a los tratamientos (2,6).

En relación a la OP, existe una discrepancia entre el número de pacientes con fracturas por fragilidad y el número de pacientes que están en tratamiento para evitar nuevas fracturas (7). Este dato indica que muchos pacientes permanecen en un alto o muy alto riesgo de padecer una nueva fractura por fragilidad, en parte por no haber recibido suficiente información sobre las consecuencias de la OP.

No obstante, informar a los pacientes sobre la OP y del riesgo de padecer nuevas fracturas en un lenguaje transparente y adecuado no es fácil. Esta complejidad viene dada en parte por la variedad de temas a abordar, incluyendo la alimentación, ejercicios, elementos nocivos a evitar, y opciones terapéuticas, así como por la escasez de herramientas de comunicación establecidas para transmitir este tipo de datos a los pacientes (8). Asimismo, tampoco es frecuente que los pacientes osteoporóticos, que ya han padecido una fractura, reciban suficiente información sobre el riesgo de padecer una nueva fractura a pesar de que existen he-

rramientas de predicción específicas como el FRAX (9). Esto contrasta con lo que ocurre en otras enfermedades como el cáncer, enfermedad en la que los pacientes cada vez comparten más decisiones sobre las opciones terapéuticas en base al riesgo de recidiva (10).

En este contexto se desarrolló el estudio "the Risk Communication in Osteoporosis (RICO)" (11), un estudio internacional multicéntrico basado en una encuesta estructurada a mujeres con osteoporosis, con y sin fracturas por fragilidad, con el objetivo de conocer sus preferencias en cuanto a cómo recibir información sobre el riesgo de padecer una fractura por fragilidad.

En el presente estudio se presenta un subanálisis del RICO en el que se analizan y se comparan los resultados obtenidos en los países participantes de lengua hispana, es decir, México (MEX), Argentina (ARG) y España (ES), para observar si las diferencias culturales confieren preferencias diferentes en el ámbito de la comunicación del riesgo de fractura.

## MÉTODOS

### DISEÑO Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El diseño y la metodología del estudio "the Risk Communication in Osteoporosis (RICO)" se ha publicado recientemente (11). Brevemente, se diseñó un estudio internacional basado en una encuesta estructurada que se realizó a mujeres con osteoporosis con y sin fracturas por fragilidad, con y sin fracturas previas y con diversos niveles de educación recibida, con el objetivo de conocer sus preferencias en cuanto a cómo recibir información de su riesgo de padecer una fractura por fragilidad. Además, se evaluaron la relevancia e importancia de las diferentes modalidades de comunicación y se estableció un modelo que se acercara a cada una de las poblaciones estudiadas.

El objetivo en este subestudio es evaluar las preferencias de comunicación de las pacientes de habla hispana.

A continuación, se describen las características principales del estudio.

### Ámbito del estudio

El estudio RICO se realizó con pacientes de 11 centros de diversos países: Estados Unidos, Canadá, Argentina, México, España, Bélgica, Holanda, Reino Unido y Japón. Los centros participantes fueron invitados por los coordinadores del estudio de forma individual y a



través asociaciones de pacientes como la *Canadian Osteoporosis Patient Network* y la *UK Royal Osteoporosis Society*.

### Criterios de inclusión

Cada centro debía incluir a 30 mujeres posmenopáusicas con osteoporosis o con riesgo de fractura. Cada centro debía incluir al menos 10 pacientes con fracturas por fragilidad y 10 sin fracturas previas. También debían tener diferentes niveles de educación, al menos 10 con estudios superiores y 10 solo con estudios primarios. Respecto al tratamiento, al menos 10 pacientes debían estar tomando activamente tratamiento farmacológico para la osteoporosis y 10 sin tomar este tipo de medicación.

### Diseño de la encuesta

La metodología de cómo se diseñó la encuesta y del estudio piloto que se realizaron previamente están ampliamente descritos en Beaudart y cols. (11). Brevemente, una serie de expertos desarrollaron un cuestionario en lengua inglesa, en el que invitaron a participar a pacientes para dar sugerencias sobre el diseño del mismo y que concluyó finalmente con un cuestionario estructurado en diversos dominios.

El cuestionario final, que se presenta en el [anexo 1 \(https://www.revistadeosteoporosisymetabolismomix.com/anexos/00048-01.pdf\)](https://www.revistadeosteoporosisymetabolismomix.com/anexos/00048-01.pdf), fue traducido a diferentes idiomas: francés, chino, japonés y español con las diferentes acepciones de España, Latino América y Centro América.

El cuestionario se estructuró en diversos apartados: 1) una introducción sobre el objetivo del estudio y recogida de datos socio-demográficos; 2) una segunda parte para conocer cuál era el conocimiento y la interpretación de los pacientes sobre el riesgo de fractura; 3) una parte más dirigida a conocer las preferencias de los pacientes de cómo recibir información sobre el riesgo de fractura, numérica o escrita, modalidades de presentación en forma verbal, colores rojo-amarillo-verde, o iconos en forma de caras; y 4) conocer la opinión sobre la recepción de información de las consecuencias de las fracturas, y sobre cuándo considerarían empezar el tratamiento si el riesgo de fractura se presentaba a 2 o 10 años.

### Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por Advarra, un Comité de Ética Institucional de Estados Unidos y por los comités locales que lo requirieron. En España se obtuvo

la aprobación del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Parc de Salut Mar núm. 2022/10299, "Improving Risk Communication in Osteoporosis (RICO)", código de protocolo 20197347.

### Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico SPSS Statistics 24 (IBM Corporation, Armonk, NY, United States). Las diferencias en las características y preferencias de las pacientes entre los países se analizaron mediante chi-cuadrado o test exacto de Fisher para las variables categóricas/binarias y con *one-way ANOVA* para las variables cuantitativas. Las diferencias dentro de un mismo país se analizaron mediante chi-cuadrado Goodness of Fit. Se consideró un *p*-valor < 0,05 como significativo.

## RESULTADOS

En el estudio global se incluyeron un total de 332 mujeres con una edad media de  $67,5 \pm 8,0$  años, de las cuales 94 pertenecían a países de habla hispana: MEX ( $n = 36$ ), ARG ( $n = 30$ ) y ES ( $n = 28$ ). En la tabla I se muestran las características demográficas de las pacientes. En estos 3 países, un 81,9 % de las participantes refirieron haber sido diagnosticadas de OP por sus médicos, situándose este valor por encima del 70 % obtenido en el estudio global. Un 40,4 % de las mujeres de estos 3 países refirieron haber tenido una fractura, con el rango de la prevalencia situado entre el 50 % en ES, el 41,7 % en MEX y el 30 % en ARG ( $p = 0,295$ ). A nivel de tratamiento, destaca que el 75 % de las participantes de ES recibían tratamiento farmacológico mientras que en MEX solamente un 38,9 % ( $p < 0,01$ ) y ARG se situaba a un nivel intermedio con un 50 %.

Al inicio de la entrevista, se preguntaba a las participantes por la educación recibida y específicamente por su habilidad con los números. En ES y ARG, un 46 % de las pacientes refirió sentirse comfortable con los elementos numéricos, frente a un 66,7 % de las pacientes de MEX (Tabla I).

Cuando se les preguntó a las participantes si consideraban importante recibir información sobre su riesgo de fractura en una escala ascendente del 1 al 7, los resultados fueron de  $6,79 \pm 0,6$  en ES,  $6,23 \pm 1,3$  en ARG y  $6,19 \pm 1,8$  en MEX, sin diferencias significativas entre los tres países.

Un 78,6 % de las participantes de ES refirieron haber recibido previamente información sobre su riesgo de fractura, un 46,7 % en ARG y un 86,1 % en MEX, habiendo diferencias significativas entre ARG y los otros dos países de habla hispana ( $p = 0,007$ ).

Tabla I. Características clínicas y sociodemográficas de la población incluida en el estudio

	Todos (n = 94)	Mexico (n = 36)	Argentina (n = 30)	España (n = 28)	p-valor <sup>1</sup>
<i>Formato de la entrevista</i>					
Online	27 (28,7 %)	26 (72,2 %)	0 (0,0 %)	1 (3,6 %)	p < 0,001
Directa	67 (71,3 %)	10 (27,8 %)	30 (100, %)	27 (96,4 %)	
Edad (años)	67,9 ± 8,1	66,5 ± 7,36	68,2 ± 8,55	69,4 ± 8,69	0,007
<i>Estudios</i>					
Primarios	16 (17,0 %)	4 (11,1 %)	2 (6,7 %)	10 (35,7 %)	
Secundarios básicos	11 (11,7 %)	6 (16,7 %)	2 (6,7 %)	3 (10,7 %)	
Secundarios superiores	16 (17,0 %)	4 (11,1 %)	9 (30,0 %)	3 (10,7 %)	
Post secundarios	10 (10,6 %)	2 (5,5 %)	8 (26,6 %)	0 (0,0 %)	
Universitarios	41 (43,7 %)	20 (55,6 %)	9 (30,0 %)	12 (42,9 %)	
Diagnóstico de OP	77 (81,9 %)	27 (75,0 %)	22 (73,3 %)	28 (100 %)	NS
En tratamiento para OP	50 (53,1 %)	14 (38,9 %)	15 (50 %)	21 (75 %)	p < 0,01
Historia de fractura	38 (40,4 %)	15 (41,7 %)	9 (30,0 %)	14 (50,0 %)	NS
<i>Fracturas previas</i>					
Columna	8	0	1	7	
Cadera	6	1	3	2	
Muñeca	13	8	1	4	
Húmero	9	4	3	2	
Otras	13	6	2	5	

<sup>1</sup>p-valor entre los diferentes países mediante chi-cuadrado (o Fisher test) para variables categóricas/binarias y one-way ANOVA para cuantitativas; OP: osteoporosis.

## Preferencias de gráficos

Cuando se les preguntó sobre la preferencia para recibir información sobre el riesgo de fractura entre tres propuestas del gráfico de colores rojo-amarillo-verde (Fig. 1A), el 78,6 % de las pacientes de ES prefirieron información en forma de flecha de colores rojo-amarillo-verde de forma significativa respecto a las otras dos opciones ( $p = 0,001$ ). Por otro lado, las participantes de MEX y ARG difirieron en este punto frente a ES, optando por la forma semafórica vertical en un 58,3 % y 40 %, respectivamente ( $p = 0,001$ ) (Fig. 1B).

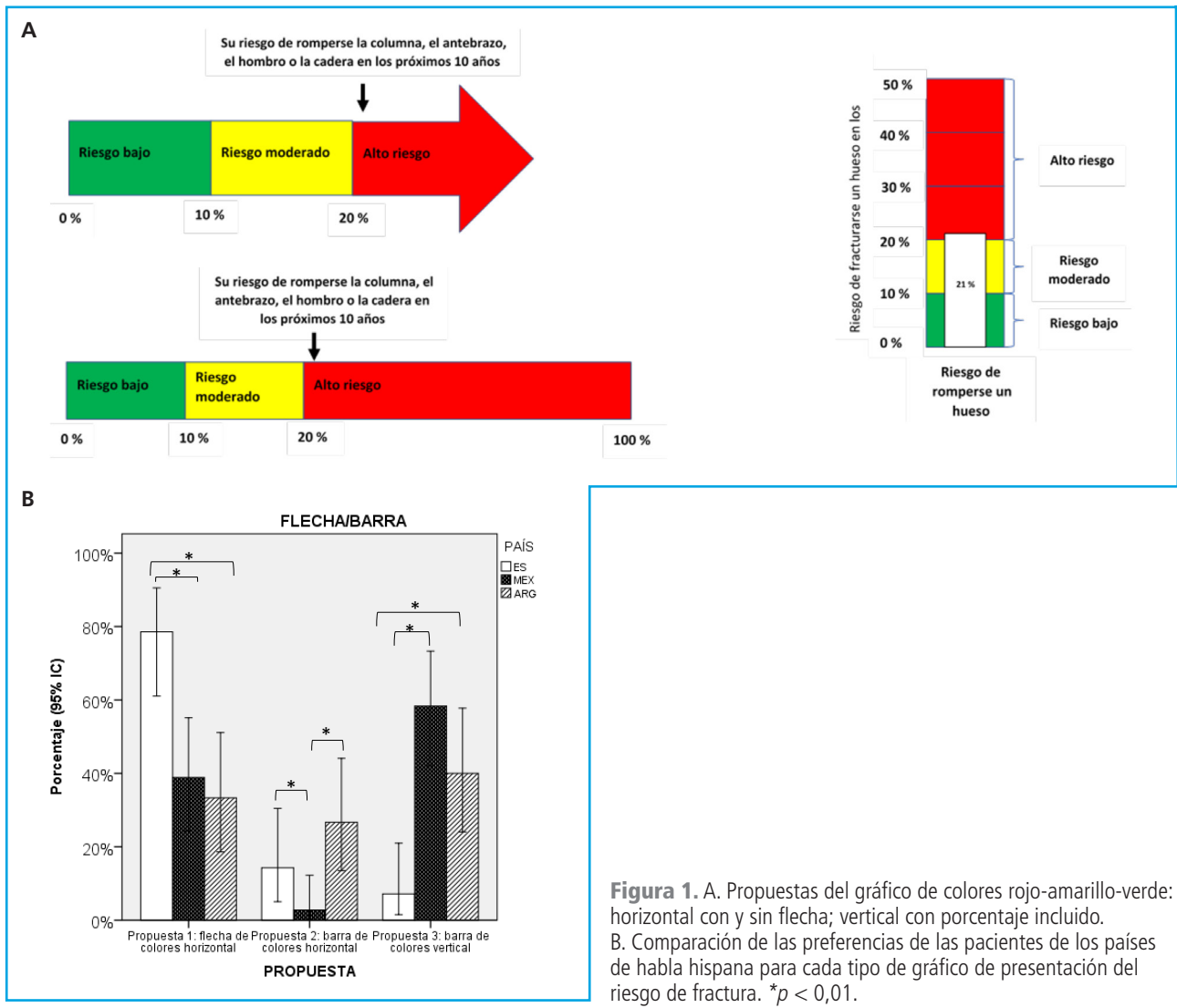
Respecto a las opciones gráficas sobre la presentación del riesgo de fractura en forma de caras "felices" o "tristes" (Fig. 2A) la que contenía una escala numérica fue la opción preferida en ES en un 67,9 %, al igual que ARG con un 66,7 %, mientras que en MEX la mayoría no tenía preferencia por ninguna de las opciones ( $p = 0,001$ ) (Fig. 2B). En cuanto a si las caras "felices" se situaban en la parte superior o inferior, la mayoría en ES y en MEX no tenían preferencia, mientras que ARG prefería las caras "felices" en la parte superior en un 61,9 % ( $p = 0,009$ ). Respecto a la representación gráfica de las caras en color o blanco y negro, el 92,9 % en ES prefería el color. MEX y ARG también prefería el color, pero en menor medida (66,7 % y 73,3 %, respectivamente) ( $p = 0,006$ ) (Fig. 3A). Respecto a la presen-

tación de 10 o 100 caras en el gráfico, en ES se prefirió la opción reducida de 10 caras en un 57,1 % al igual que ARG con un 70 %, mientras que en MEX no existía preferencia ( $p < 0,001$ ) (Fig. 3B).

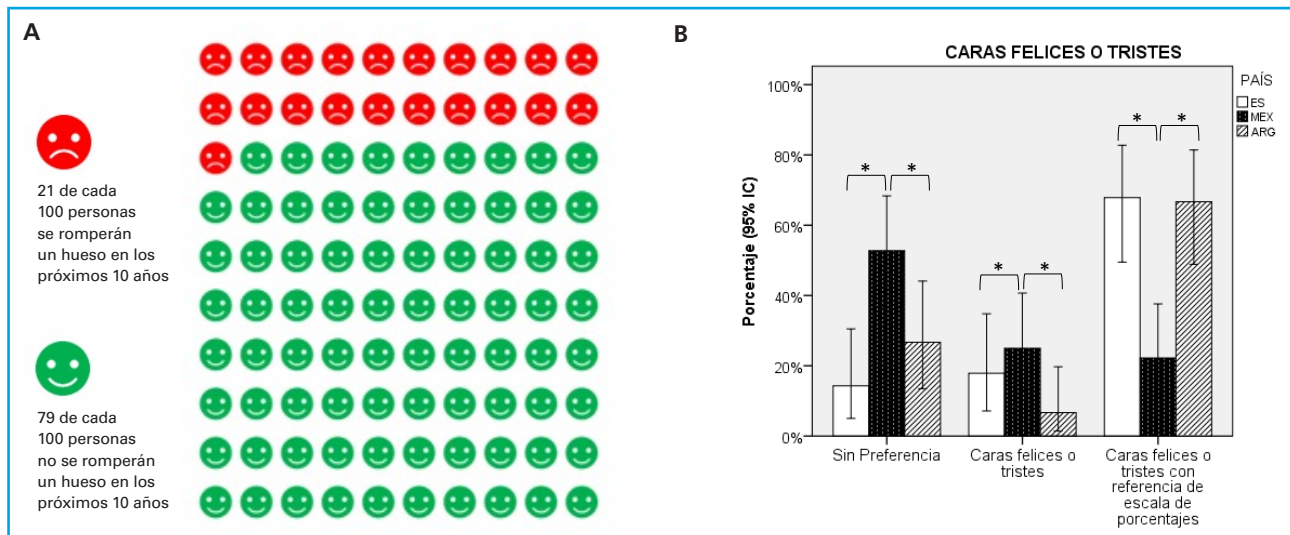
En cuanto al tratamiento, las participantes de los tres países prefirieron que, en todas las formas de presentación de riesgo de padecer una fractura, este se presentara con y sin tratamiento para ver el efecto de disminución de riesgo  $5,8 \pm 1,6$  sobre una escala de 1-7 para comunicación verbal o escrita,  $5,93 \pm 1,53$  para gráfico de colores y  $5,39 \pm 1,84$  para caritas.

En cuanto a las consecuencias de padecer una fractura se les presentó a las participantes unos dibujos para que eligieran el orden de lo que les preocupaba más (Fig. 4). Las pacientes de ES refirieron estar más preocupadas en primer lugar por la pérdida de independencia (46,4 %) mientras que en MEX era la pérdida de calidad de vida (36,1 %) y la posibilidad de cifosis en ARG (33,3 %) (Tabla II).

