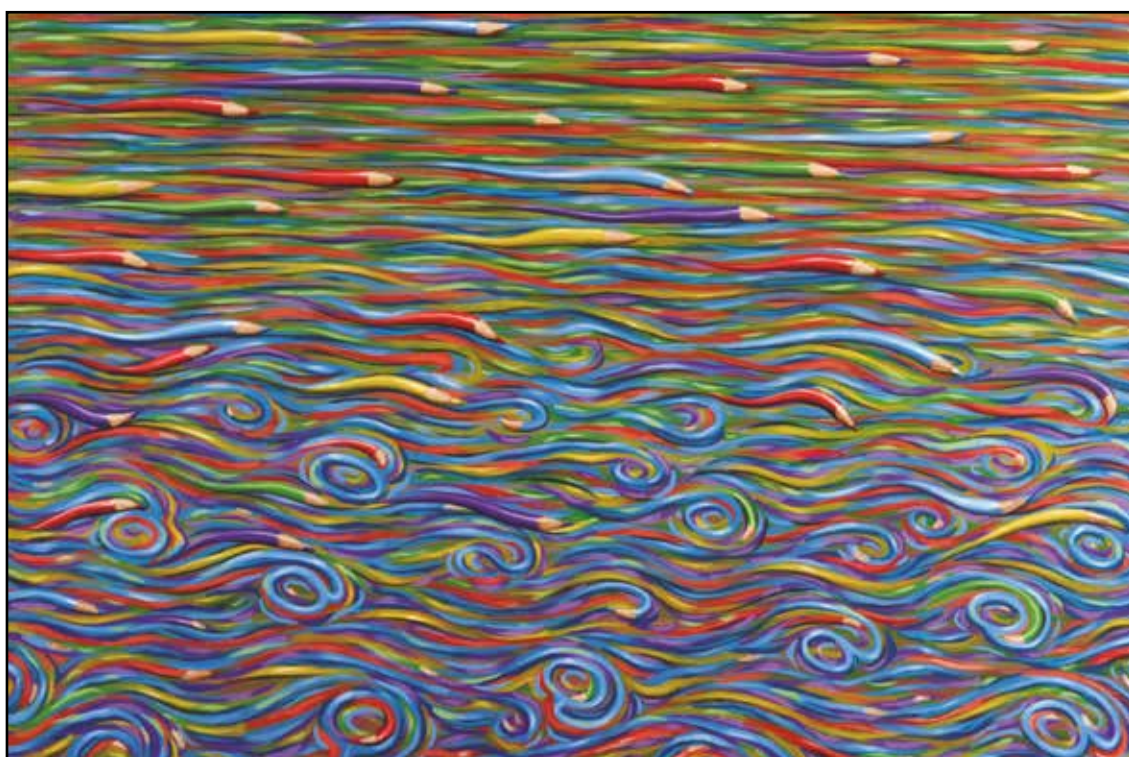


ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.



Ernesto Bertani

Rio arropa, 2010

Acrílico sobre lienzo, 80 x 120 cm

www.ernestobertani.com.ar

*Agradecimiento a Colección Zurbaran,
Cerrito 1522, CABA (www.zurbaran.com.ar)*

VOL. 10, Nº 1

enero / abril 2014

ISSN 1669-8975 (Print); ISSN 1669-8983 (Online)

www.osteologia.org.ar

Rosario (Santa Fe), Argentina

Indizada en EBSCO, Latindex, LILACS, Scopus & Embase y SIIC Data Bases



ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Publicación de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

VOL. 10, Nº 1

enero / abril 2014

ISSN 1669-8975 (Print); ISSN 1669-8983 (Online)

www.osteologia.org.ar

Rosario (Santa Fe), Argentina

Aparición: cuatrimestral

Directora: Luisa Carmen Plantalech

Sección Osteopatías Metabólicas. Servicio de Endocrinología y Metabolismo. Hospital Italiano de Buenos Aires. Juan D Perón 4190, Ciudad de Buenos Aires (C1181ACH), Argentina.

Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral

PROPIETARIO: Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral

DOMICILIO LEGAL: 9 de julio 1324, (2000) Rosario, Santa Fe, Argentina

www.aaomm.org.ar / info@aaomm.org.ar

Actualizaciones en Osteología es el órgano científico de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Aceptará para su publicación trabajos redactados en español o en inglés, que aborden aspectos clínicos o experimentales dentro de la osteología y el metabolismo mineral que puedan considerarse de utilidad e interés para nuestra comunidad científica. Dichos trabajos habrán de ser inéditos, cumplir los requisitos de uniformidad para el envío de manuscritos y estar comprendidos en algunas de las secciones de la revista (Artículos originales, Artículos de revisión, Comunicaciones Breves, Casuísticas, Consensos y Educación en Osteología, Controversias, Imágenes en Osteología, Editoriales, Cartas al Editor, Comentarios Bibliográficos, Sección Cultural).

Los artículos publicados en Actualizaciones en Osteología son indizados en EBSCO (EBSCO Host Research Databases), Latindex (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), LILACS (Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud), base de datos corporativa del Sistema BIREME (Centro Latinoamericano y del Caribe de Información en Ciencias de la Salud), Scopus & Embase (Elsevier Bibliographic Databases) y SIIC Data Bases (Sociedad Iberoamericana de Información Científica).

Esta es una revista de Acceso Abierto (*Open Access*). Todo el contenido es de acceso libre y gratuito. Los usuarios pueden leer, descargar, copiar, distribuir, imprimir, buscar o enlazar los textos completos de los artículos de esta revista sin permiso previo del editor o del autor. Sin embargo, los derechos de propiedad intelectual deben ser reconocidos, y para ello, cualquier reproducción de los contenidos de cualquier artículo de la revista debe ser debidamente referenciado, indicando la autoría y la fuente bibliográfica. Asimismo, para la reproducción escrita del material de la revista se deberá solicitar la autorización pertinente.

El contenido y las opiniones expresadas en los manuscritos son de entera responsabilidad del(los) autor(es).

Actualizaciones en Osteología is the scientific journal of the Argentina Association of Osteology and Mineral Metabolism (AAOMM). Accept for publication papers written in Spanish or English about clinical and experimental aspects within the osteology and mineral metabolism. The articles should be original, meet the uniform requirements for manuscript submission and be included in some sections of the journal (Original Articles, Review Articles, Short Communications, Case Reports, Consense Document and Osteology Education, Controversies, Images in Osteology, Editorials, Letters to Editor, Bibliographic Comments, Cultural Section).

The articles published in Actualizaciones en Osteología are indexed in EBSCO (EBSCO Host Research Databases), Latindex (Regional Information System for Scientific Journals Online of Latin America, the Caribbean, Spain and Portugal), LILACS (Latin American Literature in Health Sciences), BIREME (Latin American and Caribbean Center on Health Sciences), Scopus & Embase (Elsevier Bibliographic Databases) and SIIC data Bases (Iberoamerican Society Scientific Information).

This is an Open Access journal. All content is freely available without charge. Users are allowed to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of the articles in this journal without asking prior permission from the publisher or the author. However, intellectual rights should be acknowledged, and to that purpose, any reproduction of the contents of any article of this Journal should be duly referenced, stating the authorship and the bibliographical source. Also, for written reproduction a Journal authorization must be request.

The content and opinions expressed in articles published are the sole responsibility of the authors.

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Publicación de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

DIRECTORA

Luisa Carmen Plantalech

Sección Osteopatías Metabólicas. Servicio de Endocrinología y Metabolismo. Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina. editora-responsable@osteologia.org.ar

DIRECTORES ASOCIADOS

Lucas R. M. Brun

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina. editor-asociado@osteologia.org.ar

Alfredo Rigalli

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina. Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). editor-asociado@osteologia.org.ar

SECRETARIA DE REDACCIÓN

María Lorena Brance

Centro de Reumatología, Rosario, Argentina. redaccion@osteologia.org.ar

CORRECTORA DE TEXTO

Prof. María Isabel Siracusa. maisasiracusa@yahoo.com.ar

CUERPO EDITORIAL

Alicia Bagur

Centro de Osteopatías Médicas Dr. Carlos Mautalen. Buenos Aires, Argentina.

Teresita Bellido

Dept. of Anatomy & Cell Biology Adjunct Professor. Division of Endocrinology, Dept. of Internal Medicine Indiana University School of Medicine. Indianapolis, USA

Ricardo Boland

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina. Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Haraldo Claus Hermberg

Servicio de Endocrinología y Metabolismo del Hospital Alemán. Buenos Aires, Argentina.

Adriana Dusso

Investigador Senior. Laboratorio de Nefrología Experimental. IRB Lleida (Instituto de Investigaciones Biomédicas de Lleida). Fundacion Privada Dr. Pifarré y Hospital Universitario Arnau de Vilanova. Facultad de Medicina. Universidad de Lleida. Lleida. España.

José Luis Ferretti

Director del Centro de Estudios de Metabolismo Fosfocálcico (CEMFoC). Hospital del Centenario. Rosario. Argentina. Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y del CIUNR.

Ana María Galich

Jefa de la Sección Osteopatías Metabólicas y Médica de planta del Servicio de Endocrinología del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Carlos Mautalen

Centro de Osteopatías Médicas Dr. Carlos Mautalen. Buenos Aires, Argentina.

José Luis Millán

Sanford-Burnham Medical Research Institute. La Jolla, CA, USA.



Armando Negri

Profesor Escuela de Medicina Universidad del Salvador y Escuela de Postgrado Universidad del Salvador. Médico de Planta senior. Instituto de Investigaciones Metabólicas. Editor de la Revista Argentina de Osteología. Editor Asociado Revista de Nefrología Diálisis y Transplante.

Beatriz Oliveri

Sección Osteopatías Médicas, Hospital de Clínicas, UBA. Buenos Aires. Centro de Osteopatías Médicas Dr. Carlos Mautalen. Buenos Aires, Argentina. Investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Lilian I. Plotkin

Assistant professor, Department of Anatomy & Cell Biology Adjunct Professor. Indiana University School of Medicine. Indianapolis, USA.

Rodolfo Puche

Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral. Cátedra de Química Biológica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina

Emilio Roldán

Departamento de Investigaciones Musculoesqueléticas, Instituto de Neurobiología (IDNEU) Buenos Aires; Dirección Científica, Gador SA. Buenos Aires, Argentina.

Ana Russo de Boland

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina.

Nori Tolosa de Talamoni

Laboratorio de Metabolismo Fosfocálcico y Vitamina D "Dr. Fernando Cañas". Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

Helena Salerni

Ex presidente de la Sociedad Argentina de Osteoporosis. Médica especialista en Osteopatías Médicas. División Endocrinología del Hospital Durand. Buenos Aires, Argentina.

Julio Ariel Sánchez

Médico Director, Centro de Endocrinología. Rosario, Argentina.
Ex-director Actualizaciones en Osteología 2005-2012.

Eduardo Slatopolsky

Renal Division. Department of Internal Medicine. Washington University School of Medicine. St. Louis, Missouri, USA.

José R. Zanchetta

Director de la Maestría de Osteología y Metabolismo Mineral de la Escuela de Posgrado de la Facultad de Medicina, Universidad del Salvador. Director del Instituto de Investigaciones Metabólicas (IDIM), Argentina.



**AUTORIDADES DE AAOMM
COMISIÓN DIRECTIVA 2014-2015**

Presidente

Dra. Virginia Massheimer

Vicepresidente

Dra. Cristina Tau

Secretaria

Dra. Susana Morelli

Tesorera

Dra. Maria Belén Rauschemberger

Vocales

Dra. Gabriela Díaz Barboza

Dra. Mirena Butazzoni

Dra. Lorena Brance

Dr. Adrián Campelo

Dr. Pablo Cutini

Dra. Virginia Lezcano

Dra. Graciela Santillán

Dra. Marisa Sandoval

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Vol 10, Nº4, enero / abril 2014

ÍNDICE

EDITORIAL / Editorial

Densitometría ósea por DXA: sobrevida asegurada

Bone densitometry by DXA: safe survival

Diana C. González

7

CONSENSOS Y EDUCACIÓN EN OSTEOLOGÍA / Consense Documents and Osteology Education

Síndrome de hueso hambriento asociado al hiperparatiroidismo secundario en la enfermedad renal crónica

Hungry bone syndrome associated to secondary hyperparathyroidism due to chronic renal failure

Soledad Crucelegui, Guillermo Rosa Diez, Diego Serra, María Inés Ortiz, María Diehl

11

ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

Efectos de la ingesta de cafeína materna en los niveles de cortisol materno y en la osificación endocondral de la prole

Effects of caffeine intake in mothers on maternal cortisol levels and offspring endochondral ossification

Amanda Maria Sena Reis, Ana Cláudia Moura Batista, Natália de Melo Ocarino, Rogéria Serakides

20

COMUNICACIONES BREVES / Short Communication

Densidad de calcio de los alimentos lácteos clasificados según su densidad calórica

Calcium density from dairy foods classified according to their caloric density

Florencia Botticella, María Verónica Cámpora, María Josefina Ferro, Florencia Scibona, Julieta Villalba, María Elena Torresani

37



SECCIÓN CULTURAL / Cultural Section

El colmillo del narval*Narwhal's tusks*

Ariel Sánchez

42

ACTUALIZACIONES / Reviews

Osteocitos mirando hacia arriba (o “La estructura ósea vista desde abajo”)*Osteocytes looking upwards (OR “bone structure watched from below”)*

José Luis Ferretti, Gustavo Roberto Cointry, Ricardo Francisco Capozza

43

IMÁGENES EN OSTEOLOGÍA / Imaging in Osteology

El receptor de la vitamina D en células de músculo esquelético*Vitamin D receptor in skeletal muscle cells*

Ana Paula Irazoqui, Ricardo Boland, Claudia Buitrago

81

**Diagnóstico de las calcificaciones vasculares
por métodos radiológicos semicuantitativos***Diagnosis of vascular calcification by radiologic and semiquantitative methods*

Guillermo Rosa Diez, María Soledad Crucelegui, Griselda Irina Bratti, María Diehl, Ana María Galich

82

CONTROVERSIAS / Controversies

Controversias en la medición de 25-hidroxivitamina D*Controversies in measuring 25-hydroxyvitamin D*

Erich Fradinger

85

CASUÍSTICAS / Case Reports

**Hipofosfatemia e hiperfosfatemia espurias en una paciente
con mieloma múltiple***Spurious hypophosphatemia and hyperphosphatemia in a patient
with multiple myeloma*

María Diehl, Carolina L. Carrizo, Dorotea Fantl, Graciela B. Jiménez

91

COMENTARIOS BIBLIOGRÁFICOS / Bibliographical Comments

Glucocorticoid dose determines osteocyte cell fate.*FASEB J* 2011; 25: 3366-76.

Carola B. Bozal

97

INSTRUCCIONES PARA AUTORES / Information for Authors

100

EDITORIAL / Editorial

DENSITOMETRÍA ÓSEA POR DXA: SOBREVIDA ASEGURADA

Diana C. González*

Médica, directora asociada en MAUTALEN, Salud e Investigación.

La densitometría ósea (DMO) tiene el meritorio título de ser el primer método objetivo que permitió valorar cambios en el contenido mineral del hueso. Antes de la década del 70, los médicos no contábamos con un método accesible, sencillo y práctico que permitiera valorar la masa ósea de nuestros pacientes.

En un artículo dedicado a describir el desarrollo de la DMO hasta el comienzo de los años 90, los autores destacan una frase de Borje Nordin muy ilustrativa al respecto: “la densitometría ósea rescató a la osteoporosis del reino de la adivinanza y la llevó al de la ciencia médica”.¹

La DMO ha sido y sigue siendo una herramienta fundamental para el diagnóstico de la osteoporosis, enfermedad cuya característica primordial es la disminución de la resistencia ósea que predispone a la ocurrencia de fracturas ante traumatismos mínimos.

La masa ósea cuantificable a través de la densitometría por DXA está estrechamente asociada a la fortaleza ósea, es decir, a la resistencia de los huesos a la deformación y a la fractura cuando son sometidos a diferentes grados de carga. Sin embargo, hay pacientes que se fracturan a pesar de tener una DMO normal y por otro lado pacientes con densidades óseas muy bajas no se fracturan. Se ha demostrado, además, que varios de los fármacos de uso habitual en el tratamiento de la osteoporosis tienen muy buena eficacia antifracturaria a pesar de inducir cambios pequeños en la DMO, es decir que la mejoría en la DMO explica solo parcialmente esa eficacia antifractura.

Hoy sabemos que la masa ósea es un factor importante entre los determinantes de la resistencia ósea, pero no es el único ya que en ella intervienen: a) la estructura o geometría de los huesos, que comprende forma, tamaño y su microarquitectura (número, tamaño y conectividad trabecular) y b) las propiedades del material óseo en cuanto a la mineralización, las características cualitativas de la matriz ósea y las microlesiones.

El único acceso al estudio de la microarquitectura ósea hasta hace unos años era la histomorfometría a través de la biopsia ósea, método invasivo solo aplicable en la práctica clínica a determinadas y muy selectivas situaciones patológicas.

Nuevas técnicas no invasivas más novedosas, como la tomografía computarizada (TC) volumétrica, la tomografía computarizada de alta resolución, la resonancia magnética de alta

* Correo electrónico: dianabertini@fibertel.com.ar



resolución, la microtomografía computarizada, etc., al conseguir niveles de resolución más altos permiten acceder a la configuración de la microarquitectura ósea y aportan datos sobre calidad o resistencia óseas que con la DMO no se obtienen.

El uso de esta nueva tecnología presenta, sin embargo, limitaciones prácticas como el alto costo, la exposición a mayor radiación, la falta de normativización de datos, la poca disponibilidad de equipos y el hecho de que se aplica primariamente a la investigación clínica.

La TC periférica de alta resolución (HR pQCT) aporta información sobre el esqueleto periférico (por este método se estudian radio y tibia), pero no nos da información directa sobre la calidad ósea de la columna y el fémur, que son las localizaciones más importantes de las fracturas osteoporóticas. Otra limitación es que los niveles de resolución usados de 82 μm que permiten adecuados niveles de exposición a la radiación pueden ser insuficientes para identificar cambios en la morfología trabecular que son de similar magnitud. Lo mismo ocurre con la porosidad intracortical por debajo de esa resolución. El problema es que esos poros más pequeños serían los parcialmente reducidos por la terapia antirresortiva. Por otro lado, el algoritmo utilizado para separar hueso de tejido blando y hueso cortical de trabecular también puede dar lugar a una inadecuada cuantificación del material óseo, composición y estructura, ya que el hueso nuevo depositado durante el remodelamiento tiene menor densidad y no alcanza el umbral del algoritmo para la separación mencionada.²

Llegamos entonces a que la DMO por sí sola es insuficiente para determinar la resistencia ósea, y en esto radica su principal dificultad para predecir el riesgo de fractura y evaluar la respuesta terapéutica. Desde el punto de vista técnico, la DMO por absorciometría de doble energía tiene la limitación de ser una medición plana (mide el área proyectada por el hueso en un plano de dos dimensiones) y no volumétrica y además no diferencia entre los compartimentos cortical y trabecular. Sin embargo, la medición de DMO en columna, fémur o radio tiene buena correlación con la resistencia ósea ($r^2 = 50\text{-}90\%$) y puede considerarse que, hasta el momento, es el factor cuantificable con mayor valor predictivo del riesgo de fractura.³

La realidad de la práctica clínica habitual nos muestra los distintos escenarios donde la DMO es una herramienta de gran valor y, por el momento, irremplazable:

- Ante una mujer en edad cercana a la menopausia, una DMO nos permite identificar aquella paciente con una masa ósea inadecuada para enfrentar la pérdida ósea que provocará la cesación de la producción de estrógenos.
- En la posmenopausia, la comparación entre dos densitometrías realizadas en el lapso de un año nos permite identificar una paciente con una pérdida ósea acelerada, en cuyo caso la medición de marcadores óseos son útiles para confirmar un remodelamiento óseo aumentado y seleccionar la terapéutica de prevención más adecuada.
- En el caso de un paciente con antecedente de una o más fracturas por traumatismos mínimos, aunque ya no necesitamos de la densitometría para establecer el diagnóstico de osteoporosis, esta nos permitirá monitorizar los cambios positivos esperables con el tratamiento instituido.
- Desde el momento en que los incrementos en la DMO están relacionados con disminución del riesgo de fractura se puede asumir, entonces, que el tratamiento está resultando eficaz, si tiene como consecuencia un aumento de la densidad ósea.
- Por el contrario, si bien la DMO no es un subrogante perfecto de eficacia antifracturaria, lejos de los ensayos clínicos y frente al paciente individual, una disminución significativa de la masa ósea durante un tratamiento anticatabólico nos permite considerar que la respuesta terapéutica es inadecuada o sospechar que el tratamiento no se ha cumplido correctamente.⁴

La densitometría permitió, además, abrir nuevos capítulos en las osteoporosis secundarias al identificar el impacto óseo de algunas patologías que cursan con malabsorción intestinal como la enfermedad celíaca y la enfermedad de Crohn, sin necesidad de llegar al grado más extremo de compromiso óseo como es una osteomalacia. Las osteopenias y osteoporosis secundarias provocados por tratamientos antineoplásicos coadyuvantes para el cáncer de mama como los inhibidores de la aromatasa también se detectaron y describieron gracias a los estudios densitométricos realizados en poblaciones de mujeres sometidas a esos tratamientos, lo que permitió la implementación temprana de medidas de prevención de la pérdida ósea. Lo mismo es aplicable a la artritis reumatoidea con corticoterapia o sin ella, y en el seguimiento y decisión de tratamiento quirúrgico en el hiperparatiroidismo primario, sobre todo en el normocalcémico.

Otras aplicaciones del densitómetro

Con los equipos DXA también se puede realizar la morfometría vertebral (VFA) en el mismo momento en que el paciente hace una densitometría. Este estudio permite en muy pocos minutos identificar fracturas vertebrales, que a menudo son asintomáticas y por lo tanto de difícil reconocimiento clínico. No obstante, tiene algunas limitaciones, por ejemplo la dificultad en la correcta visualización de vértebras dorsales altas superiores a D7 en el 30 a 60% de los pacientes, y que no permite el diagnóstico diferencial entre fractura de origen osteoporótico y neoplásico, que sí puede realizarse con imágenes de mayor resolución como las que se obtienen con tomografía computarizada o resonancia magnética. El análisis semiautomático de las alturas vertebrales anterior, media y posterior y la relación o cociente entre las alturas media/posterior y anterior/posterior permiten identificar deformaciones vertebrales por acuñamiento, biconcavidad y compresión entre moderados y severos, de acuerdo con el esquema de Genant, pero identifican con una moderada sensibilidad las deformaciones leves, por lo que se recomienda la inspección visual usando el método semicuantitativo de Genant ya mencionado. Los puntos a partir de los cuales se producen las mediciones se corrigen manualmente, lo que imprime al estudio cierta subjetividad y constituye otra de sus limitaciones. La escoliosis también presenta dificultades para la interpretación de fracturas vertebrales. Entre las ventajas que ofrece la morfometría por DXA se encuentran: que es un estudio rápido y que se puede hacer simultáneamente con la densitometría, implica una muy baja radiación (menos del 5% de una radiografía simple de columna) y bajo costo en relación con la radiología convencional, hay menos distorsión de la imagen porque el haz de rayos X es ortogonal a la columna reduciendo el efecto de paralaje en los platillos vertebrales, y es de fácil acceso considerando los numerosos densitómetros que se encuentran funcionando en la actualidad. Por lo tanto, sin recurrir a la radiología convencional, una morfometría realizada simultáneamente con la densitometría mediante la cual se estudia inicialmente a un paciente permitirá un mejor diagnóstico y la consiguiente elección de la terapéutica adecuada según se detecten o no fracturas vertebrales prevalentes; esto da un valor agregado a la densitometría ósea mejorando la predicción de riesgo de fracturas.

Los equipos DXA de última generación permiten aplicar un programa para el análisis estructural de la cadera (HSA), por el cual, además de obtener datos de distribución de la masa ósea en sectores específicos del fémur proximal, aportan datos de la geometría estructural de la cadera (ancho del cuello femoral, su ángulo y longitud, longitud de la cadera) y por complejos algoritmos de cálculo se obtienen momento de inercia, diámetros subperióstico y endocortical, grosor promedio del hueso cortical, módulo de sección e índice de flexión.



Algunas publicaciones recientes informan resultados alentadores obtenidos con la incorporación al densitómetro de un novedoso programa que, mediante el análisis de la distribución de los niveles de grises de los píxeles de las imágenes obtenidas por DXA, permite obtener información sobre el estado de la estructura trabecular, lo que se denomina “trabecular bone score” (TBS).

El valor del TBS demostró estar relacionado con el número y la conectividad trabecular y, por lo tanto, agregaría información sobre la microarquitectura ósea mejorando la capacidad diagnóstica de la densitometría. Este tema fue oportunamente revisado por el Dr. R. Puche en *Actualizaciones en Osteología*,⁵ y otra muy reciente revisión de Silva y cols. ilustra extensamente la utilidad potencial del TBS como herramienta clínica en el diagnóstico, predicción de riesgo y respuesta al tratamiento de la osteoporosis.⁶

Mientras se continúa ganando experiencia con los estudios de microarquitectura del hueso periférico mediante la TC de alta resolución, la información sobre la microarquitectura vertebral con el TBS y con los parámetros macroestructurales y las variables biomecánicas que puede aportar el HSA, tanto para el clínico general como para el especialista en enfermedades metabólicas óseas, la DMO de columna y fémur sigue siendo en la actualidad la mejor opción diagnóstica y de seguimiento en la osteoporosis.

Referencias

1. Bagur A, Mautalen C. El desarrollo de la densitometría ósea hasta el comienzo de los 90. *Osteoporosis y Enfermedades Óseas* 2008; VII (2): 20-3.
2. Seeman E. Bone morphology in response to alendronate as seen by high resolution computed tomography: through a glass darkly. *J Bone Miner Res* 25(12): 2553-7.
3. Del Río L. Avances en imagenología. Cap. 19. En: Ardila E, Mautalen C, Jiménez C (eds.) *Osteoporosis en Iberoamérica*. 2ª ed. Bogotá: Manual Moderno, 2012, p. 323-44.
4. Díez Pérez A, Adachi JD, Agnusdei D, et al. Treatment failure in osteoporosis. *Osteoporosis Int* 2012; 23: 2769-74.
5. Puche R. El tejido óseo esponjoso y su evaluación por medio de imágenes. *Actual Osteol* 2013; 9(3): 277-87.
6. Silva B, Leslie W, Resch H, et al. Trabecular bone score: a noninvasive analytical method based upon the DXA image. *J Bone Miner Res* 2014; 29(3): 518-30.

CONSENSOS Y EDUCACIÓN EN OSTEOLOGÍA
Consense Documents and Osteology Education

SÍNDROME DE HUESO HAMBRIENTO ASOCIADO AL HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

Soledad Crucelegui,¹ Guillermo Rosa Diez,¹ Diego Serra,¹ María Inés Ortiz,² María Diehl^{2*}

1. Servicio de Nefrología, 2. Servicio de Endocrinología y Medicina Nuclear, Hospital Italiano de Buenos Aires.

Resumen

El síndrome de hueso hambriento (SHH) se caracteriza por un aumento de la captación ósea de calcio, fósforo y magnesio luego del descenso brusco de la hormona paratiroidea posparatiroidectomía. La hipocalcemia por SHH es frecuente en pacientes con hiperparatiroidismo secundario a enfermedad renal crónica (HPT secundario). Los factores predictores del SHH tienen relación con la magnitud del hiperparatiroidismo y la gravedad del compromiso óseo (elevación de la fosfatasa alcalina, dolores óseos, alteraciones radiológicas). El descenso de la calcemia es rápido y puede asociarse a manifestaciones clínicas como tetania y convulsiones. La hipofosfate-mia de magnitud y la hipomagnesemia son infrecuentes en pacientes con HPT secundario. Se sugiere comenzar la infusión de gluconato de calcio preferentemente por vía central con bomba de infusión continua al finalizar la cirugía. El tratamiento con calcio y calcitriol vía oral se inicia cuando se autoriza la ingesta. Es importante utilizar durante la diálisis un baño rico en calcio. Asimismo es necesario realizar controles de laboratorio frecuentes en el posoperatorio inmediato para adecuar el trata-

miento, ya que existe una gran variación individual en el requerimiento de calcio y vitamina D. La reducción de la medicación administrada debe ser gradual. En casos de compromiso óseo grave la necesidad de suplementos de calcio y vitamina D por SHH puede prolongarse durante meses o años. Es necesario un seguimiento intensivo e interdisciplinario en el posoperatorio inmediato y tardío para evitar complicaciones.

Palabras clave: síndrome hueso hambriento, paratiroidectomía, hiperparatiroidismo secundario, hipocalcemia, enfermedad renal crónica.

Summary

HUNGRY BONE SYNDROME ASSOCIATED TO SECONDARY HYPERPARATHYROIDISM DUE TO CHRONIC RENAL FAILURE

Hungry bone syndrome (HBS) after parathyroidectomy is characterized by an increase in the bone uptake of calcium, phosphate and magnesium induced by the acute descent of parathyroid hormone.

* Correo electrónico: maria.diehl@gmail.com



Hypocalcemia is frequent following surgery for secondary hyperparathyroidism in patients with chronic kidney disease. It may be abrupt and associated with clinical manifestations such as tetany and seizures. Severe hypophosphatemia and hypomagnesemia may be present but are unusual in patients with chronic kidney disease. The factors that predict HBS are related to the severity of the hyperparathyroidism and bone compromise (i.e., elevation of alkaline phosphatase, bone pain and radiologic findings). We suggest initiating i.v. calcium gluconate using a continuous infusion pump and central venous catheter immediately after surgery. High-calcium hemodialysis bath is recommended. Oral calcium and calcitriol supplements should be administered as soon as possible. There is a wide variation in calcium and calcitriol requirement. Treatment is to be adjusted according to frequent laboratory controls. Calcium and vitamin D doses should be reduced gradually. Patients with severe bone disease may need prolonged treatment with calcium and vitamin D. An intensive and multidisciplinary follow-up after surgery and in the long term are mandatory to ensure patient safety and favorable outcome.

Key words: hungry bone syndrome, parathyroidectomy, secondary hyperparathyroidism, hypocalcemia, chronic kidney disease.

Introducción

El hipoparatiroidismo y el síndrome de hueso hambriento (SHH) se consideran las causas más importantes de hipocalcemia luego de la cirugía paratiroidea y tiroidea.

El hipoparatiroidismo reduce la resorción ósea, la reabsorción tubular renal y la absorción intestinal de calcio. La hipocalcemia es transitoria en la mayoría de los pacientes, aunque en algunos casos el hipoparatiroidismo posquirúrgico es definitivo.

La presencia de hipocalcemia posoperatoria grave, prolongada, sintomática, o que requiere un importante aporte de calcio, niveles de parathormona (PTH) normales o elevados

caracteriza al síndrome de hueso hambriento (SHH).

La resorción ósea inducida por la PTH disminuye luego de la paratiroidectomía, mientras que la actividad osteoblástica persiste. El desequilibrio entre la formación y la resorción luego del descenso brusco de la PTH produce un aumento de la captación ósea de calcio, fósforo y magnesio que determina el SHH.¹

El SHH ocurre después de la paratiroidectomía en pacientes con hiperparatiroidismo primario (HPT primario) o secundario a enfermedad renal crónica (HPT secundario) o a la tiroidectomía por hipertiroidismo. En todas las circunstancias se advierte, previo a la cirugía, un aumento del remodelamiento óseo inducido por el exceso de hormona paratiroidea o tiroidea. También se ha descrito SHH en pacientes tratados con cinacalcet por HPT urémico y en pacientes con metástasis osteoblásticas.^{1,2}

El descenso de la calcemia en el SHH es rápido y puede asociarse a manifestaciones clínicas graves como la tetania y convulsiones. También pueden producirse hipofosfatemia e hipomagnesemia. Ambas alteraciones ocurren con mayor frecuencia en pacientes con HPT primario en relación con el HPT secundario.