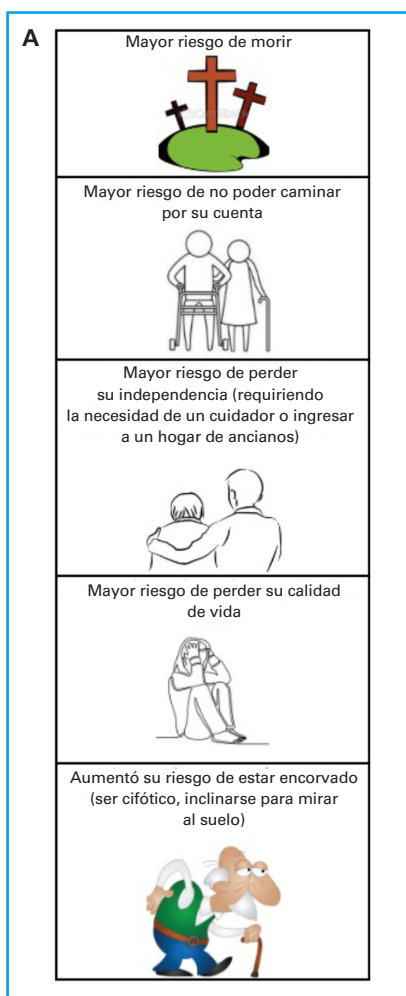
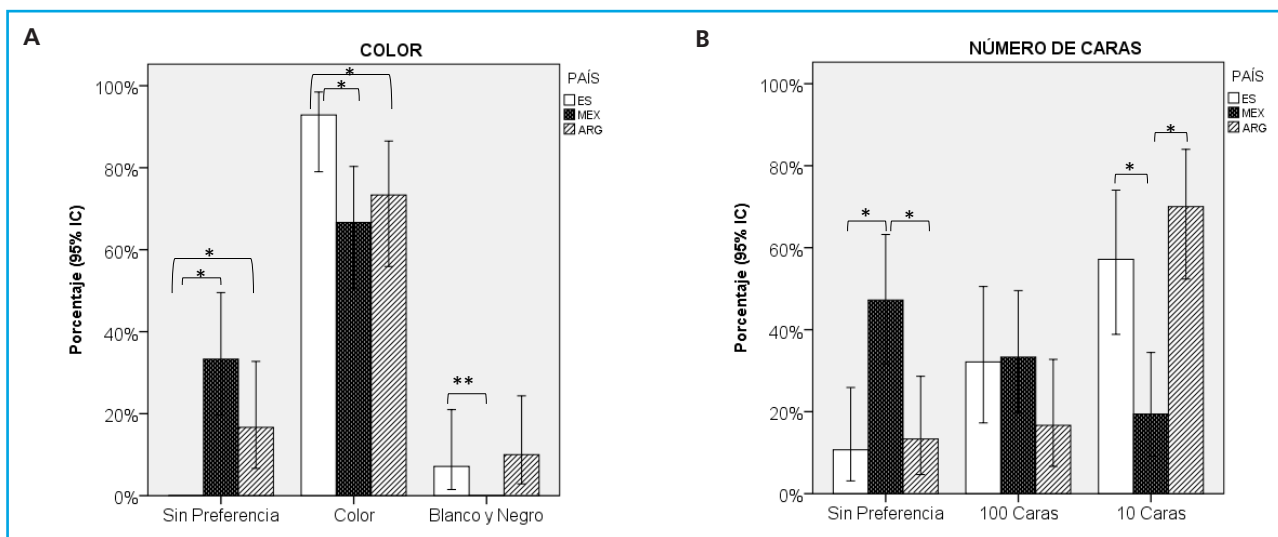
En los tres países se dio gran importancia a recibir una explicación verbal del riesgo de fractura mediante el apoyo de gráficos: ES 75 %, MEX 86,1 % y ARG 83,3 %, pero también a recibir la información impresa en papel: ES 77,5 %, MEX 80,6 % y ARG 83,3 %.



**Figura 1.** A. Propuestas del gráfico de colores rojo-amarillo-verde: horizontal con y sin flecha; vertical con porcentaje incluido. B. Comparación de las preferencias de las pacientes de los países de habla hispana para cada tipo de gráfico de presentación del riesgo de fractura. \* $p < 0,01$ .



**Figura 2.** A. Propuesta de gráfico de caras "felices" y "tristes". B. Comparación de las preferencias de las pacientes de los países de habla hispana para el tipo de gráfico de caras "felices" o "tristes" de presentación del riesgo de fractura con y sin escala de referencia de porcentajes de riesgo. \* $p < 0,01$ .



**Figura 4.** Dibujos representativos de las consecuencias de padecer una fractura.

**Tabla II. Importancia de las posibles consecuencias de padecer una fractura para las participantes de habla hispana**

Consecuencia	MEX	ARG	ES
Muerte	19,4 %	20 %	25 %
Incapacidad de andar	25 %	16,7 %	3,6 %
Pérdida de independencia	16,7 %	16,7 %	46,4 %
Pérdida de calidad de vida	36,1 %	13,3 %	17,9 %
Cifosis	2,8 %	33,3 %	7,1 %

### DISCUSIÓN

Las guías clínicas como las de la Sociedad Española de Investigación Ósea y Metabolismo Mineral (SEIOMM) recomiendan el tratamiento en función del riesgo de fractura (12). Es importante pues, conocer cuál es el riesgo específico de fractura de cada paciente e informarle de forma adecuada para tomar una decisión compartida del tratamiento más eficiente y efectivo.

En los países de habla hispana, y sobre todo en ES y MEX, las participantes habían recibido información previa de su riesgo de fractura por encima de la media del estudio RICO internacional donde tan solo un 56 % de las pacientes referían haber recibido información (11). Probablemente, este dato enlazaría con la característica cultural de una mayor comunicación verbal en los países de habla hispana. En el propio cuestionario se demostraba la preferencia de estos tres países para

recibir la información de forma gráfica e impresa, pero a la vez, explicada verbalmente por el médico o la enfermera. Sin embargo, el objetivo de comunicación del riesgo de nuevas fracturas a las pacientes con OP debería acercarse al 100 %, pues como se demostró en la encuesta, el recibir una información adecuada era una cuestión muy relevante para todas las pacientes del estudio.

Una de las cuestiones importantes de la OP a nivel mundial es la diferencia que existe entre el porcentaje de pacientes que han tenido una fractura y los que realmente reciben tratamiento para prevenir nuevas fracturas por fragilidad (13). Si bien se recomienda el tratamiento cuando ha habido una fractura, reciente o pasada, lo que representa un alto o muy alto riesgo de fractura, la realidad es que en el estudio RICO internacional algunos países como EE. UU. (California) y Bélgica, el porcentaje de pacientes sin tratamiento era mayor del 70 %. En ES esta discordancia no se apreció, al contrario, existía un mayor porcentaje de pacientes en tratamiento que con historia de fractura, probablemente porque el 100 % de los participantes estaban diagnosticados de OP, y en MEX o ARG se situaba alrededor del 70 %. A pesar de tener una menor incidencia de fracturas por fragilidad respecto a otros países como los del norte de Europa (13,14), ES sigue teniendo una mayor proporción de pacientes con OP susceptibles de tratamiento respecto a los que están recibiendo, siendo el país con una diferencia en este aspecto que más ha aumentado respecto otros países de Europa según el reciente estudio Scope 2021 (14).

En relación a la preferencia de los gráficos en cuanto a la forma de presentar la información del riesgo de fractura, destacar que las participantes de ES preferían una combinación de flecha de colores y porcentaje, mientras que en MEX y ARG preferían una opción más simple como un semáforo sin flecha ni porcentaje.

Señalar que, en la mayoría de los casos, las preferencias de las pacientes de MEX estaban bastante alejadas de las preferencias de las pacientes de ES. En cambio, las pacientes de ARG tenían unas preferencias bastante similares a las españolas. Esto demuestra que cada país tiene sus particularidades independientemente del idioma y proximidad geográfica.

Está claro, sin embargo, que la forma de comunicación visual es muy agradecida por parte de todas las pacientes, sobre todo mediante el uso de iconos que sean de fácil interpretación.

Las herramientas de ayuda para una decisión compartida en osteoporosis se han ido elaborando a lo largo de los años (15). Recientemente un grupo holandés ha desarrollado una herramienta validada de ayuda para instaurar tratamientos especialmente diseñada para las unidades de *Fracture Liason Service* (16). Esta herramienta incluye la valoración y comunicación del

riesgo de fractura mediante un folleto en el que se explica la enfermedad de la OP, sus consecuencias, consejos de alimentación, estilos de vida y tratamientos. En esta documentación que se entrega a los pacientes, se informa también del riesgo de fractura de forma general mediante figuras de huesos rotos, y es similar al presentado en forma de caras "felices" al estudio RICO.

La información sobre la OP en forma de folletos o formato digital es habitual en atención primaria y en atención especializada, sin embargo, la información específica sobre el riesgo de fractura no es tan común (17). FRAX es la herramienta más utilizada pero no está diseñada para ser comunicada a los pacientes, y en muchas ocasiones no es fácil de entender (18). Por ello es importante desarrollar nuevos elementos de apoyo al paciente donde se le ofrezcan herramientas visuales para que puedan entender cuál es el riesgo de padecer nuevas fracturas. También es muy importante explicar a los pacientes cuánto se va a reducir este riesgo con el tratamiento propuesto para conseguir una mayor adherencia terapéutica (19).

El estudio RICO tiene limitaciones. Por un lado, se ha desarrollado en tiempo de la pandemia de COVID-19, lo cual ha determinado que algunas de las entrevistas con los participantes se hayan realizado de forma virtual lo que puede haber condicionado las respuestas de algunas de las participantes. En ES, todas las entrevistas se realizaron posteriormente a la etapa de mayores restricciones y se realizaron presencialmente, mientras que en MEX y ARG fueron mixtas. Asimismo, la inclusión de pacientes ya diagnosticadas de OP puede haber influenciado resultados como el tratamiento pues muchas de ellas seguramente estaban más sensibilizadas a recibir tratamiento para prevenir nuevas fracturas. Otra limitación es el ámbito del estudio, que precisamente al ser internacional, incluyó participantes con diferentes culturas y sobre todo distintos sistemas sanitarios. Entre los países de habla hispana, el sistema público con financiación de los fármacos que tenemos en ES, es diferente al de MEX, donde la cobertura no es universal, y en ARG, donde también la sanidad privada predomina sobre la pública. Este dato, sin embargo, no afectaría a cuestiones como la de conocer la enfermedad o el riesgo de fractura o las consecuencias. Sí que podría tener influencia en la decisión de no recibir medicación hasta que el paciente vea que su riesgo sea muy alto para evitar un gasto económico elevado.

## CONCLUSIONES

El estudio RICO demuestra que existe un déficit de transmisión de información a los pacientes con OP sobre su riesgo de fractura. Las pacientes de habla hispa-



na mostraron preferencias diferentes en la presentación de los gráficos. En particular, las pacientes de MEX mostraron preferencias opuestas a las pacientes de ES. Los resultados indican que se requiere un esfuerzo por parte de los profesionales sanitarios para buscar formas efectivas de comunicación sobre el riesgo de fracturas, adecuándose a las idiosincrasias culturales de la población a tratar. Establecer herramientas de comunicación médico-paciente efectivas puede incrementar la aceptación de los tratamientos y probablemente mejorar la calidad de vida de las/los pacientes con OP.

## COAUTORES DEL ESTUDIO RICO

Mitali Sharma (The OMC Research Center. Beverly Hills, California. EE. UU.), Patricia Clark (Unidad de Epidemiología Clínica. Hospital Infantil de México Federico Gómez - Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ciudad de México, México), Saeko Fujiwara (Servicio de Farmacia. Yasuda Women's University. Hiroshima, Japón), Jonathan D. Adachi (McMaster University. Hamilton, Ontario. Canadá), Osvaldo D. Messina (IRO Medical Center. Investigaciones Reumatológicas y Osteológicas SRL. Buenos Aires, Argentina), Suzanne N. Morin (Servicio de Medicina. McGill University. Montreal, Canadá), Lynn A. Kohlmeier (Spokane Osteoporosis and Endocrinology. Spokane, Washington. EE. UU.), Caroline B. Sangán (Royal Osteoporosis Society. Bath, Reino Unido), Griselda Adriana Cruz Priego (Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica. Hospital Infantil de México Federico Gómez - Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ciudad de México, México), Andrea Cavallo (IRO Medical Center. Investigaciones Reumatológicas y Osteológicas SRL. Buenos Aires, Argentina), Fiona Cooper (Royal Osteoporosis Society. Bath, Reino Unido), Jamie Grier (Royal Osteoporosis Society. Bath, Reino Unido), Carolyn Leckie (McMaster University. Hamilton, Ontario. Canadá), Diana Montiel-Ojeda (Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica. Hospital Infantil de México Federico Gómez - Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ciudad de México, México), Alexandra Papaioannou (McMaster University. Hamilton, Ontario. Canadá), Nele Raskin (Departamento de Investigación en Servicios de Salud. CAPHRI Care & Public Health Research Institute. Maastricht University. Países Bajos), Leonardo Yurquina (AMPC, Hamilton. Ontario, Canadá), Michelle Wall (Research Institute of the McGill University Health Centre. Montreal, Quebec. Canadá), Olivier Bruyère (Centro Colaborador de la OMS para la Epidemiología de la Salud Musculoesquelética y el Envejecimiento. División de Salud Pública. Epidemiología y Economía de la Salud. University of Liège. Bélgica), Annelies Boonen (Servicio de Medicina Interna. División de Reumatología. Maastricht University Medical Center. Maastricht,

Países Bajos), Elaine Dennison (MRC Life Course Epidemiology Centre. University of Southampton. Southampton, Reino Unido), Nicholas C. Harvey (NIHR Southampton Biomedical Research Centre. University of Southampton and University Hospital Southampton NHS Foundation Trust. Southampton, Reino Unido), John A. Kanis (Centro de Enfermedades Metabólicas Óseas. University of Sheffield. Sheffield, Reino Unido), Jean-François Kaux (Departamento de Medicina Física y Rehabilitación, y Traumatología Deportiva. University Hospital of Liège. Bélgica), E. Michael Lewiecki (New Mexico Clinical Research & Osteoporosis Center. Albuquerque, Nuevo México. EE. UU.), Óscar López-Borbón (The OMC Research Center. Beverly Hills, California. EE. UU.), Zoé Paskins (Haywood Academic Rheumatology Centre. Midlands Partnership University NHS Foundation Trust. Stoke-on-Trent, Reino Unido; Cedars-Sinai Medical Center. Los Ángeles, California), Jean-Yves Reginster (Colaborador de la OMS para la Epidemiología de la Salud Musculoesquelética y el Envejecimiento. División de Salud Pública. Epidemiología y Economía de la Salud. University of Liège. Bélgica).

## FINANCIACIÓN

Financiación del proyecto RICO internacional (Comunicación de Riesgos en Osteoporosis) recibió financiación de Amgen US/UCB. Amgen no tuvo ningún papel en el diseño, recopilación, análisis o interpretación de datos.

## AGRADECIMIENTOS

FEIOMM por la Beca FEIOMM 2021 de Investigación Clínica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Elwyn G, Laitner S, Coulter A, Walker E, Watson P, Thomson R. Implementing shared decision making in the NHS. *BMJ* 2010;341:c5146. DOI: 10.1136/bmj.c5146
2. Stiggelbout AM, Van der Weijden T, De Wit MP, Frosch D, Légaré F, Montori VM, et al. Shared decision making: really putting patients at the centre of healthcare. *BMJ* 2012;344:e256. DOI: 10.1136/bmj.e256
3. Torres-Castaño A, Perestelo-Pérez L, Koatz D, Ramos-García V, González-González AI, Toledo-Chávarri A, et al. Healthcare Professionals' Perceptions about the Implementation of Shared Decision-Making in Primary Care: A Qualitative Study from a Virtual Community of Practice. *Int J Integr Care* 2024;24(2):8. DOI: 10.5334/ijic.6554

4. Salari N, Darvishi N, Bartina Y, Larti M, Kiaei A, Hemmati M, Shohaimi S, Mohammadi M. Global prevalence of osteoporosis among the world older adults: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res* 2021;16(1):669. DOI: 10.1186/s13018-021-02821-8
5. Clynes MA, Harvey NC, Curtis EM, Fuggle NR, Dennison EM, Cooper C. The epidemiology of osteoporosis. *Br Med Bull* 2020;133(1):105-17. DOI: 10.1093/bmb/ldaa005
6. Canals-Ruiz L, Comellas M, Lizán L. Preferences, satisfaction and decision-making processes in osteoporosis treatment: a systematic review of the literature. *J Comp Eff Res* 2021;10(8):629-45. DOI: 10.2217/cer-2020-0216
7. Ralston KAP, Hauser B, Paskins Z, Ralston SH. Effective Communication and the Osteoporosis Care Gap. *J Bone Miner Res* 2022;37(11):2049-54. DOI: 10.1002/jbmr.4701
8. Edmonds SW, Solimeo SL, Nguyen VT, Wright NC, Roblin DW, Saag KG, et al. Understanding Preferences for Osteoporosis Information to Develop an Osteoporosis Patient Education Brochure. *Perm J* 2017;21:16-024. DOI: 10.7812/TPP/16-024
9. Kanis JA, Harvey NC, Johansson H, Liu E, Vandenput L, Lorentzon M, et al. A decade of FRAX: how has it changed the management of osteoporosis? *Aging Clin Exp Res* 2020;32(2):187-96. DOI: 10.1007/s40520-019-01432-y
10. Reyna VF, Nelson WL, Han PK, Pignone MP. Decision making and cancer. *Am Psychol* 2015;70(2):105-18. DOI: 10.1037/a0036834
11. Beaudart C, Sharma M, Clark P, Fujiwara S, Adachi JD, Messina OD, et al. Patients' preferences for fracture risk communication: the Risk Communication in Osteoporosis (RICO) study. *Osteoporos Int* 2024;35(3):451-68. DOI: 10.1007/s00198-023-06955-9
12. Riancho JA, Peris P, González-Macías J, Pérez-Castrillón JL. Executive summary clinical practice guideline of postmenopausal, glucocorticoid-induced, and male osteoporosis (2022 update). *Rev Osteoporos Metab Miner* 2022;14(1):5-12. DOI: 10.4321/S1889-836X2022000100002
13. Liu J, Curtis EM, Cooper C, Harvey NC. State of the art in osteoporosis risk assessment and treatment. *J Endocrinol Invest* 2019;42(10):1149-64. DOI: 10.1007/s40618-019-01041-6
14. Kanis JA, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, et al. SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. *Arch Osteoporos* 2021;16(1):82. DOI: 10.1007/s11657-020-00871-9
15. Hilgsmann M, Ronda G, van der Weijden T, Boonen A. The development of a personalized patient education tool for decision making for postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 2016;27(8):2489-96. DOI: 10.1007/s00198-016-3555-1
16. Maas L, Raskin N, van Onna M, Cornelissen D, Bours S, van der Weijden T, et al. Development and usability of a decision aid to initiate anti-osteoporosis medication treatment in patients visiting the fracture liaison service with a recent fracture. *Osteoporos Int* 2024;35(1):69-79. DOI: 10.1007/s00198-023-06906-4
17. Bennett SE, Gooberman-Hill R, Clark EM, Paskins Z, Walsh N, Drew S. Improving patients' experiences of diagnosis and treatment of vertebral fracture: co-production of knowledge sharing resources. *BMC Musculoskelet Disord* 2024;25(1):165. DOI: 10.1186/s12891-024-07281-9
18. iris ES, Baim S, Nattiv A. Primary care use of FRAX: absolute fracture risk assessment in postmenopausal women and older men. *Postgrad Med* 2010;122(1):82-90. DOI: 10.3810/pgm.2010.01.2102
19. Cornelissen D, de Kunder S, Si L, Reginster JY, Evers S, Boonen A, et al.; European Society for Clinical and Economic Aspect of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO). Interventions to improve adherence to anti-osteoporosis medications: an updated systematic review. *Osteoporos Int* 2020;31(9):1645-69. DOI: 10.1007/s00198-020-05378-0



## Original

# El efecto de las caídas sobre la salud percibida en población general y sus consecuencias clínicas

Carlos Gómez Alonso<sup>1,6</sup>, Minerva Rodríguez García<sup>2,6</sup>, Carmen Palomo Antequera<sup>3</sup>, Javier Montero Muñoz<sup>4</sup>, Noelia Avello Llano<sup>5</sup>, Carmen García Gil-Albert<sup>5</sup>, Laura Naves Mendivil<sup>1</sup>, Mónica Llana Faedo<sup>1</sup>, Teresa Naves López<sup>1</sup>, Manuel Naves Díaz<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo; <sup>2</sup>Área de Gestión Clínica de Nefrología; y <sup>3</sup>Área de Gestión Clínica de Medicina Interna. Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Oviedo. <sup>4</sup>Servicio de Geriátrica. Hospital Monte Naranco. Universidad de Oviedo. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Oviedo.

<sup>5</sup>Laboratorio de Medicina. Hospital Universitario Central de Asturias. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Oviedo.

<sup>6</sup>RICORS2040 (RD21/0005/0019)

## Resumen

**Introducción y objetivo:** el objetivo fue valorar el efecto que las caídas tienen sobre la calidad de vida percibida y sus consecuencias clínicas.

**Material y métodos:** 324 hombres y mujeres > 50 años que realizaron radiología dorso-lumbar y densidad mineral ósea (DMO) repitieron a los 4 años las mismas pruebas y realizaron bioquímica, historial de caídas y el cuestionario de calidad de vida SF-36. La cohorte se siguió 4 años más para conocer la incidencia de fractura osteoporótica.

**Resultados:** las caídas fueron más frecuentes en mujeres que en hombres (34,9 % vs 14,7 %,  $p < 0,001$ ). Excepto las limitaciones del rol por problemas físicos y emocionales, 6 de las otras 8 dimensiones del cuestionario de calidad de vida SF-36 se vieron afectadas significativamente por la presencia de caídas. El análisis de regresión lineal mostró que la percepción de la salud general, vitalidad, salud mental y score total se asociaron con las caídas. En mujeres resultó afectado significativamente el dolor en últimas 4 semanas; percepción de la salud general; vitalidad; salud mental y score global. En hombres ninguna dimensión se vio afectada. El análisis de regresión logística ajustado por edad, sexo e IMC mostró que las caídas se asociaron con la incidencia de fractura osteoporótica [odds ratio (OR) = 3,56, intervalo de confianza del 95 % (IC 95 %) = (1,04-12,21)].

**Conclusiones:** las caídas afectaron en mujeres la calidad de vida en relación a la vitalidad, el dolor y la salud general, pero también la salud mental que incluye depresión, ansiedad, control emocional y conductual. En hombres, la salud percibida no se afectó por la presencia de caídas. Prevenir caídas en ambos sexos podría evitar un aumento en la incidencia de fractura osteoporótica.

**Palabras clave:**  
Caídas. Calidad de vida. Fractura.

Recibido: 22/07/2024 • Aceptado: 15/09/2024

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

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

Gómez Alonso C, Rodríguez García M, Palomo Antequera C, Montero Muñoz J, Avello Llano N, García Gil-Albert C, Naves Mendivil L, Llana Faedo M, Naves López T, Naves Díaz M. El efecto de las caídas sobre la salud percibida en población general y sus consecuencias clínicas. Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(3):88-96

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00055

## Correspondencia:

Manuel Naves Díaz. Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Avenida de Roma, s/n. 33011 Oviedo  
e-mail: mnaves.huca@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

Una caída se define como un descenso involuntario o accidental al suelo u otro nivel más bajo. En los Estados Unidos, las caídas son la causa principal de muerte accidental y la séptima causa de muerte en las personas mayores de 65 años (1).

En las personas con 65 o más años, las caídas son la principal causa de lesiones relacionadas con hospitalización y mortalidad (2). Por tanto, las lesiones producidas por caídas ocasionan una carga económica sustancial (3). No obstante, los médicos muchas veces no advierten las caídas en un paciente que no presenta lesiones o porque en la anamnesis y en el examen físico no se suele incluir la búsqueda específica de este evento. Por otro lado, muchas personas ancianas se muestran reticentes a informar de una caída porque la atribuyen al proceso normal de envejecimiento o porque tienen miedo de que su conocimiento pueda limitar sus actividades futuras. Aunque conocemos que muchas personas de edad avanzada se caen, las caídas no forman parte del proceso normal de envejecimiento.

Las caídas en los ancianos son comunes y provocan fracturas y otras consecuencias graves para la salud (4,5). En población anciana, el riesgo de fractura se incrementa de manera exponencial, no solo con el descenso de la densidad mineral ósea (DMO), sino también debido al incremento de las caídas. Varios estudios han demostrado que un historial de caídas se asocia con una mayor probabilidad de caídas futuras y un riesgo más elevado de fracturas (6-10). El aumento de la esperanza de vida en el mundo occidental va a conducir, salvo que se pongan en marcha medidas preventivas, a un crecimiento del gasto asociado a las fracturas osteoporóticas, por lo que prevenir alguno de los factores que más contribuyen a su aparición, como las caídas, tendrá una importante repercusión económica y sociosanitaria.

Por otro lado, el miedo a caer es otro factor importante que puede mediar en la relación entre lo físico y factores cognitivos, síntomas depresivos y caídas. El miedo a caerse se ha relacionado con síntomas de depresión y ansiedad, y se ha establecido una relación entre miedo a caerse y evitar actividades que afectan la fuerza y la capacidad física (11,12), lo que puede suponer el inicio de discapacidad en personas de edad avanzada.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue en primer lugar valorar el efecto que las caídas tienen sobre la calidad de vida percibida por medio de la realización del cuestionario de salud SF-36 y por otro lado analizar si la existencia de caídas podría tener consecuencias clínicas mediante un incremento en la incidencia de fractura osteoporótica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Como parte del estudio multicéntrico europeo diseñado para conocer la prevalencia e incidencia de fractura vertebral (European Vertebral and Prospective Osteoporosis Study – EVOS-EPOS) (13) se seleccionaron aleatoriamente del registro municipal de Oviedo 308 hombres y 316 mujeres mayores de 50 años. El protocolo al que hace referencia este estudio consistió en la cumplimentación de un cuestionario sobre factores de riesgo relacionados con osteoporosis, dos radiografías laterales dorso-lumbares y la recogida de mediciones antropométricas como altura y peso para determinar el índice de masa corporal (IMC). Además, más del 80 % de los participantes realizaron DMO en columna lumbar y cuello femoral. Todos los sujetos que acudieron a la Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo del Hospital Universitario Central de Asturias tenían suficiente capacidad ambulatoria o, en su defecto, con la ayuda de otra persona y el 99 % vivía en su propio domicilio.

A los 4 años de la realización del estudio basal, se invitó a los participantes a repetir las mismas pruebas que en el estudio basal, además de un estudio bioquímico, el cuestionario de salud SF-36 y un historial de caídas en los últimos 12 meses. De los 404 sujetos que acudieron al segundo corte transversal, 324 hombres y mujeres (80,2 %) estuvieron de acuerdo en realizar todas las pruebas anteriormente mencionadas.

Esta cohorte fue seguida de forma prospectiva durante otros 4 años por medio de dos cuestionarios postales con objeto de investigar la incidencia de fractura osteoporótica no vertebral.

### CUESTIONARIO DE SALUD SF-36

A los 324 participantes que realizaron en el segundo corte transversal todas las pruebas, se les administró, mediante entrevista personal, el cuestionario de salud SF-36. La realización de este estuvo a cargo de una persona entrenada en la ejecución de cuestionarios.

El SF-36 comprende 36 ítems, 35 de los cuales se encuentran agrupados en 8 dimensiones: función física: 10 ítems; limitaciones del rol por problemas físicos: 4 ítems; dolor: 2 ítems; percepción de la salud general: 5 ítems; vitalidad: 4 ítems; función social: 2 ítems, limitaciones del rol por problemas emocionales: 3 ítems; y salud mental: 5 ítems. Cada uno de los ítems en que se divide cada dimensión tiene unas puntuaciones que se transforman en una escala que va desde 0 (peor estado de salud) hasta 100 (mejor estado de salud). La versión española de cuestionario de salud SF-36 fue validada hace unos años por Alonso y colaboradores (14).

## ANÁLISIS BIOQUÍMICO

En el segundo corte transversal se tomó una muestra de sangre a cada sujeto participante en el estudio. Una vez separado el suero, las muestras se mantuvieron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su cuantificación. Se midió entre otros, filtrado glomerular estimado, fosfatasa alcalina total y fosfatasa ácido tartrato resistente utilizando un autoanalizador (Hitachi Mod. 717, Ratigen, Alemania).

Los niveles séricos de calcidiol (25OHD) se determinaron mediante extracción previa con acetonitrilo (IDS, Ltd., Bolton, Reino Unido). Los niveles de PTH intacta y osteocalcina total se midieron por radio-inmunoensayo (Instituto Nichols, San Juan de Capistrano, California, EE. UU.).

## EVALUACIÓN DENSITOMÉTRICA

La DMO se midió con un densitómetro Hologic® QDR-1000 DXA (Hologic Inc., Waltham, MA). En todos los casos, se analizaron la columna lumbar antero-posterior (L2-L4) y la densidad de fémur derecho. Los coeficientes de variación (CV) fueron de 1,2 % y 1,9 % respectivamente (15). El control de precisión y calidad fue realizado diariamente con un *phantom* de columna lumbar, con el que se obtuvo un CV de  $0,0 \pm 0,1$  %. En el cuarto año se determinó la DMO en las mismas áreas utilizadas en el primer estudio y el porcentaje de cambio entre ambas mediciones fue utilizado para evaluar los cambios en DMO en las dos localizaciones anatómicas.

## INCIDENCIA DE FRACTURA OSTEOPORÓTICA

Tras acudir al segundo corte transversal a todos los participantes se les envió, con un intervalo de 2 años, sendos cuestionarios postales que hacían referencia a la existencia de fracturas que hubieran tenido en ese periodo. Todas las fracturas osteoporóticas, excluidas las de cráneo y extremidades (manos y pies) por sus dudas de causa osteoporótica, fueron confirmadas mediante radiografía. El porcentaje de personas que participaron en estos dos seguimientos postales (excluyendo los fallecimientos) fue del 82,4 y 81,3 % respectivamente.

Todos los estudios realizados siguieron los principios enunciados en la declaración de Helsinki y fueron formalmente aprobados por el Comité de Ensayos Clínicos del Principado de Asturias.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando la versión 25.0 de SPSS para Windows. Las variables cuanti-

tativas se analizaron mediante t de Student. Las variables cualitativas de analizaron mediante chi cuadrado.

Para analizar, a nivel multivariante, el efecto de las caídas sobre la salud percibida se utilizó regresión lineal ajustada por edad, sexo e IMC para el total de los participantes al estudio o separadamente por sexos. De igual forma, para analizar de forma multivariante el efecto de las caídas sobre la posterior aparición de fractura osteoporótica incidente en ambos sexos se utilizó en este caso, al ser la variable dependiente dicotómica, una regresión logística ajustada por edad, sexo e IMC.

## RESULTADOS

La edad media y el IMC de los que cayeron fue similar a los que no cayeron (Tabla I). Tampoco se encontraron cambios entre el grado de función renal, midiendo el filtrado glomerular estimado, entre los que cayeron y no (Tabla I). Los marcadores del metabolismo óseo y mineral (calcidiol, PTH, osteocalcina, fosfatasa alcalina total y fosfatasa ácido tartrato resistente) fueron similares entre los que cayeron y los que no lo hicieron (Tabla I). Respecto a las caídas, el 25 % de los participantes ( $n = 81$ ) refirieron haber caído al menos 1 vez en los últimos 12 meses (Tabla I), más frecuente en mujeres que en hombres (34,9 % vs 14,7 %,  $p < 0,001$ ). Un 28 % de las caídas ( $n = 23$ ) se produjeron en el domicilio. No hubo tampoco cambios en el porcentaje de cambio en DMO en columna lumbar y cuello femoral entre ambos cortes transversales y la presencia de caídas en el último año (Tabla I).

A nivel univariante en el total de la cohorte, 6 de las 8 dimensiones, en que se divide el cuestionario de salud SF-36, al igual que el score global, se vieron afectadas significativamente por la presencia de caídas, excepto las limitaciones del rol por problemas físicos y por problemas emocionales. Las dimensiones más afectadas fueron: vitalidad y salud mental ( $p < 0,001$  en ambos casos) (Tabla II).

El análisis de regresión lineal ajustado por edad, IMC y sexo mostró que la percepción de la salud general (coeficiente  $\beta$  ( $\beta$ ) =  $-0,140$ ,  $p = 0,014$ ), vitalidad ( $\beta$  =  $-0,158$ ,  $p = 0,004$ ), salud mental ( $\beta$  =  $-0,130$ ,  $p = 0,016$ ) y score total ( $\beta$  =  $-0,138$ ,  $p = 0,009$ ) se asociaron con las caídas (Tabla III).

Por sexos, en mujeres resultó afectado significativamente el dolor en últimas 4 semanas ( $\beta$  =  $-0,231$ ,  $p = 0,004$ ); percepción de la salud general ( $\beta$  =  $-0,183$ ,  $p = 0,020$ ); vitalidad ( $\beta$  =  $-0,291$ ,  $p < 0,001$ ); salud mental ( $\beta$  =  $-0,162$ ,  $p = 0,042$ ) y score global ( $\beta$  =  $-0,203$ ,  $p = 0,015$ ) (Tabla IV). En hombres, ninguna de las dimensiones del cuestionario de salud SF-36 se vio afectada. El número de caídas no modificó estos resultados.

**Tabla I.** Variables demográficas, antropométricas y clínicas en la cohorte de hombres y mujeres entre los que cayeron y los que no lo hicieron en los últimos 12 meses

Variables	Caídas (n = 81)	No caídas (n = 243)	Valor de p
Edad (años)	69 ± 9	68 ± 8	0,195
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29 ± 5	28 ± 4	0,149
Sexo mujer n (%)	58 (71,6)	108 (44,4)	< 0,001
Filtrado glomerular estimado (FGe) (mL/min)	64 ± 17	67 ± 17	0,179
Calcidiol (ng/mL)	18 ± 11	17 ± 9	0,322
PTH (pg/mL)	52 ± 20	53 ± 24	0,720
Osteocalcina (ng/mL)	5,9 ± 2,4	6,0 ± 2,3	0,832
Fosfatasa alcalina total (U/L)	175 ± 50	176 ± 75	0,887
Fosfatasa ácida tartrato resistente (U/L)	2,0 ± 0,7	2,1 ± 0,7	0,554
% cambio DMO columna lumbar	0,10 ± 4,81	-0,39 ± 5,07	0,497
% cambio DMO cuello femoral	-0,25 ± 6,17	0,87 ± 5,37	0,158

**Tabla II.** Valores de las distintas dimensiones del cuestionario de salud SF-36 en hombres y mujeres que hubieran caído o no en los últimos 12 meses

Variables	Caídas (n = 81)	No caídas (n = 243)	Valor de p
Dimensión 1 (función física)	76 ± 21	82 ± 21	0,015
Dimensión 2 (limitaciones por problemas físicos)	71 ± 45	80 ± 40	0,124
Dimensión 3 (dolor últimas 4 semanas)	71 ± 19	78 ± 19	0,004
Dimensión 4 (percepción salud general)	55 ± 25	65 ± 24	0,003
Dimensión 5 (vitalidad)	57 ± 28	70 ± 33	< 0,001
Dimensión 6 (función social)	85 ± 26	91 ± 21	0,044
Dimensión 7 (limitaciones rol problema emocional)	73 ± 45	79 ± 41	0,253
Dimensión 8 (salud mental)	62 ± 23	73 ± 23	< 0,001
Puntuación total (score total)	66 ± 18	75 ± 19	< 0,001

**Tabla III.** Análisis de regresión lineal, ajustado por edad, IMC y sexo, de las diferentes dimensiones del cuestionario de salud SF-36 en la cohorte de hombres y mujeres en función de la presencia de caídas en el último año

Variables	Coefficiente beta estandarizado (n = 10)	Valor de p
Dimensión 1 (función física)	-0,061	0,274
Dimensión 2 (limitaciones por problemas físicos)	-0,047	0,398
Dimensión 3 (dolor últimas 4 semanas)	-0,098	0,080
Dimensión 4 (percepción salud general)	-0,140	0,014
Dimensión 5 (vitalidad)	-0,158	0,004
Dimensión 6 (función social)	-0,049	0,381
Dimensión 7 (limitaciones rol problema emocional)	0,002	0,977
Dimensión 8 (salud mental)	-0,130	0,016
Puntuación total (score total)	-0,138	0,009

**Tabla IV.** Análisis de regresión lineal, ajustado por edad e IMC de las diferentes dimensiones del cuestionario de salud SF-36 separadamente por sexos en función de la presencia de caídas en el último año

Género	Variables	Coefficiente beta estandarizado (n = 10)	Valor de p
Mujer	Dimensión 1 (función física)	-0,024	0,745
	Dimensión 2 (limitaciones por problemas físicos)	-0,028	0,725
	Dimensión 3 (dolor últimas 4 semanas)	-0,231	0,004
	Dimensión 4 (percepción salud general)	-0,183	0,020
	Dimensión 5 (vitalidad)	-0,291	< 0,001
	Dimensión 6 (función social)	-0,057	0,469
	Dimensión 7 (limitaciones rol problema emocional)	-0,040	0,618
	Dimensión 8 (salud mental)	-0,162	0,042
	Puntuación total (score total)	-0,203	0,015
Hombre	Dimensión 1 (función física)	-0,062	0,431
	Dimensión 2 (limitaciones por problemas físicos)	-0,040	0,622
	Dimensión 3 (dolor últimas 4 semanas)	0,062	0,445
	Dimensión 4 (percepción salud general)	-0,045	0,779
	Dimensión 5 (vitalidad)	0,067	0,396
	Dimensión 6 (función social)	0,016	0,836
	Dimensión 7 (limitaciones rol problema emocional)	0,087	0,273
	Dimensión 8 (salud mental)	-0,088	0,276
	Puntuación total (score total)	-0,025	0,752

En ninguno de los dos sexos, los cambios en DMO a nivel de columna lumbar y en cuello femoral que se produjeron entre los dos cortes transversales analizados se asociaron con la existencia de caídas. En los hombres, los cambios en DMO fueron muy similares entre los que caían (columna lumbar:  $1,12 \pm 4,71$ ; cuello femoral:  $0,98 \pm 4,71$ ) y los que no lo hacían (columna lumbar:  $1,09 \pm 4,47$ ; cuello femoral:  $0,97 \pm 5,73$ ,  $p > 0,05$  en ambos casos). En mujeres, mientras los cambios en DMO a nivel lumbar fueron muy similares entre las que caían y las que no lo hacían ( $-0,59 \pm 4,91$  vs  $-0,49 \pm 5,37$ ,  $p = 0,916$ ), en cuello femoral hubo una tendencia, aunque no significativa, hacia mayores pérdidas en aquellas mujeres que caían respecto a los que no la hacían ( $-0,71 \pm 6,32$  vs  $0,74 \pm 6,10$ ,  $p = 0,185$ ).