Existen controversias en los criterios diagnósticos, factores predictores, prevalencia, prevención, tratamiento y seguimiento del SHH luego de la paratiroidectomía por HPT secundario.

El objetivo de este artículo es aportar la experiencia acumulada en el diagnóstico y tratamiento del SHH luego de la cirugía de paratiroides en pacientes con enfermedad renal crónica e hiperparatiroidismo secundario grave.

Definición, factores predictores e incidencia del síndrome de hueso hambriento luego de la cirugía del hiperparatiroidismo secundario en la enfermedad renal crónica

El SHH es una complicación importante en

pacientes operados por HPT secundario. La incidencia publicada varía entre 20 y 100%, según distintas observaciones. La amplitud del rango se debe a los diferentes criterios diagnósticos.^{3,4,5}

El SHH se define teniendo en cuenta los niveles de calcemia ($< 7,5$ a $8,5$ mg/dl), presencia de síntomas, duración de la estadía hospitalaria, necesidad de calcio intravenoso o la combinación de más de uno de estos parámetros.³ En el trabajo de Cheng y col., la incidencia fue de 22% si el punto de corte era una calcemia menor de $7,0$ mg/dl, y de 100% si se consideraban valores inferiores a $8,5$ mg/dl.⁶

En nuestra experiencia consideramos que un paciente presenta SHH cuando se observa descenso de calcemia $< 8,5$ mg/dl, disminución de la fosfatemia con respecto al valor basal y/o altos requerimientos de calcio intravenoso y por vía oral.

Los factores predictores del SHH tienen relación con la magnitud del hiperparatiroidismo y la gravedad del compromiso óseo.

Distintos trabajos consideran como factores predictores la edad menor o igual a 45 años,^{3,4,7,8} niveles elevados de PTH^{4,9,10} y fosfatasa alcalina^{4,6,8,9} prequirúrgicos, la presencia de resorción subperióstica⁹ y el mayor tamaño glandular.⁸

La calcemia preoperatoria es controvertida. Algunos autores observaron una calcemia menor, aunque en rango normal-alto, en pacientes con SHH.^{7,8,10} En nuestra experiencia de 51 pacientes operados por HPT secundario reconocimos como factores predictores de SHH una normal alta calcemia y la fosfatasa alcalina elevada.¹¹

Manifestaciones clínicas

El cuadro clínico consiste en las manifestaciones propias de la hipocalcemia. Los síntomas neuromusculares son las parestesias periorales y en extremidades, calambres, tetania, estridor laríngeo, convulsiones, deterioro del sensorio y coma, mientras que a nivel cardiovascular se observan hipotensión, in-

suficiencia cardíaca, arritmias y prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma. Los signos de Chvostek y Trousseau orientan el diagnóstico de hipocalcemia.¹²

Las comunicaciones refieren presencia de síntomas asociados a hipocalcemia entre 23 y 95% de los casos. La población analizada por McHenry con una mayoría de pacientes sintomáticos se caracterizaba por un importante compromiso óseo prequirúrgico (dolor, fracturas, resorción subperióstica o tumores pardos).¹³

La cirugía de paratiroides en pacientes con enfermedad renal crónica en estadio dialítico representa una situación de alto riesgo, ya que en esta población vulnerable, la hipocalcemia puede poner en riesgo la vida. Se ha descrito muerte súbita en un 4,8% en el primer mes posoperatorio: la población presentaba calcio iónico previo inferior a 1 mmol/l.¹⁰

La hipofosfatemia y la hipomagnesemia sintomáticas son infrecuentes en la insuficiencia renal, pero en nuestra experiencia algunos casos esporádicos requirieron tratamiento.

Tratamiento del síndrome de hueso hambriento. Preparación previa a la paratiroidectomía

En primer lugar es importante identificar al paciente con riesgo de SHH. Según nuestra experiencia, la fosfatasa alcalina elevada o el compromiso óseo (resorción subperióstica y tumores pardos) son alarmas para preparar al paciente antes de la cirugía.

Se recomienda administrar $1-2$ μ g de calcitriol posdialisis en las tres sesiones previas a la cirugía si los niveles de calcemia y fosfatemia lo permiten y dializar al paciente el día anterior al procedimiento quirúrgico.¹⁴

El tratamiento con bifosfonatos destinado a atenuar el remodelado óseo y reducir la demanda de calcio es controvertido. Algunos autores postulan su administración con el fin de prevenir la hipocalcemia grave, disminuir el consumo de calcio en el posoperatorio y los días de internación.¹⁵ En un análisis retrospec-



tivo realizado en nuestro centro comparamos la evolución de pacientes con y sin tratamiento previo con bifosfonatos. No encontramos diferencias significativas en el requerimiento de calcio intravenoso, oral y calcitriol, ni en la estadía hospitalaria. Observamos hipocalcemia de presentación más tardía, abrupta y en algunos casos sintomática, entre los 15 y 30 días de la cirugía (Tabla 1). Esta hipocalcemia se adscribe a la pérdida de efecto terapéutico del bifosfonato. Sugerimos limitar su uso a aquellos pacientes con hipercalcemia que requiera tratamiento antes de la cirugía paratiroidea.⁸

Se sugiere la colocación de una vía central en quirófano para evitar la flebitis que con frecuencia se asocia a la administración de calcio en dosis altas por vía periférica.

Seguimiento y tratamiento inmediato luego de la paratiroidectomía

Existen distintos enfoques para la prevención y tratamiento de la hipocalcemia debida a SHH posparatiroidectomía por HPT secun-

dario, que varían entre el uso de calcio intravenoso en todos los pacientes,^{5,10,14} el inicio del tratamiento con calcio intravenoso, si la calcemia disminuye más de un 10% con respecto al valor basal,¹⁶ y la indicación exclusiva para pacientes sintomáticos o con valores de calcemia menores de 7,2 mg/dl.^{6,17}

Nuestro protocolo, similar a otros,^{5,10,14} plantea iniciar la infusión de calcio inmediatamente después de la cirugía en todo paciente operado de hiperplasia paratiroidea por HPT urémico con los factores de riesgo mencionados. El fármaco de elección para uso intravenoso es el gluconato de calcio por producir menor necrosis tisular que el cloruro de calcio en caso de extravasación. El cloruro de calcio tiene como otra desventaja el riesgo de acidosis metabólica en pacientes con enfermedad renal crónica (Tabla 2). Habitualmente se inicia la infusión en el quirófano al finalizar la cirugía. Se administran inicialmente 10 ampollas de gluconato al 10% por vía central (37,5 mg/hora de calcio elemental) y se regula la dosis según el valor de la calcemia de control, la

Tabla 1. Requerimiento de calcio y calcitriol durante la internación, duración de la estadía hospitalaria y evolución de la calcemia a los 15 y 30 días en 51 pacientes con enfermedad renal crónica operados por hiperparatiroidismo secundario. Se compara la población que recibió tratamiento con bifosfonatos previo a la cirugía, con aquella no tratada. Hospital Italiano de Buenos Aires (2003-2007).

	Bifosfonatos previos (n=14)	Sin bifosfonatos (n=37)
Gluconato de calcio e.v.	5,26±5,00 g	5,75±4,60 g
Calcio elemental v.o.	23,31±15,50 g	29,04±22,00 g
Calcitriol e.v.	6,25±3,80 µg	7,30±6,13 µg
Calcitriol v.o.	21,83±16,00 µg	17,00±15,26 µg
Días de internación	7,43±3,00	6,53±3,00
Calcemia día 15 postoperatorio	7,73±2,49 mg/dl	9,34±0,93 mg/dl
Calcemia día 30 postoperatorio	7,74±1,24 mg/dl	9,24±0,96 mg/dl

magnitud del descenso y la evolución clínica. Se sugiere el uso de una bomba de infusión continua.

En caso de hipocalcemia sintomática se infunden 90-180 mg de calcio elemental en 50 ml durante 10-20 minutos; es importante respetar estos tiempos pues a mayor velocidad hay riesgo de disfunción cardíaca. Esta dosis de carga eleva la calcemia de manera transitoria, por lo que debe continuarse con una infusión lenta de calcio en forma continua.

La vía periférica tiene como inconveniente la flebitis y se aconseja una dilución máxima de 10 ampollas de gluconato de calcio 10% en 500 ml de dextrosa en agua al 5%. La vía central permite mayores concentraciones y es de utilidad en los pacientes con enfermedad renal para evitar la sobrecarga de volumen.

Se recomienda realizar una calcemia de control cada 4-6 horas en las primeras 48 horas (prediálisis o 2 horas después de finalizada esta) y controlar diariamente fosfatemia y magnesemia. La calcemia se mide como calcio iónico o total, según la disponibilidad del laboratorio. Esta última debe ser corregida en función de la albuminemia.

Si la primera calcemia de control disminuye con respecto a la basal prequirúrgica, se aumenta la dosis de calcio en función de la magnitud del descenso. Si la calcemia se mantiene en rango de normalidad en ausencia de síntomas se mantiene la dosis y, si es mayor de 10,5 mg/dl, se reduce o se suspende la infusión de calcio intravenoso (Figura 1).

En nuestra experiencia es frecuente observar un requerimiento de 0,5-2,0 mg/kg/h (en la

Tabla 2. Preparaciones de calcio: contenido de calcio elemental.

Compuestos de calcio	Calcio elemental
Acetato de calcio (25% calcio elemental)	250 mg/gramo
Carbonato de calcio (40% calcio elemental)	400 mg/gramo
Gluconato de calcio (9% calcio elemental)	90 mg/gramo
Lactato de calcio (13% calcio elemental)	130 mg/gramo
Cloruro de calcio (27% de calcio elemental)	270 mg/gramo
Citrato de calcio	No se utiliza en insuficiencia renal
CALCIO ORAL: Comprimidos de uso habitual	
Carbonato de calcio 1.250 mg	500 mg por comprimido
Comprimidos lactato-gluconato de calcio 2.263 mg más carbonato de calcio 1.750 mg	1.000 mg por comprimido
CALCIO ENDOVENOSO: ampollas de uso habitual	
Gluconato de calcio al 10%, ampolla de 10 ml, (preparación de elección)	90 mg/ampolla
Cloruro de calcio 10% ampolla de 10 ml	270 mg/ampolla



práctica entre 10 y 30 ampollas de 10 ml de gluconato de calcio al 10% por día) en las primeras 72 horas del posoperatorio. Algunos pacientes con HPT secundario grave necesitaron dosis mayores, entre 40 y 50 ampollas/día.

Existe una gran variación individual del requerimiento de calcio, por lo que estas dosis

pueden ser diferentes según la gravedad del SHH.

Los pacientes con hiperparatiroidismo grave e hipercalcemia preoperatoria a veces manifiestan síntomas aun presentando calcemias en rango normal. La velocidad de descenso de la calcemia es un factor para considerar.

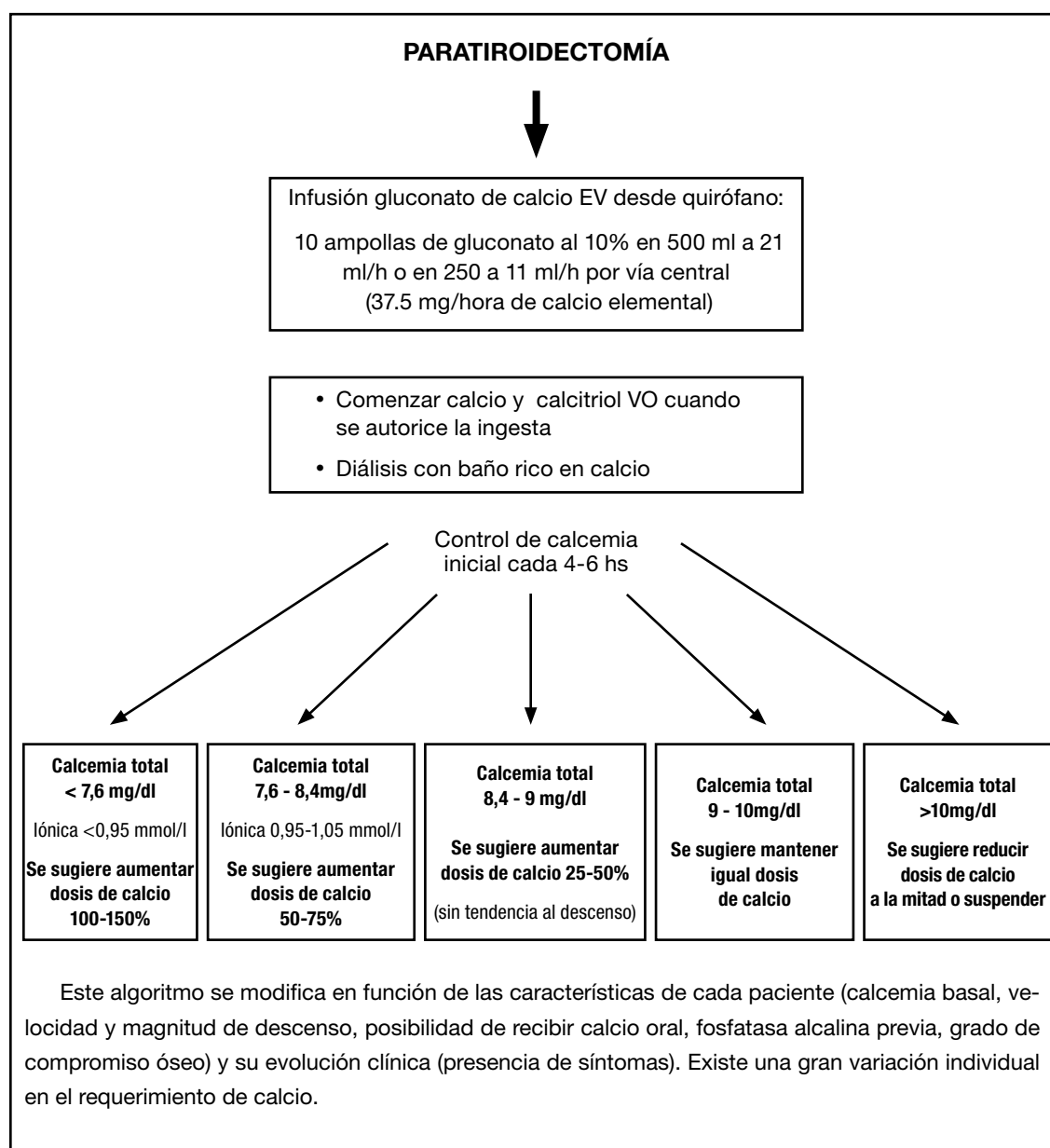


Figura 1. Algoritmo para el tratamiento de la hipocalcemia por síndrome de hueso hambriento postparatiroidectomía en pacientes con hiperparatiroidismo secundario a enfermedad renal crónica. EV: endovenoso, VO: vía oral.

Los pacientes con escaso compromiso óseo y fosfatasa alcalina en rango de normalidad suelen requerir menor cantidad de calcio, por lo que es importante adaptar el tratamiento a cada caso en particular.

Se comienza con calcio y calcitriol vía oral cuando se autoriza la ingesta. Se recomienda una dosis de calcio elemental por vía oral entre 2 y 6 gramos/día, dividida en 3-5 tomas.^{14 16}

Habitualmente comenzamos con 1 gramo de calcio elemental cada 6 horas lejos de las comidas y se ajusta la dosis de acuerdo con los valores de calcemia y la tolerancia digestiva. Los distintos compuestos de calcio contienen diferentes porcentajes de calcio elemental (Tabla 2). Asociado al calcio se indica calcitriol en dosis variables entre 0,25 y 1 µg cada 6 horas, según los valores de calcemia y fosfatemia. El calcitriol puede usarse por vía intravenosa u oral y optimiza la absorción de calcio y fósforo.

Basándose en la evolución clínica y los controles sucesivos se reduce gradualmente el aporte de calcio intravenoso hasta su suspensión y se continúa el tratamiento con calcio y calcitriol vía oral (VO).

Los pacientes operados por HPT secundario presentan descenso de la fosfatemia. Algunos pacientes pueden requerir suplementación de fosfato. Es preferible el aporte vía oral y/o la dieta rica en lácteos en forma transitoria e incrementar la dosis de calcitriol (incrementa la absorción intestinal). Si se requiere el uso de fosfato intravenoso por hipofosfatemia severa (<1 mg/dl) o sintomática nunca se debe administrar por la misma vía que el gluconato de calcio, ya que precipita. Es preferible el fosfato de sodio ya que el fosfato de potasio puede producir hiperpotasemia.

Se aconseja la administración del calcio lejos de las comidas, suspender los quelantes no cálcicos en el posoperatorio inmediato y evaluar –según la evolución de la fosfatemia– la necesidad de reiniciarlos.

La hipomagnesemia no es un fenómeno común en pacientes con enfermedad renal,

pero es importante detectarla y corregirla ya que puede ser causa de hipocalcemia refractaria por disminución de la síntesis de PTH y resistencia a su acción.

En las sesiones de hemodiálisis se debe aumentar la concentración de calcio en el dializante a 3,5 mEq/l.¹⁵ Puede ser necesario incrementar la frecuencia de sesiones de diálisis en caso de sobrecarga de volumen.

Se indica el alta hospitalaria con valores normales de calcemia 24 horas después de la suspensión del aporte intravenoso de calcio y con buena tolerancia a los suplementos de calcio y del calcitriol vía oral.

Seguimiento a largo plazo posterior a la paratiroidectomía

Se recomienda evaluar los niveles de calcio y fósforo dos veces por semana, en forma semanal y luego quincenal, durante los dos primeros meses hasta obtener valores estables y luego continuar con los controles mensuales habituales.¹⁵

Se sugiere un control estricto de la calcemia durante el primer trimestre del posoperatorio, en especial en pacientes tratados previamente con bifosfonatos.

La reducción de la dosis de calcio y calcitriol debe ser gradual; los valores normales de calcemia, fosfatemia y fosfatasa alcalina guían el descenso del aporte.

En casos de compromiso óseo muy importante, el requerimiento de calcio y vitamina D por SHH puede prolongarse durante meses o años.

Conclusiones

El SHH es una entidad clínica de relevancia en el posoperatorio inmediato del HPT secundario a la enfermedad renal crónica y puede poner en riesgo la vida del paciente. Se caracteriza por el descenso de la calcemia, de la fosfatemia y ocasionalmente también de la magnesemia.

La disminución de la calcemia se produce de manera abrupta, por lo que consideramos



conveniente la infusión intravenosa de calcio en el posoperatorio inmediato, aun con calcemias normales, para evitar la aparición de hipocalcemia sintomática.

La magnitud del hiperparatiroidismo y la presencia de compromiso óseo previo predicen el requerimiento de calcio. El aporte inicial y de mantenimiento se decide teniendo en cuenta el valor de calcemia, la presencia de síntomas y los factores predictores de SHH. Se jerarquizan, en las primeras horas posoperatorias, la tendencia y velocidad del descenso de la calcemia. Es frecuente el requeri-

miento de dosis altas de calcio y calcitriol por tiempo prolongado.

Es necesario un seguimiento intensivo e interdisciplinario en el posoperatorio inmediato y tardío para evitar complicaciones.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: febrero de 2014.

Aceptado: marzo de 2014)

Referencias

1. Angeli A, Dovio A. The hungry bone: expected and unexpected. *Ann Ital Med Int* 2004; 19: 4-6.
2. Lazar ES, Stankus N. Cinacalcet-induced hungry bone syndrome. *Semin Dial* 2007; 20:83-5.
3. Goldfarb M, Gondek S.S, Lim SM, Farra JC, Nose V, Lew JL. Postoperative hungry bone syndrome in patients with secondary hyperparathyroidism of renal origin. *World J Surg* 2012; 36:1314-19.
4. Jofré R, López Gómez JM, Menárguez J, et al. Parathyroidectomy: whom and when? *Kidney Int* 2003; 63:S97-S100.
5. Mittendorf EA, Merlino JL, Mc Henry CR. Post-parathyroidectomy hypocalcemia: incidence, risk factors, and management. *Am Surg* 2004; 70:114-9.
6. Cheng SP, Liu CL, Chen HH, Lee JJ, Liu TP, Yang TL. Prolonged hospital stay after parathyroidectomy for secondary hyperparathyroidism. *World J Surg* 2009; 33:72-9.
7. Latus J, Roesel M, Fritz P, et al. Incidence of and risk factors for hungry bone syndrome in 84 patients with secondary hyperparathyroidism. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2013; 6:131-7.
8. Torer N, Torun D, Micozkadioglu T, Noyan T, Ozdemir FN, Haberal MI. Predictors of early postoperative hypocalcemia in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Transplant Proc* 2009; 41:3642-6.
9. Nakagawa M, Emoto A, Nasu N, et al. Calcium supplement necessary to correct hypocalcemia after total parathyroidectomy for renal osteodystrophy. *Int J Urol* 2000; 7:35-40.
10. Viaene L, Evenepoel P, Bammens B, Claes K, Kuypers D, Vanrenterghem Y. Calcium requirements after parathyroidectomy in patients with refractory secondary hyperparathyroidism. *Nephron Clin Pract* 2008; 110:c80-c85.
11. Ortiz MI, Plantalech L, Diehl M, Crucelegui S, Rosa Diez G. Post-operative hypocalcemia in uremic hyperparathyroidism. Predictive factors and benefits from the use of bisphosphonates (Abstract). *Bone* 2008; 43:S132.
12. Schafer AL, Shoback D. Hypocalcemia: definition, etiology, pathogenesis, diagnosis and management. En: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 8th Edition (Rosen CJ, editor-in-chief; ASBMR). Ames, Iowa; Wiley-Blackwell, 2013. Pp 572-8.
13. McHenry CR, Wilhelm SM, Ricanati E.

- Refractory renal hyperparathyroidism: clinical features and outcome of surgery. *Am Surg* 2001; 67:310-6.
14. Peñalba A, Alles A, Aralde A. et al. Consenso en metabolismo óseo y mineral. Sociedad Argentina de Nefrología. Versión 2010. Capítulo VII: paratiroidectomía en la enfermedad renal crónica y un apéndice sobre biopsia ósea. *Dial Traspl.* 2011; 32(2):68-73
15. Davenport A, Stearns MP. Administration of pamidronate helps prevent immediate postparathyroidectomy hungry bone syndrome. *Nephrology* 2007; 12:386-90.
16. Cozzolino M, Gallieni M, Corsi C, Bastagli A, Brancaccio D. Management of calcium refilling post-parathyroidectomy in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2004; 17:3-8.
17. National Kidney Foundation K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Chronic Kidney Disease. Guideline 14: Parathyroidectomy in CKD. *Am J Kidney Dis* 2003 (Suppl 3): S 127-129.

“En una fracción de segundo volvió a examinar el sueño premonitorio que le había cambiado la vida durante tres años, y comprendió el error de su interpretación

—Dios mío—, se dijo asombrada. ¡De modo que no era la muerte!

Encontró por fin la cerradura, oyendo los pasos contados en la oscuridad, oyendo la respiración creciente de alguien que se acercaba tan asustado como ella en la oscuridad, y entonces comprendió que había valido la pena esperar tantos y tantos años, y haber sufrido tanto en la oscuridad, aunque solo hubiera sido para vivir aquel instante”.

Cien años de Soledad (1967)
Gabriel García Márquez (1927-2014)



ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

EFFECTS OF CAFFEINE INTAKE IN MOTHERS ON MATERNAL CORTISOL LEVELS AND OFFSPRING ENDOCHONDRAL OSSIFICATION

Amanda Maria Sena Reis, Ana Cláudia Moura Batista, Natália de Melo Ocarino, Rogéria Serakides*

Universidade Federal de Minas Gerais. Brasil

Summary

The objective of the present study was to assess the effects of caffeine intake in mothers on maternal cortisol levels and on endochondral ossification of the offspring after birth. A total of 38 Wistar rats were analyzed, including a control group and three treated with caffeine at doses of 25, 50 and 100 mg/kg throughout pregnancy and lactation. Maternal cortisol levels were measured by chemiluminescence in the morning period. Endochondral ossification of the offspring was assessed at 3 and 21 days of age by histomorphometry. Only the mothers in the group treated with 100 mg/kg of caffeine exhibited significantly higher cortisol levels in comparison to the control group. The offspring of mothers treated with 50 and 100 mg/kg doses of caffeine showed significant reduction in the length of their limbs and vertebral bodies. Bone histomorphometry at 3 days of age showed abnormalities at all doses of caffeine. The 21-day-old offspring of mothers treated with caffeine remained

significantly lower in weight and long bone length compared at 3 days of age.

We conclude that caffeine does not stop endochondral ossification, but rather inhibits. In addition, the effects of caffeine were more detrimental to the cartilage growth of 3-day-old pups, and the frequency and intensity of the observed changes were dose-dependent.

Keywords: cartilaginous tissue, growth, caffeine, rats

Resumen

EFFECTOS DE LA INGESTA DE CAFÉINA MATERNA EN LOS NIVELES DE CORTISOL MATERNO Y EN LA OSIFICACIÓN ENDOCHONDRAL DE LA PROLE

El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de ingesta de cafeína sobre los niveles de cortisol materno y sobre la osificación endocondral de las crías. Se analizaron 38 ratas Wistar, incluyendo un grupo control y tres tra-

* Dirección Postal: Escola de Veterinária da UFMG. Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 567, campus Pampulha da UFMG, CEP 30161-970. Belo Horizonte, MG, Brasil.
Correo electrónico: serakidesufmg@gmail.com (R. Serakides)

tados con cafeína 25, 50 y 100 mg/kg durante la gestación y lactancia. Los niveles de cortisol materno se midieron por quimioluminiscencia por la mañana. La osificación endocondral de las crías a los 3 y 21 días de edad fue evaluada por histomorfometría. Sólo las madres en el grupo 100 mg/kg de cafeína mostraron niveles de cortisol significativamente mayores en comparación con el control. Las crías de madres tratadas con cafeína 50 y 100 mg/kg mostraron una reducción significativa en la longitud de sus extremidades y cuerpos vertebrales. La histomorfometría ósea a los 3 días de edad mostró alteraciones en todas las dosis de cafeína. A los 21 días de edad, las crías presentan peso y longitud de huesos largos significativamente inferiores en comparación a los 3 días de edad. Se concluye que la cafeína no detiene osificación endocondral, sino que la inhibe. Además, los efectos de la cafeína fueron más perjudiciales en las crías de 3 días de edad, y la frecuencia y la intensidad de los cambios fueron dependientes de la dosis.

Palabras clave: tejido cartilaginoso, crecimiento, cafeína.

Introduction

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is a pharmacologically active xanthine present in coffee, tea, sodas, energy drinks, chocolates, cocoa based foods and drugs; thus, it is widely consumed in the human diet ^{1,2,3,4}.

In pregnant women, caffeine crosses the placenta and is also conveyed through breast milk. Therefore, the consumption of this substance by the mother may pose a potential risk to the health of the fetus ^{5,6}.

Although there are some beneficial effects of caffeine, there have been several reports of adverse effects on organisms ^{4,7,8,9,10}.

Previous studies have shown that caffeine causes changes in the bone structure of fetuses and younger rats. In rat fetuses exposed to high doses of caffeine, teratogenic changes such as palatoschisis, malformations of the limbs, ectrodactyly^{11,12} and reduced bone mineral

content have been observed⁷. However, studies conclude that the dietary exposures of caffeine are not teratogenic or are directly responsible for an increased risk of spontaneous abortion or fetal growth retardation¹³.

Demineralized bone fragments implanted into the subcutaneous tissue of growing rats treated with caffeine resulted in the inhibition of chondrogenesis and a reduction of the expression of collagen II, histone and TGF beta¹⁴. Thus, it has been postulated that high doses of caffeine can inhibit endochondral ossification in young rats¹⁵.

Recently, the effects of prenatal exposure to caffeine at a dose of 120 mg/kg were investigated. The results demonstrated that caffeine inhibits bone growth, and this effect is associated with maternal exposure to glucocorticoids and the inhibition of IGF-1 expression in the epiphyseal plates¹⁶.

Studies have shown that young, rapidly growing rats fed a diet supplemented with 20-40mg/kg caffeine exhibited abnormalities in bone tissue structures that were similar to those occurring with age, such as a smaller cross-sectional bone area with fewer osteocytes present; however, these studies failed to examine the effects of caffeine on cartilaginous tissue^{8,17}.

The objective of this study was to assess the effects of caffeine intake (different doses) in mothers on endochondral ossification after birth by histomorphometric analysis of the epiphyseal cartilage of 3-day-old rats and the articular cartilage and epiphyseal plates of various bones in 21-day-old rats. The histomorphometry studies were subsequently correlated with maternal serum cortisol levels.

Materials and methods

All experimental procedures were approved by the Institutional Ethics Committee in Animal Experimentation at *Universidade Federal de Minas Gerais* (UFMG) (protocol no. 177/2010).

Thirty-eight adult female Wistar rats were



used in this study. Animals from the same experimental group were housed at a density of six rats per cage on a 12-h light-dark cycle. The rats were fed commercial rat chow containing 22% crude protein, 1.4% calcium and 0.6% phosphorus. Food and water were provided ad libitum to all of the animals. After a 30-day adaptation period, the rats were randomly divided into four groups, three of which were treated with different doses of caffeine and a control group. The treated groups (10 animals/group) received daily caffeine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in 5 mL of distilled water at doses of 25, 50 or 100 mg/kg. Doses were administered by an oral-gastric probe at the same time each day over the course of the experimental period. As a placebo, the control group (8 animals) received 5 mL of distilled water administered daily by oral-gastric probe. Rats from all groups were subjected to vaginal cytology to monitor the estrous cycle. Rats in estrus were kept in plastic cages with adult male rats for 12 h. After this period, vaginal smears were obtained daily to detect spermatozoa. Copulation was confirmed by the presence of spermatozoa in the vaginal cytology samples, and this day was considered Day 0 of gestation. After copulation, the females were kept individually in plastic cages. Animals in the treated and control groups continued to receive caffeine and water, respectively, by an oral-gastric probe throughout the duration of the experimental period (pregnancy and lactation).

Measurement of maternal levels of serum cortisol

After breastfeeding elapsed (21 days), the rats were anesthetized in the morning with ketamine (40 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and blood was collected by intracardiac puncture. The blood was collected in tubes and serum was obtained and stored at -20° C for subsequent measurement of cortisol levels. The cortisol measurements were performed by chemiluminescence (Access Immunoas-

say System, Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc., Chaska, MN, USA) using a fully automated system according to the manufacturer's recommendations and the kit instructions.

Necropsy and histological processing

Three days after birth, three pups from each litter were euthanized and both the right hind limb and the lumbar spine were collected for histopathological analysis. At weaning, three 21-day-old pups from each litter were euthanized; the left humerus, femur, and tibia, and the thoracic and lumbar vertebrae were collected for histomorphometric analysis. The bones were fixed in 10% formalin neutral buffer for 24 hours, decalcified in 21% formic acid for a period of 20 days with changes of the solution occurring every three days. Subsequently, the bones were processed using a routine paraffin inclusion technique. Histological sections (4 µm) were stained with hematoxylin-eosin (HE) before histological evaluation.

Weight and size of offspring

Weight measurements were recorded throughout the duration of the experimental period from birth to the end of weaning. The size of 3-day-old pups was measured as the distance from the neck to the base of the tail, and the length of the pelvic and thoracic members were also measured with a caliper. In 21-day-old pups, the length and width of the long bones (femur, tibia and humerus) were measured with a caliper¹⁸.

Histomorphometric analysis of the bones of 3-day-old rats

The trabecular bone percentage was determined using histological sections of vertebrae and long bones of 3-day-old rats. The percentage of trabecular bone was determined in the bones located directly below the epiphyseal plate (i.e., the primary spongy bone) of two vertebral bodies in a random field of the lumbar spine and in a random field of the tibia

per animal. This analysis was performed with the aid of a 121-point graticule attached to the microscope underneath a 40x objective.

The thickness of the epiphyseal plates of two vertebrae/animal from the 3-day-old rats was determined at three equidistant points with the aid of an ocular micrometer on a 40x objective. The length of the vertebral bodies was measured for two vertebrae per animal with a 10x objective. The values were obtained using an eyepiece micrometer and were subsequently converted to mm using a micrometric slide.