En el período de 4 años de seguimientos postales se informaron 15 sujetos (10 mujeres y 5 hombres) con 16 fracturas incidentes no vertebrales (6 fracturas de cadera, 6 de antebrazo distal y 4 de otras localizaciones). El 8,6 % ( $n = 7$ ) de los que habían caído en el último año se fracturaron en el período de seguimiento de 4 años frente al 2,9 % ( $n = 7$ ) de fracturas incidentes osteoporóticas que ocurrió entre los que no se habían caído ( $p = 0,035$ ). El análisis de regresión logística ajustado por edad, IMC y sexo mostró que haber tenido caídas previas se asociaron con aumento en la incidencia de fractura osteoporótica [odds ratio (OR) = 3,56, intervalo de confianza del 95 % (IC 95 %) = (1,04-12,21)].

## DISCUSIÓN

Las caídas fueron más frecuentes en las mujeres que en los hombres. Las caídas afectaron en mujeres a la calidad de vida en aquellas dimensiones relacionadas con la vitalidad, el dolor y la salud general, pero también la salud mental que incluye depresión, ansiedad, control emocional y conductual. En hombres, por el contrario, ninguna de las dimensiones del cuestionario de salud SF-36 se vio significativamente afectada. Los cambios en DMO a nivel de columna lumbar y en cuello femoral que se produjeron entre los dos cortes transversales analizados no se asociaron con la existencia de caídas en ninguno de los dos sexos. Sin embargo, es interesante resaltar que la presencia de caídas en esta población se asoció con un incremento de 3,5 veces de la incidencia de fractura osteoporótica no vertebral.

Como hemos observado, de acuerdo con lo descrito en la literatura, las caídas fueron mucho más frecuentes en mujeres que en hombres (16). Aunque las razones que puedan explicar esta diferencia por sexos siguen siendo desconocidas, hay varias teorías relativas al diferente estilo de vida, la mayor longevidad, la fragilidad e incluso factores de tipo genético que pudieran explicar este diferente comportamiento por sexo (17). Aproximadamente el 30 % de las personas con 65 o más años que viven en sus domicilios y el 50 % de los residentes en centros de atención a personas mayores



se caen más de una vez al año (4,18,19). En nuestro caso, este porcentaje en personas con más de 54 años, que vivía el 99 % en su domicilio, fue ligeramente inferior al 30 %, tal vez por esa diferencia de edad en la cohorte estudiada.

Las caídas son comunes en los ancianos y se ha encontrado una correlación positiva entre la depresión y las caídas en algunos estudios (20,21). En un metaanálisis, los autores demostraron que la depresión era un factor predictor de caídas (22). Además, el modelo de riesgo de caídas de Hendrich II, que es una evaluación para predecir el riesgo de caídas de los pacientes, señaló a la depresión como uno de los ocho factores de riesgo analizados (23). Las caídas y los síntomas depresivos tan comunes en las personas mayores suponen una carga importante para el sistema sanitario y para la sociedad (24).

La relación entre los síntomas depresivos y las caídas es compleja. Los síntomas depresivos en las personas mayores se han asociado con una serie de factores de riesgo de caídas conocidos, incluyendo deterioro cognitivo, velocidad lenta al caminar, mal equilibrio, tiempo de reacción lento y falta de fuerza. Hay autores que consideran probable que los síntomas depresivos están relacionados con problemas físicos y deterioros cognitivos lo que conduciría a un incremento en el riesgo de caída (22). Además, se ha demostrado que la fragilidad está relacionada con una peor función cognitiva, una peor función física, peor salud autopercibida y problemas de movilidad y actividades de la vida diaria, todas las cuales también se han relacionado a caídas (25), si bien no está claro si los síntomas depresivos son la causa o el resultado de las caídas o viceversa.

En nuestro caso, hemos observado un mayor efecto de las caídas sobre la salud percibida en las mujeres, efecto que no hemos observado en hombres. Algunos autores han sugerido un efecto del género en la calidad de vida, efecto que se observa en cohortes con edades superiores a la nuestra de > 75 años (26).

El miedo a caer es otro factor importante que puede mediar en la relación entre lo físico y factores cognitivos, síntomas depresivos y caídas. El miedo a caerse se ha relacionado con síntomas de depresión y ansiedad, y se ha establecido una relación entre miedo a caerse y evitar actividades que afectan la fuerza y la capacidad física (11,12).

Los individuos con miedo a caerse tienen puntuaciones significativamente más bajas en la función social, la función mental y la limitación del rol debido a los problemas emocionales. Se dice que esta disminución de la calidad de vida está asociada con una reducción en la cantidad de interacción social que experimenta el individuo, lo que lleva a un menor contacto social con amigos y familiares, aislamiento social, depresión y ansiedad (27).

El efecto de las caídas y los problemas emocionales ha sido descrito en otros trabajos, si bien no se ven otras dimensiones afectadas (17). En nuestro caso esta dimensión no se afectó significativamente. No podemos descartar que en personas de 65 o más años se estima una prevalencia de sintomatología depresiva leve del 15 % en aquellas personas que viven en sus domicilios, aumentado esta proporción en aquellos que viven en residencias de la tercera edad (28-30). En nuestro estudio, el 99 % de los participantes vivía en su propio domicilio con lo que es probable una menor limitación de la conducta por problemas emocionales a diferencia de los que viven en residencias de la tercera edad, donde se sienten en la mayoría de las ocasiones abandonados por sus familiares, lo que probablemente repercute de forma significativa en la esfera emocional. No obstante, debemos recordar que este estudio se realizó hace casi 30 años y que probablemente la percepción de la esfera emocional de las personas de edad avanzada se haya visto modificada en el tiempo transcurrido.

Es bien sabido que el envejecimiento poblacional se está acelerando sobre todo en el mundo occidental y donde nuestro país es uno de los más envejecidos del entorno. Las caídas y sus consecuencias son cada vez más comunes. Por tanto, prevenir y tratar las caídas es un desafío desde el punto de vista socio-asistencial. Hay que realizar un gran esfuerzo para que las personas mayores no tengan miedo a informar sobre sus caídas para así poder implementar medidas efectivas que impidan una pérdida de la capacidad funcional y calidad de vida del anciano (31-34).

Otro aspecto interesante a destacar es la presencia de la caída como un importante factor de riesgo predisponente de fractura. Un trabajo de Kim y cols. (35) muestra que, en personas mayores, una caída en un período de 4 meses implica un alto riesgo de fractura durante el siguiente año, independientemente de su aparición (35). En nuestro caso, el haber tenido al menos una caída previa incrementó la incidencia de fractura osteoporótica 3,5 veces. Resultados similares se han observado en otros estudios longitudinales, algunos con una mayor asociación (36), mientras que otros con una asociación mucho menor (37). Incluso, algunos autores no han sido capaces de ver el efecto de las caídas como factor de riesgo para fractura inminente probablemente por el corto espacio de tiempo observado de 1 año (38), mientras que en nuestro estudio el seguimiento fue a 4 años. No obstante, nuestros resultados de presencia de fracturas (8,6 %) durante un período de seguimiento de 4 años, en aquellos que cayeron, estuvo en proporción inferior, pero similar a lo encontrado por otros autores en un estudio español de solo un año de seguimiento (2,3 %), pero en población más envejecida (19).

Varios medicamentos utilizados para tratar la depresión han demostrado que aumentan el riesgo de caídas y fracturas, y algunos también tienen un efecto

directo sobre el hueso, aumentando potencialmente el riesgo de fractura en caso de caída (39,40). Sin embargo, solo dos estudios identificaron a los antidepresivos como un predictor de caídas posteriores, efecto que se perdió en el análisis multivariante (41,42). Otros estudios han informado sobre el uso de psicotrópicos o medicamentos psicoactivos como predictores de caídas (22).

Un reciente metaanálisis muestra que el riesgo de las caídas para incrementar la fractura es independiente de la DMO (43), algo similar a lo que hemos observado en nuestra cohorte y en ambos sexos a nivel de columna lumbar y de cuello femoral. Estos resultados refuerzan la importancia de controlar y evitar las caídas como un importante factor predisponente para la fractura con independencia de los niveles de DMO.

Nuestro estudio tiene limitaciones, pero también fortalezas. Respecto a las primeras, el hecho de que el cuestionario de calidad de vida SF-36 no fue autoadministrado sino administrado por un entrevistador podría haber sesgado alguna de las respuestas de los participantes. Es probable que el recordatorio del historial de caídas en personas de edad avanzada no sea del todo fidedigno, pero es una limitación inherente a los estudios epidemiológicos. Otra limitación podría ser el escaso número de fracturas osteoporóticas incidentes ocurridas en el período de 4 años. Cabe mencionar que este estudio formó parte de un estudio multicéntrico europeo que en sus directrices no contemplaba la realización de estudios de calidad de vida. En nuestro caso, tratando de aprovechar la posibilidad de disponer de una amplia cohorte poblacional seguida de forma prospectiva, analizamos algunos aspectos concretos no contemplados en las directrices del estudio europeo a nivel global. Tampoco debemos olvidar que el estudio se realizó hace casi 30 años con lo que algunos de los resultados obtenidos puedan estar condicionados por este período de tiempo transcurrido.

Como fortalezas, los porcentajes de participación de más del 80 % en los seguimientos postales realizados hasta 8 años después del estudio basal avala la representatividad de la muestra analizada. Por otra parte, este estudio fue prospectivo y no transversal, lo que refuerza la validez de los resultados encontrados y su mayor grado de asociación. Estudios previos de esta cohorte han mostrado cómo las caídas también se asociaron con pérdidas de capacidad funcional, lo que de algún modo avala que los resultados de este estudio pueden ser tomados en consideración (44).

Como conclusiones de este trabajo podemos destacar que prevenir caídas en las mujeres podría condicionar una mejor percepción de la salud y mayor vitalidad, evitando depresión, ansiedad, así como un mejor control emocional y conductual, sin embargo estos resultados deberían ser debidamente confirmados en un estudio específico sobre caídas. Las caídas no se rela-

cionaron en ninguno de los dos sexos con una mayor pérdida de DMO, ni a nivel de columna lumbar ni de cuello femoral, pero las caídas podrían tener importantes consecuencias clínicas con un incremento en la incidencia de fractura osteoporótica.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Estudio Europeo sobre Osteoporosis Vertebral (EVOS), Unión Europea (1991-1993); Estudio Europeo Prospectivo sobre Osteoporosis (EPOS), Unión Europea (BIOMED 93-95), BMHI-CT 092-0182 (1993-1997); Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 94/1901-E); Retic REDinREN de ISCIII (RD06/0016/1013, RD12/0021/0023, RD16/0009/0017, RICORS2040 (RD21/0005/0019), Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Financiado por la Unión Europea – Next Generation EU”, Mecanismo para la Recuperación y la Resiliencia (MRR); Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 y 2018-2022 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028, IDI-2018-000152, IDI-2021-000080); Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT).

## BIBLIOGRAFÍA

1. National Safety Council: Older Adult Falls. <https://www.nsc.org/community-safety/safety-topics/older-adult-falls?srsltid=AfmBOorZP3l0t-fuvhL3wXrxu2x95cBeEDeFFCQXuqRkvlfrVJ37r-kc>
2. Baker SP, Harvey AH. Fall injuries in the elderly. *Clin Geriatr Med* 1985;1:501-12. DOI: 10.1016/S0749-0690(18)30920-0
3. Ray NF, Chan JK, Thamer M, Melton LJ III. Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995: report from the national osteoporosis foundation. *J Bone Miner Res* 1997;12:24-35. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.1.24
4. Tinetti ME, Speechley M, Ginter SF. Risk factors for falls among elderly persons living in the community. *N Engl J Med* 1998;319:1701-7. DOI: 10.1056/NEJM198812293192604
5. Kannus P, Niemi S, Palvanen M, Parkkari J. Fall-induced injuries among elderly people. *Lancet* 1997;350:1174. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)26042-3
6. Schwartz AV, Nevitt MC, Brown BW Jr, Kelsey JL. Increased falling as a risk factor for fracture among older women: the study of osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol* 2005;161:180-5. DOI: 10.1093/aje/kwi023
7. Dargent-Molina P, Favier F, Grandjean H, Baudoin C, Schott AM, Hausherr E, et al. Fall-related factors and risk of hip fracture: the EPIDOS prospective study. *Lancet* 1996;348:145-9. DOI: 10.1016/S0140-6736(96)01440-7
8. Harvey NC, Odén A, Orwoll E, Lapidus J, Kwok T, Karlsson MK, et al. Falls predict fractures independently of FRAX probability:



- a meta-analysis of the osteoporotic fractures in men (MrOS) study. *J Bone Miner Res* 2018;33:510-6. DOI: 10.1002/jbmr.3331
9. Van Staa T, Geusens P, Kanis J, Leufkens H, Gehlbach S, Cooper C. A simple clinical score for estimating the long-term risk of fracture in post-menopausal women. *J Assoc Phys* 2006;99:673-82. DOI: 10.1093/qjmed/hcl094
  10. Kelsey JL, Browner WS, Seeley DG, Nevitt MC, Cummings SR. Study of osteoporotic fractures research group. Risk factors for fractures of the distal forearm and proximal humerus. *Am J Epidemiol* 1992;135:477-89. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a116314
  11. Delbaere K, Crombez G, Vanderstraeten G, Willems T, Cambier D. Fear-related avoidance of activities, falls and physical frailty. A prospective community-based cohort study. *Age Ageing* 2004;33:368-73. DOI: 10.1093/ageing/afh106
  12. van Haastregt JCM, Zijlstra GAR, van Rossum E, van Eijk JTM, Kempen GJIM. Feelings of anxiety and symptoms of depression in community-living older persons who avoid activity for fear of falling. *Am J Geriatr Psychiatry* 2008;16:186-93. DOI: 10.1097/JGP.0b013e3181591c1e
  13. O'Neill TW, Felsenberg D, Varlow J, Cooper C, Kanis JA, Silman AJ. The prevalence of vertebral deformity in European men and women: the European Vertebral Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 1996;11:1010-8. DOI: 10.1002/jbmr.5650110719
  14. Alonso J, Prieto L, Anto JM. La versión española del SF-36 Health Survey (Cuestionario de Salud SF-36): un instrumento para la medida de los resultados clínicos. *Med Clin (Barc)* 1995;104:771-6.
  15. 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. DOI: 10.1007/s00198-007-0539-1
  16. Moreland B, Kakara R, Henry A. Trends in nonfatal falls and fall-related injuries among adults aged  $\geq 65$  years - United States, 2012-2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020;69:875-81. DOI: 10.15585/mmwr.mm6927a5
  17. Coimbra AMV, Ricci NA, Coimbra IB, Costallat LTL. Falls in the elderly of the Family Health Program. *Arch Gerontol Geriatr* 2010;51:317-22. DOI: 10.1016/j.archger.2010.01.010
  18. Thapa PB, Brockman KG, Gideon P, Fought RL, Ray WA. Injurious falls in nonambulatory nursing home residents: A comparative study of circumstances, incidence, and risk factors. *J Am Geriatr Soc* 1996;44:273-8. DOI: 10.1111/j.1532-5415.1996.tb00913.x
  19. Rodríguez Molinero A, Narvaiza L, Gálvez Barróna C, de la Cruz JJ, Ruíz J, Gonzalo N, et al. Caídas en la población anciana española: incidencia, consecuencias y factores de riesgo. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2015;50:274-80. DOI: 10.1016/j.regg.2015.05.005
  20. Hoffman GJ, Hays RD, Wallace SP, Shapiro MF, Ettner SL. Depressive symptomatology and fall risk among communitydwelling older adults. *Soc Sci Med* 2017;178:206-13. DOI: 10.1016/j.socscimed.2017.02.020
  21. Eggermont LHP, Penninx BWJH, Jones RN, Leveille SG. Depressive symptoms, chronic pain, and falls in older communitydwelling adults: the MOBILIZE Boston Study. *J Am Geriatr Soc* 2012;60:230-7.
  22. Kvelde T, McVeigh C, Toson B, GreenawayM, Lord SR, Delbaere K, et al. Depressive symptomatology as a risk factor for falls in older people: systematic review and meta-analysis. *J Am Geriatr Soc* 2013;61:694-706. DOI: 10.1111/jgs.12209
  23. Hendrich AL, Bender PS, Nyhuis A. Validation of the Hendrich II fall risk model: a large concurrent case/control study of hospitalized patients. *Appl Nurs Res* 2003;16:9-21. DOI: 10.1053/apnr.2003.016009
  24. Watson W, Clapperton A, Mitchell R. The cost of falls injury among older people in New South Wales 2006/07. *N S W Public Health Bull* 2010;22:55-9. DOI: 10.1071/NB10002
  25. Cawthon PM, Marshall LM, Michael Y, Dam TT, Ensrud KE, Barrett-Connor E, et al. Frailty in older men: Prevalence, progression and relationship with mortality. *J Am Geriatr Soc* 2007;55:1216-23. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2007.01259.x
  26. Racziewicz D, Bejga P, Owoc J, Witczak M, Bojar I. Gender gap in health condition and quality of life at advanced age. *Ann Agric Environ Med* 2020;27:636-43. DOI: 10.26444/aaem/125753
  27. Akosile CO, Anukam GO, Johnson OE, Fabunmi AA, Okoye EC, Iheukwumere N, et al. Fear of Falling and Quality of life of apparently-healthy elderly individuals from a Nigerian population. *Cross Cult Gerontol* 2014;29:201-9. DOI: 10.1007/s10823-014-9228-7
  28. Beekman AT, Copeland JR, Prince MJ. Review of community prevalence of depression in later life. *Br J Psychiatry* 1999;174:307-11. DOI: 10.1192/bjp.174.4.307
  29. Blazer D, Hughes DC, George LK. The epidemiology of depression in an elderly community population. *Gerontologist* 1987;27:281-7. DOI: 10.1093/geront/27.3.281
  30. Anstey KJ, von Sanden C, Sargent-Cox K, Luszcz MA. Prevalence and risk factors for depression in a longitudinal, population-based study including individuals in the community and residential care. *Am J Geriatr Psychiatry* 2007;15:497-505. DOI: 10.1097/JGP.0b013e31802e21d8
  31. Montero-Odasso M, van der Velde N, Martin FC, Petrovic M, Tan MP, Ryg J, et al. World guidelines for falls prevention and management for older adults: a global initiative. *Age Ageing* 2022;51:afac205. DOI: 10.1093/ageing/afac205
  32. Montero-Odasso MM, Kamkar N, Pieruccini-Faria F, Osman A, Sarquis-Adamson Y, Close J, et al. Evaluation of Clinical Practice Guidelines on Fall Prevention and Management for Older Adults: A Systematic Review. *JAMA Netw Open* 2021;4:e2138911. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.38911
  33. van der Velde N, Seppala LJ, Hartikainen S, Kamkar N, Mallet L, Masud T, et al. European position paper on polypharmacy and fall-risk-increasing drugs recommendations in the World Guidelines for Falls Prevention and Management: implications and implementation. *Eur Geriatr Med* 2023;14:649-58. DOI: 10.1007/s41999-023-00824-8
  34. Sherrington C, Fairhall N, Kwok W, Wallbank G, Tiedemann A, Michaleff ZA, et al. Evidence on physical activity and falls prevention for people aged 65+ years: systematic review to inform the WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *Int J Behav Nutr Phys Act* 2020;17:144. DOI: 10.1186/s12966-020-01041-3
  35. Kim KM, Lui LY, Cummings SR. Recent fall and high imminent risk of fracture in older men and women. *Age and Ageing* 2022;51:1-7. DOI: 10.1093/ageing/afac141
  36. Vranken L, Wyers CE, Van der Velde RY, Janzing HMJ, Kaarsemakers S, Driessen J, et al. Association between incident falls and subsequent fractures in patients attending the fracture liaison service after an index fracture: a 3-year prospective observatio-