In 3-day-old rats, the percentage of nuclei, the percentage of chondroblast gaps and the percentage of cartilaginous tissue matrix in the cartilaginous epiphysis of the distal femur and of the proximal tibia were determined with the aid of a 121-point graticule attached to the microscope under the 40x objective.

Histomorphometric analysis of the bones of 21-day-old rats

The percentage of trabecular bone was determined using histological sections of vertebrae and long bones from 21-day-old rats. The percentage of trabecular bone was determined in six random fields of primary spongy bone, in three vertebral bodies per animal in the thoracic spine 1-7, in the thoracic spine 8-13, in the lumbar spine 1-3, in the lumbar spine 4-6, and in primary spongy bone of the femur, tibia, and humerus. This analysis was performed with the aid of a 121-point graticule attached to the microscope under the 40x objective.

The thickness of the epiphyseal plates of three vertebrae bodies per animal from 21-day-old rats was determined at three equidistant points with the aid of a micrometer ocular on a 10x objective. In articular cartilage and the epiphyseal plates of femurs, tibias and humeri, the mean thickness was measured at 15 points distributed throughout their length with the aid of an eyepiece micrometer and a 10x objective. The length of the verte-

bral bodies was measured in three vertebrae per animal with a 4x objective. Values were obtained using an eyepiece micrometer and were subsequently converted to mm using a micrometric slide.

Statistical analysis.

Delineation was performed in a random manner and the mean and standard deviation were determined for each variable. We performed an ANOVA and compared the means using a Student-Newman-Keuls test. Differences were considered to be significant if $p < 0.05$ ¹⁹. For data analysis the GraphPad InStat software version 3.05 was used.

Results

Measurement of maternal levels of serum cortisol

The group control exhibited mean and standard deviation of serum cortisol of 0.486 ± 0.089 . The group treated with dose of caffeine 25 mg/kg exhibited mean and standard deviation of serum cortisol of 0.4625 ± 0.0744 . The group treated with dose of caffeine 50 mg/kg exhibited mean and standard deviation of serum cortisol of 0.555 ± 0.1740 . The group treated with dose of caffeine 100 mg/kg exhibited mean and standard deviation of serum cortisol of 0.7625 ± 0.1847 .

The groups treated with lower doses of caffeine (25 and 50 mg/kg) exhibited serum cortisol levels similar to the control group ($p \geq 0.05$). However, concentrations of cortisol were significantly higher in the mothers treated with 100 mg/kg caffeine than in the control group.

Weight, size of offspring and histomorphometric analysis of the bones of 3-day-old rats

The weights of the offspring of rats treated with 50 and 100 mg/kg of caffeine were significantly lower than those of the control group throughout the experimental period. However, the weight of the offspring of rats treated



with 25 mg/kg caffeine was not different from those of the offspring of control rats (Table 1).

Similar to previously described weight results, the distance measured from the neck to the base of the tail and the length of the hind limbs of the 3-day-old offspring of the rats treated with 50 and 100 mg/kg of caffeine were significantly lower compared to the control group. No significant difference was observed between the 25 mg/kg caffeine-treated group and the control group (Table 2); however, it is interesting that the length of the forelimbs of 3-day-old rats was significantly lower in all the caffeine-treated groups when compared to the forelimb lengths of the control group (Table 2). The length of the spine of the 3-day-old offspring of the 100 mg/kg caffeine-treated rats was significantly lower when compared to the control group and the other caffeine-treated groups. However, no

significant differences were observed among the 25 mg/kg caffeine-treated group, the 50 mg/kg caffeine-treated group and the control group (Table 2).

Epiphyseal plate and primary spongy bone of the tibia and vertebrae

The epiphyseal plate of long bones and vertebrae of 3-day-old offspring of rats treated with caffeine was poorly differentiated and different areas could not be distinguished from each other. In contrast, it was possible to visualize a well-differentiated hypertrophic columnar zone in the control group. In the offspring of the 100 mg/kg caffeine-treated rats, the epiphyseal plate cells were quite disorganized and were undifferentiated in all of the areas examined. The thickness of the epiphyseal plate of the 3-day-old offspring of the 50 and 100 mg/kg caffeine-treated rats

Table 1. Pup weight (g) of rats treated with different doses of caffeine and control rats from birth to weaning (mean $\pm$ SD).

Days	Control	Caffeine 25mg/Kg	Caffeine 50mg/Kg	Caffeine100mg/Kg
Day 1	7,23 $\pm$ 0,62 A	7,38 $\pm$ 0,66 AB	6,53 $\pm$ 0,65 B	5,87 $\pm$ 0,96 B
Day 3	9,55 $\pm$ 0,77 A	9,19 $\pm$ 1,11 A	8,17 $\pm$ 1,75 A	6,84 $\pm$ 1,13 B
Day 5	12,65 $\pm$ 1,48 A	11,67 $\pm$ 1,46 A	9,85 $\pm$ 1,30 B	9,12 $\pm$ 1,07 B
Day 7	16,50 $\pm$ 2,05 A	14,63 $\pm$ 2,37 A	12,19 $\pm$ 2,04 B	11,06 $\pm$ 1,59 B
Day 9	18,89 $\pm$ 2,71 A	17,72 $\pm$ 2,87 A	14,58 $\pm$ 3,27 B	13,43 $\pm$ 1,35 B
Day 11	23,59 $\pm$ 3,08 A	21,50 $\pm$ 3,67 A	18,44 $\pm$ 1,83 B	16,26 $\pm$ 1,59 B
Day 13	26,46 $\pm$ 3,67 A	25,19 $\pm$ 4,91 A	21,61 $\pm$ 2,09 B	19,42 $\pm$ 2,46 B
Day 15	29,38 $\pm$ 4,80 A	28,01 $\pm$ 5,25 A	24,86 $\pm$ 2,44 AB	22,79 $\pm$ 2,68 B
Day 17	33,47 $\pm$ 5,64 A	31,08 $\pm$ 5,64 AB	27,55 $\pm$ 2,91 B	25,21 $\pm$ 2,70 B
Day 19	39,30 $\pm$ 7,00 A	36,16 $\pm$ 6,06 AB	31,91 $\pm$ 3,58 B	28,58 $\pm$ 2,93 B
Day 21	44,66 $\pm$ 9,30 A	44,32 $\pm$ 6,26 A	38,82 $\pm$ 4,70 AB	34,96 $\pm$ 3,82 B

* Means with capital letters equal in the line do not differ by Student Newman Keuls test (SNK) ($p \geq 0.05$).
Day 1 = 24 hours after parturition.

was significantly lower than that of the control group. Empty chondroblast lacunae were also observed in the offspring of caffeine-treated rats (Table 2).

The primary spongy bone of the tibia of 3-day-old offspring of rats treated with 50 and 100 mg/kg of caffeine displayed thin trabecular bones with a significant reduction in the percentage of trabecular bone. The group treated with 25 mg/kg of caffeine exhibited characteristics of the primary spongy bone of the tibia that were similar to those of the control group. The percentage of primary spongy bone in the lumbar vertebrae of all groups treated with caffeine was significantly

lower when compared to the control group (Table 3, Figure 1). Interestingly, regardless of which bone was examined, all caffeine-treated groups displayed trabeculae lined by active cuboidal osteoblasts, as observed in the control group (Figure 1).

Cartilaginous epiphysis of the femur and tibia of 3-day-old rats

In all groups of offspring from caffeine-treated mothers, pyknotic chondroblasts and a large number of empty lacunae were observed, both of which are characteristic of tissue degeneration and necrosis. The groups treated with 50 or 100 mg/kg of caffeine, the

Table 2. Body length measured from the neck to the base of the tail, the length (mm) of the members, the length (mm) of the vertebral body, and vertebral epiphyseal plate width (mm) of three-day-old offspring of untreated control rats and those treated with different doses of caffeine (mean $\pm$ SD).

Variable (mm)	Control	Caffeine 25 mg/Kg	Caffeine 50 mg/Kg	Caffeine 100mg/Kg
Body length	38,200 $\pm$ 3,084 A	38,125 $\pm$ 1,246 A	33,330 $\pm$ 2,550 B	31,937 $\pm$ 2,367 B
Pelvic member	3,160 $\pm$ 0,150 A	2,675 $\pm$ 0,088 A	2,060 $\pm$ 0,084 B	1,980 $\pm$ 0,063 B
Thoracic member	3,270 $\pm$ 0,231 A	3,087 $\pm$ 0,064 B	2,550 $\pm$ 0,143 C	2,230 $\pm$ 0,200 C
Length of the vertebral body	1,505 $\pm$ 0,126 A	1,490 $\pm$ 0,136 A	1,300 $\pm$ 0,107 A	1,125 $\pm$ 0,143 B
Epiphyseal plate width	0,398 $\pm$ 0,015 A	0,375 $\pm$ 0,043 AB	0,322 $\pm$ 0,055 BC	0,305 $\pm$ 0,037 C

* Means with capital letters equal in the line do not differ by Student Newman Keuls test (SNK) ($p \geq 0.05$).

Table 3. Percentage of trabecular bone in the primary spongy bone of the proximal tibia and lumbar vertebrae of 3-day-old offspring of control rats and those treated with different doses of caffeine (mean $\pm$ SD).

Bone site	Control	Caffeine 25mg/Kg	Caffeine 50mg/Kg	Caffeine 100mg/Kg
Tibia	39,812 $\pm$ 8,965 A	39,498 $\pm$ 14,138 A	22,968 $\pm$ 9,644 B	19,502 $\pm$ 1,902 B
Lumbar vertebrae	43,796 $\pm$ 14,080 A	28,342 $\pm$ 7,773 B	31,566 $\pm$ 8,067 B	21,402 $\pm$ 2,436 B

* Means with capital letters equal in the line do not differ by Student Newman Keuls test (SNK) ($p \geq 0.05$).

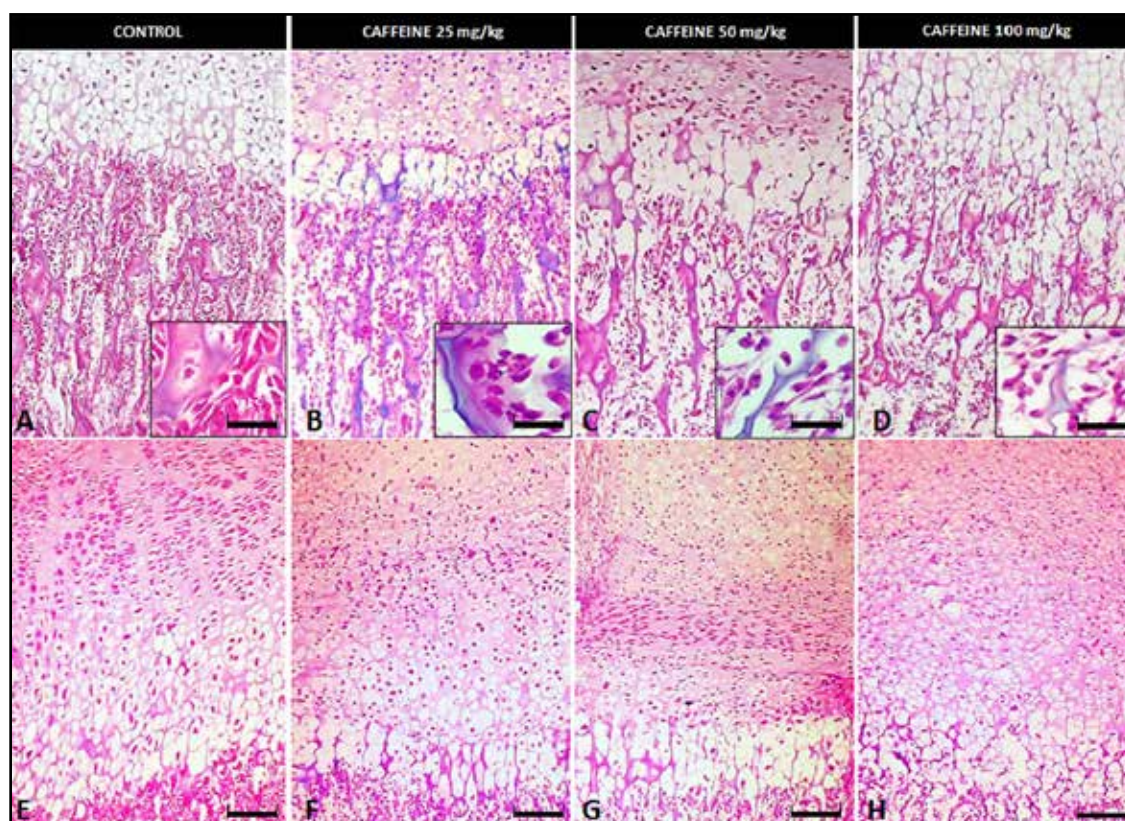


Figure 1. Three-day-old rat. HE, bar = 94.59 μ m. A, B, C and D) The primary spongy bone of the tibia of mice of control groups and groups treated with 25, 50 and 100 mg/kg of caffeine, respectively. The amount of trabecular bone in the groups treated with caffeine at doses of 50 and 100 mg/kg (C, D) was smaller when compared to the control group (A) and the group treated with 25 mg/kg caffeine (B). E, F, G and H) The primary spongy bone of the vertebrae of the rats of the control group and groups treated with caffeine at doses of 25, 50 and 100 mg/kg, respectively. The amount of trabecular bone in the groups treated with caffeine at doses of 25 mg/kg (B), 50 mg/kg (C), and 100 mg/kg (D) was lower when compared to the control group (A).

percentages of pyknotic chondroblasts and empty lacunae were significantly higher in the cartilaginous epiphysis of the femur and the tibia when compared to the control group (Figure 2, Table 4).

Weight, size of offspring and histomorphometric analysis of the bones of 21-day-old rats

The weights of the offspring of rats treated with 50 and 100 mg/kg of caffeine were significantly lower than those of the control group throughout the experimental period. However,

the weight of the offspring of rats treated with 25 mg/kg caffeine was not different from those of the control rats.

The length of the long bones (femur, tibia and humerus) of 21-day-old pups of rats treated with all doses of caffeine was significantly lower when compared to the control group (Table 5).

With regard to the width of the long bones, only the femur and tibia widths of the offspring of rats treated with 50 and 100 mg/kg of caffeine were significantly lower when compared to the control group. The width of the humerus did

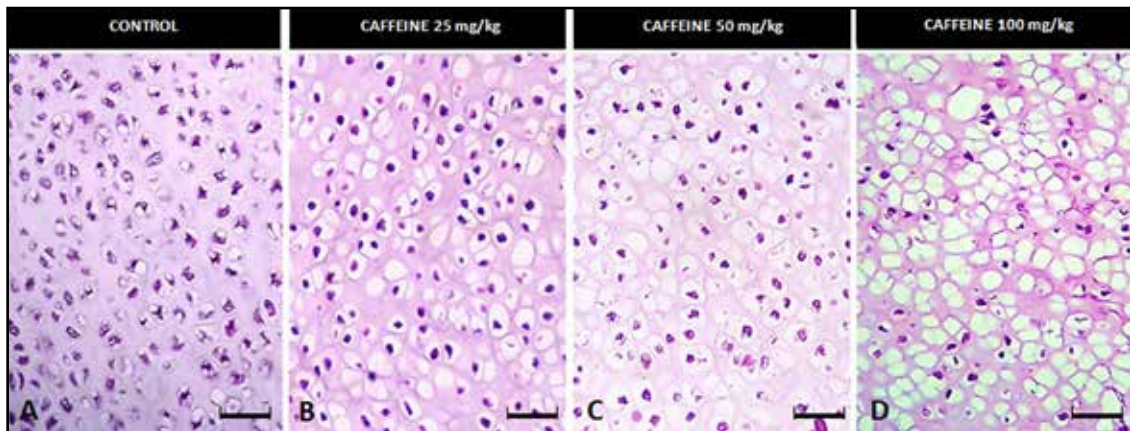


Figure 2. Cartilaginous epiphysis of the tibia of rats (three days old). HE, bar = 23.64 μ m. A, B, C and D) Control groups and groups treated with caffeine at doses of 25, 50 and 100 mg/kg, respectively. Empty chondroblast gaps were present in all groups treated with caffeine. Groups treated with 50 or 100 mg/kg of caffeine had the largest number of pyknotic nuclei and empty gaps of chondroblasts when compared to the control group.

Table 4. Percentage of empty lacunae in 100 cells in the cartilaginous epiphysis of the femur and tibia of 3- day-old offspring of control rats and those treated with different doses of caffeine (mean $\pm$ SD).

Bone site	Control	Caffeine 25mg/Kg	Caffeine 50mg/Kg	Caffeine 100mg/Kg
Femur	7,00 $\pm$ 2,23 C	19,00 $\pm$ 11,11 B	29,60 $\pm$ 11,52 BC	55,00 $\pm$ 20,00 A
Tibia	4,40 $\pm$ 2,40 C	21,80 $\pm$ 8,46 B	32,00 $\pm$ 7,03 B	58,25 $\pm$ 19,38 A

* Means with capital letters equal in the line do not differ by Student Newman Keuls test (SNK) ($p \geq 0.05$).

not differ significantly among the groups treated with caffeine and the control group (Table 5). The length of the vertebral bodies of the entire column was significantly smaller in 21-day-old offspring of the rats treated with 100 mg/kg of caffeine when compared to the control group. At a dose of 50 mg/kg of caffeine, the length of the vertebral bodies was significantly lower when compared to the control group but only in the segment of the fourth to sixth lumbar vertebrae. The vertebral length of the 25 mg/kg caffeine-treated group did not differ significantly from that of the control group (Table 5).

In the control group, the articular cartilage of the long bones showed a well-differentiated layer of chondroblasts and each was morphologically distinct. The chondroblasts of the surface zone displayed a lower nuclear volume and a smaller gap in comparison with those found in the mid and deep layers, where the chondrocytes contained a large nucleus with relaxed chromatin and were housed in large gaps. In all of the caffeine-treated groups, chondrocytes showed more intense and diffuse nuclear pyknosis than was observed in the control group. Furthermore, at a dose of



Table 5. Length and width (cm) of the femur (F), tibia (T) and humerus (H) and thoracic (VT) and lumbar (VL) vertebral length (mm) of 21-day-old offspring of control rats and those treated with different doses of caffeine (mean $\pm$ SD).

Variable	Control	Caffeine 25mg/Kg	Caffeine 50mg/Kg	Caffeine 100mg/Kg
length F	1,804 $\pm$ 0,046 A	1,730 $\pm$ 0,068 B	1,653 $\pm$ 0,057 C	1,586 $\pm$ 0,059 D
length T	2,344 $\pm$ 0,081 A	2,156 $\pm$ 0,088 B	2,127 $\pm$ 0,061 B	1,977 $\pm$ 0,079 C
length H	1,569 $\pm$ 0,037 A	1,514 $\pm$ 0,045 B	1,454 $\pm$ 0,047 C	1,399 $\pm$ 0,049 D
width F	0,207 $\pm$ 0,011 A	0,201 $\pm$ 0,003 AB	0,196 $\pm$ 0,007 B	0,195 $\pm$ 0,014 B
width T	0,153 $\pm$ 0,005 A	0,150 $\pm$ 0,0003 A	0,138 $\pm$ 0,010 B	0,114 $\pm$ 0,013 C
width H	0,169 $\pm$ 0,015 A	0,161 $\pm$ 0,018 A	0,171 $\pm$ 0,016 A	0,257 $\pm$ 0,232 A
VL 1-3	2,962 $\pm$ 0,269 A	2,687 $\pm$ 0,470 A	2,533 $\pm$ 0,265 AB	2,256 $\pm$ 0,380 B
VL 4-6	3,102 $\pm$ 0,174 A	2,946 $\pm$ 0,400 AB	2,699 $\pm$ 0,210 B	2,513 $\pm$ 0,311 B
VT1-7	1,907 $\pm$ 0,139 A	1,789 $\pm$ 0,210 A	1,758 $\pm$ 0,204 A	1,519 $\pm$ 0,208 B
VT 8-13	2,148 $\pm$ 0,459 A	1,944 $\pm$ 0,295 AB	1,915 $\pm$ 0,205 AB	1,669 $\pm$ 0,152 B

* Means with capital letters equal in the line do not differ by Student Newman Keuls test (SNK) ($p \geq 0.05$).

100 mg/kg, pups still displayed a large quantity of empty chondrocytes lacunae. The thickness of the articular cartilage was significantly greater in the humerus of the offspring of rats treated with 100 mg/kg of caffeine (Table 6).

The thickness of the epiphyseal plates of the long bones and vertebrae of 21-day-old offspring of rats treated with caffeine did not differ significantly when compared to the control group (Data not shown). However, several changes were observed in the morphology of the epiphyseal plate of bones, especially in the areas of proliferation and differentiation, or the columnar zone. In the control group, the epiphyseal plate in all of the bones examined appeared well-differentiated and the cellular morphology of each of the zones was distinctly different. In the zone of proliferation, the chondroblasts presented

with voluminous nuclei and gaps, sometimes with prominent nucleoli. Chondroblasts in this area in the group treated with 25 mg/kg of caffeine exhibited some nuclear pyknosis. However, the changes were more intense in the groups treated with 50 and 100 mg/kg of caffeine: the chondroblasts showed intense nuclear pyknosis (Figure 3) that presented with either a multifocal or diffuse distribution. Foci of empty lacunae of chondroblasts were present. For the caffeine-treated groups, chondrocytes in the zone of differentiation were small and displayed multifocal nuclear pyknosis diffusely distributed throughout that zone. The zone of differentiation was also less organized in the caffeine-treated groups; it lacked a columnar pattern as well-defined as the control group. All of these features were more pronounced in the

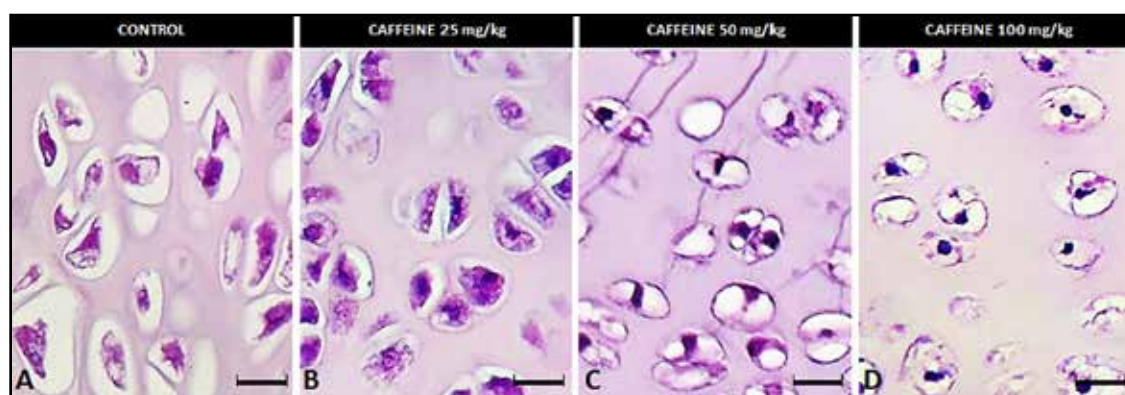


Figure 3. Proliferation Zone of the growth plate of the femur of rats at 21 days of age. HE, bar = 9.45 μ m. A, B, C and D) control groups and groups treated with caffeine at doses of 25, 50 and 100 mg/kg, respectively. A) Chondrocytes with numerous nuclei and loose chromatin. B) Chondrocytes with numerous nuclei with slightly condensed chromatin. C) Chondrocytes with pyknotic nuclei and some empty gaps. D) Chondrocytes with intensely pyknotic nuclei and with some empty gaps.

Table 6. Thickness (mm) of the articular cartilage of the long bones (femur, tibia, and humerus) of 21-day- old offspring of control rats and those treated with different doses of caffeine (mean $\pm$ SD).

Bone site	Control	Caffeine 25mg/Kg	Caffeine 50mg/Kg	Caffeine 100mg/Kg
Femur	0,493 $\pm$ 0,074 A	0,523 $\pm$ 0,045 A	0,530 $\pm$ 0,089 A	0,565 $\pm$ 0,045 A
Humerus	0,379 $\pm$ 0,040 B	0,408 $\pm$ 0,037 B	0,385 $\pm$ 0,053 B	0,488 $\pm$ 0,094 A
Tibia	0,474 $\pm$ 0,053 A	0,445 $\pm$ 0,800 A	0,472 $\pm$ 0,058 A	0,497 $\pm$ 0,075 A

* Means with capital letters equal in the line do not differ by Student Newman Keuls test (SNK) ($p \geq 0.05$).

groups treated with 50 and 100 mg/kg of caffeine (Figure 4).

The hypertrophic zone of the epiphyseal plate showed similar morphology among all the groups, including the control group. Chondrocytes showed large gaps and cores that were sometimes bulky and sometimes pyknotic with vascular invasion and a small amount of extracellular matrix. No formation of a terminal distal bone plate was observed in any of the animals.

The percentage of trabecular bone in the epiphysis, the primary spongy bone of the

femur, tibia, and humerus, the thoracic vertebrae (8-13) and the lumbar vertebrae (1-6) did not differ significantly among any of the groups (Table 7). However, the percentage of trabecular bone in the thoracic vertebrae segment 1-7 obtained from the offspring of rats treated with 50 and 100 mg/kg of caffeine was significantly lower when compared to the control group (Table 7, Figure 5). In these caffeine-treated groups, the trabeculae were present in fewer numbers and were less interconnected. However, the morphology of the osteoblasts and osteocytes was similar among

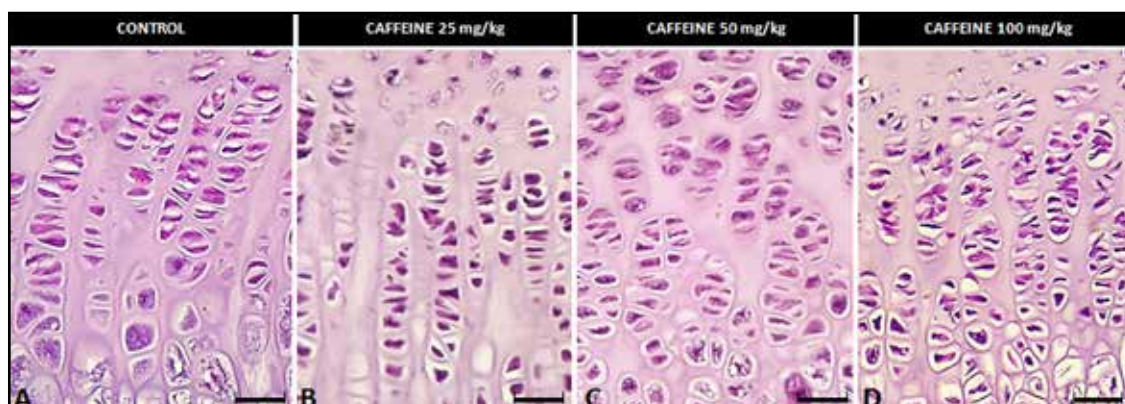


Figure 4. Columnar zone of the epiphyseal plate of the femur of rats at 21 days of age. HE, bar = 9.45 μ m. A, B, C and D) Control group and groups treated with caffeine 25, 50 and 100 mg/kg, respectively. A) Chondrocytes arranged in columns with large nuclei and loose chromatin. B) Chondrocytes arranged in columns with smaller nuclei compared to the control with slightly condensed chromatin. C) Chondrocytes poorly organized in columns with small nuclei and discretely condensed chromatin. D) Chondrocytes with large amounts of pyknotic nuclei and flattening of the columnar zone.

the groups. The osteocytes were voluminous, were sometimes housed in enlarged gaps, and sometimes exhibited small nuclei within narrow gaps. The osteoblasts were always voluminous and were arranged in one or more layers coating the surface of the trabeculae (Figure 5).

Discussion

The plasma concentrations of cortisol in mothers at 21 days of lactation were higher only in the group treated with caffeine at a dose of 100 mg/kg when compared to the control group. The elevation of cortisol can be explained by the psychoactive effects of caffeine on the nervous system²⁰, which induce a release of dopamine, and consequently increase the levels of glucocorticoids²¹. Caffeine can also increase cortisol secretion by acting directly on the hypothalamus or by acting indirectly through stimulation of the release of epinephrine by the adrenal gland. These mechanisms of action have important implications for the ability of caffeine to affect behavioral stress²¹. Cortisol in pregnant or lactating females can also pass through the placenta

and the milk^{22,23}. Thus, one cannot rule out the possibility that cortisol is a contributing factor in the changes found during the growth of offspring whose mothers received caffeine at a dose of 100 mg/kg during pregnancy and lactation. The administration of caffeine at a dose of 120 mg/kg during the middle third to the end of gestation also resulted in high levels of maternal cortisol¹⁶; however, it is important to note that this would not be the main mechanism by which caffeine affects endochondral growth because the 25 and 50 mg/kg doses were able to alter bone growth despite levels of maternal cortisol that were statistically similar to the control group.

Chronic use of high doses of caffeine (50 and 100 mg/kg) by the rat during pregnancy and lactation also affected the weight of their offspring. Research has shown that both low doses (4 mg/day) and high doses of caffeine (120 mg/kg) in mice and doses above 300 mg/day in humans can also reduce the body weight of offspring^{16,24,25}. It is likely that caffeine interferes with the intrinsic fetal-maternal-placental balance, affecting the formation and growth of the fetus, and consequently

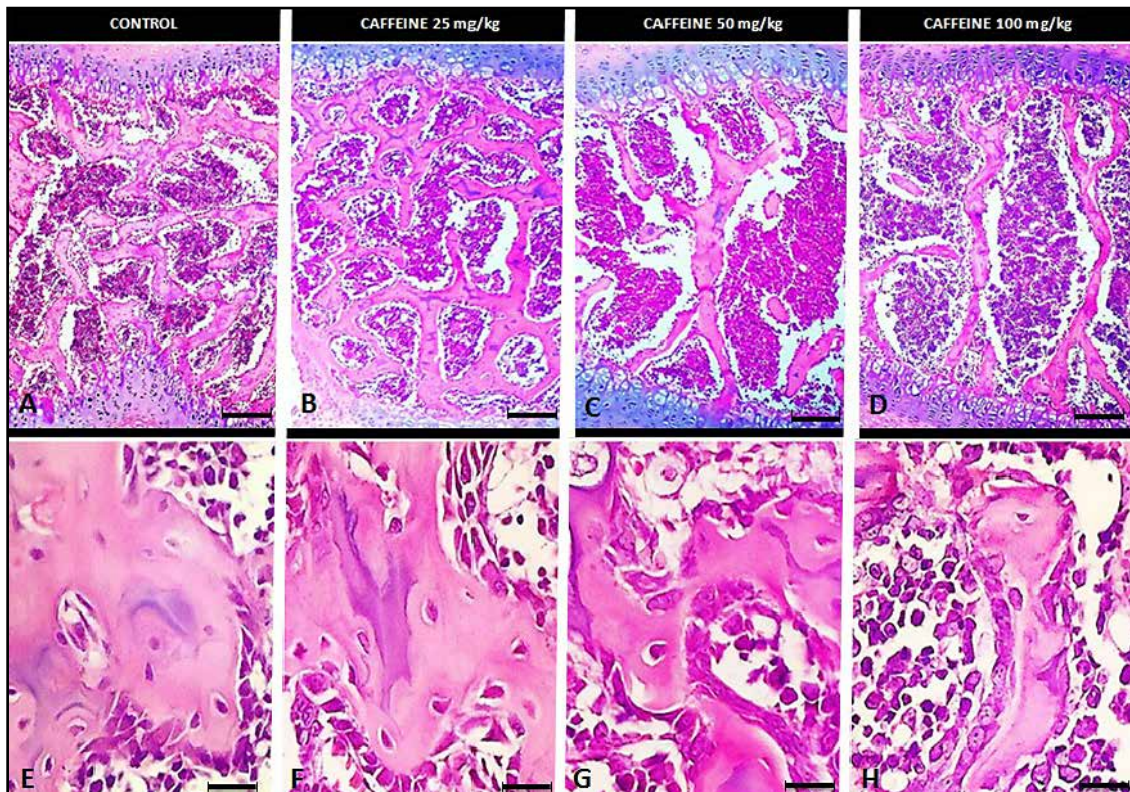


Figure 5. Primary spongy bone of the thoracic vertebrae 1-7 of rats at 21 days of age and Trabecular bone of the thoracic vertebrae 1-7 of rats at 21 days of age HE, bar = 94.59 μ m. A, B, C and D) control group and groups treated with caffeine at doses of 25, 50 and 100 mg/kg, respectively. The percentage of trabecular bone in the groups treated with caffeine at doses of 50 and 100 mg/kg was lower when compared to the control group. E, F, G and H) Control group and groups treated with 25, 50, and 100 mg/kg caffeine, respectively. In all groups, the osteoblastic coating is uniform and formed by bulky osteoblasts arranged in one or more layers.

the fetal birth weight¹⁵. It is postulated that the vasoconstrictor effects of caffeine, via an increase in catecholamines, may influence placental development and reduce the fetal oxygen supply^{26,27}. It is probable that caffeine also causes unknown changes in the placenta that may lead to low fetal birth weight. The gestational period in rats treated with 50 and 100 mg/kg of caffeine was one day less when compared to the control group (data not shown). This may be an alternative explanation for the lower birth weight of the offspring of these groups.