- nal cohort study. *BMJ Open* 2022;12:e058983. DOI: 10.1136/bmjopen-2021-058983
37. Afrin N, Sund R, Honkanen R, Koivumaa-Honkanen H, Rikkinen T, Williams L, et al. A fall in the previous 12 months predicts fracture in the subsequent 5 years in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2020;31:839-47. DOI: 10.1007/s00198-019-05255-5
  38. Barron RL, Oster G, Grauer A, Crittenden DB, Weycker D. Determinants of imminent fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 2020;31:2103-11. DOI: 10.1007/s00198-020-05294-3
  39. Coupland C, Dhiman P, Morriss R, Arthur A, Barton G, Hippisley-Cox J. Antidepressant use and risk of adverse outcomes in older people: Population based cohort study. *BMJ* 2011;343:d4551. DOI: 10.1136/bmj.d4551
  40. Verdel BM, Souverein PC, Egberts TCG, van Staa TP, Leufkens HGM, de Vries F. Use of antidepressant drugs and risk of osteoporotic and non-osteoporotic fractures. *Bone* 2010;47:604-9. DOI: 10.1016/j.bone.2010.06.006
  41. Rosendahl E, Lundin-Olsson L, Kallin K, Jensen J, Gustafson Y, Nyberg L. Prediction of falls among older people in residential care facilities by the Downton index. *Aging Clin Exp Res* 2003;15:142-7. DOI: 10.1007/BF03324492
  42. Granek E, Baker SP, Abbey H, Robinson E, Myers AH, Samkoff JS, et al. Medications and diagnoses in relation to falls in a long-term care facility. *J Am Geriatr Soc* 1987;35:503-11. DOI: 10.1111/j.1532-5415.1987.tb01395.x
  43. Vandendput L, Johansson H, McCloskey EV, Liu E, Schini M, Åkeson KE, et al. A meta-analysis of previous falls and subsequent fracture risk in cohort studies. *Osteoporos Int* 2024;35:469-94. DOI: 10.1007/s00198-023-07012-1
  44. Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Rodríguez-Rebollar A, Palomo-Antequera C, Martín-Virgala J, Martín-Carro B, et al. Efecto de la fragilidad y la sarcopenia sobre el riesgo de caídas y de fracturas osteoporóticas en población no seleccionada. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2020;12:81-6. DOI: 10.4321/s1889-836x2020000300002

## Original

# Exploring NF- $\kappa$ B silencing biosafety in mesenchymal stem cells as a possible strategy for osteogenic augmentation

Jennifer Cabello-Sanz<sup>1</sup>, Itziar Álvarez-Iglesias<sup>1</sup>, Vito Lomele<sup>2</sup>, Daniel García-Sánchez<sup>3</sup>, Alberto González-González<sup>1</sup>, Flor María Pérez-Campo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology. Faculty of Medicine. Universidad de Cantabria. IDIVAL. Santander, Spain. <sup>2</sup>Università degli Studi di Ferrara. Ferrara, Italy. <sup>3</sup>Department of Physiology and Cell Biology. Winthrop P. Rockefeller Cancer Institute. University of Arkansas for Medical Sciences. Little Rock, USA

### Abstract

**Introduction:** the decrease in oestrogen levels after menopause increases inflammation, activating the NF- $\kappa$ B pathway in mesenchymal stem cells (MSCs). This pathway has a marked anti-osteogenic effect and plays critical roles in cellular function. Our hypothesis is that silencing key genes in the canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B pathways in endogenous MSCs using the Aptamer-Lipid Nanoparticle-Gapmer system previously designed by our group could be a viable strategy for the treatment of osteoporosis. However, it is essential to verify that such silencing does not compromise basic cellular functions, given the multiple roles of NF- $\kappa$ B in regulating immune responses, apoptosis, and cellular homeostasis.

**Materials and methods:** the murine MSC line C3H10T1/2 was used to assess the silencing of key genes (I $\kappa$  $\alpha$ , I $\kappa$  $\beta$ , Nemo, and Nik) in the canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B pathways using GapmeRs. Gene expression levels were measured post-silencing and compared with those achieved using commercial inhibitors (BMS-345541 and MLN120B). Additionally, basic cellular function assays, including proliferation, chemotaxis, cell migration, and viability, were conducted to evaluate the safety of NF- $\kappa$ B silencing.

**Results:** silencing I $\kappa$  $\alpha$ , I $\kappa$  $\beta$ , Nemo, and Nik resulted in a significant reduction in gene expression in vitro. While NF- $\kappa$ B activation with lipopolysaccharide (LPS) significantly increased the expression of target genes such as IL-6 and NF $\kappa$ B1A, this increase was blocked after gene silencing, reaching levels comparable to those achieved with commercial inhibitors. Cellular function assays showed no significant changes in proliferation, chemotaxis, cell migration, or viability following silencing.

**Conclusions:** NF- $\kappa$ B pathway silencing using GapmeRs does not negatively impact basic cellular functions, suggesting that this approach is safe and efficient. These findings support its potential clinical application in promoting the osteogenic differentiation of MSCs for osteoporosis treatment.

**Keywords:**  
Mesenchymal stem cells.  
Osteogenic differentiation.  
Osteoporosis.  
NF- $\kappa$ B. Cellular therapy.

Received: 30/07/2024 • Accepted: 30/09/2024

Jennifer Cabello-Sanz and Itziar Álvarez-Iglesias have contributed equally to this work.

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

Artificial intelligence (AI): this manuscript was reviewed for grammar and spelling using artificial intelligence tools provided by OpenAI (ChatGPT4o).

Cabello-Sanz J, Álvarez-Iglesias I, Lomele V, García-Sánchez D, González-González A, Pérez-Campo FM. Exploring NF- $\kappa$ B silencing biosafety in mesenchymal stem cells as a possible strategy for osteogenic augmentation. Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(3):97-107

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00056

### Correspondence:

Flor María Pérez-Campo. Department of Biochemistry and Molecular Biology. Faculty of Medicine. Universidad de Cantabria. Avda. Herrera Oria, s/n. 39011 Santander, Spain  
e-mail: f.perezcampo@unican.es

## INTRODUCTION

Osteoporosis, a condition commonly associated with advanced age, is characterized by a reduction in bone mass density and a concomitant deterioration of bone microstructural integrity, leading to an increased susceptibility to fractures (1). The overall prevalence of osteoporosis results in more than 10 million fragility fractures annually, a number that is expected to rise in the coming years due to the aging global population (2). Importantly, osteoporosis-related fragility fractures linked are associated with a significant reduction in quality of life and increased disability.

Currently, there are 2 different approaches to manage osteoporosis: antiresorptive and osteoanabolic drugs. Antiresorptive agents block the osteoclast-mediated bone resorption process. Typical antiresorptive agents are monoclonal antibodies such as Denosumab—targeting RANKL—an activator of pre-osteoclast maturation or bisphosphonates such as alendronate, which induce osteoclast apoptosis. On the other hand, drugs such as teriparatide, a truncated PTH derivative (3), or abaloparatide, a PTH analog (4) have an osteoanabolic function, stimulating osteoblasts proliferation. Both antiresorptive and osteoanabolic drugs have important adverse effects associated to prolonged use, something difficult to avoid in a chronic disease such as osteoporosis (3,5). No new agents had come to market in the last few years except for romosozumab, an anti-sclerostin antibody with a dual antiresorptive and osteoanabolic action (6). However, although treatment with romosozumab dramatically reduces the occurrence of fragility fractures in patients with postmenopausal osteoporosis (7), clinical trials showed an increased cardiovascular risk in patients on romosozumab (7). In addition, the cost of treatment per patient with romosozumab is significantly higher than that of other anti-osteoporotic drugs, something that would negatively impact the national health system. Hence, an emergency clinical need exists to develop cost-effective and long-term safe osteoporosis treatments.

In recent years, there has been increasing interest in using mesenchymal stem cells (MSCs)-based approaches to improve bone regeneration (8). MSCs are multipotent cells with self-renewal capacity, which makes them promising candidates for therapeutic applications in regenerative medicine (9). Importantly, MSCs from osteoporotic individuals seem to have an increased adipogenic capacity at the expense of their osteogenic potential. Therefore, we hypothesize that the enhancement of this osteogenic capacity in MSCs would be a valid approach for osteoporosis treatment. We propose to increase this osteogenic potential of MSCs by silencing key genes with anti-osteogenic activities.

The Wnt/ $\beta$ -catenin (10) and bone morphogenetic proteins (BMP) signaling (11) pathways play major roles

in bone formation. The activation of these pathways drives the transcription of genes, such as alkaline phosphatase (*ALPL*), osteocalcin (*BGLAP*) and the Runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*), which regulate osteoblast differentiation, extracellular matrix synthesis, and bone mineralization. Previous works from our group have shown that silencing inhibitors of the BMP (*Smurf1*) or the Wnt/ $\beta$ -catenin (*Sfrp1*) pathways lead to a significant increase in the osteogenic capacity of MSCs *in vitro* in MSCs from osteoporotic patients (12,13). Moreover, we designed a system to specifically silence those genes at the endogenous MSCs (14). Our system is based on the use of a particular type of lock nucleic acid-antisense oligonucleotides (LNA-ASOs), known as GapmeRs. These molecules consist of a single-stranded deoxyribonucleotide typically composed by 14-20 bp, which specifically binds to its mRNA target creating a DNA/RNA hybrid duplex that will be then recognized by the RNaseH leading to the degradation of the targeted mRNA (15). The GapmeR construct includes a central DNA sequence flanked by 2 RNA sequences modified for heightened resistance to endonucleases, ensuring optimal efficacy and durability (13). The silencing produced by the GapmeRs is transient and does not cause permanent changes to the DNA, thus reducing possible unwanted side effects. This method is clinically safe enabling the translation of this treatment into the routine clinical practice (16). In fact, some treatments currently used in clinical practice are based in the use of ASOs (17), such as eteplirsen for treatment of Duchenne muscular dystrophy (DMD) (18), or nusinersen for treatment of spinal muscular atrophy (19). To specifically deliver the GapmeRs to endogenous MSCs, these molecules are encapsulated within hybrid nanoparticles and specifically directed to the BM-MSCs using aptamers that recognize these cells. We have shown that silencing *Sfrp1 in vivo*, at the level of the endogenous MSCs, using this system is a viable approach to increase bone mass in an osteoporotic mouse model. Targeting this inhibitor of the Wnt/ $\beta$ -catenin *in vivo* using this gapmeR-nanoparticles-aptamer system increases bone mass in osteoporotic mice by up to 30 % (12,14). Our current aim is to increase bone-formation efficiency of our system. For this purpose, in this work we tested the feasibility of targeting another signaling pathway that has an anti-osteogenic activity, the NF- $\kappa$ B pathway, with the notion that the simultaneous silencing of *Sfrp1* and a putative target from the NF- $\kappa$ B pathway will significantly increase the previous percentage.

The NF- $\kappa$ B signaling pathway includes 3 integral components: the NF- $\kappa$ B dimer, the IKK complex, and the I $\kappa$ B protein (15). Although the NF- $\kappa$ B dimer is constitutively present in the cytosol of cells it is kept in an inactive state by the action of the I $\kappa$ B proteins. I $\kappa$ B proteins have a domain called the destruction box, which is rich in serine residues. When the cell receives a signal activating the NF- $\kappa$ B pathway, serine residues in the destruction box domain are phosphorylated by the IKK

protein kinases, thus inducing the degradation of the I $\kappa$ B protein and the release of the NF- $\kappa$ B dimer. Once released, this dimer can translocate to the nucleus and regulate the expression of target genes (15). The NF- $\kappa$ B pathway exhibits 2 distinct modalities known as the canonical and alternative pathways. In the canonical route, the IKK complex is composed by *Ikk $\alpha$* , *Ikk $\beta$* , and *Nemo*. *Ikk $\beta$*  serves as the primary kinase responsible for phosphorylating the serine residues within the I $\kappa$ B $\alpha$  destruction box. The phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  leads to the release of the NF- $\kappa$ B dimer, which translocates into the nucleus (15). In contrast, the non-canonical or alternative route depends on *Nik*, which is a constitutively active but normally degraded protein. When the cell receives an activation signal from the NF- $\kappa$ B pathway, the degradation of *Nik* stops and *Nik* phosphorylates the *Ikk $\alpha$*  protein, thus leading to a subsequent release of the NF- $\kappa$ B dimer, which again translocates into the nucleus (15). The NF- $\kappa$ B canonical and non-canonical pathways are involved in many processes, such as cell proliferation and survival, DNA damage repair, and immunity (20). NF- $\kappa$ B inactivation has been associated with an increased osteoblast activity and bone formation (21) suggesting that inactivation of this pathway could be a likely approach for further enhancing bone formation in our model (22).

The NF- $\kappa$ B signalling pathway plays a pivotal role in regulating various basic cellular functions, including viability, migration, chemotaxis, and proliferation, particularly in mesenchymal stem cells (MSCs). NF- $\kappa$ B is a family of transcription factors that control the expression of genes involved in immune and inflammatory responses, as well as cell survival, differentiation, and apoptosis (23). In MSCs, NF- $\kappa$ B activation is crucial for maintaining cellular viability by regulating anti-apoptotic genes and promoting resistance to stress-induced cell death. Moreover, NF- $\kappa$ B influences the migratory and chemotactic capabilities of MSCs, which are essential for their therapeutic potential in tissue repair and regeneration. This pathway modulates the expression of chemokines and adhesion molecules, thereby guiding MSCs migration towards injury sites (24). NF- $\kappa$ B also plays a significant role in cell proliferation by regulating the expression of cyclins and other cell cycle-related proteins, ensuring proper cell cycle progression and proliferation. These multifaceted roles underscore the importance of NF- $\kappa$ B signalling in the functional regulation of MSCs and its potential implications in clinical applications. Besides its implication in bone formation and basic cellular functions, the NF- $\kappa$ B pathway plays a crucial role in the regulation of inflammation, which indirectly impacts bone formation. Ageing and, in women, the decline in estrogen levels after menopause, lead to a significant increase of inflammation in the bone marrow (BM) microenvironment, resulting in the establishment of a hostile environment. This inflammatory environment prevents the differentiation of MSCs into osteoblasts promoting their adipocytic differentiation (25). The

activation of the NF- $\kappa$ B pathway in BM MSCs directly contributes to the establishment of this hostile microenvironment. Once this pathway has been activated in MSCs, these cells would produce a set of pro-inflammatory cytokines, that, in turn, exacerbate inflammation, further hindering bone regeneration.

We propose that silencing key genes of the canonical and/or non-canonical NF- $\kappa$ B pathways in MSCs would increase their osteogenic capacity, thus increasing the efficiency of our previous model based on the sole silencing of *Sfrp1*. Importantly, this approach would not only enhance osteogenic differentiation but could also modulate the composition of the MSCs secretome, thus reducing the presence of pro-inflammatory factors. This immunomodulatory effect would create a permissive BM microenvironment that would facilitate bone regeneration. Both strategies aim to effectively increase bone mass, offering a promising treatment approach for diseases characterized by reduced bone mass, including osteoporosis.

## MATERIALS AND METHODS

---

### CELL CULTURE

C3H10T1/2 (Clone 8, Ref. CCL-226, ATCC, Manassas, VA, United States), an immortalized murine MSCs line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, Waltham, MA, USA) supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) and 1 % penicillin-streptomycin. Cell passage was performed using TryPLE Express (Ref. 12604-013, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA United States).

### GapmeR DESIGN

Antisense LNA GapmeRs were purchased from Exiqon (Qiagen, Venlo, The Netherlands). A non-specific GapmeR Negative Control A (Ref. 339515 LG00000002-DDA) was used as a control GapmeR, and specific GapmeRs were used to target *Ikk $\alpha$*  (Ref. LG00824583-DDA), *IKK $\beta$*  (Ref. LG00824663-DDA), *Nemo* (Ref. LG00824633) and *Nik* (Ref. LG00824353).

### CELL TRANSFECTION

Lipofection was performed in a 24-well plate using Dharmafect (Ref. T-2001-01, Dharmacon, Horizon Discovery, Cambridge, United Kingdom), following the manufacturer's instructions for use. Cells were seeded at 12,500 cells/cm<sup>2</sup> 24 hours before transfection. Two hours before transfection, cells were washed twice



with PBS 1X and culture medium was replaced with Opti-MEM (Ref. 31985047, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). GapmeR concentration used was 20nM. Transfection was performed following the manufacturer's instructions for use. After incubation at 37 °C for 24 hours, an equal volume of culture medium was added. Finally, 48 hours after transfection, the medium was removed and the cells were washed once with PBS, and culture medium was added.

### RNA EXTRACTION AND CONVERSION TO cDNA

Cells were washed twice with PBS prior to collect the mRNA using TRIzol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, United States). After TRIzol addition, the plate surface was scrapped to maximize the material collected. RNA was extracted following the manufacturer's instructions for use. mRNA retrotranscription was performed with the PrimeScript RT Reagent Kit (RR037A, Takara Bio Inc, Shiga, Japan) following the manufacturer's instructions for use. The resulting cDNA was diluted 4 times with ddH<sub>2</sub>O to perform gene expression analysis by semi-quantitative PCR.