Another hypothesis that does not explain the low birth weight, but which might ex-

plain the low weight of caffeine-treated pups at weaning is the reduced nutritional quality of the milk. Caffeine has been shown to reduce the content of copper, zinc and iron in milk²⁸ and, consequently, the development of the feeding pup. Another possibility could be a change in the palatability of the milk. Studies have also shown that the palatability of animal feed can be affected by the addition of caffeine, leading to a decrease in food intake, and, consequently, the weight of the animals²⁹. Elevated levels of cortisol in mothers treated with the highest dose of caffeine (100 mg/kg) may also have contributed to the low weight of the pups at weaning. Because high levels



Table 7. Percentage of trabecular bone in the epiphysis and primary spongiosa of the long bones and vertebrae of 21-day-old offspring of control rats and those treated with different doses of caffeine (mean $\pm$ SD).

Bone site	Control	Caffeine 25mg/Kg	Caffeine 50mg/Kg	Caffeine 100mg/Kg
Femur-Ep.	23,510 $\pm$ 7,500 A	27,650 $\pm$ 6,740 A	25,130 $\pm$ 0,470 A	23,340 $\pm$ 0,003 A
Femur-Met.	35,420 $\pm$ 9,490 A	30,650 $\pm$ 6,030 A	30,790 $\pm$ 4,040 A	30,770 $\pm$ 5,820 A
Tibia-Ep.	27,940 $\pm$ 9,340 A	24,080 $\pm$ 5,220 A	24,420 $\pm$ 6,650 A	21,820 $\pm$ 9,840 A
Tibia-Met.	34,550 $\pm$ 3,770 A	38,810 $\pm$ 14,750 A	35,590 $\pm$ 5,940 A	35,800 $\pm$ 5,980 A
Humerus-Ep.	30,980 $\pm$ 14,520 A	23,990 $\pm$ 10,190 A	24,960 $\pm$ 5,470 A	25,990 $\pm$ 4,320 A
Humerus-Met.	34,140 $\pm$ 3,230 A	34,250 $\pm$ 5,390 A	33,240 $\pm$ 10,160 A	35,800 $\pm$ 8,380 A
VL1-3	24,140 $\pm$ 2,610 A	28,930 $\pm$ 18,060 A	22,890 $\pm$ 9,040 A	19,650 $\pm$ 8,730 A
VL4-6	26,530 $\pm$ 7,830 A	19,500 $\pm$ 7,030 A	20,120 $\pm$ 5,920 A	20,400 $\pm$ 7,930 A
VT1-7	31,620 $\pm$ 9,170 A	28,440 $\pm$ 8,760 AB	22,130 $\pm$ 5,880 B	18,310 $\pm$ 4,220 B
VT8-13	24,610 $\pm$ 5,680 A	18,210 $\pm$ 5,630 A	21,260 $\pm$ 4,680 A	22,440 $\pm$ 3,570 A

* Means with capital letters equal in the line do not differ by Student Newman Keuls test (SNK) ($p \geq 0.05$).

*Ep.: Epiphysis; *Met.: Metaphysis; VL: Lumbar vertebrae; VT : Thoracic vertebrae.

of this hormone affect the animals behavior²³ and increase both maternal and fetal stress levels^{23,30}, high cortisol levels can result in a decrease in the receptivity between mother and pup. Cortisol is passed to the pups both through the placenta and through milk, and can also affect the endochondral formation and the growth of pups, thus exerting negative overall effects on skeletogenesis^{22,23}. However, serum cortisol concentrations in mothers after weaning were only higher in the group treated with 100 mg/kg of caffeine when compared to the other groups. Thus, it is postulated that cortisol levels may be responsible for the low birth weights observed only in the 100 mg/kg caffeine-treated group.

Beyond the direct effects of caffeine, high levels of plasma cortisol can pass to the

fetus and intensify the effects of caffeine. The elevated cortisol levels can affect the fetus through at least two possible pathways. In the first pathway, the maternal cortisol crosses the placenta and directly exerts its effects on the fetus, acting on the hypothalamic-pituitary axis³¹. Fetal exposure to elevated cortisol, arising directly from the mother and indirectly affecting the hyper-activation of the fetal hypothalamic-pituitary axis, can then affect fetal growth. It increases the fetal caloric expenditure through an increase in neuromuscular activity and glycogenolysis³². In the second pathway, the maternal cortisol crosses the placenta and affects the regulation of related placental hormones such as corticotropin, leading to hyperperfusion of the placenta and resulting in reduced blood flow to the fetus^{33,34}.

The results of the present study demonstrate that caffeine, particularly at doses of 50 and 100 mg/kg, significantly affected endochondral growth, with a dose of 25 mg/kg resulting in milder changes. Because the 3-day-old rats exhibited caffeine-induced changes, it is postulated that prenatal endochondral bone formation may also have been altered. A delay in postnatal growth was confirmed in this study, but growth did not stop completely by the observation that there was no formation of the distal terminal bone plaque below the growth plate. There were also no moments of interruption and resumption of growth, as was evident from the absence of transverse bone trabeculae in the metaphysis. Interestingly, the growth reduction was most likely the result of a decrease in the growth rate. The inability to differentiate among the zones of growth, the degenerative changes or even the cell death observed in the cartilage indicates a reduction in growth rate. This reduction in growth had been previously observed by other researchers who reported that the offspring of rats treated with caffeine were smaller in size and also exhibited a reduction in the expression of some factors (IGF-1, histone, collagen I and II and aggrecan) involved in the mechanism of action of caffeine on endochondral ossification^{15,16}. In addition, subcutaneous implantation of demineralized bone fragments in mice in which chondrogenesis was inhibited by a reduction in the expression of collagen II, histones and TGF beta also resulted in smaller sizes¹⁴. Regardless, the present study seems to be the first to detail and compare the morphological changes in the growth of cartilage tissue induced by caffeine. In addition, this study demonstrated that these changes occurred at low doses, such as 25 mg/kg, without the intervention of maternal cortisol. Moreover, compared with the caffeine levels tested in previous studies, the level lowest tested in this study is closer to those typically ingested by humans^{11,14}. However it is difficult to estimate the actual human consumption,

because the average consumption of caffeine varies widely per country, and the variety and quantity of individual human diet that can contain caffeine as coffee, tea, sodas, energy drinks, chocolates, cocoa based food, and drugs^{1,2,3,4}. Searches can not account for all the sources of caffeine in the human diet, so our research also used higher doses. Also to be taken into account individual habits like smoking, drinking alcoholic beverage and drug use that may increase or decrease the time of clearance of caffeine^{1,5}. The periods and amounts of caffeine used in this study are also related to the proportionality of the relationship: quantity supplied, lifespan of animals, including time of pregnancy and metabolism versus human consumption through the various sources of caffeine in diet, metabolism as well as life expectancy and gestation time longer.

By analysis of the trabecular bone percentage, the effects of caffeine were found to be more significant in the bones of 3-day-old rats than in 21-day-old rats. The percentage of trabecular bone in 3-day-old rats was lower in the tibia and vertebrae, even with administration of the lowest dose of caffeine (25 mg/kg). In 21-day-old rats, the percentage of trabecular bone was only minor in the 1-7 segments of the thoracic vertebrae at the 50 and 100 mg/kg doses of caffeine. This reduction in the percentage of trabecular bone below the cartilage was most likely due to a reduction in bone growth. There was no indication of osteoporosis in any of the animals; the trabeculae presented regular osteoblastic coverage and the presence of voluminous osteoblasts was observed, as in the control group. Caffeine is also considered a risk factor for osteoporosis and periodontal disease in adults³⁵. In vitro, it has a negative effect on osteoblasts, in which it reduces cell viability and increases apoptosis^{36,37,38,39}. Furthermore, the addition of caffeine to osteoblast cultures decreases protein synthesis and the expression of genes such as collagen, alkaline



phosphatase, osteocalcin, osteopontin, histone and Cbfa1/Runx-2^{36,39}. Other research indicate que caffeine has a beneficial effect on cultured primary adipose-derived stem cells and bone marrow stromal cells, enhancing differentiation to osteoblasts, this effect, which is mediated via RUNX2 activation at low doses is Significantly suppressed at high doses⁴⁰. However, in this study, despite the reduced percentage of trabecular bone, which is generally a feature of osteopenia, there was no atrophy or osteoblastic hypoplasia, both of which are common morphological characteristics of osteoporosis.

Conclusions

We conclude that caffeine inhibits endochondral ossification in the offspring of rats treated with caffeine during pregnancy and lactation. The effects of caffeine are more damaging to cartilage growth in 3-day-old pups. In addition, the frequency and intensity of the changes are dose-dependent and low doses of caffeine (25 mg/kg) can cause

changes in the cartilaginous tissue of the offspring after birth. Although the serum cortisol levels were not altered when the mothers were treated with low doses of caffeine, high doses of caffeine (100 mg/kg) increased the serum levels of maternal cortisol, and this is associated with more severe changes in the cartilaginous tissue related to endochondral ossification of the offspring.

Acknowledgements

This work was supported by grants from *Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig)*, *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* and *Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq)* of the *Universidade Federal de Minas Gerais*.

Declaration of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

(Recibido: septiembre 2013.

Aceptado: enero 2014)

References

1. Dews PB. Caffeine. *Ann Rev Nutr* 1982; 2:323-341.
2. Barone JJ, Roberts HR. Caffeine consumption. *Food Chem Toxicol* 1996; 34:119-29.
3. Reissig CJ, Strain EG, Griffiths RR. Caffeinated energy drinks: a growing problem. *Drug Alcohol Depend* 2009; 99:1-10.
4. Heckman MA, Weil J, Mejia GJ. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *J Food Sci* 2010; 75:77-87.
5. Brooke OG, Anderson HR, Bland JM, Peacock JL, Stewart CM. Effects on birth weight of smoking, alcohol, caffeine, socioeconomic factors, and psychosocial stress. *BMJ* 1989; 298:795-801.
6. Fenster L, Eskenazi B, Windham GC, Swan SH. Caffeine consumption during pregnancy and fetal growth. *Am J Public Health* 1991; 81:458-61.
7. Nakamoto T, Grant S, Yazdani M. The effects of maternal caffeine intake during pregnancy on mineral contents of fetal rat bone. *Res Exp Med* 1989; 189:275-280.
8. Wink CS, Rossowska MJ, Nakamoto T. Effects of caffeine on bone cells and bone development in fast-growing rats. *Anat Rec* 1996; 246:30-8.
9. Duarte PM, Marques MR, Bezerra JP, Bastos MF. The effects of caffeine administration

- on the early stage of bone healing and bone density. A histometric study in rats. *Arch Oral Biol* 2009; 54:717-22.
10. Liu SH, Chen C, Yang RS, Yen YP, Yang YT, Tsai C. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *J Orth Res* 2011; 29:954-60.
 11. Scott Jr, WJ. Caffeine-induced limb malformations: description of malformations and quantitation of placental transfer. *Teratology* 1983; 28:427-35.
 12. Narod SA, Santose S, Victora C. Coffee during pregnancy: a reproductive hazard? *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164:1109-14.
 13. Brent RL, Christian MS, Diener RM. Evaluation of the Reproductive and Developmental Risks of Caffeine. *Birth Defects Research* 2011; 92 (Part B):152-87.
 14. Barone LM, Tassinari MS, Bortell R, et al. Inhibition of induced endochondral bone development in caffeine treated rats. *J Cell Biochem* 1993; 52:171-82.
 15. Huang TH, Yang RS, Hsieh SS, Liu SH. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. *Bone* 2002; 30:293-9.
 16. Tan Y, Liu J, Deng Y, et al. Caffeine-induced fetal rat over-exposure to maternal glucocorticoid and histone methylation of liver IGF-1 might cause skeletal growth retardation. *Toxicology Letters* 2012; 214:279-287.
 17. Sasahara H, Cheuk SL, Wink CS, Hashimoto K, Rossowska MJ, Nakamoto T. Alteration of femoral structure in later life by chronically feeding caffeine during rapid growing period in newborn female rats. *Toxicol Lett* 1994; 73:55-64.
 18. Kenney-Hunt JP, Wang B, Norgard EA, et al. Pleiotropic Patterns of Quantitative Trait Loci for 70 Murine Skeletal Traits. *Genetics* 2008; 178:2275-88.
 19. Sampaio IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 1998.
 20. Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:857-72.
 21. Lovallo WR, Whitsett TL, Al'absi M, Sung BH, Vincent AS, Wilson MF. Caffeine stimulation of cortisol secretion across the waking hours in relation to caffeine intake levels. *Psychosom Med* 2005; 65:734-9.
 22. Swolin-eide D, Dahlgren J, Nilsson C, Albertsson Wikland K, Holmäng A, Ohlsson C. Affected skeletal growth but normal bone mineralization in rat offspring after prenatal dexametasone exposure. *J Endocrinol* 2002; 174:411-8.
 23. Glynn LM, Davis EP, Schetter CD, Chiciz-Demet A, Hobel CJ, Sandman CA. Postnatal maternal cortisol levels predict temperament in healthy breastfed infants. *Early Hum Develop* 2007; 83:675-81.
 24. Gilbert EF, Pistey WR. Effect on the offspring of repeated caffeine administration to pregnant rats. *J Reprod Fertil* 1973; 34:495-9.
 25. Vlainiac HD, Petrovic RR, Marinkovic JM, Sipetié SB, Adanja BJ. Effect of caffeine intake during pregnancy on birth weight. *Am J Epidemiol* 1997; 145:335-8.
 26. Kirkinen P, Jouppila P, Koivula A, Vuori J, Puukka M. The effect of caffeine on placental and fetal blood flow in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147:939-42.
 27. Nehlig A, Debry G. Potential teratogenic and neurodevelopmental consequences of coffee and caffeine exposure: A review on human and animal data. *Neurotoxicol Teratol* 1994; 16:531-43.
 28. Rossowska MJ, Carvajal W, Joseph F, Nakamoto T. Postnatal caffeine effects on copper, zinc, and iron concentrations in mammary gland, milk and plasma of lactating dams and their offspring. *Ann Nutr Metable* 1997; 41:60-5.
 29. Li S, Hacker RR. The effects of caffeine on mammary gland development and milk yield in primiparous sows. *J Anim Sci* 1995; 73:534-40.
 30. Merlot E, Couret D, Otten W. Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain Behav Immun* 2008; 22:42-51.



31. Diego MA, Jones NA, Field T, et al. Maternal psychological distress, prenatal cortisol, and fetal weight. *Psych Med* 2006; 68:747-53.
32. Seckl JR, Meaney MJ. Glucocorticoid programming. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1032:63-84.
33. Jones SA, Brooks AN, Challis JRG. Steroids Modulate Corticotropin-Releasing Hormone Production in Human Fetal Membranes and Placenta. *J Clin Endocrinol Metable* 1989; 68:825-30.
34. Donoghue JF, Leitch IM, Boura AL, Walters WA, Giles WB, Smith R. Fetal placental vascular responses to corticotropin-releasing hormone *in vitro*. Effects of variation in oxygen tension. *Placenta* 2000; 21:711-7.
35. Kamagata-kiyoura Y, Ohta M, Cheuk G, Yazdani M, Saltzman MJ, Nakamoto T. Combined effects of caffeine and prostaglandin E2 on the proliferation of osteoblast-like cells. *J Periodontol* 1999; 70:283-8.
36. Tassinari MS, Gerstenfeld LC, Stein GS, Lian JB. Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix *in vitro*. *Bone Miner Res* 1991; 6:1029-36.
37. Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Sun SC, Chen SC. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. *J Orth Surg Res* 2006; 1:1-10.
38. Lu PZ, Lai CY, Chan WH. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int J Mol Sci* 2008; 9:698-718.
39. Zhou Y, Guan XX, Zhu ZL, Guo J, Huang YC, Hou WW. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Pharmacol* 2010; 161:1542-52.
40. Su SJ, Chang KL, Su, SH, Yeh YT, Shyu HW, Chen KM. Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. *Int J Food Sci Nutr* 2013; 64:429-36.

COMUNICACIONES BREVES / *Short Communication*

DENSIDAD DE CALCIO DE LOS ALIMENTOS LÁCTEOS CLASIFICADOS SEGÚN SU DENSIDAD CALÓRICA

Florencia Botticella, María Verónica Cámpora, María Josefina Ferro, Florencia Scibona, Julieta Villalba, María Elena Torresani*

Cátedra de Dietoterapia del Adulto. Carrera de Nutrición, UBA.

Resumen

En la edad adulta se observa disminución de la densidad mineral ósea, ganancia de peso corporal y redistribución de la masa grasa con predominio de la grasa abdominovisceral. Esto favorece el riesgo de enfermedades cardiometabólicas. Con el propósito de generar una herramienta que oriente a los profesionales de la salud para cubrir las recomendaciones actuales de calcio, sin descuidar la prevención y el control del peso corporal, se confeccionó una tabla de alimentos y productos lácteos agrupados según la densidad calórica y la densidad de calcio que aportan. A través del concepto de densidad de nutrientes, la clasificación resultante permite evaluar la calidad nutricional de los alimentos y seleccionar los que aporten alta densidad de calcio y baja o normal densidad calórica.

Palabras clave: densidad de calcio; densidad calórica; alimentos lácteos.

Summary

CALCIUM DENSITY FROM DAIRY FOODS CLASSIFIED ACCORDING TO THEIR CALORIC DENSITY.

In adulthood decreased bone mineral density, body weight gain and redistribution of fat mass with predominance of fat abdominovisceral is observed. This increases the risk of cardiometabolic diseases. In order to create a tool to guide health professionals to cover current calcium recommendations, without neglecting the prevention and body weight control, a table of food and dairy products was compiled grouped according to the caloric density and calcium density. Through the concept of nutrient density, the resulting classification allows to evaluate the nutritional quality of food, and select those that provide high calcium density and normal or low caloric density.

Key words: calcium density; caloric density; dairy foods.

* Correo electrónico: mtorresani@fmed.uba.ar



En la edad adulta se observa disminución de la absorción del calcio e incremento de las pérdidas renales, asociados a la disminución de la densidad mineral ósea. En consecuencia, las recomendaciones nutricionales de este mineral son mayores, teniendo en cuenta las observaciones de los organismos internacionales.¹

Los lácteos constituyen la fuente natural más importante de calcio; la leche, el yogur y algunos quesos, son los alimentos con mayor aporte. El calcio se encuentra unido a la caseína del suero, y su contenido no varía por ello prácticamente entre los productos enteros o descremados.

Se recomiendan los lácteos como fuente de calcio; estos presentan mejor biodisponibilidad a nivel intestinal; en las dietas habituales aportan entre el 75 y el 80% de las recomendaciones de calcio.²

En la edad adulta se gana peso corporal y se observa redistribución de la masa grasa con mayor predominio de la grasa abdominalvisceral, que favorece el riesgo de enfermedades cardiometabólicas.³ En el mercado local se observa una amplia variabilidad de alimentos lácteos disponibles, con diferentes aportes lipídicos y calóricos; se plantea, entonces, la necesidad de llevar a cabo una oportuna selección de alimentos, que asegure un adecuado aporte de calcio pero, a la vez, con el menor tenor calórico posible.

El concepto de la densidad de nutrientes fue originalmente desarrollado por Hansen y Wyse,⁴ con la intención de comparar la cantidad de los nutrientes aportados por un alimento en relación con la energía provista por él. En consecuencia, aquellos alimentos que presentan una alta densidad de nutrientes son más importantes como fuentes de estos que como fuentes de energía.⁵

La densidad de nutrientes es una manera de medir la eficacia de los alimentos que se consumen para una salud óptima. Cuanto más alta densidad tenga un alimento, más nutrientes aportará por caloría.⁶

Con el propósito de generar una herramienta que oriente a los profesionales de la salud en el control del peso corporal, la prevención de los factores de riesgo cardiometabólicos y además cubrir las recomendaciones actuales de calcio, se confeccionó una tabla donde se clasifican los alimentos o productos lácteos según la densidad calórica y la densidad de calcio que aportan.

Metodología

Para la construcción de la tabla de alimentos se consideraron las marcas de primera línea disponibles en el mercado local. Se tuvieron en cuenta el contenido de calcio y las calorías por 100 gramos de alimentos o productos lácteos declarados en el rotulado nutricional y se efectuó el promedio de esos valores cuando se encontraron dos o más marcas líderes para un mismo producto.

Se calcularon los índices de densidad calórica (DC) y densidad de calcio (DCa). La DC se expresó en kcal/g y se obtuvo relacionando el aporte calórico y el volumen del alimento. Para obtener la DCa se relacionó el contenido de calcio con las calorías aportadas y se expresó en mg/kcal.

Se clasificó a los alimentos lácteos según la DC, considerando densidad calórica normal a igual aporte calórico por volumen de producto ($DC=1\pm 10\%$ kcal/g).

Como resultado se obtuvieron tres categorías de alimentos o productos lácteos:

- 1) Alimentos o productos lácteos con DC baja: $< 0,9$ kcal/g
- 2) Alimentos o productos lácteos con DC normal: $0,9$ a $1,1$ kcal/g
- 3) Alimentos o productos lácteos con DC alta: $> 1,1$ kcal/g

A su vez, dentro de cada una de estas categorías se agruparon los alimentos o productos en orden decreciente según la DCa que aportan.

Como puede observarse en la tabla resultante, entre los alimentos o productos lácteos con baja densidad calórica se

Clasificación de alimentos o productos lácteos según Densidad Calórica y Densidad de Calcio por 100 gramos

Densidad calórica (kcal/g)	Alimentos	Calcio (mg%)	Calorías (%)	Densidad de calcio % (mg Ca/kcal)
Baja (<0,9)	Yogur suplementado con calcio	400	50	8,0
	Leche fluida totalmente descremada	130	33	3,9
	Yogur saborizado bebible descremado	110	30	3,7
	Bebida láctea con fitoesteroles	129	41	3,1
	Leche deslactosada parc. descremada	140	45	3,1
	Yogur saborizado batido descremado	133	45	2,9
	Leche fermentada descremada	108	39	2,8
	Leche fluida parcialmente descremada	120	44	2,7
	Yogur saborizado firme descremado	110	43	2,6
	Leche chocolatada parc. descremada	120	51	2,4
	Yogur c/ colchón de frutas descremado	116	53	2,2
	Leche fluida entera	123	57	2,2
	Yogur c/ cereales descremado	134	69	1,9
	Yogur natural entero	123	67	1,8
	Leche deslactosada entera	105	58	1,8
	Postre lácteo descremado	146	80	1,8
	Yogur con fitoesteroles descremado	102	67	1,5
	Yogur saborizado firme entero	125	89	1,4
	Leche chocolatada entera	112	81	1,4
	Queso untable 0%	100	74	1,4
Normal (0,9 a 1,10)	Leche fermentada entera	95	82	1,2
	Yogur saborizado bebible entero	93	87	1,1
	Ricota magra	365	102	3,6
	Yogur saborizado batido entero	132	104	1,3
	Flan light	106	99	1,1
Alta (> 1,10)	Flan entero	114	106	1,1
	Queso untable semidescremado	102	104	1,0
	Leche en polvo fortificada con calcio	1850	360	5,1
	en polvo descremada	1303	360	3,6
	Queso cremoso light	700	213	3,3
	Quesos duros enteros	996	384	2,6
	Queso rallado entero	1390	571	2,4
	Queso en hebras light	700	290	2,4
	Queso untable fundido light	350	153	2,3
	Queso en hebras entero	800	359	2,2
	Queso semiduro entero	646	364	1,8
	Queso fundido	645	364	1,8
	Leche en polvo entera	821	490	1,7
	Leche condensada light	250	146	1,7
	Queso cremoso entero	452	289	1,6
	Queso untable fundido entero	635	474	1,3
	Ricota entera	209	169	1,2
	Leche condensada	284	321	1,1
	Yogur c/ cereales entero	118	118	1,0
	Dulce de leche entero	322	341	0,9
	Yogur c/ colchón de frutas entero	98	146	0,7
	Postre lácteo entero	112	183	0,6
	Dulce de leche light	64	256	0,3
	Queso untable entero	56	245	0,2
	Crema de leche	65	352	0,2
	Manteca	15	758	0,1



encuentran aquellos que brindan pocas calorías en mayor volumen y, por ende, pueden aumentar la saciedad sin un gran aporte energético. En cambio, entre los de mayor densidad calórica se ubican aquellos que, aun en poca cantidad, ofrecen más calorías, pues concentran grasas o azúcares en su composición.

A nivel mundial ha aumentado en los últimos años la tasa de las enfermedades no transmisibles; uno de los factores determinantes es la presencia de un perfil nutricional no saludable determinado por el alto aporte calórico y bajo contenido de nutrientes.⁷

Las tendencias actuales muestran que la problemática del sobrepeso, la obesidad y la diabetes seguirán en ascenso en la población latinoamericana durante los próximos años. Por otro lado, el envejecimiento poblacional pone en evidencia la osteoporosis como patología prevalente de nuestros tiempos.

Según la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud se ha corroborado en mujeres en edad fértil, una alarmante deficiencia de ingesta de calcio en la Argentina, observaciones similares a las referidas a nivel mundial.⁸

Con el fin de ayudar a mejorar la relación entre los nutrientes y la energía, las Guías Alimentarias propias de cada país recomiendan que los consumidores incorporen en su dieta alimentos saludables, definidos más por la presencia de los nutrientes beneficiosos que por la ausencia de determinados ingredientes.⁹ Esta orientación alimentaria presupone el reconocimiento de los

alimentos según su densidad de nutrientes como un medio para evaluar la calidad nutricional.¹⁰ En tal sentido, la FDA ha manifestado su interés en el rediseño de la etiqueta de los alimentos utilizando un estándar de densidad de nutrientes y la proporción de nutrientes a calorías.

A medida que disminuye la ingesta de energía con la edad, es importante consumir mayor proporción de alimentos ricos en nutrientes, para que la ingesta recomendada de ellos no disminuya.

En relación con el calcio, a los fines de cubrir las recomendaciones nutricionales y a su vez sostener un enfoque preventivo de las enfermedades crónicas no transmisibles, se sugiere en la población adulta seleccionar alimentos lácteos que aporten alta densidad de calcio y baja o normal densidad calórica.

Se concluye que la aplicación del concepto de densidad de nutrientes permite a los consumidores identificar, dentro de cada grupo de alimentos, aquellos más nutritivos, saludable y asequibles, seleccionando en forma adecuada todos los nutrientes necesarios sin perder el control sobre el consumo diario de calorías.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: diciembre de 2013.

Aceptado: marzo de 2014)

Referencias

1. Catharine Ross A, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB (eds). Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC:IOM (Institute of Medicine).The National Academies Press; 2011. p. 345-402.
2. Murphy SP. Nutrient intakes of women in NHANES II, emphasizing trace minerals, fiber and phytate. *J Am Diet Ass* 1986; 86 (10):1366-72.
3. Riobó P, Fernández Bobadilla B, Kozarcewski M, Fernández Moya JM. Obesidad en la mujer. *Nutr Hosp* 2003; 18 (5): 233-7.
4. Hansen RG, Wyse BW. Expression of nutrient allowances per 1000 kilocalories. *J Am Diet Assoc* 1980; 76: 223-37.
5. Depósito de documentos de la FAO. Densidades relevantes de nutrientes para el desarrollo y evaluación de guías dietéticas basadas en alimentos (1 p). Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s1y.htm>. Consultado mayo 05, 2013.
6. Drewnowski A. Concept of a nutritious food: toward a nutrient density score1-3. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:721-32.
7. Maillot M, Darmon N, Vieux F, Drewnowski A. Low-energy density and high-nutritional quality are each associated with higher diet costs in French adults. *Am J Clin Nutr* 2007; 86:690-6.
8. Ministerio de Salud. Encuesta Nacional de Nutrición y Salud. Buenos Aires, Argentina. Documento de Resultados. 2007: <http://www.msak.gov.ar>
9. FAO/OMS. Preparación y uso de guías alimentarias basadas en alimentos. Informe de una consulta conjunta FAO/OMS, Nicosia, Chipre. Roma. 1998.
10. Drewnowski A. The Nutrient Rich Foods Index helps to identify healthy, affordable foods. *Am J Clin Nutr* 2010; 91(4):1095S-1101S.



SECCIÓN CULTURAL / Cultural Section

EL COLMILLO DEL NARVAL

Ariel Sánchez*

Centro de Endocrinología, Rosario.

El narval (*Monodon monoceros*) es un cetáceo odontoceto de la familia *Monodontidae* que habita los mares del Ártico y el norte del Océano Atlántico. Es el único integrante del género *Monodon* y una de las dos especies de la familia junto a la ballena beluga.

Los machos de esta especie se caracterizan por presentar un colmillo muy largo y retorcido de manera helicoidal que puede llegar a medir dos metros y pesar hasta diez kilogramos. Se cree que este diente especializado puede ser un receptor sensorial o un carácter sexual secundario.

La población mundial es de algo más de 75.000 ejemplares. En 2008 fue catalogado como especie casi amenazada, debido a que se mantiene una caza significativa, controlada, en Canadá y Groenlandia (Dinamarca) por parte del pueblo inuit, que se beneficia con su carne, su grasa y el comercio del colmillo. Este es una hermosa pieza ebúrneá, con un perfil espiralado. La Figura 1 muestra un narval con su colmillo. En la Figura 2 se ve uno de esos colmillos transformado en elegante bastón.

Fuente: Wikipedia



Figura 1. Narval con su colmillo



Figura 2. Bastón de colmillo de narval

* Correo electrónico: asanchez@circulomedicorosario.org

ACTUALIZACIONES / Reviews

OSTEOCITOS MIRANDO HACIA ARRIBA (o “La estructura ósea vista desde abajo”)

José Luis Ferretti, Gustavo Roberto Cointry, Ricardo Francisco Capozza

Centro de Estudios de Metabolismo Fosfocálcico (CEMFoC), Universidad Nacional de Rosario/
CONICET.

“Sólo existen los átomos y el vacío; todo lo demás es opinión.”

Demócrito (460-370 a.C.)

“La música no está separada de los sonidos.”

Baruch de Spinoza (1632-1677)

**“A la Naturaleza no le importa en absoluto que sus abstrusos métodos
y procedimientos sean expuestos al Mundo según la mediocridad de los hombres.”**

Aforismo del siglo IX

Resumen

Los sistemas biológicos integrados a nivel de complejidad individual deben analizarse sobre la base del conjunto de interacciones que ocurren entre todos sus elementos, desde el nivel molecular hasta el de sistemas de órganos, que es el que interesa a los clínicos. Los huesos nacen, se desarrollan y mueren *biomecánicamente*. Así los consideraremos en este artículo, y en esa dirección deberían también los osteólogos orientar el diagnóstico y el tratamiento de las afecciones que los fragilizan.

El inusual objetivo de este artículo es revisar el conocimiento actual sobre los osteocitos como núcleos sensores de los mecanismos que regularían la rigidez, la tenacidad y

la resistencia de los huesos integrados como órganos. Ese intento involucra suposiciones creativas, hipótesis arriesgadas y paradigmas insoslayables, pero permite comprender la etiopatogenia y la fisiopatología de todas las osteopatías fragilizantes desde un punto de vista dinámico, cercano al interés del osteólogo práctico. Este artículo 1) considera los osteocitos como “parte de un sistema, organizado en los niveles de complejidad celular, tisular y orgánico, que comprende la estructura resistiva de un hueso ideal (matriz ósea mineralizada, vasos y nervios, células intrínsecas - osteocitos - y extrínsecas - osteoblastos, osteoclastos y sus precursores -), integrado en el esqueleto del vertebrado que lo contiene en los niveles de complejidad sistémico e indivi-

* Correo electrónico: jlferretti@arnet.com.ar



dual, sobre el cual tienen lugar influencias mecánicas y endocrinometabólicas”; 2) respeta el *paradigma* que propone que “todas las estructuras resistivas vivientes están reguladas, de modo que las deformaciones provocadas por las cargas máximas que usualmente soportan resulten mucho menores que las que determinarían su fractura; es decir, manteniendo razonables *factores de seguridad*”; y 3) fundamenta la *organización* de un sistema estructural que propone la existencia de “un *mecanismo de control retroalimentado* de su rigidez a nivel tisular, del cual los osteocitos, como *unidades constitutivas* a nivel celular, representan sus *componentes sensores*”. Se espera que esta revisión, que los autores pretenden apoyar con algunas contribuciones propias, oriente a los osteólogos a razonar en consonancia con los últimos hallazgos del análisis biomecánico óseo, que constituyen el conocimiento necesario para interpretar, diagnosticar, tratar y monitorizar la evolución de todas las osteopatías fragilizantes, en función de los factores determinantes excluyentes de la resistencia a la fractura.

Palabras clave: osteocitos; biomecánica ósea; estructura ósea; resistencia ósea; tomografía ósea; pQCT.

Summary

OSTEOCYTES LOOKING UPWARDS (OR “BONE STRUCTURE WATCHED FROM BELOW”)

The mechanistic investigation of the complex molecular and cellular pathways that underlie the manifestations of all biological systems is plausible; however, such systems are better understood - especially by clinicians - when they are studied at the highest possible (ideally, individual) level of structural organization. Bones are born, grow and dead biomechanically. This way they will be described and interpreted in this article, as needed to understand the mechanisms by which many weakening diseases affect their behavior as struts or levers.

The unusual aim of this article is to review the current knowledge on osteocytes as sensitive “headquarters” of the mechanisms which seem to govern the whole-bone (structural) stiffness, toughness and strength at the organ level of integration. Thus, use is made of creative suppositions, risky hypotheses, and unavoidable paradigms, in the hope to help understand the pathophysiology and the real nature of all bone-weakening diseases from a dynamic point of view, close to the clinical and therapeutic interest of the osteologists. No less than three distinctive features of this article support that philosophy: 1) Osteocytes are regarded as “parts of a system organized at the cell, tissue and organ levels of biological complexity, which involves the supporting structure of an ideal bone - mineralized bone matrix, vessels and nerves, intrinsic (osteocytes) and extrinsic (blasts, clasts) cells and their precursors -, integrated in a vertebrate’s skeleton at the systemic and individual levels, and subjected to both mechanical and metabolic interactions”; 2) The leading paradigm proposes that “all living supporting structures are biologically regulated, in such a way that the stresses and strains provoked by the maximal loads they usually stand result much lesser than those that will break them (i.e. maintaining reasonable “safety factors”); 3) The organization of the proposed structure is based on a feedback mechanism that will control its stiffness at both tissue and organ levels of complexity, of which osteocytes (its cellular units) will be the sensor elements”. Authors hope this revision - which they pretend to have supported with a reasonable amount of original evidences - will help osteologists to get familiar with bone structural and biomechanical analysis, to understand, diagnose, treat, and monitor all bone-weakening condition as resulting from changes in the true, structural determinants of bone strength.

Key words: osteocytes; bone biomechanics; bone structure; bone strength; bone tomography; pQCT.

Introducción

Connotaciones epistemológicas

El tratamiento de este tema requiere la integración de algunos conceptos abstractos de Biología General y de Metodología Científica, que sintetizaremos en esta digresión previa. Los dos primeros aforismos enunciados como epígrafes comparten su racionalidad y su intemporalidad. El primero podría trasladarse a Einstein, y el segundo a Aristóteles, viajando más de 20 siglos hacia atrás o hacia adelante, sin problemas. El tercero (un desconcertante corolario de los otros dos) apunta al corazón del tema que nos ocupa y será respetado en todo este artículo, porque es aplicable a cualquier investigación científica.

Los modelos que debe diseñar el investigador solo pueden tener sentido dentro del entorno deliberadamente limitado de la “realidad” que pretende analizar. Ese “fragmento del Universo”, que *deja afuera todo lo demás*, es lo que constituye un *sistema*. Ergo, todos los sistemas surgen de una *intencionalidad*, que inevitablemente respeta ciertos sesgos, llamados “paradigmas”. Los investigadores somos usuarios culposos, aunque no dolosos, de esos paradigmas y tendemos a mantenerlos. Este artículo está escrito por esa clase de indagadores, simplemente porque otra no hay. Como contraparte de esas dificultades, hay dos límites naturales de las manifestaciones observables de las estructuras *vivientes*, que simplifican su interpretación: uno atañe a las estructuras mismas; el otro, a su organización.

a) Respecto de las estructuras, su análisis siempre distingue *componentes* materiales definidos (p. ej., *células*), que operan como *unidades de acción* dentro del sistema (Figura 1-a). A su vez, la acción integrada de un conjunto de componentes puede manifestar propiedades “emergentes”, por sobre las que aporta la suma del trabajo de cada uno. Esta distinción señala el acceso a *una nueva unidad* (en el ejemplo, *un tejido*), de la cual los componentes unitarios (las células) ahora son

parte (Figura 1b). En ese caso, a esta nueva unidad se le reconoce un *nivel de complejidad más alto* que el de sus componentes. Esta situación puede repetirse, sucesivamente, generando una escala curiosamente única de niveles de complejidad para todos los seres vivos: molecular/supramolecular-macromolecular, organelar, celular, tisular, orgánico, sistémico (de sistemas de órganos), individual, poblacional, comunitario y ecosistémico.

b) La *organización* de esas estructuras es el *conjunto de transformaciones e interacciones* entre componentes y unidades que el sistema expresa, interpretado por el observador respetando el “tercer aforismo” referido arriba, y las pautas del paradigma reconocido (Figura 1-a). Los “espacios de organización” entre los distintos niveles *están vacíos*, de modo que la organización de la materia viva puede concebirse como *una escalera de escalones firmes, pero estancos*. Además, el comportamiento observable de las estructuras vivientes suele presentar una propiedad única: cuando el accionar de una unidad en un determinado nivel de complejidad perturba el trabajo de otra en un nivel superior, esta tiende a reaccionar *oponiéndose* a la transformación original (Fig 1-b, flechas). Se configura así un mecanismo de interacción *retroalimentado negativo*, que tiende a mantener un *statu quo* del funcionamiento de las unidades interactuantes,¹ que le permite al observador distinguir variables determinantes (“reguladoras”) y determinadas (“reguladas”) en el sistema delimitado, *dentro del paradigma aceptado*. Así, la *estructura* viviente observada *cambia* (por “pisos” de complejidad), porque es materia; pero la *organización* asignada por el observador *no cambia* (ni por pisos, ni en conjunto), porque es una idea, preconcebida por él y reforzada o no por la investigación realizada.

No tendría sentido otorgarle una “razón de ser” al funcionamiento del sistema delimitado. Según Maturana,² los componentes de las estructuras vivientes manifiestan relaciones de especificidad (asociadas al DNA), de

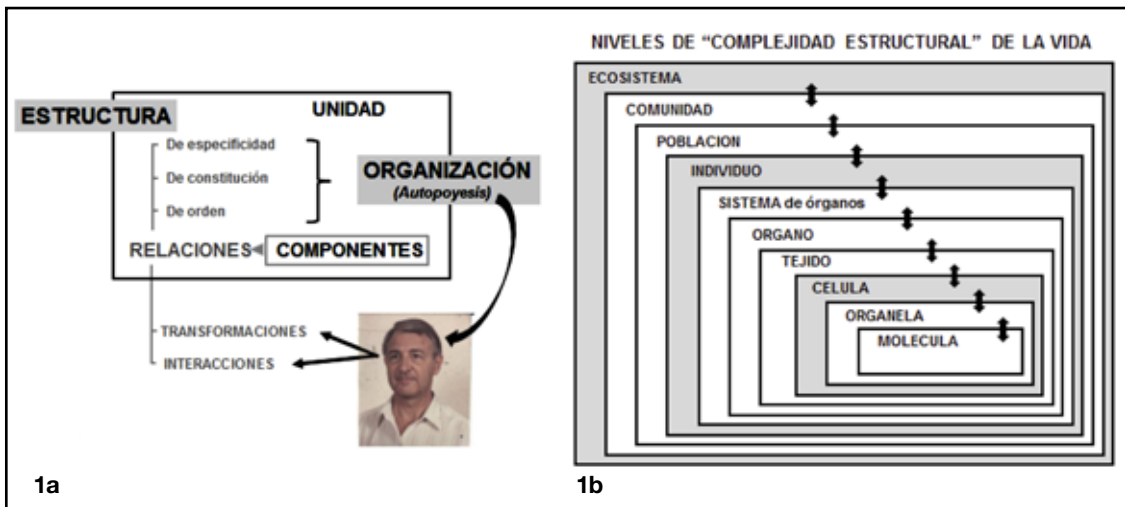


Figura 1-a. Observación de una estructura viviente con criterio científico, inspirada en Maturana.² El observador reconoce componentes y unidades, que a su vez pueden ser componentes de otras unidades más complejas, e interpreta las transformaciones e interacciones manifestadas por los componentes (únicas manifestaciones vitales observables) como reflejando *relaciones*, que le sugieren una *organización* estable (*autopoyesis*).

b. Arreglo típico de todas las estructuras vivientes en niveles definidos y estancos de complejidad estructural, que mantienen entre sí intercambios y relaciones que, en ciertos casos, pueden interpretarse como parte de sistemas regulatorios de variables controladas.

constitución (asociadas a las proteínas) y de orden (asociadas a las enzimas y a su ambiente), organizadas de modo que su único sentido aparente sería “mantener logísticamente la aptitud de manifestar permanentemente ese mismo funcionamiento, como único recurso para la supervivencia (*autopoyesis*)” (Figura 1-a). Traslado de estos conceptos a la Osteología, todas las transformaciones e interacciones observables de los esqueletos ocurrirían simplemente porque “de otro modo perturbarían la estabilidad de su *organización* como estructuras vivientes”. Es decir que eso no ocurriría necesariamente respondiendo a un “esquema funcional” con un determinado “objetivo”. Que de ese accionar surjan *también* transformaciones e interacciones que parezcan “servir” a determinados propósitos quedaría fuera de esta discusión. Entonces, no puede decirse que las estructuras bioló-

gicas (incluidos los esqueletos) “sepan”, ni “deban” hacer lo que hacen. Ellas hacen solamente lo que “pueden” hacer, y, cada vez que “pueden” hacer algo, inevitablemente *lo hacen*. Los químicos explican ese comportamiento como una “afinidad” dentro de las interacciones moleculares. Los físicos cuánticos tienen otras ideas.³ Esto no desautoriza a quienes opinan, *teleológicamente*, que las estructuras vivientes (incluidos los esqueletos) “sirven” para *algo* determinado. Pero ese es un problema del investigador, *no* de la estructura estudiada (Figura 1-a). Por eso, a lo largo de este artículo, nunca se alude al concepto de “función”, que, para los autores, no tiene sentido científico.

La siguiente exposición considerará los osteocitos como “parte de un *sistema*, organizado en los *niveles de complejidad* celular, tisular y orgánico, que comprenderá la

estructura resistiva de un hueso ideal (matriz ósea mineralizada con sus vasos y nervios, todas sus células intrínsecas - osteocitos - y extrínsecas - osteoblastos, osteoclastos y sus precursores -), integrado en el esqueleto del vertebrado que lo contiene, en los niveles de complejidad sistémico e individual, sobre el cual tienen lugar influencias de sus entornos mecánico y endocrinometabólico". El *paradigma* respetado para el caso (Paradigma de Utah^{4,5}) propone que "todas las estructuras *resistivas* vivientes están reguladas, de forma que las deformaciones provocadas por las cargas máximas que usualmente soportan resulten mucho menores que las que determinarían su fractura; es decir, manteniendo razonables *factores de seguridad*". Y la *organización* del sistema estructural que se pretende fundamentar propone la existencia de "un *mecanismo de control retroalimentado* de su rigidez a nivel tisular, del cual los osteocitos, en cuanto *unidades* constitutivas a nivel celular, representarían sus *componentes* sensores".

Incumbencias osteológicas

"Natividad biomecánica" de los huesos

Los huesos y esqueletos se comprenden mejor si se analizan sus componentes y unidades, y las propiedades, transformaciones e interacciones que manifiestan en distintos niveles de complejidad estructural (Figura 1), que si se les atribuyen "funciones". Opinar que los esqueletos tienen la "función" de actuar como escudos protectores para la médula ósea, o como reservorio de minerales para el equilibrio del medio interno (propiedades para las cuales no se conocen enfermedades asociadas), tiene tan poco sentido como pensar que una de las "funciones" del hígado sea la de mantener, por su peso, el equilibrio del cuerpo. Sin embargo, sí tiene sentido atribuir a los esqueletos "utilidades registradas" respecto de la *historia natural de su comportamiento*, en relación con cosas *pasadas* que, *sin* su presencia o su participación, *no*

habrían podido producirse. Ahora sí, queda claro: "servir" (que no necesariamente implica "cumplir funciones"), en Biología, no va en infinitivo; va en *pasado compuesto*: "haber servido" es la cuestión, y solo cuenta respecto de la selección natural y la evolución de las especies. Esto sí tiene importancia para este artículo, porque apunta al papel que los osteocitos podrían haber desempeñado durante todo el proceso evolutivo, incluidos los vertebrados actuales. Ni la selección natural ni la evolución se investigan (son ideas): lo que hacemos quienes las defendemos es recoger evidencias experimentales parciales del comportamiento observable de sistemas (materiales) específicamente delimitados para contribuir a fundamentar su proposición.

Los esqueletos surgieron *dentro del agua*,⁶ que entonces era el *hábitat* de toda vida animal no artrópoda, pero no se circunscribieron a ese medio por mucho tiempo. El ambiente extraacuático constituyó un campo fertilísimo para diversificar los comportamientos de todas las especies de... *vertebrados* que lograron... *salir* del agua, hace unos 300 millones de años. Fuera del agua, muchas especies desarrollaron aptitudes para reptar, caminar, correr, saltar, trepar, volar, y volver a nadar sin ser peces,⁷ adaptando su aparato masticatorio para comer lo accesible; y manteniendo, los machos, su capacidad de luchar por las hembras, y las hembras, su aptitud para parir. Esto es lo que la Ciencia puede proponerles (no asegurarles) a los "teleologistas del pasado", respecto de "*para qué*" *sirvieron* los huesos... hasta *hoy*.

Las manifestaciones pasadas de los esqueletos dependieron siempre de las propiedades de los huesos en tanto *vigas o palancas rígidas y resistentes*. Es decir, que el origen y el desarrollo filogenético y ontogenético del hueso (a nivel de complejidad *tisular*), de los huesos (a nivel *orgánico*) y de los esqueletos (a nivel de *sistemas de órganos*), *debieron haber sido* siempre selectivamente orientados por determinantes *mecánicos*, antes



que metabólicos, desde su aparición sobre la Tierra.⁸ Las condiciones de rigidez y resistencia no son estrictamente paralelas (Figura 2-a). La resistencia a la fractura de un hueso está determinada, primariamente, por la rigidez (resistencia a la deformación inductora de resquebrajaduras), pero, adicionalmente, también por la *tenacidad* de su estructura (resistencia a la formación y al progreso de las

resquebrajaduras hasta determinar la fractura)⁹ (Figura 2-a). La expresión de estas dos propiedades al nivel de hueso-órgano solo es posible por la integración de lo que podemos llamar la “calidad mecánica del tejido mineralizado” (Figura 2-a, izq.) y la “calidad arquitectónica del diseño estructural óseo”¹⁰ (Figura 2-a, der.), que a su vez dependen de los siguientes determinantes:⁹

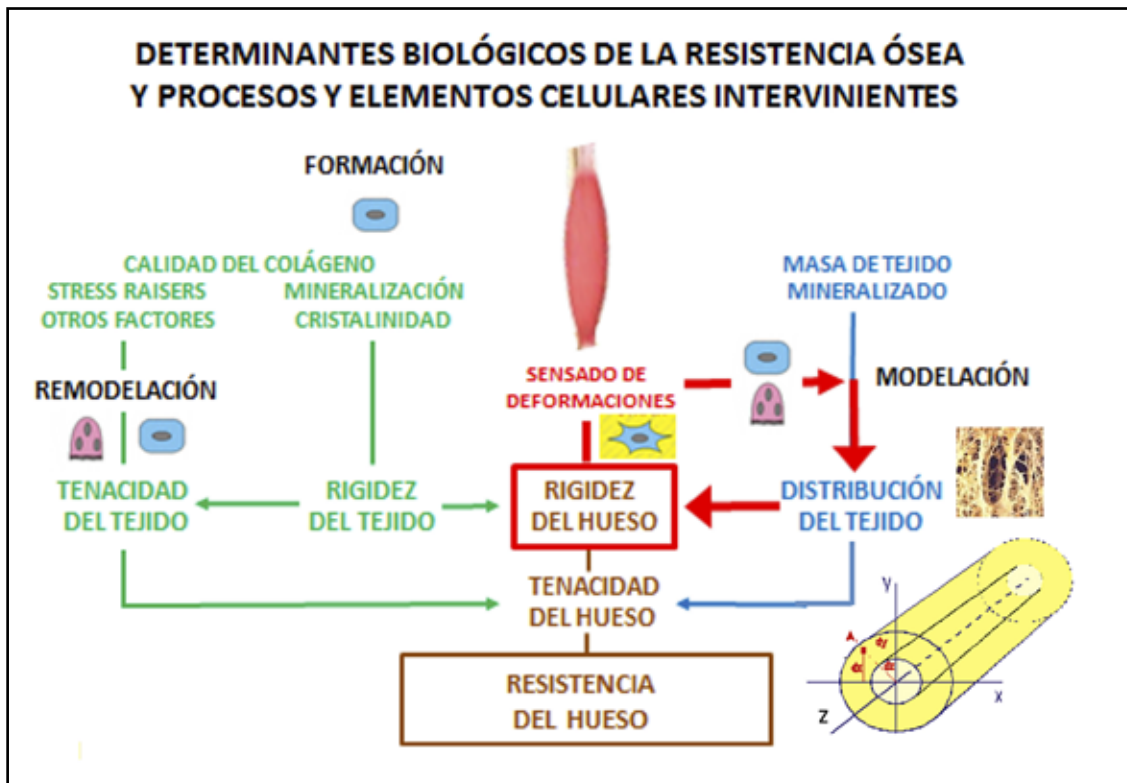


Figura 2-a. Determinación biológica de las propiedades materiales (rigidez y tenacidad *del tejido*, izquierda), del *diseño* cortical o trabecular (calidad arquitectónica de la distribución del tejido, derecha), y de la *resistencia a la fractura* de un hueso integrado como órgano (propiedades estructurales, **centro-abajo**). En flechas gruesas se esquematiza el asa regulatoria que describe el funcionamiento del *me-canostato*. Abajo, a la derecha, se esquematizan los momentos de inercia (*MI*) de una sección cortical diafisaria, supuesta con la cara anterior hacia arriba, con respecto a los ejes de referencia para flexión anteroposterior (*x*) y lateral (*y*), y para torsión (*z*). Cada *MI* se calcula como la suma integral de los productos de las áreas de cada pixel de la imagen ósea (tomográfica) por los cuadrados de sus distancias al eje correspondiente; por eso, los *MIs* *crecen exponencialmente* con la “*perifericidad*” del tejido cortical con respecto al eje considerado.

- *La calidad del tejido* (independiente de la forma) está representada, por un lado, por su *rigidez específica*, que depende de la calidad y del grado de mineralización del colágeno;¹¹ y por otro, por su *tenacidad*, que depende del mismo colágeno, de otras proteínas no colágenas y de los “concentradores de estrés” (*stress raisers*), que son soluciones de continuidad de la matriz determinadas por lagunas, poros, canaliculos, sistemas de Havers, y resquebrajaduras provocadas por el uso (microdaño; en inglés, *microdamage* [Figura 2, izq.]).

- *La calidad del diseño* (forma, tamaño y estructura del hueso, independiente de la calidad del tejido) está dada por la eficacia mecánica de la *distribución arquitectónica* del tejido duro en las cortezas y en las tramas trabeculares, en relación con la direccionalidad de las cargas deformantes.⁸

Algunos aspectos de esta *naturaleza mecánica* de los huesos constituyen verdaderos misterios biológicos. ¿Quién podría explicar hoy por qué, de dos células mesodérmicas indiferenciadas vecinas, en cierto momento del desarrollo embrionario, una de ellas - candidata a mioblasto - desarrolla un tejido productor de fuerza *inductora* de estrés (carga direccionalmente ejercida por unidad de área transversal de la estructura que la produce o que la soporta) para transmitirlo vectorialmente a la otra célula - candidata a condroblasto, luego reemplazable por un osteoblasto, eventualmente destinado a osteocito -, que generará más tarde un tejido capaz de *absorber o soportar* ese estrés?⁶

Por otro lado, *sí* existen ya algunas evidencias experimentales de la “natividad biomecánica” de los huesos, relativas al desarrollo del tejido óseo, en cuanto “competidor exitoso por la absorción del estrés”. Cuando un tejido embrionario mesenquimático osteogénico es sometido por su ambiente natural a estrés mediante compresión en todos sus puntos por igual, como si estuviera dentro de un globo inflado con agua, su diferenciación

produce cartílago hialino, y su ulterior osificación genera hueso - obviamente, tramado, porque no hubo otro antes - de tipo *endocondral*. En cambio, si el mismo tejido es deformado según lo que se llama “esfuerzo de corte” o deslizamiento (en inglés, *shear*; similar al desplazamiento de las hojas de un libro sobre el cual se hubiera parado alguien que girara su cuerpo), su diferenciación se orienta hacia tejido conectivo fibroso, y su ulterior osificación produce hueso - tramado - de tipo *membranoso*. Y si *no* se lo somete a estímulo mecánico alguno, termina desarrollándose cartílago fibroso, que *no* generará ulteriormente hueso.¹² Más adelante, el uso del esqueleto así generado modificará permanentemente la estructura de cada hueso, orientando la redistribución de su tejido mineralizado según patrones de estimulación direccional, exclusivamente *mecánicos*, según se describe luego. Por encima de eso, el *desuso* (mecánico) del hueso determinará la destrucción y la desaparición del tejido mineralizado que lo constituye. *Todos* esos procesos *mecánicos* están gobernados por osteocitos.

Ergo: “Los huesos nacen, se desarrollan y mueren *biomecánicamente*”. Así los describiremos e interpretaremos en este artículo, y con ese criterio deberían también orientarse el diagnóstico y el tratamiento de las afecciones que los fragilizan. Recordar el aforismo: “Hueso que no trabaja, se orina”. Eso ocurre solo gracias a los osteocitos, sin la interferencia natural de ninguna hormona, metabolito, o gen como agentes de cambio.

Cuando surgieron los esqueletos, ya estaban presentes, en las especies que los desarrollaron, varios *sistemas de control del equilibrio mineral del medio interno*, filogenéticamente prioritarios para el sostén de la vida. Digámoslo *teleológicamente*: “En ese momento, en todos los vertebrados, estos sistemas reorientaron su desarrollo, obrando como si fuera *conveniente aprovechar* las reservas minerales del esqueleto para sus *finalidades* regulatorias propias, ignorando las



necesidades regulatorias que podrían haberse *satisfecho* respecto de la eficacia mecánica del esqueleto”. En pocas palabras: “Los sistemas endocrino-metabólicos *no regulan nada* en los esqueletos; antes bien, *parecen servirse* de algunos de sus componentes bioquímicos *para* solucionar sus propios problemas regulatorios”. Esta interpretación impone reconocer *dos determinantes ambientales excluyentes* de las propiedades estructurales óseas: uno *direccional* (vectorial), derivado de estímulos *mecánicos* producidos por el uso del esqueleto, y el otro *no direccional*, resultante de factores locales y sistémicos, endocrino-metabólicos, *no mecánicos*.¹³

Los osteocitos, dentro del sistema integrado propuesto

De todas las células óseas, solo los osteocitos son *intrínsecos* al tejido mineralizado, de cuya estructura forman parte, y de cuyo mecanismo de control biomecánico constituirían el único *sensor* conocido. Los blastos y clastos están fuera de ese “subsistema estructural resistivo” que podemos delimitar por simple conveniencia. No obstante, la participación de esas células en el control de la eficacia mecánica del sistema entero es esencial, aunque solo como *efectores*. En nuestra opinión, los osteocitos son tan importantes que se puede afirmar que su vida constituye la vida del hueso. En efecto: salvo en ciertos peces con esqueleto óseo acelular,⁶ no hay hueso vivo sin osteocitos vivos; en tanto, no podría decirse lo mismo de los osteoblastos y osteoclastos. Así como se dice que cada hombre tiene la edad de sus arterias, también puede decirse que *cada hueso tiene la vitalidad de sus osteocitos*.¹⁴⁻¹⁷

Obviamente, los osteocitos operan a nivel de complejidad celular, como unidades (Figura 1-a) conformadas por componentes organelares y moleculares. Por eso, su funcionamiento puede entenderse parcialmente analizándolos a ese nivel, incluyendo los mecanismos celulares de sus respuestas a los

factores no direccionales locales y sistémicos que los afectan. Dichos aspectos han sido revisados en dos artículos previos de esta revista.^{18,19} En este trataremos de demostrar que las manifestaciones más trascendentes del trabajo de los osteocitos reflejan interacciones con las otras células óseas, dentro del entorno de influencias biomecánicas, cuyo significado biológico debe interpretarse también en niveles de complejidad *más altos*: el *tisular* y el *orgánico*. Esas interacciones explican cómo los huesos, “autorregulando” la eficacia mecánica de su estructura, pueden modificar mucho las expresiones finales (propiedades emergentes) de fenómenos que cursan en los niveles de complejidad inferiores: molecular, organelar y celular.

Evidencia creciente sugiere que los osteocitos responderían específicamente a su *deformación*, que es una consecuencia natural de la deformación *de la estructura* del hueso en la que están inmersos, aunque los mecanismos íntimos del proceso no estén aún bien definidos.²⁰ Tampoco está claro cómo estimar la intensidad, la direccionalidad, ni el signo de la estimulación que *efectivamente* les llega a los osteocitos de un hueso deformado según un determinado patrón de carga.²¹ ¿Cuánto es deformado proporcionalmente un osteocito medio-diafisario de un hueso largo, cargado en flexión al centro? Cuestiones como esta reconocen *tres problemas diferentes* para resolver: **a)** cuánta carga le llega al tejido mineralizado que constituye el entorno del osteocito, por unidad de área seccional (es decir: cuánto estrés soporta el tejido *en ese punto*); **b)** cuánta *deformación* sufre el tejido, alrededor del osteocito, en términos porcentuales de longitud y **c)** qué *clase* de deformación le produce esa situación al osteocito mismo (acortamiento, estiramiento, etc.). Analicemos estas cuestiones, una por una.

a) Cuánto estrés llega al sitio. Cuando un hueso es cargado en determinado sentido, la fuerza que opera sobre su estructura se distribuye en función de su complejidad geomé-

trica, definida por el diseño arquitectónico de la corteza o de las tramas trabeculares (del mismo modo que la fuerza del viento se distribuye diferencialmente a lo largo de las varillas que soportan la estructura de un paraguas, según cómo se lo oriente). Esto es lo que efectivamente determina el estrés (= fuerza/área transversal a la carga) inducido en cada punto del hueso.⁹ Existen indicadores morfométricos no invasivos de la calidad del diseño arquitectónico de las tramas trabeculares, medibles por μ -CT,²² y del diseño de las cortezas, medibles por pQCT,^{10,23,24} que permiten describir su influencia en la determinación de ese estrés en cada punto de un hueso. Esa influencia depende de *dos* determinantes del estrés: la direccionalidad de la carga y la geometría del diseño óseo. En general, la resistencia a la *compresión* está determinada en buena parte por la simple cantidad de tejido duro - *masa* trabecular, o cortical - presente en la sección transversal a la carga; pero, para evaluar la resistencia a la *flexión* o a la *torsión* de las diáfisis de huesos largos, deben medirse otras variables, entre ellas los llamados “momentos de inercia” (MIs) de sus secciones transversales (Figura 2-a, abajo-derecha). Los MIs son proporcionales al área de la sección, pero también crecen exponencialmente con el cuadrado de la distancia a la cual el tejido cortical está dispuesto respecto del eje de referencia seleccionado para determinar la clase de deformación analizada: flexión de diversos tipos, o torsión. En general, a una mayor eficacia arquitectónica del diseño del hueso corresponde siempre una *menor cantidad de estrés* que juega efectivamente sobre el osteocito. Por esa razón, la optimización del diseño resulta un recurso crucial para adecuar la resistencia de los huesos a cualquier circunstancia.

b) Cuánto se deforma el tejido en ese punto. La deformación del tejido alrededor del osteocito está determinada no solo por la intensidad del estrés que efectivamente afecta esa región ósea, sino también por la *rigidez específica del tejido mineralizado*, que

es independiente de la forma del hueso. Esa variable, conocida como “módulo de elasticidad” (abreviado: E),⁹ varía paralelamente con el grado de mineralización.¹¹ La deformación del tejido en cualquier punto estará siempre “moderada” por una combinación de E con el diseño del hueso.²⁵

c) “Cómo” se deforma el osteocito. Existen solo cinco maneras “típicas” de deformar un hueso, u otro cuerpo sólido cualquiera: en compresión (acortándolo), en tracción (alargándolo), en flexión (doblando), en torsión (retorciéndolo), y en esfuerzo de corte (ejemplo del libro referido antes). Además, los ingenieros reconocen solo *tres* descriptores físicos de un proceso cualquiera de deformación: la compresión, la tracción y el esfuerzo de corte.²⁵ Esta simplificación se debe a que la flexión produce una combinación de deformaciones en compresión, del lado cóncavo de la curvatura, y de tracción, del lado convexo; y la torsión también combina tracción, en sentido longitudinal, y compresión, en sentido transversal, del cuerpo deformado. Más aún: un osteocito *in vivo*, flotando en su laguna, solo podría ser deformado en compresión o en tracción, dado que sus propios sensores moleculares de deformación solo podrían detectar acortamientos o estiramientos. Esto simplifica bastante el análisis del problema de la *transducción mecanobiológica* de los estímulos físicos provocados por las cargas, a las respuestas bioquímicas de los osteocitos estimulados, aunque la deformación de los osteocitos puede ser *amplificada* a nivel de la laguna.²¹ A continuación explicaremos cómo la respuesta osteocítica a solamente *una* clase de deformación con doble signo: acortamiento o alargamiento, puede determinar *variaciones tridimensionales* de la distribución del material duro, y de la rigidez y la resistencia del hueso, *en cualquier dirección* del espacio, optimizando, con solo eso, el diseño del hueso-órgano para resistir las *cinco* clases diferentes de deformación.