### GENE EXPRESSION ANALYSIS

Gene expression levels were measured using semi-quantitative PCRs TaqMan assays (Applied Biosystems, Waltham, MA, United States). To test gene silencing, the following TaqMan assays were used: Mm00432529\_m1 (*Ikkα*), Mm01222247\_m1 (*Ikkβ*), Mm00494927\_m1 (*Nemo*), Mm00444166\_m1 (*Nik*). To analyze gene expression of the NF-κB pathway target genes, the following TaqMan assays were used: Mm00446190\_m1 (*Il-6*) and *NFKB1A* (Mm00477798\_m1). For normalization, we used the mouse housekeeping GAPDH gene (Assay Mm99999-915\_G1).

### FLOW CYTOMETRY AND APOPTOSIS ASSAY

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (556547, BD Bioscience, San Diego, CA, United States) was used following the manufacturer's instructions for use. Forty-eight hours after transfection, 100,000 cells per condition were transferred into 2 flow cytometry tubes and washed twice with 1× PBS at 4 °C. The cells were, then, resuspended in 100 μL of Binding Buffer and 2.5 μL of Annexin V-FITC labelled antibody was added to 1 tube for each condition. After 30 minutes incubation in the dark, cells were washed twice with 1X PBS at 4 °C and resuspended in 100 μL of Binding Buffer. Finally, 2.5 μL of 7-amino-actinomycin D (7-AAD) was added to each tube just before flow cytometry.

### CELL PROLIFERATION ASSAY

Cells were transfected in 24-well plates as previously explained and harvested 48 h after transfection. Afterwards, different cell numbers (100, 200, 300 and 400 cells per well) were seeded onto a 96-well plate in triplicates and allowed to attach overnight. Then, cells were allowed to proliferate for 1, 4, 6, 8, 10 and 12 days. To determinate cells viability at different timeframes, culture media was substituted by complete DMEM (10 % FBS and 1 % penicillin-streptomycin) containing 0.5 mg/mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and cells were incubated for 4 hours. Then, the media was changed to 100 μL of 2-propanol and incubated at 37°C for 10 minutes. Finally, absorbance at 570 nm was measured with a plate lector Eon (BioTek, Winooski, VT, United States). The results are represented as the increase in cell number vs the previous day.

### CELL MIGRATION ASSAY

Cell migration capacity after transfection with the GapmeRs was analyzed by a wound healing assay. For this, C3H10T1/2 cells were seeded at high confluence in a 6-well plate (25,000 cells/cm<sup>2</sup>) and then transfected following the standard protocol. Wounds were performed using a 0.1-20 μL pipette tip to produce wounds 300 μm wide. In a Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments Inc. Melville, NY, United States), pictures of the 6 different fields were taken every 3 hours for a total of 15 hours. The live cell microscope maintained the cells at 37 °C under normoxic conditions. Finally, we measured the area of the wound every 3 hours with the NIS-Elements software (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, United States), and determine the average wound area per time and condition.

### TRANSWELL MIGRATION ASSAY

A total of 7000 transfected cells resuspended in 200 μL of serum-free media were seeded per upper chamber of a 6.5 mm Transwell with 8 μm Pore Polycarbonate Membrane Insert (3422, Corning, Somerville, Massachusetts, United States). Cells were incubated with 100 ng/mL Stromal cell-Derived Factor-1 (SDF-1, Ref. 10118-HNAE, Sino Biological Inc., Houston, Texas, United States) in 600 μL of serum-free media in the lower chamber for 24 hours at 37 °C. After incubation, to avoid background signal, cells that did not migrate through the membrane were eliminated by washing the upper chamber twice with 1× PBS and cleaning it with a cotton swap. Finally, cells were stained with 600 μL 1.01 μg/mL DAPI (Ref. 62248, ThermoFisher Scientific, Rockford, United States) in 1X PBS for 10 minutes and kept in 1× PBS until

4-5 fields per well at 10 $\times$  pictures were taken in a fluorescence or phase contrast microscope. Graph represents average cell number per well.

## STATISTICAL ANALYSIS

Error bars on graphs represent the standard error of the mean value (SEM). Statistical significance was calculated using the Students' t test. Significance was always set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### NF- $\kappa$ B PATHWAY INACTIVATION IN THE MSCs CELL LINE C3H10T1/2

We hypothesized that silencing key genes in the NF- $\kappa$ B pathway may lead to a reduced overall activity of the pathway, thus increasing the osteogenic potential of MSCs. To put this hypothesis to the test, we first needed to efficiently silence these genes and confirm the inactivation of the pathway in the murine MSCs cell line C3H10T1/2. We selected 4 key components of the canonical and non-canonical pathways: *Ikk $\alpha$* , *Ikk $\beta$* , *Nemo* and *Nik* and designed specific GapmeRs to achieve gene silencing. The expression of the targeted genes was assessed by qPCR 48 hours after transfection with these GapmeRs (Fig. 1A). Transfection with a non-specific gapmeR was used as a control in all the experiments (GpmR Ctrl). We observed a statistically significant silencing of 61.2 % of *Ikk $\alpha$* , 62.1 % of *Ikk $\beta$* , 64.5 % of *Nemo* and 43 % of *Nik* vs control.

Once we confirmed the silencing of the different targets, we needed to make sure that those levels of silencing led to a significant inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway. For this purpose, we needed to establish a method to monitor the activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. Activation of this pathway in MSCs *in vitro* is generally achieved through incubation with lipopolysaccharide (LPS) (26). To determine the optimal concentration of LPS for pathway activation in our experimental settings, we measured the activation of the pathway in response to different concentrations of LPS by evaluating the increase in *Il-6* expression levels, a direct target of this pathway (27). We conducted a screening in untransfected cells using 3 different concentrations of LPS (0.5  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL, and 50  $\mu$ g/mL) (Fig. 1B). Our results indicate that a concentration of 1  $\mu$ g/mL LPS leads to a significant increase in *Il-6* expression levels and thus, is optimal for NF- $\kappa$ B pathway activation. This amount of LPS, maintained in the culture media for 18 hours, resulted in a 1.5-fold increase in *Il-6* expression.

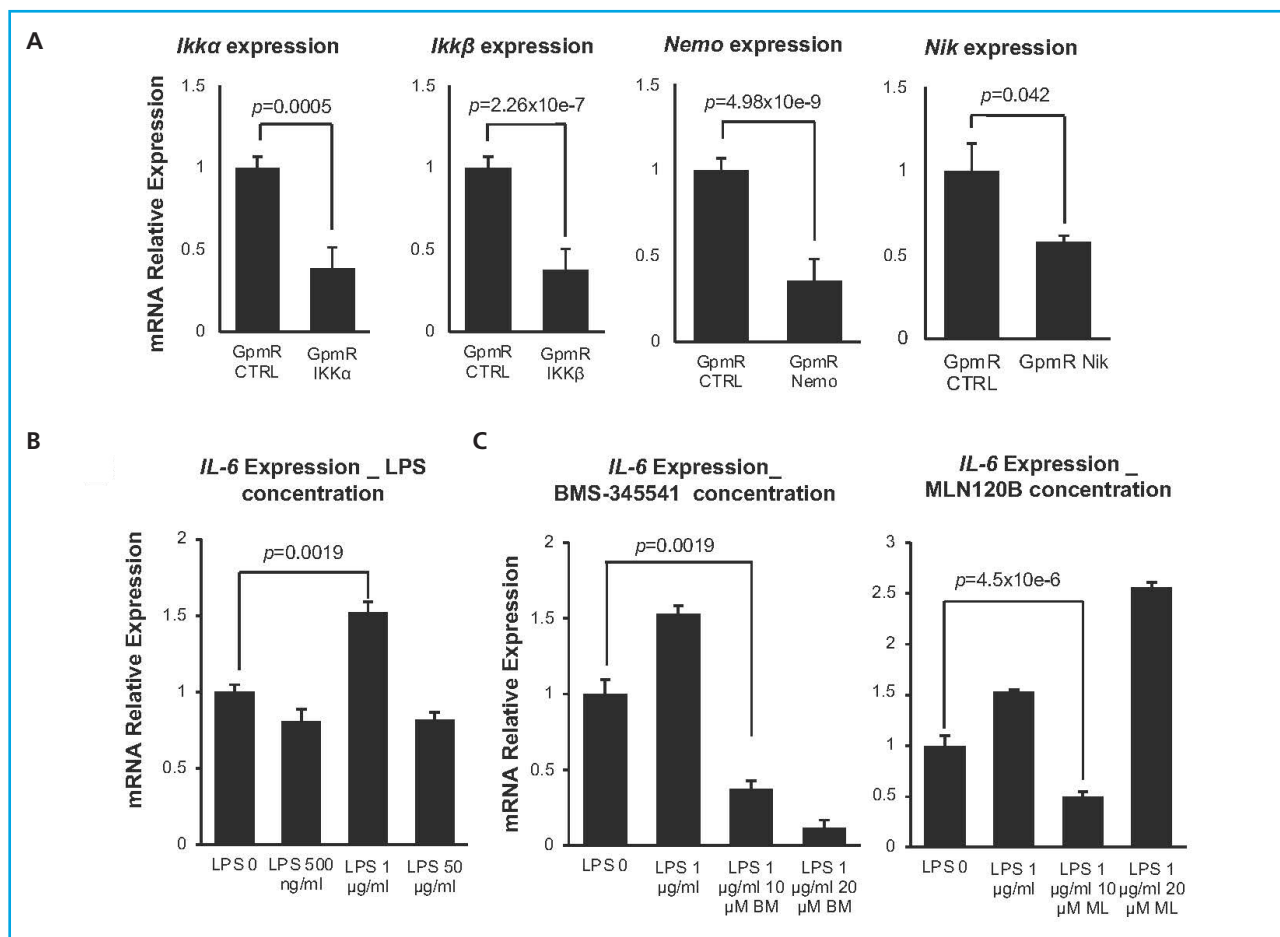
Simultaneously, we determined the appropriate concentration of commercial inhibitors of the NF- $\kappa$ B pathway (BMS-345541 and MLN120B) that effectively block its activation without inducing toxicity in the C3H10T1/2 cell line (Fig. 1C). These molecules would be used as controls of pathway inhibition in our experiments. Two different concentrations of each inhibitor were tested, 10  $\mu$ M and 20  $\mu$ M in cells cultured in the presence of 1 mg/mL LPS. With both inhibitors a concentration of 10  $\mu$ M was found to significantly inhibit the surge in *Il-6* expression in response to LPS. In the case of the BMS-345541 inhibitor, a higher reduction in *Il-6* expression was detected when the concentration used was 20  $\mu$ M due to the toxic effect of this condition that would lead to a significant increase in cell death.

Once the appropriate concentrations of LPS and inhibitors were determined, we were set to verify that the inhibition of the different components of the NF- $\kappa$ B pathway with the specific GapmeRs did indeed lead to a reduction in the activity of the pathway. Therefore, we compared the expression of *Il-6* in transfected cells grown in LPS to that of cells transfected with the control GapmeR grown in the same inductive conditions. The decrease in the level of pathway activity achieved by the silencing of each of the genes was compared to that achieved by the commercial inhibitors BMS-345541 and MLN120B (Fig. 2A). The results show that cells transfected with *Ikk $\alpha$* , *Nemo* and *Nik* GapmeRs did not respond to LPS by increasing *Il-6* expression confirming that the silencing of those genes greatly impacts the activity of the pathway. Results obtained with cells where *Ikk $\beta$*  had been silenced were somewhat different. The graph shows that *Il-6* expression significantly increases in cells where *Ikk $\beta$*  has been silenced vs the gpmR control group without LPS. Since it has been described that *Ikk $\beta$*  silencing could have an effect on the expression of negative regulators of the pathway, such as I $\kappa$ B $\alpha$ , which sequester NF- $\kappa$ B in the cytoplasm, affecting both basal and stimulated activity, we decided to analyze the expression of an alternative target of the NF- $\kappa$ B pathway, the *NF $\kappa$ B1A* (28) gene (Fig. 2B) to provide insights into whether the observed effects on *Il-6* are specific to its regulatory mechanisms or reflect a broader alteration in NF- $\kappa$ B signaling. In this case, the pattern of *NF $\kappa$ B1A*, unlike *Il-6*, would support the negative effect of *Ikk $\beta$*  silencing on general NF- $\kappa$ B activity.

### EVALUATION OF THE BIOSAFETY OF SILENCING NF- $\kappa$ B GENES IN THE MURINE MSCs CELL LINE C3H10T1/2

Since the NF- $\kappa$ B pathway regulates various cellular responses, including cell proliferation, migration, and survival, we decided to analyze the effect of





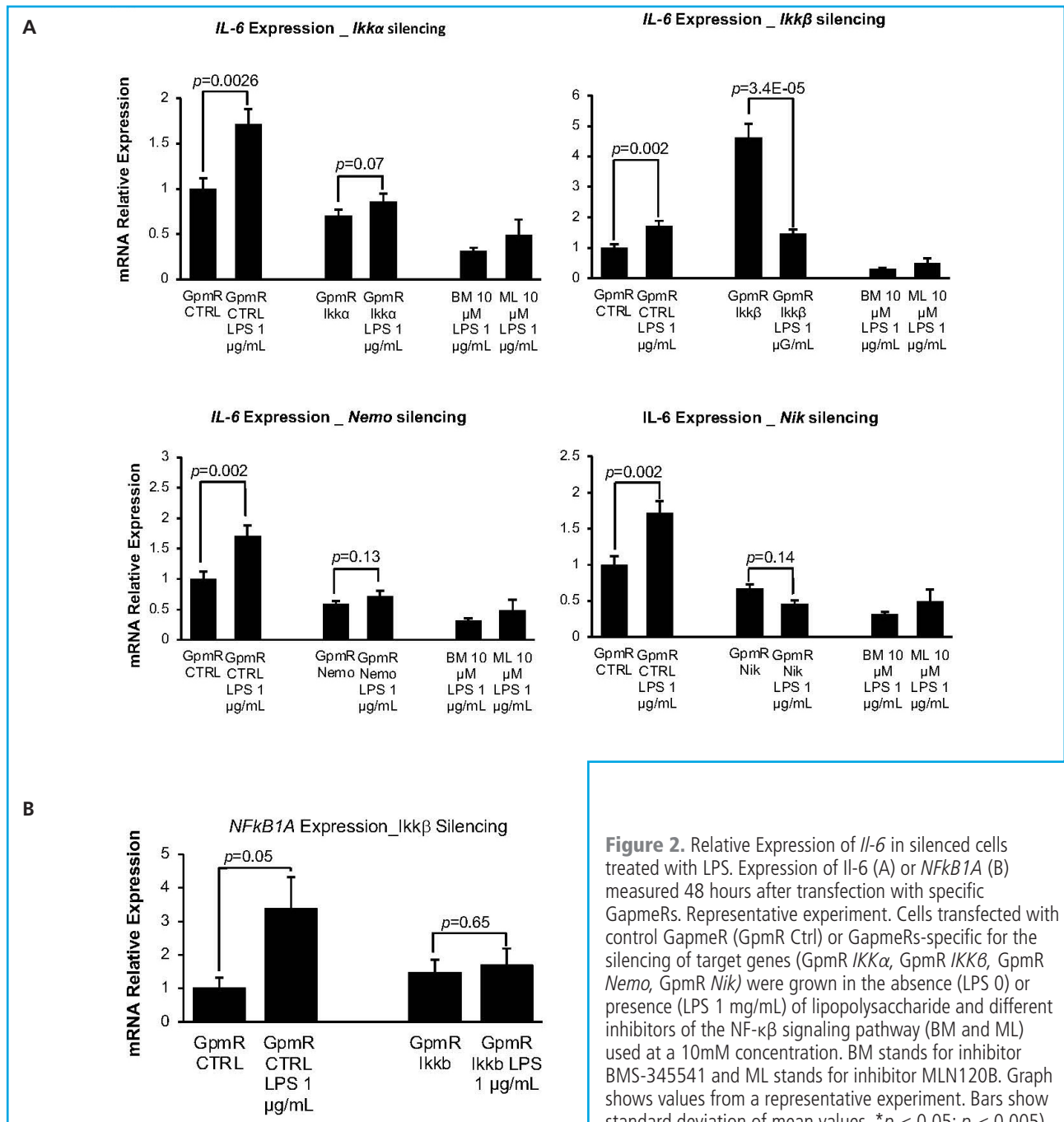
**Figure 1.** Silencing of NF- $\kappa$ B pathway in the C3H10T1/2. A. Relative expression of targeted genes. Expression was measured 48 hours after transfection with specific GapmeRs. Absolute values were normalized vs those obtained after transfection with a control GapmeR ( $n = 4$ ). B. Relative expression of *IL-6* after treatment with different concentrations of LPS. Expression was measured 18 hours after growing C3H10T1/2 with LPS 0.5, 1 and 50  $\mu$ g/mL to activate NF $\kappa$ B pathway ( $n = 3$ ). C. Relative expression of *IL-6* with commercial inhibitors BMS-345541 and MLN120B in the presence of 1  $\mu$ g/mL LPS ( $n = 3$ ). Bars show standard deviation of mean values. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ).

*Ikka*, *Ikkβ*, *Nemo* and *Nik* silencing these basic cellular functions.

To analyze the proliferation of the transfected cells, we performed an MTT assay (Fig. 3A). Results are represented as the increase in cell number vs the previous day. No significant differences were observed between the silenced cells and control, except for *Ikkβ* silenced cells at the D8/D4 point exhibiting a significant increase in proliferation. Nevertheless, this increase was resolved at the last day, a point at which proliferation levels were comparable to those of the control.