Resultados estructurales de la respuesta osteocítica al estímulo mecánico

Los osteocitos parecen responder al sentido histórico de deformaciones del tejido en dos formas opuestas²⁶ (Figura 2-b):

a) Cuando las deformaciones sensadas muestran amplitudes o frecuencias relativamente *altas* (Figura 2-b, der.), los osteocitos reconocen la correspondiente “señal de error” y, como respuesta, liberan mediadores hacia las *lining-cells* vecinas, con las que los vinculan sus canalículos más superficiales. Entre esos mediadores, que estimulan la diferenciación de las *lining-cells* a osteoblastos activos, se conocen algunos del tipo anti-esclerostina o asociados al sistema Wnt/ β -catenina.²⁷ Si hubiera estado desarrollándose en ese sitio un pozo remodelatorio previo, no orientado mecánicamente (remodelación aleatoria, *stochastic remodeling*²⁸⁻³⁰), gene-

ralmente ese proceso resultaría *inhibido*.^{16,31} Sea como fuere, el resultado de la respuesta a los osteocitos siempre *incrementa* la formación neta local de hueso nuevo - lamelar -, sobrepuesto al preexistente, que *refuerza* la estructura en ese punto. Las tasas de deformaciones altas también previenen la apoptosis natural de los osteocitos.³² Sin embargo, el registro de deformaciones *demasiado* altas y/o frecuentes puede originar la formación de hueso nuevo tramado, en vez de lamelar, y producir microdaño (fatiga ósea), con activación de la remodelación reparadora y con resultados mecánicamente negativos.³³

b) Cuando la amplitud y la frecuencia históricas de las deformaciones sensadas son relativamente *bajas* (Figura 2-b, izq.), los mismos osteocitos reconocen también la correspondiente “señal de error”, opuesta a la anterior, a la cual responden liberando hacia

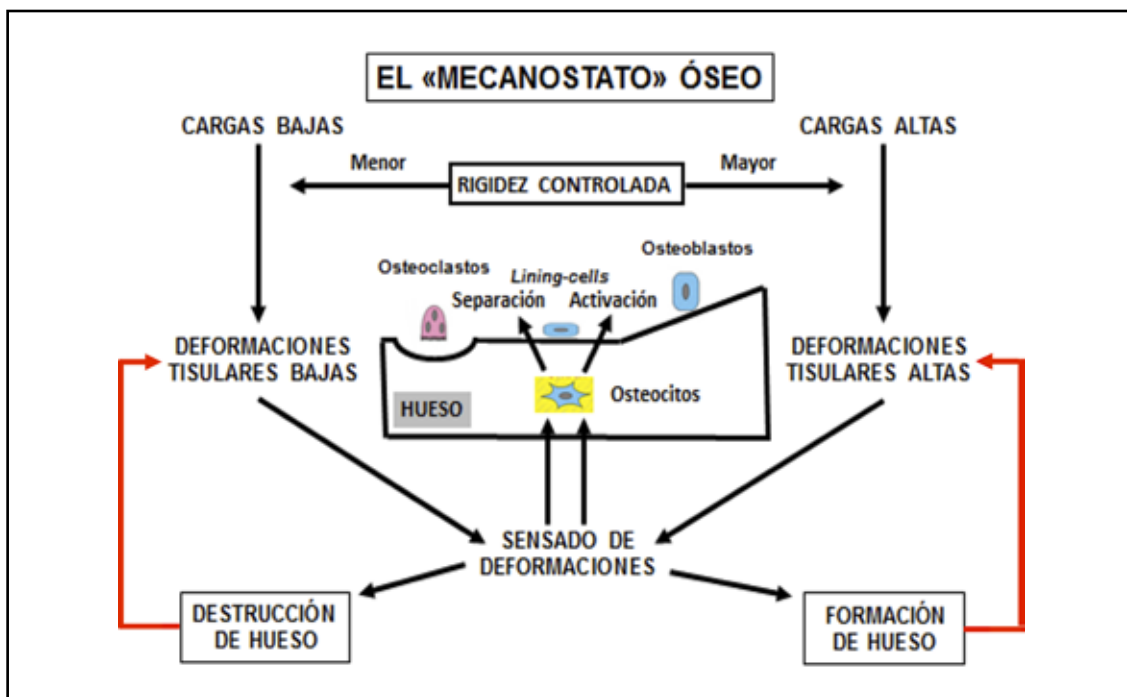


Figura 2-b. Funcionamiento de los osteocitos (sensores) y de los osteoblastos y osteoclastos (efectores) en relación con el sistema propuesto para el *mecanostato* óseo como servomecanismo de control de la rigidez estructural ósea.

las mismas *lining-cells* factores mediadores locales, también *opuestos* a los anteriores, entre los cuales se conocen algunos asociados al sistema RANK/RANK-L.³⁴ Estos mensajeros inducen a las *lining-cells* a separarse, permitiendo el acceso de osteoclastos al lugar, promoviendo la eliminación de parte del hueso descubierto y *debilitando* la estructura en ese punto. La magnitud de la señal de error modula la *posible respuesta acoplada* de la formación ósea, que tanto puede configurar una *remodelación orientada (targeted remodeling* ²⁸⁻³⁰) en “modo desuso”, con balance negativo de los pozos,³⁵ como llegar a anularse. Este último caso configuraría una fase *puramente destructiva*, no acoplada, de una *modelación*. La inactividad absoluta y la ingravidez inducen, además, apoptosis de los osteocitos y rápida destrucción de hueso.³⁶

El resultado global de ese *sistema*, que funciona como un “edificio inteligente”, adecuaría el diseño del hueso a las cargas usuales, por remoción de material excesivo y/o adición de material necesario, en sitios adecuados, para mantener siempre constante un cierto grado de rigidez regional.^{37,38} En general, mayores deformaciones inducen aumentos de rigidez, y viceversa, configurándose un sistema regulador retroalimentado negativo (Figura 2-a, centro) que, respondiendo a la *deformación*, controla la *rigidez* de todos los huesos móviles o sometidos a cargas, exceptuando los craneofaciales y los del oído. Las respuestas del sistema resultarían *proporcionales* a las magnitudes (importancia de los llamados “picos de deformación”) y/o a las frecuencias de las deformaciones sensadas, así como a su velocidad, o grado de *impacto*.³⁹ Además, también se compensarían las diferencias históricas de respuestas a señales de error bajas o altas regulando el “área bajo la curva” de deformaciones en el tiempo (comportamientos “proporcional”, “diferencial” e “integral” del sistema). Obviamente, las respuestas de los osteocitos son “ciegas” a los *factores externos determinantes* de las deformaciones sensadas. Los

osteocitos no pueden distinguir si una carencia histórica de deformaciones responde a una baja actividad física, o a una alta rigidez de la estructura ósea local del individuo. Viceversa, tampoco pueden discriminar si una historia de deformaciones altas responde a un exceso de actividad física, o a una baja rigidez del tejido. Está en discusión la influencia del signo del estímulo (estiramiento/acortamiento) y de la presión hidrostática local, sobre el comportamiento de los osteocitos en distintas partes del esqueleto.

El servosistema que coordina de esta manera los osteocitos, blastos y clastos, a nivel de complejidad *tisular*, fue concebido por Harold M. Frost como el *mecanostato óseo*.¹³ Dado que las deformaciones sensadas son adimensionales (son variaciones relativas de *longitud*, ΔL , en función de otra *longitud*, de reposo, L), es cómodo expresarlas como variaciones porcentuales ($100 * \Delta L/L$), en la dirección analizada. Pero, como los ΔL son en general muy pequeños, resulta más práctico hacerlo en unidades concretas, no proporcionales.⁴⁰ Con esa finalidad se dividió la longitud total de reposo en millonésimos, como unidades de deformación (en inglés, deformación = *strain*), llamadas *microstrains* ($\mu Strains$). Así, por ejemplo, una deformación del 1% (10.000 por millón) de la longitud de reposo equivale a 10.000 $\mu Strains$. El *mecanostato* parece mantener la deformabilidad estructural ósea en un nivel próximo al 0,2% de la longitud de reposo (2000 $\mu Strains$) en cualquier dirección, para los esfuerzos fisiológicos máximos de todos los huesos móviles, en todos los vertebrados. En congruencia con el llamado “Paradigma de Utah”,⁵ este nivel de deformación está bastante alejado del que determina indefectiblemente la fractura de cualquier hueso, que es del 2,0% (20.000 $\mu Strains$).

La Figura 2-c esquematiza la correspondencia entre la magnitud promedio de las deformaciones históricas de un hueso (eje X, expresada en $\mu Strains$) y las respuestas locales modelatoria -formadora- o remode-



latoria con balance negativo -perdedora- (eje Y, expresada como positiva o negativa, sin unidades ni valores) correspondientes a cada nivel de deformación sensada.⁴⁰ La gráfica no describe el accionar de los osteocitos, pero muestra el resultado visible de su participación como sensores de deformaciones. Se destacan, sobre el eje X, dos límites críticos de deformación de la estructura ósea vecina a los osteocitos: uno a 0,7, y el otro a 2 milésimos (700 y 2000 μ Strains). Estos valores están propuestos como los límites inferior y superior de la escala de deformaciones producidas por los niveles normales de actividad de cualquier individuo activo, y corresponderían a los “umbrales de disparo” de la remo-

delación local en modo desuso (perdedora de hueso) o de la modelación (ganadora) por los mediadores liberados por los osteocitos.³⁵ El rango de deformaciones comprendido entre ambos límites se considera una zona de “confort” del sistema, dentro de la cual el trabajo osteocítico no estimula la modelación ni la remodelación. La definición de dicha zona está actualmente en discusión.⁴¹ Esos “umbrales de disparo” son meras concepciones teóricas del funcionamiento del sistema pero, a falta de otros argumentos, pueden contribuir a explicar, a veces, los efectos de algunos tratamientos que parecen “desplazarlos” sobre el eje X de la gráfica, favoreciendo o dificultando las respuestas modeladoras o remo-

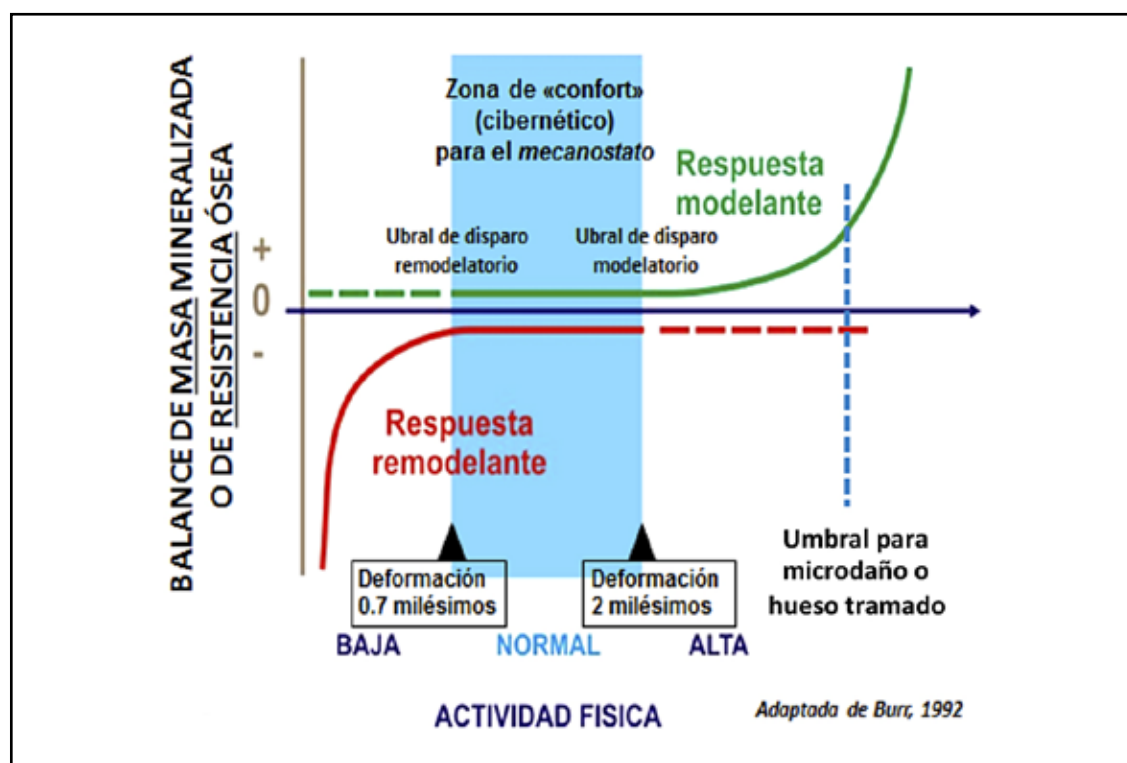


Figura 2-c. Graficación didáctica de las respuestas ganadora (modelante) y perdedora (remodelante) de la masa o la eficacia estructural de un hueso, referidas a los correspondientes umbrales de disparo (“señales de error” de deformaciones demasiado altas o demasiado pobres, respectivamente) medidos en milésimos de la longitud ósea de reposo (1 milésimo = 1000 μ Strains).⁴⁰ Se indica el umbral para microdaño o para formación de hueso tramado (unos 3500 μ Strains).

deladoras de los osteocitos.^{4,13,35,42-50} Es difícil discernir si los efectos de este tipo resultan de verdaderas alteraciones del mecanismo sensor osteocítico, o de simples modificaciones de sus respuestas,⁵¹ o de las de los efectores blásticos o clásticos. El rendimiento del sistema no sería simétrico a ambos lados de la zona de “confort”: por encima del umbral modelatorio (a la derecha del gráfico), la respuesta formadora de los osteocitos es eficaz en personas jóvenes, pero decae mucho con la edad.^{21,42} Además, sobrepasado cierto límite de deformaciones (unos 3500 $\mu\text{Strains}$, del orden de las que soportan los levantadores de pesas), el hueso adicionado podría ser del tipo tramado, y podría producirse microdaño, incrementándose la remodelación reparadora que alteraría la continuidad de la microestructura cortical (“fatiga” ósea), con resultados mecánicamente negativos. Contrariamente, por debajo del umbral para el disparo de la remodelación en “modo desuso” (a la izquierda), la respuesta perdedora de hueso es muy eficaz y tiende a aumentar con la edad. Se considera que, cuando el promedio de deformaciones no sobrepasa los 100 $\mu\text{Strains}$ (0,1 milésimo), tiene lugar la destrucción pura de hueso, modelatoria, *no acoplada* a una respuesta formadora. Por eso, en personas de edad con actividad normal, la indicación de ejercicios físicos reglados es poco eficaz para ganar hueso *de novo*; en tanto que la recomendación a individuos poco activos de llevar una actividad normal puede evitar pérdidas muy importantes.

Esta situación (“hueso que no trabaja, se orina”), gobernada por el *mecanostato* en función exclusiva del trabajo de los osteocitos, se expresa crudamente en pacientes cuadripléjicos. A partir del accidente, los lesionados pierden hasta un 50% de la masa ósea densitométrica del raquis en unos 36 meses.⁵² Pero el progreso de esa pérdida no es lineal, sino exponencial decreciente, asintótico en un nivel mínimo, irreductible. Esta es una clara manifestación del papel sensor

de los osteocitos. Al principio, cuando la estructura ósea del paciente es todavía normal, las deformaciones sensadas son casi nulas, y se remueve *naturalmente* hueso a gran velocidad. Más tarde, cuando las pérdidas han reducido la rigidez de sus huesos, el paciente continúa perdiendo hueso *naturalmente*, pero a menor velocidad, porque sus osteocitos ya han comenzado a sensar algunas deformaciones. Finalmente, cuando ya el simple traslado pasivo del paciente produce deformaciones óseas similares a las provocadas en salud por los esfuerzos fisiológicos máximos, los osteocitos vuelven a sensar deformaciones *normales* (recuérdese que ellos son “ciegos” a los *determinantes externos* de las deformaciones) y no envían más mensajes “destructores” a sus osteoclastos vecinos. En todo este proceso, *nunca* tiene lugar la intervención de hormonas o genes alterados. Tanto el nivel de masa ósea medido en salud, como las pérdidas iniciales rápidas y las ulteriores más lentas, como en el *statu quo* final, *todo* ocurre solo gracias al *mecanostato*, centrado en el accionar “a ciegas” de los osteocitos.

De rigideces, resistencias y “safety factors”

La *rigidez estructural* sería la *única* propiedad ósea servocontrolada conocida en todos los vertebrados.⁵³ La *resistencia* del hueso, que estaría dada por el estrés (fuerza por unidad de área transversal a la carga) que la estructura ósea manifestaría como reacción igual y opuesta a la fuerza de carga (Principio de acción y reacción) para cada valor de deformación producido, no se puede controlar, porque no se puede medir biológicamente como la deformación. Pero también resultaría, en cierto modo, *modulada* por el sistema en forma indirecta, siempre paralela a la rigidez (más adelante). El control de la rigidez por el *mecanostato* provee que las deformaciones óseas provocadas por los esfuerzos fisiológicos máximos sean de unos



2000 $\mu\text{Strains}$, en tanto que la deformación máxima soportada por el hueso sin fracturarse es de 20.000 $\mu\text{Strains}$; es decir que los huesos trabajan normalmente contando con un “factor de seguridad” (*safety factor, SF*) de $20.000/2.000 = 10$ en términos de rigidez.⁵⁴ Los correspondientes valores de estrés que el hueso así regulado puede manifestar (o soportar) frente a esfuerzos fisiológicos máximos, y al ser exigido por las máximas cargas, son, respectivamente, de unos 30 y 180 meganewtons/m² (MN/m²) o megapascals (MPa); o bien, unos 3 y 18 kg/mm². Esto da lugar a un SF de $180/30 = 6$, en términos de resistencia a la fractura. La diferencia entre los SF's de 10 para deformación y 6 para resistencia está dada por la pérdida gradual de resistencia que todos los huesos manifiestan al comenzar a resquebrajarse, que reduce el valor final de estrés “devuelto” por el hueso a los altos valores de deformación que tienen lugar en esas condiciones.

Para los teleólogos - el mismo Hal Frost lo era-, el logro de estos SF's constituiría un “objetivo natural” de la existencia de este y de los demás *mecanostatos*.⁵ Perdonémosle a Hal este teleologismo circunstancial: por fuera de esa filosofía, él mismo inventó el doble marcado con tetraciclina,⁵⁵ descubrió la modelación y la remodelación óseas y sus diferencias,⁵⁶ señaló a los osteocitos como el “núcleo sensor” del *mecanostato* óseo, apenas descripta su aptitud sensora^{57,58}, y reconoció la importancia de la fuerza muscular sobre la estructura ósea,^{35,59} cerrando, con criterios biomecánicos, el círculo de “asociaciones morfológicas” musculoesqueléticas iniciado por Galileo y continuado por Wolff.⁶⁰ Frost^{5,13,53} concibió el *mecanostato* como un sistema estrictamente *biomecánico*, que cuenta con los osteocitos como sensores, y con los osteoblastos y clastos como efectores direccionales, cibernéticamente orientado al mantenimiento de los SFs, *integrado en varios niveles de complejidad* (“organización intermedia” del esqueleto⁵⁶) (Figura 1-b). Po-

demos decir que “Los motores *moleculares* y los sensores *organelares* que determinan el funcionamiento de sus *células*, integrados al nivel *tisular*, permiten que el *mecanostato* provea un control retroalimentado de la rigidez estructural de los huesos a nivel de *órganos*, adecuado al uso mecánico habitual del esqueleto a nivel de *sistema de órganos*, gracias al cual es posible mantener adecuados ‘factores de seguridad’ a nivel *individual*” (Paradigma de Utah).^{4,5}

El *mecanostato* sería capaz de orientar la estructura ósea en forma tridimensional. Uno de los “secretos” de los osteocitos para responder tridimensionalmente a deformaciones sensadas solo en una dirección, y con solo dos sentidos posibles: acortamiento-estiramiento, es la disposición de sus prolongaciones en todas las direcciones del espacio. Al detectar la dirección, el sentido y la magnitud de esos estímulos unidimensionales, los osteocitos pueden orientar el quita-y-pon de material mineralizado en cualquier punto del esqueleto. Así pueden optimizar no solo la masa mineralizada presente en cualquier sección ósea, relevante para la resistencia a la compresión, sino también los MIs de las diáfisis de los huesos largos (Figura 3-a), relevantes para la resistencia a la flexión y a la torsión. La figura muestra cómo pueden los osteocitos “diseñar” secciones óseas diafisarias complejas, con MIs “optimizados” para resistir a la flexión en cualquier sentido y a la torsión, como los de la tibia humana, por encima de lo necesario para resistir solamente en compresión. Recuérdese que los MIs seccionales capturan la distancia a la cual el tejido cortical está dispuesto en la sección con respecto a ejes de referencia teóricos, de cuya existencia no les llega a los osteocitos ninguna señal. Planteado en forma simple: ¿cómo (re-)distribuyen los osteocitos el tejido cortical seccional de las diáfisis en forma diferencial, priorizando ciertas direcciones en desmedro de otras, determinadas todas en relación con ejes de deformación

diferentes del hueso? La cuestión pasa por la *intensidad relativa* de esos acortamientos y estiramientos. El ejemplo más sencillo es la deformación en flexión. Por ejemplo: con el fin de optimizar el MI para flexión *lateral* de un hueso largo de sección símil-cilíndrica, el tejido cortical debe redistribuirse, tendiendo a acumularse en los sectores más lejanos al eje de flexión “y” (en este caso, los sectores laterales, tal como lo muestra la sección elíptica de hueso del esquema). Los osteocitos responden solamente a acortamientos, por compresión, o a estiramientos, por tracción;

pero ambos tipos de estímulo determinan la liberación de mediadores formadores y destructores en forma *proporcional a la magnitud* de las deformaciones producidas. Obviamente, la flexión del hueso determinará una compresión del lado cóncavo y un estiramiento del lado convexo, cuya intensidad relativa crecerá *hacia la periferia* de la sección. Esto determina una mayor respuesta osteocítica formadora (engrosamiento) hacia la periferia de los cuadrantes laterales, con respecto al anterior y al posterior. Esto ocurre por haberse orientado su deposición

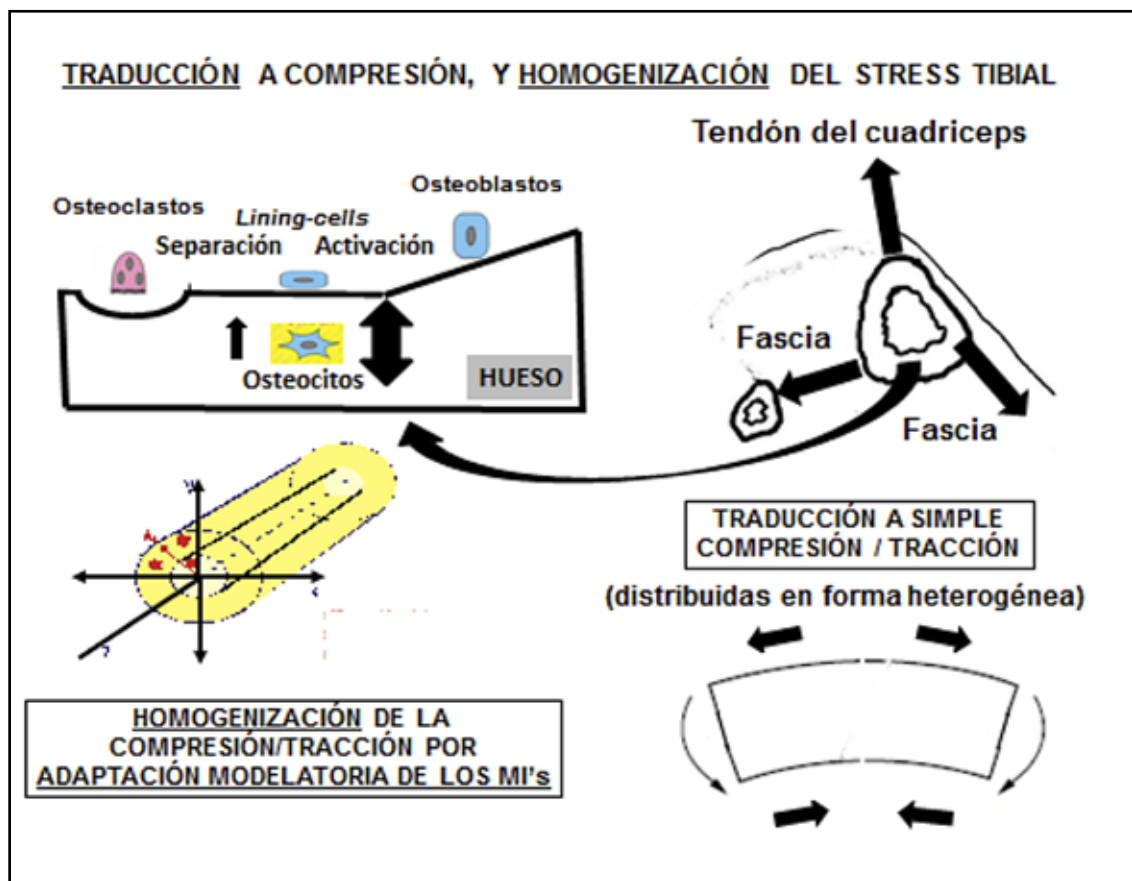


Figura 3-a. Patrón complejo de deformaciones provocadas por el uso en el tercio superior de la tibia humana (**derecha**), reducción de ese esquema a un simple modelo de compresiones y tracciones de intensidades variables (**izquierda**) y orientación espacial de la modelación y la remodelación por los osteocitos, de la que resulta un diseño óseo (evaluado aquí por sus MIs – **abajo, izq**) específicamente orientado para minimizar las deformaciones habituales de los entornos celulares y del hueso entero.



en el sentido “más exigido”, induciendo a la sección a adoptar progresivamente una forma *elíptica*, alargándose en el sentido lateral (eje *x*). Entonces, el valor del MI para el eje *perpendicular* al considerado (eje *y*) será mayor, porque los MIs aumentan en función del *cuadrado de la distancia* a la cual la masa de material cortical está dispuesta respecto del eje seleccionado.⁸ La reiteración de este fenómeno en diferentes puntos a lo largo del hueso, trasladará el efecto al terreno 3-D. La figura esquematiza estas interacciones, referidas a las deformaciones complejas provocadas en la tibia por las tracciones tendinosas y fasciales, que son traducidas en el ambiente osteocítico a meros estiramientos o acortamientos, claro que con *distintas intensidades puntuales*. De esos efectos diferenciales resulta la complicada geometría de la sección tibial y de la tibia entera¹²⁹ (y la de cualquier otro hueso).

Así, los osteocitos regularían la *rigidez* estructural ósea; pero, pese a las correlaciones entre los SF's referidas arriba, no surge de eso que también regulen la propiedad que realmente importa, que es la *resistencia* a la fractura, porque esta depende también de la *tenacidad* estructural⁹ (Figura 2-a). La “resistencia a la fractura” es una variable sin unidades, para la cual *no se conocen* mecanismos de medición biológica, como sí poseen los osteocitos para medir deformaciones y, obviamente, lo que no se puede medir, no se puede regular. Sin embargo, el sensado osteocítico permite no solo adecuar la rigidez estructural ósea, sino también “*modificar*” *paralelamente*, aunque no estrictamente “*regular*”, la cantidad de masa (área) ósea mineralizada presente en distintos puntos de las secciones, que constituye el *denominador* del cociente que expresa el estrés (fuerza/área) soportado por la estructura (Figura 3-b, centro-arriba). Aunque esa variación de masa (área) no esté estrictamente asociada a la variación de la rigidez estructural del hueso, al menos constituye un recurso *modulatorio*

-no regulatorio- de su resistencia, concebida como su capacidad de soportar estrés de carga, que, al menos, *corre paralelo* a la variación de la rigidez. Esto le permite al *mecanostato* “controlar colateralmente” la resistencia a la fractura. Por esto es que se relaciona el mantenimiento del SF de 6 antes referido “para estrés de fractura (resistencia)”, con el accionar del sistema para controlar directamente el SF de 10 “para rigidez estructural”.

Además, y aparte de su propuesta actividad como agentes endocrinos sistémicos, que no corresponde tratar aquí, los osteocitos pueden participar en mecanismos relevantes para la resistencia a la fractura, que *no tienen* relación con el *mecanostato* descripto. Conocemos dos asociaciones sugestivas entre los osteocitos y la producción y la reparación de resquebrajaduras inducidas por el uso en el seno del tejido cortical, que afectan la *tenacidad* del hueso: **1)** la producción de resquebrajaduras es inversa a la densidad de lagunas con osteocitos vivos, aunque no se sabe qué es lo que ocurre primero⁶¹ y **2)** la lesión de las prolongaciones osteocíticas vecinas a la resquebrajadura ósea promovería y orientaría la formación de un canal de Havers hacia el sitio lesionado, otro ejemplo de “remodelación orientada”.^{17,28-30} Así, el tejido resquebrajado resulta eliminado por los osteoclastos convocados, y el material de reposición rellena el tubo, restaurando la continuidad de la estructura. Nótese que la secuencia: [resquebrajadura (reducción de tenacidad) -> lesión osteocítica (reconocimiento de la anomalía) -> atracción de clastos y blastos -> remodelación reparadora (normalización de la tenacidad)] sugiere el trabajo de un mecanismo regulatorio retroalimentado, que podría controlar al menos uno de los determinantes de la *tenacidad* del tejido y, por extensión, del hueso (Figura 2-a). Accesoriamente, el clásico control del *diseño* óseo por el *mecanostato* para regular la rigidez estructural contribuiría agonísticamente con esa “regulación de la tenacidad del tejido”.⁶² De hecho, el umbral

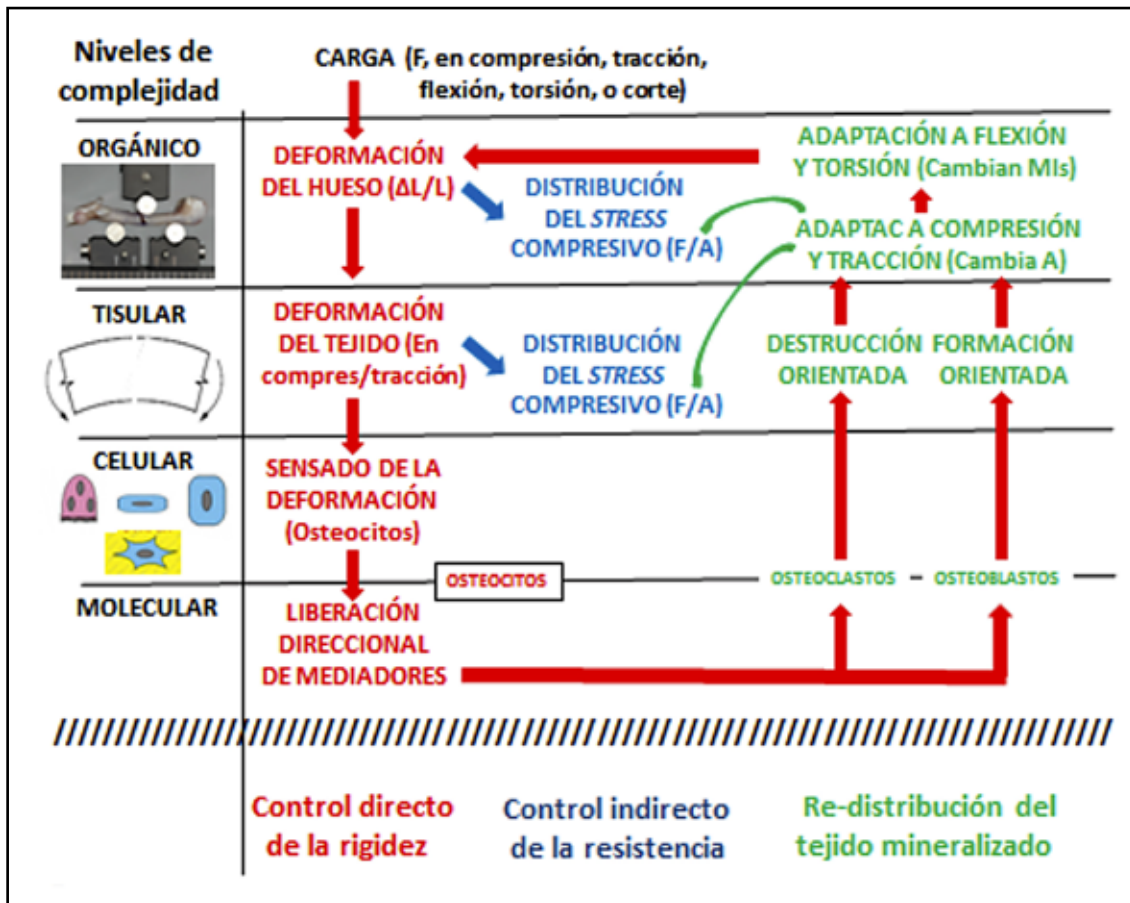


Figura 3-b. Esquema del funcionamiento del *mecanostato* teniendo en cuenta los niveles de complejidad de organización estructural ósea (molecular, celular, tisular y orgánico) en los cuales se manifiesta (izq.). Se distingue el control clásico de la rigidez estructural (**derecha**) y una modulación paralela, accesoria, de la resistencia del hueso (**centro**), que resulta de variaciones del área de sección - denominador del cálculo de estrés ($= F/A$) soportado por la estructura - aunque la resistencia no está sujeta a un control retroalimentado como variable regulada.

de disparo modelatorio (unos 2000 $\mu Strains$) está razonablemente por debajo del “umbral de producción de microdaño” (fatiga ósea - unos 3500 $\mu Strains$ - Figura 2-c).

Es prematuro aceptar esta proposición, pero ese mecanismo podría configurar un “segundo *mecanostato*” y elevar a dos las propiedades estructurales óseas servocontroladas: la rigidez y (al menos en parte) la tenacidad, que son los dos determinantes excluyentes de la resistencia a la fractura del

hueso-órgano (Figura 2-a). Curiosamente, si así fuera, ambos sistemas regulatorios reconocerían como núcleos sensores a los osteocitos. Algunas evidencias concretas soportan esta propuesta de “regulación indirecta” de la resistencia ósea por los osteocitos. La *densidad de osteocitos vivos* por unidad de campo histomorfométrico de cualquier hueso es la variable que mejor discrimina entre individuos fracturados y sanos.^{14,15} Además, el producto de un indicador de rigidez tisular (la



vDMO cortical) por cualquiera de los MI de un hueso largo, propuesto y validado por nosotros como un estimador de su rigidez estructural gobernada por el *mecanostato*⁶³ (véase “BSIs”, más adelante, y la Figura 6-c), correlaciona mejor con su resistencia a la fractura que con su rigidez. Un aspecto interesante de esta “doble regulación” de la rigidez y la tenacidad es que estas dos variables están *inversamente* relacionadas en todos los esqueletos, a nivel *tisular* (a mayor rigidez del tejido, menor tenacidad, y viceversa), debido a la precisa selección natural de un mismo determinante, que es el grado de mineralización de la matriz.⁶⁴ Tal vez esto explique por qué, **a)** respecto de la rigidez, los osteocitos *regularían a priori* la distribución del material mineralizado para prevenir deformaciones excesivas de la estructura de cada hueso y **b)** respecto de la tenacidad, los osteocitos solo *enmendarían a posteriori* los resultados catastróficos (resquebajaduras) producto del fracaso previo de propiedades estructurales cuyas variaciones, en principio, no son capaces de detectar. Notablemente, en ambos casos, sus efectos se expresan siempre a nivel de complejidad *orgánica*, por encima del tisular o el celular.

Traducción a la clínica

Sobre la base de estos conceptos, podemos proponer un esquema etiopatogénico para todas las *osteopatías fragilizantes*, centrado en el *mecanostato*, que distingue solo tres clases de afecciones:⁶⁵⁻⁷⁰ **1)** cuando la enfermedad afecta directamente las células sensoras (osteocitos) y/o efectoras (blastos, clastos) del sistema, se producen fragilidades óseas *primarias* (mal de Paget, osteogénesis imperfecta, osteodistrofias, etc.), menos comunes que las demás, que no tienen, en general, tratamientos específicos; **2)** cuando tiene lugar una hipoactividad o inactividad, o una inmovilización, en individuos con un *mecanostato* normal, la falta de *input* del sistema (pobre estimulación de osteocitos sanos)

determina fragilidades óseas *por desuso*, que requieren tratamientos fisiátricos y **3)** cuando una enfermedad endocrino-metabólica afecta sistémicamente a cualquiera de sus células (osteocitos, blastos, clastos) pueden ocurrir desplazamientos a la izquierda o a la derecha de cualquiera de los dos umbrales del sistema (*setpoints* - Figura 2-c) que determinan que este funcione “engañado”, como si se ubicara la zona de “confort” entre valores distintos de los normales. Esto puede ocasionar fragilidades *secundarias*, como las producidas por menopausia, diabetes, raquitismo u osteomalacia, hiperparatiroidismo, etc., que requieren tratamientos farmacológicos.

La evaluación del trabajo osteocítico y de su impacto mecánico ofrece interés diagnóstico. Por el momento, no es posible estimar no invasivamente el grado de actividad de los osteocitos de un paciente, pero sí se pueden determinar algunos indicadores del *sistema osteomuscular*, cuyas variaciones, individuales o asociadas, pueden proveer *evidencias indirectas* de la eficacia del trabajo regulador del *mecanostato* que los incluye. Para establecer qué propiedades óseas convendría determinar con ese propósito, vale considerar las siguientes *4 características* de las relaciones naturales entre las cargas que usualmente deforman a los huesos y el modo como ellos las soportan: **1)** la *fuerza de la musculatura regional* es la principal proveedora de estimulación mecánica (estrés de carga, *input* del *mecanostato*, picos de *strain*) sobre el hueso que se va a estudiar;⁷¹ **2)** la *masa de tejido mineralizado* contenida en una sección del hueso transversal a la carga es un determinante *directamente eficaz* de la resistencia a deformaciones en compresión, no en flexión o torsión;^{9,10} **3)** la *densidad mineral volumétrica* de ese tejido refleja su rigidez específica (módulo elástico, E), que determina su capacidad intrínseca de oponerse a cualquier deformación producida por la carga, con independencia de la forma del hueso¹¹ y **4)** la *distribución espacial* de ese tejido en los

distintos cuadrantes de una sección ósea refleja la eficacia de su diseño para resistir deformaciones en flexión de cualquier tipo, o en torsión.⁸ Algunas de esas variables pueden evaluarse empleando pQCT, o técnicas similares, en un mismo hueso (largo). Son ellas: **a)** el CMO, idealmente *cortical*, o bien *total*, si es hueso metafisario; **b)** la *vDMO cortical*; **c)** Los *MI*s de las secciones diafisarias, calculados para flexión o para torsión (Figura 2-a y d), el *área de corte máxima de la musculatura* del miembro al cual el hueso pertenece, que estima la fuerza máxima que ella es capaz de ejercer sobre el sistema de palancas óseas.⁷² Asimismo, esa fuerza puede determinarse en forma directa, *dinamométrica*. También pueden medirse por DXA las masas mineral

(CMO) y magra (correlativa de la fuerza muscular) del cuerpo entero, o de los miembros por separado, con menor correlato biomecánico. Se puede proponer, razonablemente, que *no menos de 5* de las familias de relaciones que esas variables pueden manifestar entre sí son analizables a partir de las determinaciones referidas. Esta posibilidad podría trasladarse al diagnóstico, si se contara con cartas normales de referencia estandarizadas. Esas relaciones son:

1. Las relaciones “hueso/músculo” (h/m; Figura 4-a,b,c,d), que expresan la proporcionalidad entre cualquier variable ósea (*y*) y la masa densitométrica (DXA, Figura 4-a), el área de corte máxima (pQCT, Figura 4-b), o la fuerza dinamométrica (plataformas de piso,

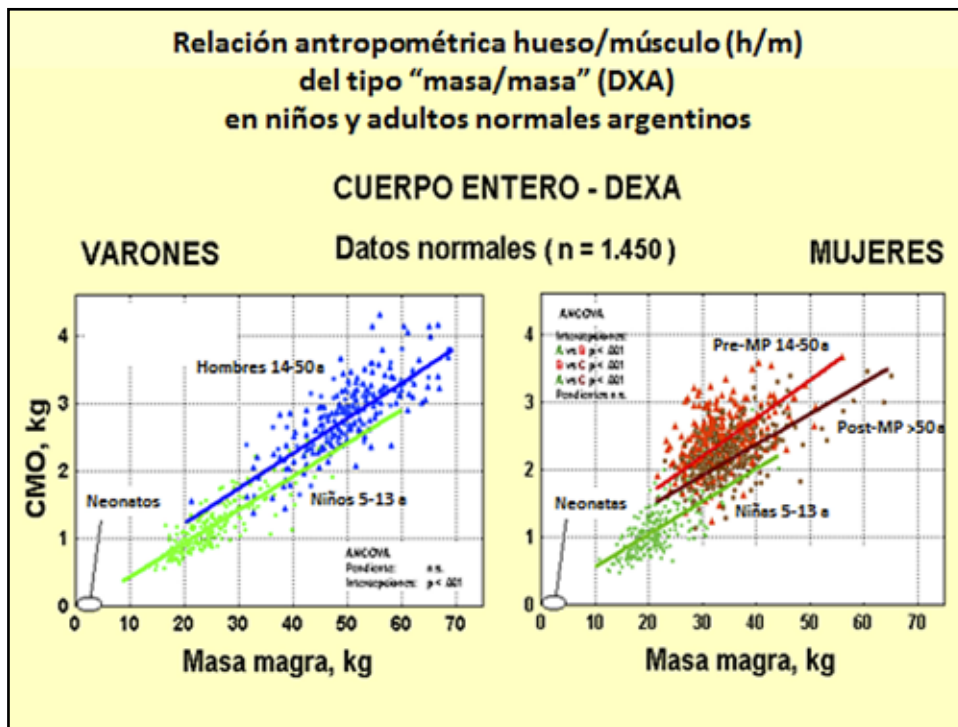


Figura 4-a. Relación *h/m* antropométrica entre las masas densitométricas ósea (CMO) y “muscular” (magra) del cuerpo entero en 1450 niños y niñas, hombres, y mujeres premenopáusicas y posmenopáusicas.
⁷⁷ Primera evidencia de la existencia de un *mecanostato* óseo único para la especie, y de la interacción (positiva) de las hormonas sexuales con la relación *h/m* determinada.

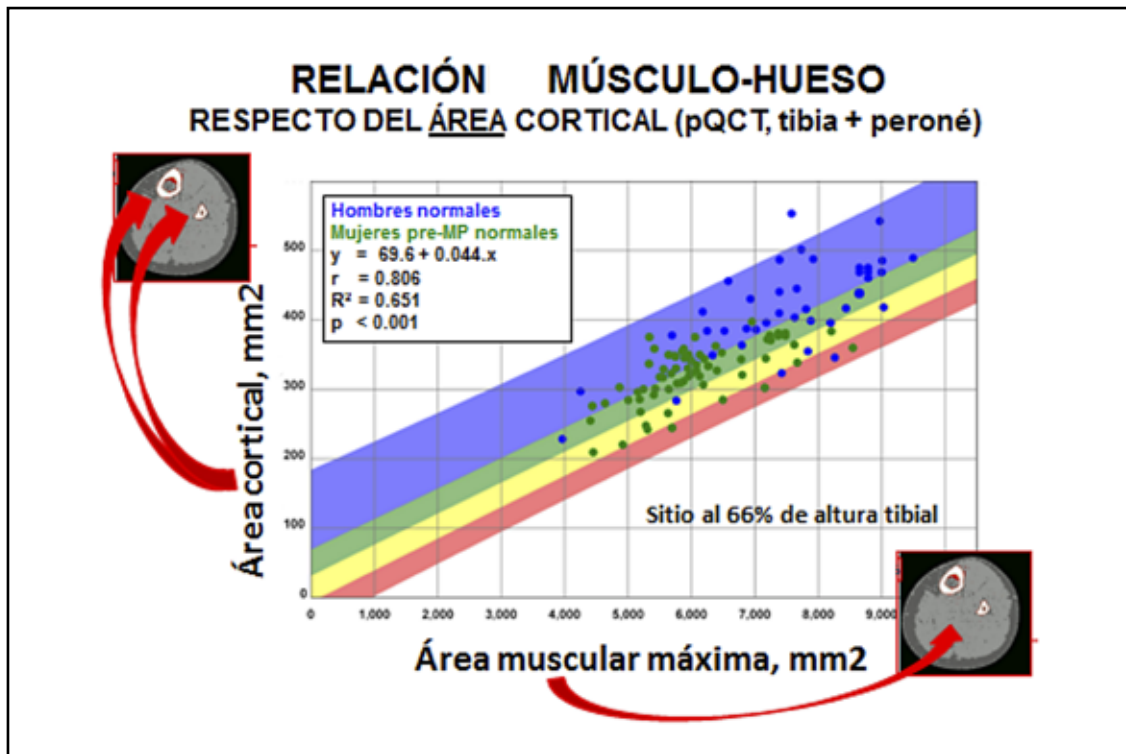


Figura 4-b. Gráfica Z-scorizada de una relación hueso/músculo (h/m) tomográfica, determinada en hombres y mujeres premenopáusicas normales en conjunto, referida en este caso a la masa ósea. Se seleccionaron como variables el CMO tibioperoneo (y) y el área máxima de la musculatura de la pantorrilla (x), medidos por pQCT al 66% de altura de la tibia.

grip-strength, etc., **Figura 4-d**) de la musculatura regional (x).^{59,66,72-82} Cartas Z-scorizadas^{73,75} de las relaciones h/m permiten establecer, comparativamente, si las propiedades óseas guardan o no relaciones normales con el estrés máximo que la musculatura regional puede inducirles, siempre que *no existan afecciones primarias de la estructura de los músculos* que alteren la proporcionalidad entre su masa y su fuerza.⁸¹ La Figura 4-c esquematiza esas relaciones. Una relación h/m normal reflejará una adecuación estructural del hueso a la fuerza muscular. Valores bajos de ambas variables podrían corresponder a una persona menuda normal; pero, en casos de osteopenia, también identificarían su naturaleza “mecánica”, o *por desuso*, que sería

compatible con un trabajo osteocítico normal. Una relación h/m baja con musculatura normal reflejaría una inadecuación de la estructura ósea a esa fuerza. En casos de osteopenia, eso identificaría su naturaleza “metabólica” o “sistémica”, que puede involucrar un desplazamiento de los umbrales de disparo del sistema para modelación o remodelación (Figura 2-c), o bien una afección primaria de las células del *mecanostato*, pudiendo ambas comprometer o no a los osteocitos. Nosotros hemos demostrado esta concepción, asociada a la distinción entre “osteopenias fisiológicas” y “osteoporosis verdaderas” propuesta por Frost,⁸³ en diversos estudios clínicos usando DXA^{74,84-87} o pQCT (Figura 5-a).^{88,89} Algunas implicaciones teleológicas de estas

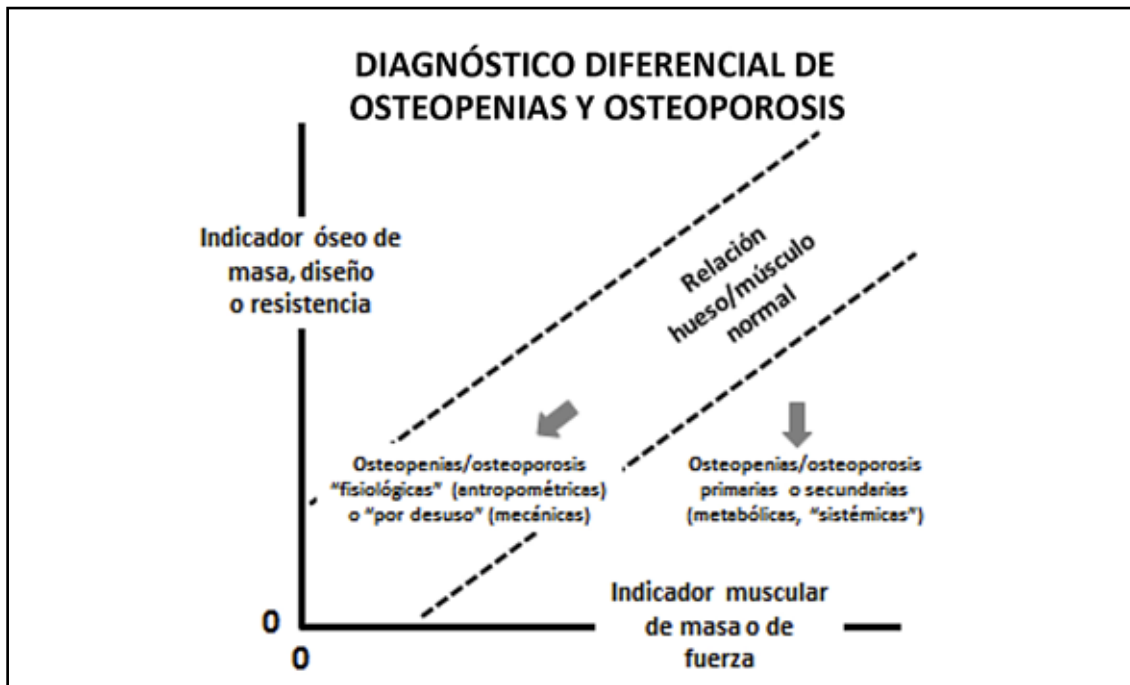


Figura 4-c. Gráfica idealizada de una relación h/m , y aplicaciones diagnósticas, según el texto.

relaciones respecto de las diferencias sexuales de disponibilidad de masa ósea por unidad de masa muscular asociadas a la "necesidad" de nutrir a las eventuales crías,^{42,90-92} motivaron trabajos alusivos.^{17,24,46,59,65-67,81,82,93}

2. La evaluación del estado del "factor de seguridad" (SF) de un hueso, que expresa en qué medida la resistencia de su estructura está optimizada para que el desafío mecánico cotidiano opere lejos del límite crítico de fractura.⁶⁵ La Figura 4-d esquematiza la determinación del SF respecto de la resistencia tibial a la compresión (que normalmente valdría 6), en tres pasos: **a)** determinando la fuerza dinamométrica máxima de la musculatura regional (sural) se calcula la fuerza que efectivamente afectará al hueso, según las palancas óseas correspondientes; **b)** conociendo la capacidad natural máxima del tejido óseo para soportar estrés (fuerza/área seccional) sin fracturarse (180 MPa, o 18 kg/mm²) se calcula qué área de tejido óseo debería

contener la sección tibial que naturalmente trabaja a la compresión uniaxial casi pura (que nosotros establecimos como el sitio al 14-15% de altura del hueso)¹²⁹ para resistir 6 veces esa fuerza sin fracturarse (tal como los arquitectos calculan el grosor de las columnas de los edificios, basándose en el estrés máximo típico del cemento armado, multiplicándolo luego por un "factor de seguridad" determinado). Para el hueso resistiendo en compresión, vale: [área ósea teóricamente adecuada = $6 * \text{fuerza máxima a soportar fisiológicamente} / 180 \text{ MPa}$]; **c)** midiendo después por pQCT el área ósea que realmente contiene la sección en ese sitio, se establece en qué proporción el área ósea teóricamente adecuada para resistir una fractura por compresión está satisfecha en el paciente, dentro del paradigma establecido al principio de este artículo.^{4,5} En términos prácticos: [cobertura porcentual del SF = $100 * \text{hueso presente} / \text{hueso necesario}$]. Esta evaluación constitui-

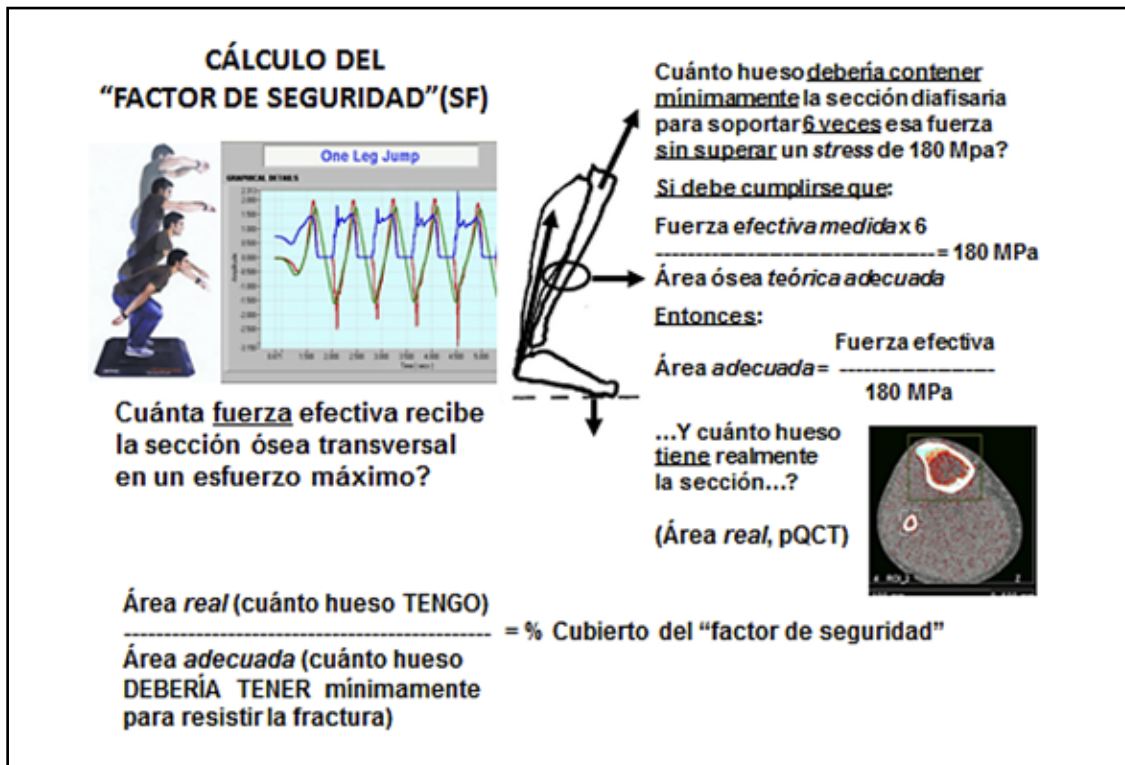


Figura 4-d. Determinación no invasiva del grado de satisfacción del *Safety Factor (SF)* para la tibia humana. Primero se determina dinamométricamente la fuerza efectivamente ejercida en compresión uniaxial sobre el hueso mediante una plataforma de piso al efectuar un salto en una sola pierna, a la máxima altura posible (**izquierda**). Luego, conociendo que el tejido óseo cortical normal soporta un estrés de 180 MN/m² oó MPa (unos 18 kg/mm²) como límite prefractura, se calcula la mínima masa mineralizada (área ósea teóricamente *adecuada*) que debería contener la sección tibial a la altura del 14% (donde tiene lugar la compresión en forma más pura) para soportar 6 veces el estrés provocado por el salto (**derecha**). Determinando el área ósea *real* del paciente a esa misma altura por pQCT (**abajo, derecha**), se calcula luego la *relación porcentual* entre el valor *real* y el *adecuado* de área ósea (**abajo**), que estimará en qué proporción está controlado el SF calculado para esa resistencia en su nivel adecuado.

ría un verdadero diagnóstico biomecánico de fragilidad ósea en términos porcentuales, que captaría la participación de los osteocitos en el *mecanostato*, referido directamente al sujeto estudiado, sin necesidad de compararlo con individuos diferentes.

3. Las relaciones de "distribución/masa" (d/m), que expresan la eficacia con la cual el *mecanostato* optimiza el diseño óseo para resistir flexión o torsión (MI, y), distribuyendo el tejido mineralizado en función de la

cantidad disponible del mismo (CMO, x). Hemos demostrado que, en huesos largos, estas relaciones difieren en complejidad según se analicen sus metáfisis⁹⁰ o sus diáfisis.⁹⁴ En las metáfisis (Figura 5-a) existen diferencias sexuales (pubertad, menopausia) entre los diámetros óseos y entre los tejidos cortical y trabecular, que se refieren aparte. En las diáfisis, el análisis puede efectuarse por correlaciones como la de la Figura 5-b. Los valores normales de esa relación descartan la afecta-

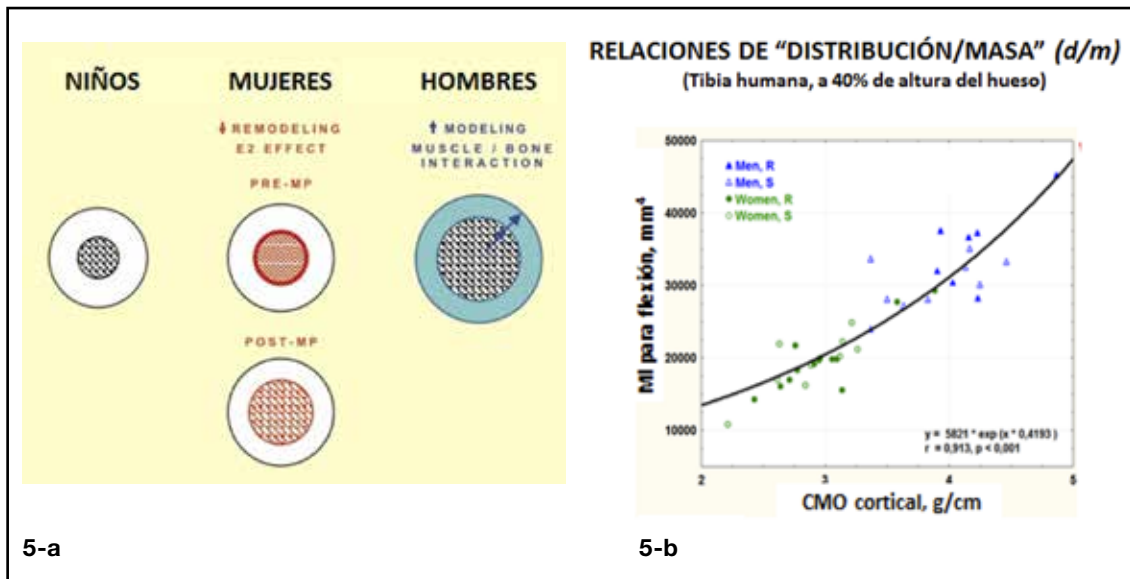


Figura 5-a. Secciones esquemáticas de metáfisis radiales de niños y niñas, mujeres premenopáusicas y posmenopáusicas, y hombres normales, según datos de pQCT.^{91,92} Las diferencias estructurales reflejan interferencias hormonales sobre el *mecanostato*, con probable efecto sobre los umbrales de deformación para el disparo modelatorio y remodelatorio por los osteocitos (**Figura 2-c**). Estas relaciones reflejan las expresadas en forma de relaciones h/m antropométricas (**Figura 4-a**) y estarían relacionadas con la aptitud del esqueleto femenino de acumular mineral en exceso para proporcionarlo a las crías.

5-b. Ejemplo de curva de relación de "distribución/masa" (d/m), obtenido midiendo por pQCT un MI para flexión (y) y el CMO cortical (x), al 40% de altura tibial, en hombres y mujeres sanos sedentarios (S) o corredores (R).

ción del *mecanostato* y de los osteocitos por la enfermedad, y los valores *bajos* permiten *proponerla*, como diagnóstico patológico presuntivo. Estas relaciones también podrían cuantificar biomecánicamente el impacto de una osteopenia (carencia de tejido mineralizado, sin alusión expresa a su distribución espacial), en función de la severidad con que esa carencia afectaría la optimización del diseño del hueso, que es el verdadero determinante de fragilidad (osteoporosis).⁹⁴ La anomalía de una relación d/m indica una incapacidad del *mecanostato* para optimizar el diseño diafisario, que *puede o no* involucrar a los osteocitos.

4. Las relaciones de "distribución/calidad" (d/c), que, según nuestros propios estu-

dios,^{23,24,65,69,95-99} expresan la eficacia con que el *mecanostato* optimiza el diseño *diafisario* (evaluado por alguno de los MIs, y) para resistir flexión o torsión, *en función de la mayor o menor dificultad para deformar el tejido duro* (evaluada mecánicamente, o asimilada a la vDMO cortical, x ; Figura 6-a).⁹⁴ La relación negativa hiperbólica que obtuvimos, que muchos confirmaron luego, aunque sin reconocer su significado fisiológico,¹⁰⁰⁻¹¹⁶ es típica de las asociaciones entre variables reguladas por sistemas retroalimentados, y puede asimilarse a la que vincula los gastos para mejorar la calidad de los materiales (x) y para contratar al arquitecto cuando se construye una casa (y ; Figura 6-b). En un hueso, los valores *normales* de esa relación *descartarían* la afecta-

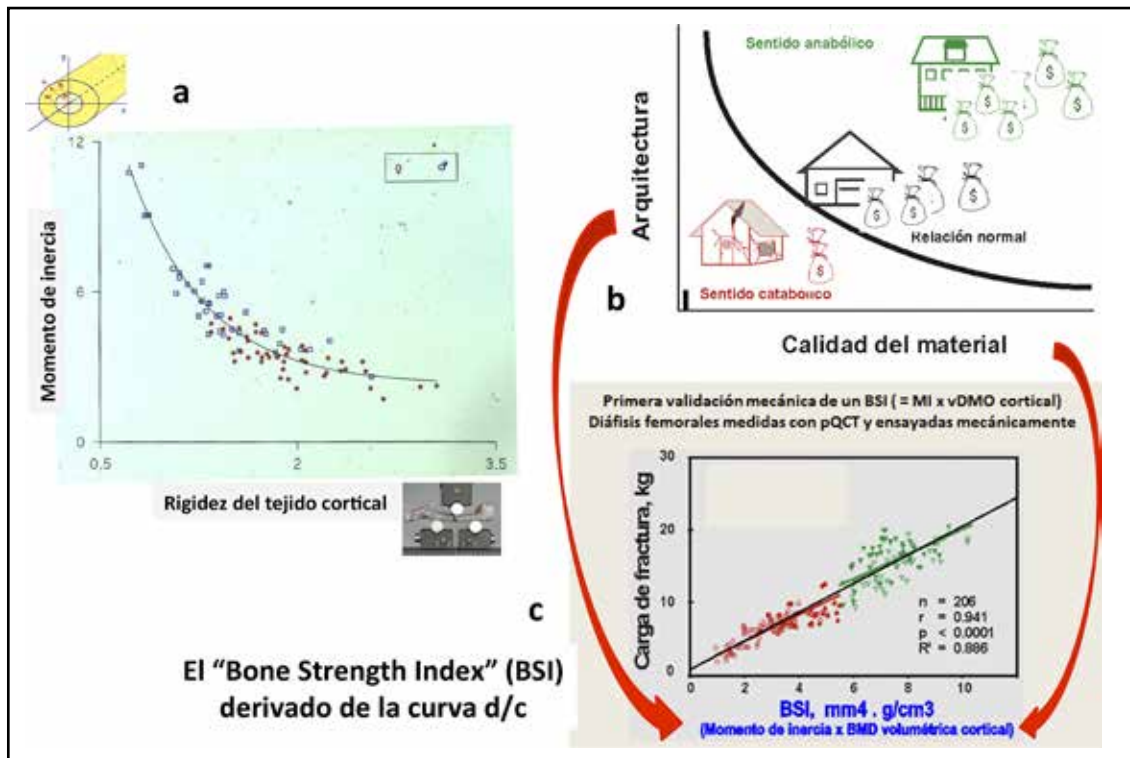


Figura 6-a. Curva experimental original, obtenida en ratas machos y hembras, a partir de la cual se plantearon originalmente las relaciones d/c ,⁹⁵⁻⁹⁷ graficando el MI para flexión femoral (y) vs la rigidez específica del tejido cortical del mismo hueso determinada mecánicamente (x).

6-b. Esquema didáctico del significado biológico de una curva d/c , asimilado a la relación inversa que normalmente existe entre los gastos originados en mejorar la calidad de los materiales y en los honorarios del arquitecto para la construcción de una casa.