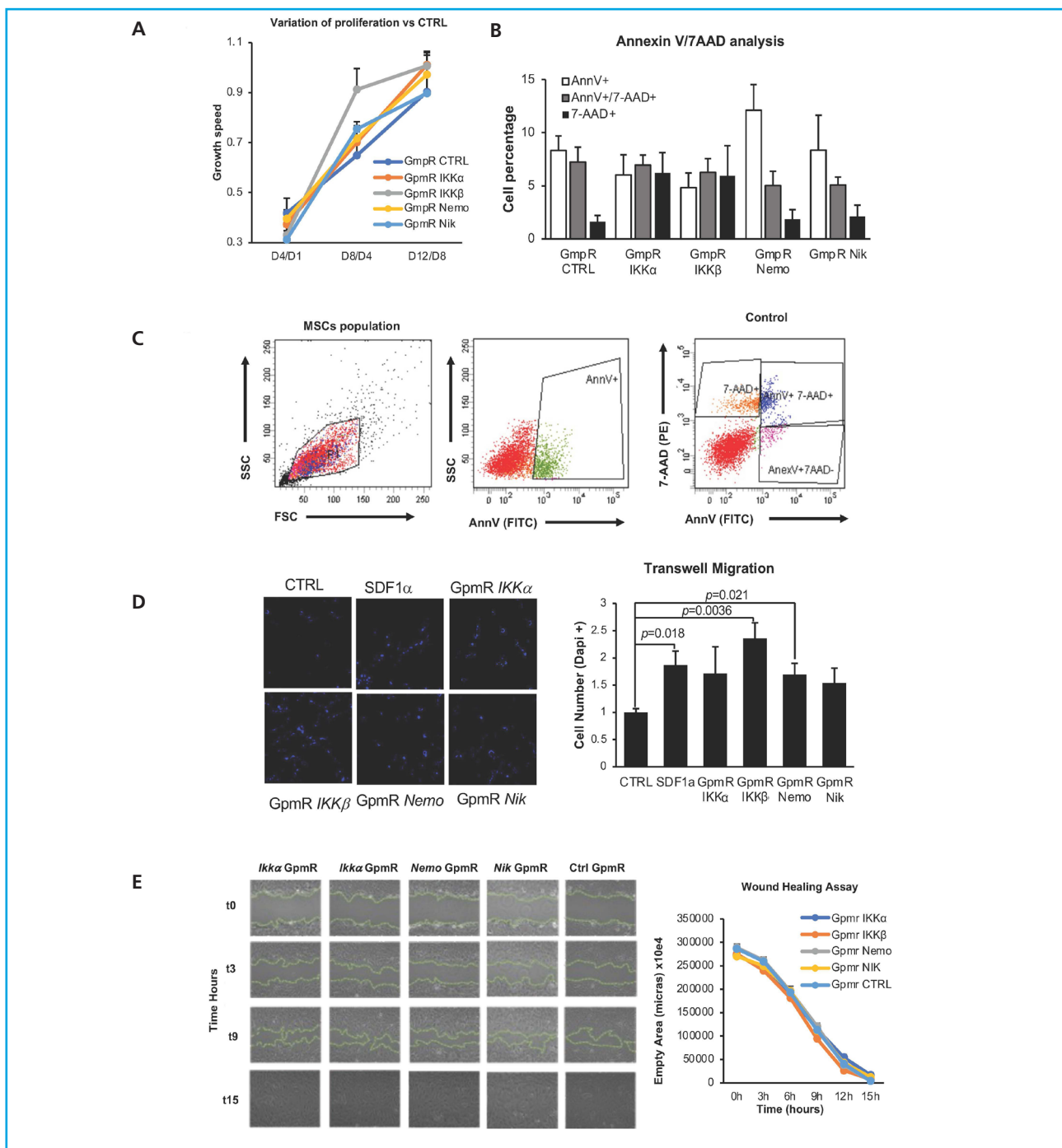
CXCL12/CXCR4 signaling is involved in the chemotaxis and homing of stem cells (29). Since one of the known targets of the NF- $\kappa$ B pathway in other cells is C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) (30), the receptor for the stromal cell derived factor 1 (SDF-1  $\alpha$ ) (27), we decided to analyze if silencing the different genes could affect the capacity of transfected

cells to respond to this chemotactic agent (Fig. 3B). Therefore, we performed a chemotaxis analysis using a transwell migration assay. Forty-eight hours after transfection, cells were added to the upper side of a 0.8 transwell membrane and exposed to medium containing SDF-1 on the lower chamber of the transwell. Cells were allowed to migrate towards the lower part of the transwell membrane for 24 hours. Cells that had migrated and were attached to the lower part of the transwell membrane were stained with DAPI and detected using fluorescence microscopy. The results are normalized to gapmeR transfected cells exposed to SDF-1. The negative control (CTRL corresponding to cells not exposed to SDF-1 $\alpha$ ) showed a significantly lower migration than that of cells exposed to SDF-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ). However, no significant differences were found between the chemotactic response to SDF-1 $\alpha$  of the cells where the different genes of the NF- $\kappa$ B pathway have been silenced and non-transfected cells.



Finally, to analyze the effect of *Ikkα*, *Ikkβ*, *Nemo* and *Nik* silencing on MSCs viability, we performed an Annexin/7-AAD assay (Fig. 3C) 48 hours after transfection, using annexin V (AnnV) and 7-amino-actinomycin D (7-AAD). AnnV marks cells undergoing apoptosis, as it binds to phosphatidylserine when this phospholipid translocates to the outer part of the cell membrane, one of the early signs of apoptosis. Conversely, 7-AAD marks cells in late apoptosis, as it binds to DNA but cannot penetrate intact cell mem-

branes, thus only entering the cells when cellular integrity is compromised. We can detect viable cells (Ann-/7-AAD-), early apoptotic cells (Ann+/7-AAD-), late apoptotic cells (Ann+/7-AAD+), and dead cells (Ann-/7-AAD+). Although a tendency to an increase of apoptotic cells was observed upon transfection with the gapmeR for the *Nemo* silencing, this difference was not significant, suggesting that the silencing of genes from the NF- $\kappa$ B signaling pathway has no effect on cell viability.



**Figure 3.** Evaluation of the biosafety of MSCs C3H10T1/2 cell line expressing low levels of NF- $\kappa$ B key genes. **A.** Effect of target inhibition on cell proliferation. Results from the MTT analysis to measure the effect of target gene inhibition on cell proliferation ability. The results are expressed as the difference of each endpoint relative to the previous one ( $n = 2$ ). **B.** Effect of target inhibition over the response to chemotactic agents. C3H10T1/2 migration capacity in response to SDF-1 $\alpha$ . To the left, representative images of transfected cells that migrated through the transwell membrane stained with DAPI (magnification 10 $\times$ ). To the right, quantification of migrating cells. The number of migrating cells in each case is normalized vs the number of cells transfected with the control GpmR migrating in the absence of SDF-1 $\alpha$ . Representative result ( $n = 5$ ). **C.** Effect of target genes inhibition over MSCs viability. Results are expressed as the percentage of cells marked with AnnV and/or 7-AAD. AnnV+ are early apoptotic cells, AnnV+/7-AAD+ are late apoptotic cells, and 7-AAD+ are necrotic cells ( $n = 3$ ). For all experiments, graph express the mean values of 5 or 3 experiments, as indicated. Bars show standard deviation of the mean values. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ . **D.** Wound healing assay performed 48 h after transfection. **E.** Right. representative pictures at time 0, 3, 9, 15 hours of control group and cells transfected with specific GapmeRs for *Ikk $\alpha$* , *Ikk $\beta$* , Nemo and *Nik*. Areas lacking cells are outlined in green. Left. Mean values of the quantification of the wound area (in pixels) performed every 3 hours.

## DISCUSSION

MSCs-based approaches had been proposed as an alternative to improve bone regeneration. We have previously managed a 30 % increase in the osteogenic potential of osteoporotic MSCs by silencing *Sfrp1*, an inhibitor of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway (14). We hypothesize that it would be possible to further increase this osteogenic potential by silencing key genes of the NF- $\kappa$ B canonical and non-canonical pathways. This hypothesis originates from the previously explained role of the pathway in reducing bone mass, both directly through the inhibition of osteoblastogenesis and indirectly through the increase of inflammation levels in the BM microenvironment.

Regarding its anti-osteogenic activity, the NF- $\kappa$ B signaling pathway influences osteogenesis through different mechanism. NF- $\kappa$ B binds to the promoter of *Smurf1* and *Smurf2*, both inhibitors of the BMP pathway, and increases their transcription (22). In addition, NF- $\kappa$ B inhibits the activity of Fos-related antigen 1 (Fra-1) (31). This protein, part of the activator protein-1 (AP-1) family, regulates the expression of various genes involved in osteoblast differentiation and bone matrix production. In relation to the indirect influence of NF- $\kappa$ B in bone formation, this pathway plays a major role in establishing the BM pro-inflammatory microenvironment. Loss of estrogen increases the activity of Th17 (32) cells, and, consequently, proinflammatory cytokines such as Interleukine-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interleukine-17 (IL-17) and receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANKL) (33). These molecules work by activating the NF- $\kappa$ B signaling pathway, thus perpetuating the activation of Th17 lymphocytes by producing cell survival factors and pro-inflammatory cytokines. In addition, the activation of the NF- $\kappa$ B pathway inhibits the anti-inflammatory activity of B lymphocytes. B cells reduce the pro-inflammatory environment and increase bone formation producing osteoprotegerin (OPG) (33), while T cells have a pro-inflammatory action (34). These pro-inflammatory cytokines also inhibit the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway by increasing the expression of sclerostin and decreasing the synthesis of *RUNX2*, *IBSP* and *BGLAP* (35). All this combined results in major differentiation of MSCs into adipocytes, decreasing their differentiation into osteoblasts, thereby compromising bone homeostasis.

To silence the selected target genes of the NF- $\kappa$ B pathway we designed a specific gapmeR for each target gene which binds to the mRNA molecule by inducing its degradation by the RNase H. The silencing caused by this system is transient and does not cause permanent changes to the DNA, thereby ensuring its safety. Silencing target genes with GapmeRs was confirmed by qPCR. The expression of target genes is significantly reduced after transfection vs the control GapmeRs, indicating an efficient silencing of those genes. Although the different expression of the targeted genes

between control cells and those transfected with the correspondent GapmeR were rarely > 65 %, this reduction in gene expression is enough to produce substantial changes in cellular behavior, protein production, and overall phenotype. For instance, in therapeutic contexts, even the partial knockdown of a gene involved in a disease can result in meaningful clinical improvements (36,37).

Once the efficiency of GapmeRs in silencing gene expression was evaluated, we needed to perform an essay to make sure that the inhibition of target genes effectively reduced NF- $\kappa$ B signaling. IL-6 serves as a marker of pro-inflammatory activity, showing clear responses to pathway activation levels (27). *Ikk $\alpha$* , *Ikk $\beta$* , *Nemo* and *Nik* targeting showed a statistically significant reduction of *Il-6* expression upon activation with LPS 1  $\mu$ g/mL for 18 hours vs control (Fig. 2A), meaning that NF- $\kappa$ B is effectively inhibited even in the presence of an inducer. This underscores the fact that a small percentage of gene silencing could have substantial effects on cell phenotype, particularly in the case of *Nik* silencing where a significant decrease of *Il-6* expression is achieved. Interestingly, we found that cells where *Ikk $\beta$*  had been silenced showed a significant increase in *Il-6* expression without LPS. However, expression levels of *NFKBIA*—another direct target of the NF- $\kappa$ B pathway—did follow the expected expression pattern and were downregulated in *Ikk $\beta$* -silenced cells. The differences in the effects of *Ikk $\beta$*  silencing on *Il-6* and *NFKBIA* (*I $\kappa$ B $\alpha$* ) expression highlight the complex nature of NF- $\kappa$ B signaling regulation. When *Ikk $\beta$*  is silenced, the canonical NF- $\kappa$ B pathway is inhibited, as evidenced by the decreased expression of *NFKBIA*. However, the increased *Il-6* expression could be due to compensatory mechanisms such as the activation of the MAPK/ERK or JNK pathways, which can independently regulate IL-6 production (38). Moreover, the NF- $\kappa$ B pathway involves intricate feedback loops, and silencing *IKK $\beta$*  might disrupt these loops, leading to an unexpected upregulation of *Il-6* as a compensatory response (39).

NF- $\kappa$ B pathway is not only involved in inflammation but in other cell functions such as cell proliferation. Therefore, we needed to make sure that the changes introduced in the MSCs did not affect basic cell functions. Although the results of our MTT assays showed a significant difference in *Ikk $\beta$* -silenced cells at the midpoint. Of note, this difference disappears at the endpoint when its proliferation matches the control. This suggests that this difference found at midpoint is not due to a true increase in their proliferation capacity. No other significant differences were found. Therefore, these results suggest that the silencing target genes does not affect the cells proliferative capabilities.

On the other hand, reducing NF- $\kappa$ B pathway activity by silencing target genes could reduce CXCR4 expres-



sion affecting the MSCs behavior in the bone marrow. However, the results of our transwell migration assay eliminated this possibility in our system since no statistically significant differences were found between the different conditions. These results suggest that NF- $\kappa$ B silencing is not affecting the ability of the transfected cells to respond to chemotactic agents. In fact, MSC chemotaxis could be regulated by other signaling pathways that are not affected by the silencing of NF- $\kappa$ B components. For instance, chemokine receptors such as CXCR4 are also regulated by the PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling pathways, which might maintain chemotactic responses independently of NF- $\kappa$ B (40).

To be able to use a pro-regenerative approach involving silencing of any of the targeted genes *in vivo*, we also needed to guarantee the safety of this change and check that silencing of the targeted genes was not touching the cells viability. Therefore, we conducted a flow cytometry analysis with AnnV and 7-AAD. Our results show no significant differences at this level between control and the silenced cells. However, *Nemo*-silenced cells seem to have more apoptotic cells, and *Ikk $\alpha$*  and *Ikk $\beta$* -silenced cells seem to have more percentage of necrotic cells. However, none of these differences were significant confirming that silencing targeted genes does not affect the cells viability.

Our study demonstrates that targeted silencing of key genes in the NF- $\kappa$ B pathway could be used as an approach to enhance the osteogenic potential of MSCs without compromising their viability, proliferative capabilities, or chemotactic behavior. The significant reduction in *Il-6* expression upon silencing key components of the pathway underscores the critical role of the NF- $\kappa$ B pathway in modulating inflammatory responses within the BM microenvironment. Moreover, the transient nature of gene silencing via GapmeRs ensures the safety and reversibility of changes, making this approach viable for potential clinical applications.

The combination of silencing genes from the NF- $\kappa$ B signalling pathway with the previously proven silencing of *Sfrp1* in endogenous MSCs (12,14) could synergistically enhance the pro-osteogenic properties of osteoporotic MSCs. Our previous research has shown that silencing *Sfrp1*—an inhibitor of the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway—leads to a 30 % increase in osteogenic potential (14). Therefore, combining the silencing of *Sfrp1* with key genes from the NF- $\kappa$ B signalling pathway may further amplify the regenerative effects, offering a robust strategy to fight osteoporosis and other bone-related conditions. Future research should focus on *in vivo* studies to validate these findings and explore the long-term effects of combined pathway modulation on bone homeostasis and regeneration. Additionally, investigating the interplay between NF- $\kappa$ B and other signalling pathways involved in MSC differentiation and function could provide deeper insights into optimizing regenerative strategies.

## REFERENCES

1. Siris ES, Adler R, Bilezikian J, Bolognese M, Dawson-Hughes B, Favus MJ, et al. The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the National Bone Health Alliance Working Group. *Osteoporosis International* 2014;25:1439-43. DOI: 10.1007/s00198-014-2655-z
2. Sing C, Lin T, Bartholomew S, Bell JS, Bennett C, Beyene K, et al. Global Epidemiology of Hip Fractures: Secular Trends in Incidence Rate, Post-Fracture Treatment, and All-Cause Mortality. *JBMR* 2023;38:1064-75. DOI: 10.1002/jbmr.4821.
3. Cranney A. Parathyroid hormone for the treatment of osteoporosis: a systematic review. *Can Med Assoc J* 2006;175:52-9. DOI: 10.1503/cmaj.050929.
4. Shirley M. Abaloparatide: First Global Approval. *Drugs* 2017;77:1363-8. DOI: 10.1007/s40265-017-0780-7
5. Kennel KA, Drake MT. Adverse Effects of Bisphosphonates: Implications for Osteoporosis Management. *Mayo Clin Proc* 2009;84:632-8. DOI: 10.1016/S0025-6196(11)60752-0
6. Markham A. Romosozumab: First Global Approval. *Drugs* 2019;79:471-6. DOI: 10.1007/s40265-019-01072-6
7. Fixen C, Tunoa J. Romosozumab: a Review of Efficacy, Safety, and Cardiovascular Risk. *Curr Osteoporos Rep* 2021;19:15-22. DOI: 10.1007/s11914-020-00652-w
8. Zigdon-Giladi H. Recent advances in bone regeneration using adult stem cells. *World J Stem Cells* 2015;7:630. DOI: 10.4252/wjsc.v7.i3.630
9. Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant* 2011;20:5-14. DOI: 10.3727/096368910X
10. Li L, Peng X, Qin Y, Wang R, Tang J, Cui X, et al. Acceleration of bone regeneration by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway via lithium released from lithium chloride/calcium phosphate cement in osteoporosis. *Sci Rep* 2017;7:45204. DOI: 10.1038/srep45204
11. Beederman M, Lamplot JD, Nan G, Wang J, Liu X, Yin L, et al. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *J Biomed Sci Eng* 2013;06:32-52. DOI: 10.4236/jbise.2013.68A1004
12. Wan M, Cao X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:651-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.067>
13. García-Sánchez D, González-González A, García-García P, Reyes R, Pérez-Núñez MI, Riancho JA, et al. Effective Osteogenic Priming of Mesenchymal Stem Cells through LNA-ASOs-Mediated *Sfrp1* Gene Silencing. *Pharmaceutics* 2021;13:1277. DOI: 10.3390/pharmaceutics13081277
14. García-García P, Ruiz M, Reyes R, Delgado A, Évora C, Riancho JA, et al. *Smurf1* Silencing Using a LNA-ASOs/Lipid Nanoparticle System to Promote Bone Regeneration. *Stem Cells Transl Med* 2019;8:1306-17. DOI: 10.1002/sctm.19-0145
15. García-García P, Reyes R, García-Sánchez D, Pérez-Campo FM, Rodríguez-Rey JC, Évora C, et al. Nanoparticle-mediated selective *Sfrp-1* silencing enhances bone density in osteoporotic mice. *J Nanobiotechnology* 2022;20:462. DOI: 10.1186/s12951-022-01674-5
16. Brasier AR. The NF- $\kappa$ B Regulatory Network. *Cardiovasc Toxicol* 2006;6:111-30. DOI: 10.1385/CT:6:2:111
17. Crooke ST, Witztum JL, Bennett CF, Baker BF. RNA-Targeted Therapeutics. *Cell Metab* 2018;27:714-39. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.03.004

18. Dhuri K, Bechtold C, Quijano E, Pham H, Gupta A, Vikram A, et al. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *J Clin Med* 2020;9:2004. DOI: 10.3390/jcm9062004
19. Lim KR, Maruyama R, Yokota T. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther* 2017;11:533-45. DOI: 10.2147/DDDT.597635
20. Acsadi G, Crawford TO, Müller-Felber W, Shieh PB, Richardson R, Natarajan N, et al. Safety and efficacy of nusinersen in spinal muscular atrophy: The EMBRACE study. *Muscle Nerve* 2021;63:668-77. DOI: 10.1002/mus.27187
21. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF- $\kappa$ B and the immune response. *Oncogene* 2006;25:6758-80. DOI: 10.1038/sj.onc.1209943
22. Jimi E, Takakura N, Hiura F, Nakamura I, Hirata-Tsuchiya S. The Role of NF- $\kappa$ B in Physiological Bone Development and Inflammatory Bone Diseases: Is NF- $\kappa$ B Inhibition "Killing Two Birds with One Stone"? *Cells* 2019;8:1636. DOI: 10.3390/cells8121636
23. Chang J, Liu F, Lee M, Wu B, Ting K, Zara JN, et al. NF- $\kappa$ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting  $\beta$ -catenin degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013;110:9469-74. DOI: 10.1073/pnas.1300532110
24. Rinkenbaugh A, Baldwin A. The NF- $\kappa$ B Pathway and Cancer Stem Cells. *Cells* 2016;5:16. DOI: 10.3390/cells5020016
25. Mussbacher M, Salzmann M, Brostjan C, Hoesel B, Schoergenhofer C, Datler H, et al. Cell Type-Specific Roles of NF- $\kappa$ B Linking Inflammation and Thrombosis. *Front Immunol* 2019;10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00085
26. McLean RR. Proinflammatory cytokines and osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2009;7:134-9. DOI: 10.1007/s11914-009-0023-2
27. Sakai J, Cammarota E, Wright JA, Cicuta P, Gottschalk RA, Li N, et al. Lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B nuclear translocation is primarily dependent on MyD88, but TNF $\alpha$  expression requires TRIF and MyD88. *Sci Rep* 2017;7:1428. DOI: 10.1038/s41598-017-01600-y
28. Libermann TA, Baltimore D. Activation of Interleukin-6 Gene Expression through the NF- $\kappa$ B Transcription Factor. *Mol Cell Biol* 1990;10:2327-34. DOI: 10.1128/mcb.10.5.2327-2334.1990
29. Basak S, Kim H, Kearns JD, Tergaonkar V, O'Dea E, Werner SL, et al. A Fourth I $\kappa$ B Protein within the NF- $\kappa$ B Signaling Module. *Cell* 2007;128:369-81. DOI: 10.1016/j.cell.2006.12.033
30. Greenbaum A, Hsu Y-MS, Day RB, Schuettelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 2013;495:227-30. DOI: 10.1038/nature11926
31. Penzo M, Habel DM, Ramadass M, Kew RR, Marcu KB. Cell migration to CXCL12 requires simultaneous IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ -dependent NF- $\kappa$ B signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Cell Research* 2014;1843:1796-804. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.04.011
32. Chang J, Wang Z, Tang E, Fan Z, McCauley L, Franceschi R, et al. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor- $\kappa$ B. *Nat Med* 2009;15:682-9. DOI: 10.1038/nm.1954
33. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*; 2000. Fourth edition.
34. Collins FL, Ríos-Arce ND, Schepper JD, Parameswaran N, McCabe LR. The Potential of Probiotics as a Therapy for Osteoporosis. *Microbiol Spectr* 2017;5(4):10.1128/microbiolspec.BAD-0015-2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.BAD-0015-2016.
35. Li J-Y, Tawfeek H, Bedi B, Yang X, Adams J, Gao KY, et al. Ovariectomy deregulates osteoblast and osteoclast formation through the T-cell receptor CD40 ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:768-73. DOI: 10.1073/pnas.1013492108
36. Kim B-J, Bae SJ, Lee S-Y, Lee Y-S, Baek J-E, Park S-Y, et al. TNF- $\alpha$  mediates the stimulation of sclerostin expression in an estrogen-deficient condition. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;424:170-5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.100
37. Kang H, Ga YJ, Kim SH, Cho YH, Kim JW, Kim C, et al. Small interfering RNA (siRNA)-based therapeutic applications against viruses: principles, potential, and challenges. *J Biomed Sci* 2023;30:88. DOI: 10.1186/s12929-023-00981-9
38. Wang Y, Zhai Y, Zhang M, Song C, Zhang Y, Zhang G. Escaping from CRISPR-Cas-mediated knockout: the facts, mechanisms, and applications. *Cell Mol Biol Lett* 2024;29:48. DOI: 10.1186/s11658-024-00565-x
39. Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B Signaling Module: Temporal Control and Selective Gene Activation. *Science* 2002;298(5596):1241-5. DOI: 10.1126/science.1071914
40. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol* 2014;26:253-66. DOI: 10.1016/j.smim.2014.05.004
41. Shi Y, Riese DJ, Shen J. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. *Front Pharmacol* 2020;11:574667. DOI: 10.3389/fphar.2020.574667



## Artículo Especial

### The most interesting papers on vitamin D published in 2023

José Luis Mansur

Centro de Endocrinología y Osteoporosis La Plata. Buenos Aires, Argentina

#### Abstract

We have chosen the most important articles related to vitamin D published in 2023. We chose manuscripts with clinical importance on the non-classical actions of this hormone, and its use in the prevention or treatment of non-bone diseases. We will analyze the genetics and the presence of an onco-suppressor gene to explain why supplementation with vitamin D can be effective in some subjects and not in others, the lower appearance of autoimmune diseases in a randomized controlled study, the use of vitamin D in women with diabetes gestation, the possible programming of stems cells in embryos and the risk of type 2 diabetes mellitus, the relationship with Parkinson's disease, the increase in levels with supplementation related to basal body weight, and the relationship with uterine fibroids (leiomyomas or fibroids).

**Keywords:**  
Vitamin D.  
Colecalciferol.  
25OH Vit D.

This is a highly subjective selection of papers that caught my attention published from January 1<sup>st</sup> 2023 through January 31<sup>st</sup>, 2024.

Although, for years, it has been known why vitamin D deficiency is clearly associated with the presence of non-bone diseases—also in longitudinal studies—and the appearance of these conditions, the first studies ever reported on supplementation vs placebo did not prove beneficial in these conditions (cancer, diabetes, hypertension, cardiovascular disease, etc.). It quickly became clear to me that many publications were being conducted with low doses, using short regimens, or with “sufficient” populations of 25OHD.

After delving into these articles, interesting topics emerged:

1. Some beneficial effects of supplementation occur “in many” but not “in all” patients due to genetics. Studies have been published (in my opinion with very little impact) showing benefits in subgroups of people with some genetic polymorphisms and not in others. The first paper was published years ago by Baron in England, United Kingdom (1). He published that in subjects with colonic polyps, supplementation with vitamin D did not prevent the appearance of new polyps. However, the next year, when they genetically studied that population, they found that polyps had been prevented in the subgroup that

Received: 05/08/2024 • Accepted: 16/09/2024

*Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.*

*Artificial intelligence: the authors declare not to have used artificial intelligence (AI) or any AI-assisted technologies in the elaboration of the article.*

Mansur JL The most interesting papers on vitamin D published in 2023. Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(3):108-111

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00057

#### Correspondence:

José Luis Mansur. Centro de Endocrinología y Osteoporosis La Plata. 1900 Buenos Aires, Argentina  
e-mail: joseluismansur@yahoo.com.ar

had the rs7968585 polymorphism among individuals with the AA genotype (26 %) in the vitamin D receptor (VDR) gene. It is in this subgroup that the supplementation of vitamin D was able to reduce the appearance of new polyps by 64 % (2).

The first new study on this subject is of that same style. It has a first “negative” part and a second, new “positive” part. This is the AMATERASU study conducted by Urashima et al. (3), which, in 2019, showed that administering 2000 IU/d for 3.5 years vs placebo did not prevent recurrences or improve survival in Japanese subjects with digestive cancers. Now, it is postulated that the key to achieving a certain “extraosseous” benefits is not the dose administered but to what extent 25OHD levels were reached. In the subgroup with < 20 ng/mL at baseline, a mean of 36 ng/mL was reached. In the subgroup with between 20 and 40 ng/mL at baseline, they reached a mean of 45 ng/mL. In the analysis of subgroup study, lower recurrence and higher survival were demonstrated... but in which subgroup? In those who had very little vitamin D (< 20 ng/mL) or in those who had enough for the IOM criterion (> 20 ng/mL)? The answer is that it was prevented in the subgroup that had more 25OHD (HR, 0.44), which are those that reached a mean value > 40 ng/mL. The authors highlighted this finding with caution. At that time, it was not postulated that perhaps 40 mg/mL could be a cut-off value to achieve to prevent or alleviate some non-classic conditions. In this study, polymorphisms of the VDR receptor and the transporter protein were analyzed, and no relationship with benefit was ever found. The new study by this group—whose lead author is now Kanno (4)—studied how many of these subjects were “immunoreactive to the onco-suppressor protein P53”, defining them by having serum antibodies against P53 (+) or an accumulation of that protein in more than 99 % of cancer cells. The hypothesis was that supplementing with vitamin D can increase the anti-cancer immunoreaction only in a subgroup, and results proved it: in the P53 (+) subgroup, relapse or death occurred in 9/56 subjects (16.7 %) vs 14/26 with placebo (53.8 %), while no differences were reported in the P53 (-). In my opinion this manuscript did not achieve the impact it deserves. It is clear that the answer to 25OHD in some non-classical diseases—cancer in this case—may depend on genetics or the presence of certain onco-suppressive proteins.

2. Another re-analysis: supplementing with vitamin D prevented the appearance of autoimmune diseases in the vital study. In 2021, Hanh published that in the 5.3-year follow-up the appearance of an autoimmune disease was confirmed in fewer supplemented patients vs the placebo group (HR, 0.61; 0.43-0.86), concluding that it reduced them by 25 % to 30 %—especially rheumatoid arthritis—and after 2 years of supplementation (5).

What is new about this topic?: Well, 2 years later (at the end of the 7<sup>th</sup> year), Costenbader published that prevention was no longer significant (patients no longer had supplementation) yet the condition appeared: psoriasis was prevented (HR, 0.61; 0.38-0.98). The other finding is that categorizing them by their BMI, those whose BMI was < 25 kg/m<sup>2</sup> maintained prevention (HR, 0.75; 0.59-0.95). Of note, the main limitation of this study, which did not prevent any positive results: participants were allowed the voluntary use of vitamin supplements (6).

3. Vitamin D supplementation improves outcomes in women with gestational diabetes. A meta-analysis (7) that analyzed 20 RCTs concluded that those supplemented increased their HDL-C levels, decreased their LDL-C and triglyceride levels, and reduced the risk of premature birth, hyperbilirubinemia and neonatal hospitalization. Of note what doses these women (mostly from Iran and China) received. Another topic is the prevention of gestational diabetes, which we have analyzed with other “outcomes” in a review (8).
4. A work as fascinating as it is complex is “Embryonic vitamin D deficiency programs hematopoietic stem cells to induce type 2 diabetes mellitus”. The authors study in mice the epigenetic mechanisms that influence the risk of intrauterine diabetes associated with vitamin D deficiency. Studies in rodents confirm the relationship among intrauterine vitamin D deficiency, inflammation, hepatic steatosis, excess adiposity and insulin resistance (IR), suggesting it induces epigenetic programming. It has been suggested that the VDR receptor plays a role in programming the immune system during embryogenesis. In these studies, vitamin D-deficient fetal hematopoietic stem cells (HSCs) were transplanted into the uterus of vitamin D-sufficient mice inducing diabetes. These studies show that the deficit epigenetically suppresses Jarid2 expression and activates the Mef2/PGC1 step in HSCs, which results in adipose infiltration into macrophages, which secrete miR106-5p, which in turn promotes IR. Vitamin D-deficient monocytes in the human cord have, these studies state, the above-mentioned changes, causing IR. The authors conclude that this vitamin D deficiency during development has enough epigenetic consequences on the immune system to trigger IR (9).
5. Vitamin D and Parkinson’s disease (PD). Two meta-analyses from 2017 and 2018 confirmed the association between 25OHD deficiency and PD risk and severity (10,11). What is new is the appearance of a meta-analysis on supplementation. It only includes 5 articles (4 on PD and 1 on restless legs syndrome). Some studies showed improvement, especially 1 from Poland where 4000 IU/d were ad-

ministered only for 3 months to patients with BMI < 25; 5000 IU/d with BMI = 25-30 and 6000 IU/d with BMI > 30. Another study with a 4-month regimen of 10,000 IU/d only seemed to improve balance in young participants, while the remaining studies which administered 1000 IU/d and 1200 IU/d found modest improvements. The authors conclude that screening for vitamin D deficiency and supplementation might be necessary in patients with PD (12).

6. A Vital sub-study showed that the increase in 25OHD observed with 2000 IU/d supplementation was lower in obese and overweight subjects. What was the extent of this 25OHD increase based on their respective BMI?

BMI	n	< 18.5	18.5-24.9	25.0-29.9	30.0-34.9	> 35.0	
25OHD ng/mL	16,375	32.6	32.4	30.6	29.0	28.0	p < 0.001

This may partly explain higher or lower responses to health objectives that were found in other megatrials (13).

7. Vitamin D and uterine fibroids, more commonly called leiomyomas, or fibromas. This year (14) Okoro that 75 women with uterine leiomyoma had 25OHD levels of  $15.26 \pm 4.96$  ng/mL while the 75 controls had 25OHD levels of  $22.45 \pm 6.93$  ng/mL ( $p < 0.001$ ). Additionally, there was a negative correlation between fibroid volume and 25OH Vit D ( $p < 0.001$ ). In 2013 reports came on the negative correlation between 25OHD and fibroid weight (15) and, in 1997, on the fact that black women had less vitamin D and greater fibroid masses (16).

In 2023 Combs conducted an interesting meta-analysis and concluded that 14 studies confirmed the correlation between 25OHD and the presence of fibroids. A different question is if vitamin D supplementation could reduce the size of leiomyomas? Four out of 5 studies found that compared to placebo, leiomyomas did not grow or shrink. Of note, 2 studies were conducted for as long as 2 months, another 2 for as long as 3 months, and 1 study for as long as 1 year. All participants in all studies were supplemented with 50,000 IU/week, except for the 1-year study in which participants received 50,000 IU/month for 2 months, followed by 2000 IU/day (17).

Finally, a Chinese study conducted after this meta-analysis compared 25 women with fibroids supplemented with a 3-month regimen of 1600 IU/day vs placebo and found a decrease in size with vitamin D. What is striking is that this increase was not very significant (from 10.45 up to 17.14 ng/mL), which are values that stand far away from for the bone health target of 30 ng/mL and even further from the targets suggested for non-classical actions (40 ng/mL) (18).

In conclusion, these are arbitrarily selected studies that, nonetheless, allow us to keep in mind the possibility that vitamin D supplementation can prevent or alleviate multiple non-bone conditions.

## REFERENCES

1. Baron JA, Barry EL, Mott LA, Rees JR, Sandler RS, Snover DC, et al. A Trial of Calcium and Vitamin D for the Prevention of Colorectal Adenomas. *N Engl J Med* 2015;373(16):1519-30. DOI: 10.1056/NEJMoa1500409
2. Barry EL, Peacock JL, Rees JR, Bostick RM, Robertson DJ, Bresalier RS, et al. Vitamin D Receptor Genotype, Vitamin D3 Supplementation, and Risk of Colorectal Adenomas: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2017;3(5):628-35. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.5917
3. Urashima M, Ohdaira H, Akutsu T, Okada S, Yoshida M, Kitajima M, et al. Effect of Vitamin D Supplementation on Relapse-Free Survival Among Patients with Digestive Tract Cancers: The AMATERASU Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2019;321(14):1361-9. DOI: 10.1001/jama.2019.2210
4. Kanno K, Akutsu T, Ohdaira H, Suzuki Y, Urashima M. Effect of Vitamin D Supplements on Relapse or Death in a p53-Immunoreactive Subgroup with Digestive Tract Cancer: Post Hoc Analysis of the AMATERASU Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* 2023;6(8):e2328886. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2023.28886
5. Hahn J, Cook NR, Alexander EK, Friedman S, Walter J, Bubes V, et al. Vitamin D and marine omega 3 fatty acid supplementation and incident autoimmune disease: VITAL randomized controlled trial. *BMJ* 2022;376:e066452. DOI: 10.1136/bmj-2021-066452
6. Costenbader KH, Cook NR, Lee IM, Hahn J, Walter J, Bubes V, et al. Vitamin D and Marine n-3 Fatty Acids for Autoimmune Disease Prevention: Outcomes Two Years After Completion of a Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol* 2024;76(6):973-83. DOI: 10.1002/art.42811
7. Wu C, Song Y, Wang X. Vitamin D Supplementation for the Outcomes of Patients with Gestational Diabetes Mellitus and Neonates: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Int J Clin Pract* 2023;2023:1907222. DOI: 10.1155/2023/1907222
8. Mansur JL, Oliveri B, Giacoia E, Fusaro D, Costanzo PR. Vitamin D: Before, during and after Pregnancy: Effect on Neonates and Children. *Nutrients* 2022;14(9):1900. DOI: 10.3390/nu14091900
9. Oh J, Riek AE, Bauerle KT, Dusso A, McNerney KP, Barve RA, et al. Embryonic vitamin D deficiency programs hematopoietic stem cells to induce type 2 diabetes. *Nat Commun* 2023;14(1):3278.
10. Luo X, Ou R, Dutta R, Tian Y, Xiong H, Shang H. Association Between Serum Vitamin D Levels and Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Neurol* 2018;9:909. DOI: 10.3389/fneur.2018.00909
11. Zhou Z, Zhou R, Zhang Z, Li K. The Association Between Vitamin D Status, Vitamin D Supplementation, Sunlight Exposure, and Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Med Sci Monit* 2019;25:666-674. DOI: 10.12659/MSM.912840

12. Homann C, Homann B, Ivanic G, Urbaiz-Purkart T. Vitamin D supplementation in later life: a systematic review of efficacy and safety in movement disorders. *Front Aging Neurosci* 2024;16:1333217. DOI: 10.3389/fnagi.2024.1333217
13. Tobias DK, Luttmann-Gibson H, Mora S, Danik J, Bubes V, Copeland T, et al. Association of Body Weight with Response to Vitamin D Supplementation and Metabolism. *JAMA Netw Open* 2023;6(1):e2250681. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2022.50681
14. Okoro CC, Ikpeze OC, Eleje GU, Udigwe GO, Ezeama CO, Ugbaja JO, et al. Association between serum vitamin D status and uterine leiomyomas: a case-control study. *Obstet Gynecol Sci* 2024;67(1):101-11. DOI: 10.5468/ogs.23143
15. Paffoni A, Somigliana E, Viganò P, Benaglia L, Cardellicchio L, Pagliardini L, et al. Vitamin D status in women with uterine leiomyomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(8):E1374-8. DOI: 10.1210/jc.2013-1777
16. Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RL, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, et al. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol* 1997;90(6):967-73. DOI: 10.1016/s0029-7844(97)00534-6
17. Combs A, Singh B, Nylander E, Islam MS, Nguyen HV, Parra E, et al. A Systematic Review of Vitamin D and Fibroids: Pathophysiology, Prevention, and Treatment. *Reprod Sci* 2023;30(4):1049-64. DOI: 10.1007/s43032-022-01011-z
18. Wang Q, Tian P, Sun W, Liu X, Yang X, Yang Z. A Multimodal Ultrasound Observation Study on the Effect of Vitamin D on Uterine Fibroids in Non-menopausal Women. *Curr Med Imaging* 2023 Oct 31. Epub ahead of print. DOI: 10.2174/0115734056281479231030053817