6-c. Validación original del poder predictor del producto $MI \times vDMO$ (= *Bone Strength Index*, BSI; x) determinado por pQCT en fémures de ratas de dos tamaños distintos, sobre la carga real de fractura en flexión determinada mecánicamente (y).

ción del *mecanostato* y de los osteocitos por la enfermedad, y los valores *bajos* permitirían *proponerla*, como diagnóstico patológico presuntivo.⁹⁴ Las curvas d/c toman en cuenta directamente un indicador de la rigidez del tejido duro; o sea, de la dificultad con que los estímulos mecánicos podrían deformar a los osteocitos. Por eso, las curvas d/c evaluarían el funcionamiento del *mecanostato* (implicando o no a los osteocitos en el diagnóstico, según el caso) en forma más específica por su modo de actuar que como lo harían las curvas d/m . Además, podrían distinguir

afecciones derivadas o no de valores bajos o altos de $vDMO$ cortical, que solo pueden producirse por cambios en su mineralización y/o en la remodelación intracortical haversiana, suficientes para saturar la capacidad del *mecanostato* para compensarlos adecuando el diseño óseo. Hemos evidenciado esto **1**) en ratas, tratadas con corticoides (inductores de apoptosis osteocítica; Figura 7-a),^{47,94,117-122} bifosfonatos (protectores antiapoptóticos de los osteocitos; Figura 7-b),^{44,48,123-126} PTH (también protectora) en un modelo con una pata inmovilizada y la otra sobrecargada (primera

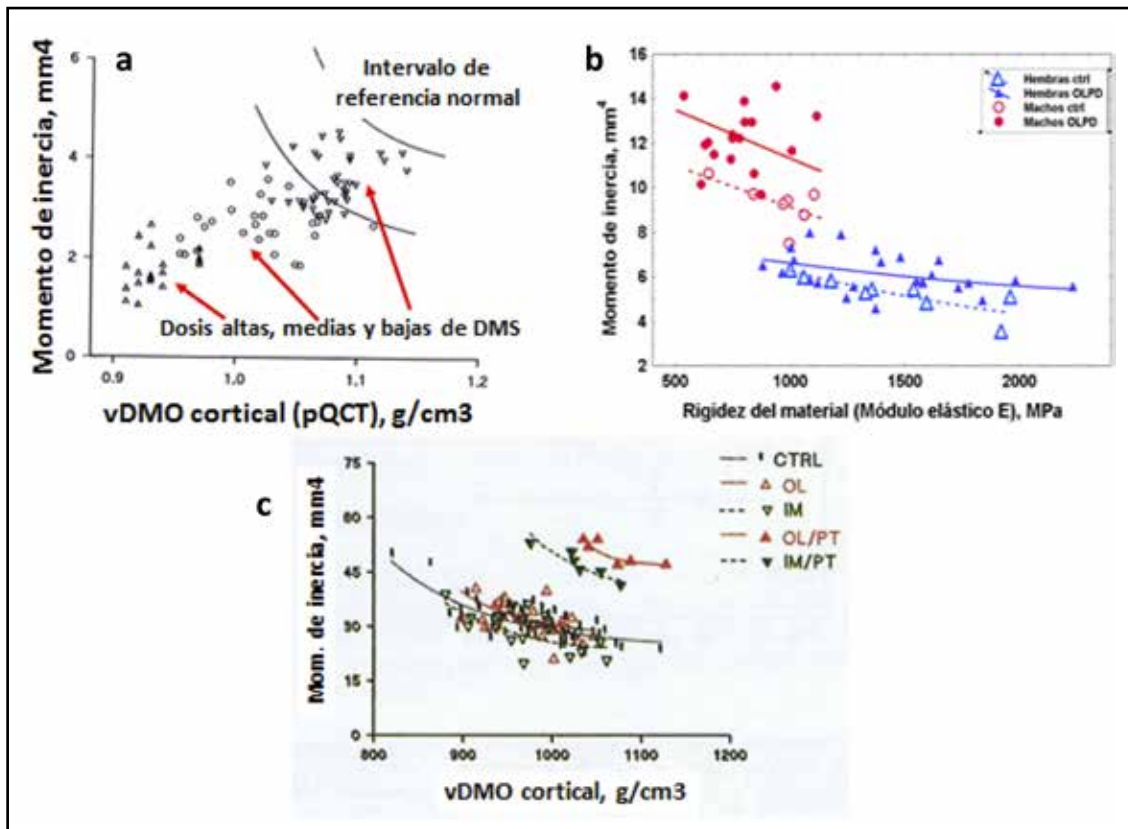


Figura 7-a. Relaciones d/c, determinadas por pQCT (primer ejemplo de este tipo de análisis de los efectos de un tratamiento osteoactivo) en fémures de ratas tratadas con dexametasona (DMS), graficadas con referencia al IC para 95% de los datos de una curva d/c de controles normales.⁴⁷ Interacción negativa del tratamiento, promotor de apoptosis osteocítica.

7-b. Curvas d/c determinadas por pQCT (MI) y test mecánicos (módulo E) en fémures de ratas macho y hembra tratadas o no con olpadronato (OLPD).⁴⁴ Interferencia positiva del tratamiento, protector antiapoptótico de los osteocitos.

7-c. Curvas d/c determinadas por pQCT en fémures de ratas con una pata trasera inmovilizada y la otra sobrecargada (IM/OL), tratadas o no con PTH anabólica (PT), vs. las de controles intactas sin tratar.⁴³ Primera evidencia (1995) de una interacción positiva de la PTH (protectora antiapoptótica de los osteocitos) con la eficacia del *mecanostato*, y del efecto agonista del ejercicio físico sobre esa interacción.

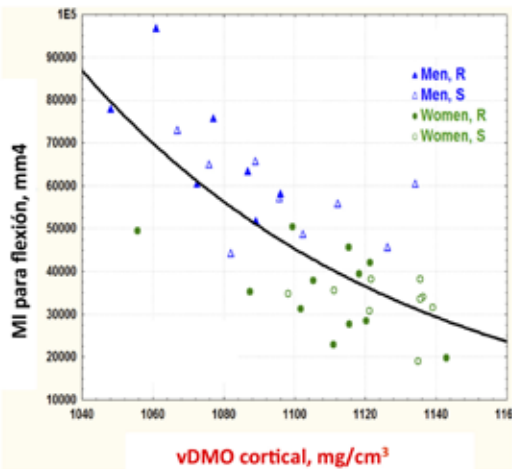
evidencia de un agonismo hormonal con la actividad física sobre la relación d/c; Figura 7-c),⁴³ y otros tratamientos^{68,127}, y en ratones con distinta conformación corporal,¹²⁸ y **2)** en seres humanos con distintos grados de actividad física^{94,129-132} (Figura 8-a), en mujeres pos-MP (mejora de la arquitectura cortical radial por PTH)⁴⁹ y en cirróticos¹³³ y hemodializados crónicos (Figura 8-b).

5. Los Índices de Resistencia Óseas (Bone Strength Indices, BSIs), que evalúan, con especificidad de sitio, la rigidez estructural (resistencia a la deformación determinante de fractura) de huesos largos.⁶³ Nosotros mismos desarrollamos originalmente los BSI, como una derivación matemática de nuestras curvas d/c. La forma simil-hiperbólica de esas curvas indica que el producto entre los valo-



RELACIONES d/c TIBIALES EN HUMANOS ADULTOS (pQCT)

a. En individuos sedentarios (S) o entrenados en carrera (R)



b. En hombres hemodializados por IRC de distintas etiologías

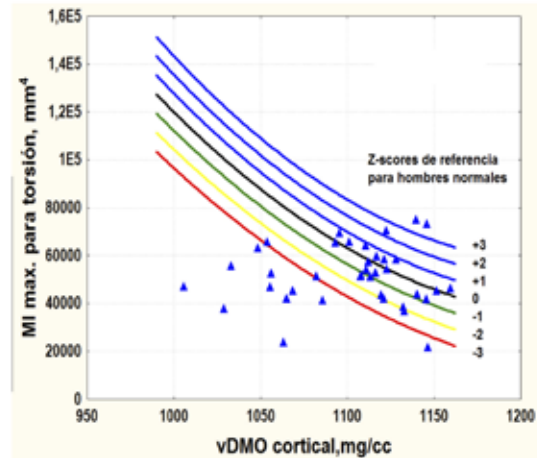


Figura 8-a. Relación d/c entre el MI para flexión y la vDMO cortical medidos por pQCT a 65% de la altura de la tibia de hombres y mujeres sanos sedentarios (S) o entrenados en carrera (R),⁹⁴ mostrando las mismas características que las gráficas expuestas en las Figuras 6 y 7.

8-b. Relación d/c medida como en (a) al 38% de la altura de la tibia de hombres hemodializados, con referencia a una curva d/c Z-scorizada obtenida de 100 hombres sanos (Tesis de Doctorado, Dra. Irene Grappiolo, UNR). La relación d/c variable de los pacientes reflejaría diferencias de influencia del entorno metabólico, que explicarían sus distintos riesgos de fractura en regiones corticales, mejor que como podría hacerlo la DXA.

res de y (MI) y de x (vDMO cortical) de cualquiera de sus puntos tenderá a arrojar resultados constantes. Para el caso, ese producto representaría la rigidez estructural del hueso estudiado, que es calculable, en estructuras tubulares, simplemente como $MI \times E$, siendo E la rigidez específica (módulo elástico) del material del tubo,¹³⁴ que en los huesos es estimada por la vDMO cortical.^{11,64} Los BSIs ($=MI \times vDMO \text{ cortical}$; Figura 6-c) trasladan al terreno práctico (resistencia a la fractura) la expresión de las curvas d/c y permiten establecer, además del diagnóstico de fragilidad

ósea, el grado de participación etiológica de la calidad del material mineralizado (vDMO, independiente de los osteocitos) o de su distribución espacial (MIs, determinados por los osteocitos a través del *mecanostato*).¹³⁵ Su valor predictivo se demostró en fracturados de Colles¹³⁶ y fue destacado por otros autores.¹³⁷⁻¹⁴⁴

Por qué “mirar hacia arriba”

Las descripciones publicadas de la traducción mecánico-biológica en los osteocitos en los niveles molecular y celular^{18-21,34,58,145} y

las crecientes alusiones a su participación en mecanismos homeostáticos sistémicos¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ inducen a creer que es posible *extrapolar* directamente esos resultados a niveles más elevados de complejidad estructural ósea. Esto puede ser correcto en algunos casos; pero, en general, el sistema que hemos delimitado como *mecanostato* comprende la organización del trabajo de sus componentes y unidades, integrada en niveles de complejidad estructural molecular, organelar, celular, tisular, orgánico y sistémico (Figura 1-b), en forma diversa y compleja.⁵⁶ Esta distinción es importante, porque, como ya se anticipó, las “perturbaciones” originadas en niveles inferiores de complejidad, que consiguen afectar

a niveles superiores, tienden a ser automáticamente *neutralizadas* por interacciones servocontroladas que tienen lugar entre todos los niveles (Figura 1-b). Curiosamente, en todos los esqueletos, el *único sistema regulatorio* conocido que comprende ese tipo de *interacciones interniveles* es el *mecanostato* óseo (Figura 2-a,b y 3), y los osteocitos son, precisamente, los encargados de trasladar las correspondientes transformaciones e interacciones a los niveles de complejidad *suprace-lulares*. Estos conceptos pueden ordenarse en un esquema sencillo (Figura 9), adaptado para su traducción elemental a la clínica, que expone la organización del control biológico de la eficacia mecánica de la estructura ósea

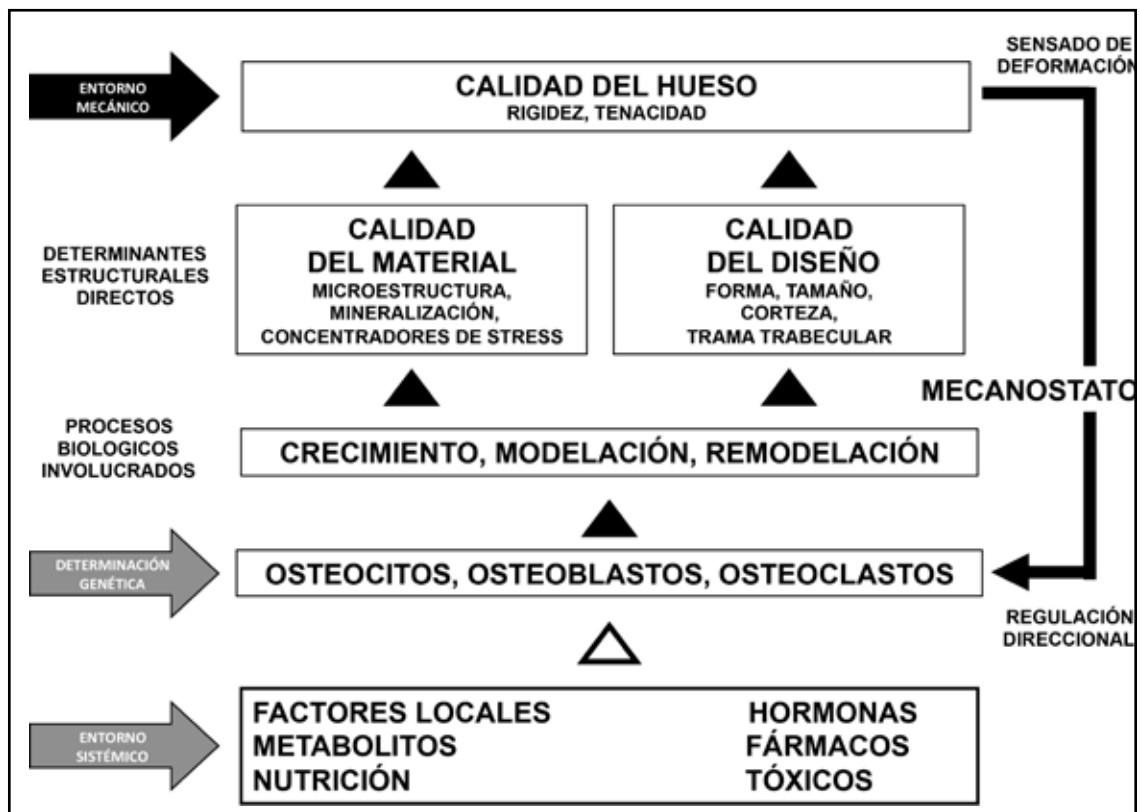


Figura 9. Esquemización “por pisos de integración” de los factores y mecanismos determinantes de la resistencia ósea a la fractura, didácticamente organizada para apreciar sus aplicaciones clínicas y terapéuticas (explicación en el texto).



en forma completa, didácticamente descripta en forma de “niveles de organización” de las propiedades correspondientes y de los procesos que las determinan, en relación con la Figura 2-a. El esquema de la Figura 9 está estructurado en “pisos” ascendentes según su grado reciente de integración. Cada piso contiene la totalidad de los factores determinantes de lo que representa y depende, en forma excluyente, del estado del piso inferior. Ergo, ningún elemento de un piso puede cambiar, si no cambia alguno de los elementos de pisos inferiores en forma suficiente como para afectarlo. Y viceversa, para que cualquier cambio producido en un piso influya sobre algún factor contenido en un piso más alto, necesariamente debe afectar a sus componentes determinantes, con la intensidad suficiente. Yendo en sentido descendente, el piso superior describe la llamada “calidad ósea”, que es la resistencia a la fractura, determinada excluyentemente por la rigidez y la tenacidad estructurales del hueso. El piso siguiente contiene los dos determinantes excluyentes de esas dos propiedades: la calidad mecánica del tejido mineralizado y la calidad arquitectónica del diseño. El siguiente expone los tres únicos mecanismos conocidos que pueden afectar esas dos calidades: el crecimiento en largo, la modelación y la remodelación. El siguiente indica las únicas células capaces de manifestar esos mecanismos: osteocitos, blastos y clastos, que constituyen el único punto de acceso al esquema de las interacciones genéticas (a la izquierda). Sobre el piso superior se muestra, a la izquierda, la influencia direccional del entorno mecánico, cuyas consecuencias (deformaciones) son sensadas por los osteocitos, pudiendo afectar por esa vía los componentes y/o las propiedades de los pisos superiores al celular (mecanismo “direccional” de funcionamiento del *mecanostato* -flechas llenas-). Y el piso inferior contiene todos los factores no mecánicos (metabólicos, sistémicos) que pueden afectar en forma no direccional el funcionamiento de

las células óseas (flecha hueca), cualquiera sea el estado funcional del *mecanostato*; y con ellas, la eficacia regulatoria biomecánica de todo el esquema. Esta forma didáctica de representación permite apreciar dos condiciones importantes para la terapéutica clínica (a nivel de complejidad *individual*), para las cuales los osteocitos desempeñan un papel protagonista central:

1) Ningún tratamiento farmacológico (piso inferior) puede producir cambios efectivos en la “calidad ósea” (piso superior) si no modula de alguna forma el funcionamiento de *al menos uno* de los componentes o propiedades de *cada uno de todos* los pisos intermedios del esquema en forma relevante. Esto explica por qué la “masa” ósea densitométrica (DMO), que no figura en el esquema, es irrelevante a esos efectos.

2) Si un tratamiento alterara por cierto tiempo el funcionamiento de cualquiera de las células óseas, y con él, el del *mecanostato* en pleno, entonces, apenas se lo suspendiera, el mismo sistema tendería rápidamente a neutralizar todo cambio inducido previamente en la eficacia estructural ósea (Tabla 1). Esta drástica observación comprende tanto los tratamientos que afectan directamente a los osteocitos, sean aplicados en forma sistémica (farmacológicos: bifosfonatos, PTH, estrógenos, calcitonina -anti-apoptóticos-) o direccional (fisioterápicos: ejercicio dirigido, con especificidad de sitio), como todos los demás tratamientos que *no parecen* afectar a los osteocitos, sino a los efectores, blastos y clastos, o al tejido óseo mismo (denosumab o similares, ranelato de estroncio, calciferoles, etc.). Los agentes antiapoptóticos han mostrado agonismo con los efectos del entorno mecánico del esqueleto sobre los osteocitos. Entre ellos, **a)** los bifosfonatos producen efectos antirremodelatorios más prolongados que las demás drogas, pero no muy intensos en términos de masa ósea, que pueden traducirse en mejoras del diseño diafisario en huesos no remodelantes (fémures de roe-

Estado del individuo	Efecto probable del tratamiento	Evolución después de suprimir
SANO (Tratamiento mal indicado)	Aumento de masa ósea mecánicamente inútil	Pérdida de toda la masa ósea inútilmente aumentada
Sin neutralizar la causa (mec, met)	Aumento de masa ósea mecánicamente útil	Pérdida de toda la masa ósea correctamente aumentada
OSTEOPÉNICO (Tratamiento bien indicado)		
Neutralizando la causa (mec, met)	Aumento de masa ósea mecánicamente útil	Conservación de sólo la masa ósea "necesaria" aumentada

Tabla 1 - Efectos transitorios que cabe esperar de tratamientos “antirremodelatorios” o “anabólicos” crónicos, que modifican la actividad de los osteoblastos y osteoclastos (**centro**) en distintos individuos (**izquierda**), y evolución más probable de los mismos hacia la desaparición luego de suspenderlos (**derecha**). Se destaca el valor de aprovechar el tiempo de tratamiento para controlar la afección responsable de la osteopenia, en individuos activos.

dores),^{48,123-126} pero no en seres humanos; sin embargo, pueden también contaminar los cristales de apatita, rigidizando demasiado la matriz y reduciendo su tenacidad, y **b)** la PTH intermitente produce aumentos “pro-modelatorios” de masa, menos persistentes, pero mucho mayores que los que inducen los bifosfonatos, que pueden traducirse convenientemente en mejoras geométricas del diseño diafisario en el radio distal humano,⁴⁹ aunque a veces puede incrementarse demasiado el *turnover* óseo. Pero, de todos modos, cualquiera de los tratamientos referidos, aplicado para prevenir o mejorar una osteopenia o una osteopatía fragilizante, producirá al menos parte de sus efectos de una manera

“antinatural” respecto de la situación previa del paciente. Por esta razón, el *mecanostato* siempre tenderá, tarde o temprano, al completar o suspender el tratamiento, a retrotraer el estado biomecánico de su esqueleto a su nivel inicial, salvo que la mejora obtenida haya respetado una direccionalidad espacial mecánicamente relevante.¹⁴⁹

Esta circunstancia parece decepcionante. Sin embargo, cuando la osteopatía fragilizante reconoce *factores causales definidos* de cualquier tipo, el período de tratamiento durante el cual el *mecanostato* trabajaría “engañado” por sus efectos (es decir: con sus umbrales de disparo desplazados) podría aprovecharse para tratar de *neutralizar*



accesoriamente al factor causal (Tabla 1). Si eso se lograra, al finalizar el tratamiento, las eventuales mejoras de la resistencia ósea (no estrictamente de la masa mineralizada) deberían mantenerse, en proporción con el grado de *neutralización etiológica* alcanzado mediante otros recursos, gracias a la orientación modelatoria/remodelatoria a cargo de los osteocitos. Nuestros estudios en animales y seres humanos sugieren que tanto la protección antirremodelatoria producida por los bifosfonatos¹²³⁻¹²⁶ como el aumento anabólico de masa ósea inducido por la PTH intermitente^{43,48} podrían ser convenientemente orientados por la indicación simultánea de ejercicios diseñados en las direcciones específicas de las cargas inductoras de las deformaciones que se desea prevenir. Otros estudios seguramente ampliarán la lista de estos potenciales recursos combinados, fármaco-fisiológicos.

No está todo dicho respecto del papel de los osteocitos como núcleos sensores del *mecanostato*. De hecho, la regulación biomecánica de los esqueletos óseos de algunos

peces carentes de osteocitos constituye todo un misterio.¹⁵⁰ Pero es cada vez más evidente que cualquier tratamiento que pretenda ejercer efectos reales sobre la estructura ósea humana debe estar orientado, primordial y “direccionalmente”, a ellos. Y parece que la única forma de conseguir eso, aparte de seleccionar el tratamiento adecuado (PTH, estrógenos, bifosfonatos), es haciendo trabajar paralelamente el esqueleto en forma específicamente orientada según los vectores a respetar... (*teleológicamente*) ... “tal como la Selección Natural parece haberlo dispuesto”.

Tal vez el lector (si ha sobrevivido hasta aquí) haya percibido que este artículo le indujo, primero, la sensación “epistemológica” de que “los *mecanostatos* no existen...”, y que, al final, terminó proponiéndole “pero que los hay, *los hay...!*”. Si así ocurrió, no tiene por qué preocuparse por el trueque de ideas: la razón de ese vuelco de opinión radica, exclusivamente y sin duda alguna, en el descubrimiento de la existencia y la forma de trabajo de los osteocitos.

**Un día descubrí el camino para saberlo todo;
pero antes de llegar al final, me desperté.**

Werner Heisenberg

(Descubridor del “Principio de Indeterminación”,
Premio Nobel de Física en 1932)

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: febrero 2014.

Aceptado: marzo 2014)

Referencias

1. Riggs DS (ed). The Mathematical Approach to Physiological Problems. Baltimore: Williams & Wilkins; 1963.
2. Maturana H, Varela F (eds). De Máquinas y Seres Vivos. Una Teoría sobre la Organización Biológica. Santiago (Chile): Ed Universitaria; 1972.
3. Penrose R. Quantum Aspects of Life. Abbott D, Davies PCW (eds). London: Imperial College Press; 2008.
4. Frost HM. Why do bone strength and "mass" in aging adults become unresponsive to vigorous exercise? Insights of the Utah paradigm. *J Bone Miner Metab* 1999b; 17: 90-7.
5. Frost HM (ed). The Utah Paradigm of Skeletal Physiology, Vols I & II. Atenas: ISMNI; 2005.
6. Hall BK (ed). Bones and Cartilage. Developmental and Evolutionary Skeletal Biology. Amsterdam: Elsevier; 2005, p. 24-32.
7. Thompson DW (ed). Sobre el Crecimiento y la Forma (Traducc. de *On Growth and Form*. Cambridge: Cambridge Univ Press; 1961). Barcelona: Blume; 1968.
8. Wainwright SA, Biggs WD, Currey JD, Gossline JM (eds). Diseño Mecánico en Organismos (Traducc. de *Mechanical Design in Organisms*. London: Edward Arnold, 1976). Barcelona: Blume; 1980.
9. Martin RB, Burr DB, Sharkey NA (eds). Skeletal Tissue Mechanics. New York: Springer; 1998.
10. Ferretti JL. Biomechanical properties of bone. Cap 8. In: Genant HK, Guglielmi G, Jergas M (eds). Bone Densitometry and Osteoporosis. Berlin: Springer; 1997, p. 143-61.
11. Currey JD. The effect of porosity and mineral content on the young modulus of elasticity of compact bone. *J Biomech* 1988; 21:131-9.
12. Carter DR, Orr TE, Fyhrie DP, Schurman DJ. Influences of mechanical stress on prenatal and postnatal skeletal development. *Clin Orthop Relat Res*. 1987; 219:237-50.
13. Frost HM. The mechanostat: a proposed pathogenetic mechanism of osteoporosis and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone Miner* 1987; 2:73-85.
14. Qiu S, Rao DS, Planiktar S, Parfitt AM. Relationships between osteocyte density and bone formation rate in human cancellous bone. *Bone* 2002; 31:709-11.
15. Qiu S, Rao DS, Planiktar S, Parfitt AM. Reduced iliac cancellous osteocyte density in patients with osteoporotic vertebral fracture. *J Bone Miner Res* 2003; 18:1657-63.
16. Parfitt AM. Life story of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragility. *J Musculoskel Neuron Interact* 2002; 2:499-500.
17. Parfitt AM. A new approach to iliac bone histomorphometry. Implications for biomechanics and cell biology. *J Clin Invest* 2014; 124:70-1.
18. Bellido T. Osteocytes and their role in bone remodeling (*Y literatura citada*). *Actual Osteol* 2013; 9:56-64.
19. Bozal CB. Los osteocitos como mecanosensores del hueso (*Y literatura citada*). *Actual Osteol* 2013; 9:176-93.
20. Klein-Nulend J, Bakker AD, Bacabac RG, Vatsa A, Weinbaum S. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone* 2013; 54:182-90.
21. Stern AR, Nicoletta DP. Measurement and estimation of osteocyte mechanical strain. *Bone* 2013; 54:191-95.
22. Engelke K, Libanati C, Fuerst T, Zysset P, Genant HK. Advanced CT based in vivo methods for the assessment of bone density, structure, and strength. *Curr Osteopor Rep* 2013; 11:246-55.
23. Ferretti JL. Peripheral quantitative computed tomography (pQCT) for evaluating structural and mechanical properties of small bone. Cap 26. In: An YH, Draughn RA (eds). Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface. Boca Raton (FL): CRC Press; 1999, p. 385-406.
24. Ferretti JL, Cointy GR, Capozza RF.



- Noninvasive analysis of bone mass, structure, and strength. Cap. 8. In: An YH (ed). Orthopaedic Issues in Osteoporosis. Boca Raton: CRC Press; 2002, p. 145-67.
25. Cowin SC. Mechanics of materials. In: Cowin SC (ed). Bone Mechanics Handbook, 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2001, p. 6.1-6.24.
26. Carter DR. Mechanical loading histories and cortical bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 1984; 36 (Suppl.1):19-24.
27. Burgers TA, Williams BO. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling within and from osteocytes. *Bone* 2013; 54:244-9.
28. Parfitt AM. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit organization and progression. *Bone* 2002; 30:5-7.
29. Burr DB. Targeted and nontargeted remodeling. *Bone* 2002; 30:2-4.
30. Martin RB. Is all cortical bone remodeling initiated by microdamage? *Bone* 2002; 30:8-13.
31. Martin RB. Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone* 2000; 6:1-6.
32. Plotkin L, Mathov I, Aguirre JI, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins Src kinases, and ERKs. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2005; 289:633-43.
33. Turner CH, Forwood MR, Rho JY, Yoshikawa T. Mechanical loading thresholds for lamellar and woven bone formation. *J Bone Miner Res* 1994; 9:87-97.
34. O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone* 2013; 54:258-63.
35. Frost HM. The role of changes in mechanical usage set points in the pathogenesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1992; 7:253-61.
36. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res* 2006; 21:605-15.
37. Lanyon LE. Functional strain in bone tissue as an objective, and controlling stimulus for adaptive bone remodelling. *J Biomech* 1987; 20:1083-93.
38. Rubin CT, Lanyon LE. Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif Tissue Int* 1985; 37:411-7.
39. Mosley JR, Lanyon LE. Strain rate as a controlling influence on adaptive modeling in response to dynamic loading of the ulna in growing male rats. *Bone* 1998; 23:313-8.
40. Burr DB. Orthopedic principles of skeletal growth, modeling and remodeling. In: Carlson DS, Goldstein SA (eds). Bone biodynamics in orthodontic and orthopaedic treatment. Ann Arbor: Univ Michigan; 1992; pp 15-50.
41. Sujiyama T, Meakin LB, Browne WJ, Galea GL, Price JS, Lanyon LE. Bones' adaptive response to mechanical loading is essentially linear between the low strains associated with disuse and the high strains associated with the lamellar/woven bone transition. *J Bone Miner Res* 2012; 27:1784-93.
42. Frost HM. On the estrogen-bone relationship and postmenopausal bone loss: A new model. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1437-7.
43. Capozza RF, Ferretti JL, Ma YF, et al. Tomographic (pQCT) and biomechanical effects of hPTH(1-38) on chronically immobilized or overloaded rat femurs. *Bone* 1995; 17:S233-9.
44. Capozza RF, Mondelo N, Reina PS, et al. Mineralization- and remodeling-unrelated improvement of the post-yield properties of rat cortical bone by high doses of olpadronate. *J Musculoskel Neuron Interact* 2013; 13:185-94.
45. Becker CB. Sclerostin inhibition for osteoporosis – a new approach. *N Engl J Med* 2014; 370:476-7.
46. Galea GL, Price JS, Lanyon LE. Estrogen receptors' roles in the control of mechanically adaptive bone (re)modeling. *BoneKey Rep* 2013; 4:413.
47. Ferretti JL, Gaffuri OH, Capozza RF, et al. Dexamethasone effects on structural, geometric and material properties of rat

- femur diaphyses as described by peripheral quantitative computerized tomography (pQCT) and bending tests. *Bone* 1995; 16:119-24.
48. Ferretti JL, Mondelo N, Capozza RF, Cointy GR, Zanchetta JR, Montuori E. Effects of large doses of olpadronate (dimethyl-pamidronate) on mineral density, cross-sectional architecture, and mechanical properties of rat femurs. *Bone* 1995; 16:285-93.
 49. Zanchetta JR, Bogado CE, Ferretti JL, et al. Effects of teriparatide [recombinant human parathyroid hormone (1-34)] on cortical bone in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2003; 18:539-43.
 50. Schiessl H, Frost HM, Jee WSS. Estrogen and bone-muscle strength and mass relationships. *Bone* 1998; 22:1-6.
 51. Bellido T, Saini V, Pajevic PD. Effects of PTH on osteocyte function. *Bone* 2013; 54:250-7.
 52. Biering-Sørensen F, Bohr HH, Scheedt OP. Longitudinal study of bone mineral content in the lumbar spine, the forearm and the lower extremities after spinal cord injury. *Eur J Clin Invest* 1990; 20:330-5.
 53. Frost HM. Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A* 2003; 275:1081-101.
 54. Frost HM. On the strength-safety factor (SF) for load-bearing skeletal organs. *J Musculoskel Neuron Interact* 2003; 3:136-40.
 55. Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* 1969; 3:211-37.
 56. Frost HM (ed). *Intermediary Organization of the Skeleton*, Vols I & II. Boca Raton: CRC Press; 1986.
 57. Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, Lanyon LE. Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J Bone Miner Res* 1989; 4:783-8.
 58. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011; 26:229-38.
 59. Frost HM, Ferretti JL, Jee WSS. Some roles of mechanical usage, muscle strength, and the mechanostat in skeletal physiology, disease, and research (Editorial). *Calcif Tissue Int* 1998; 62:1-7.
 60. Frost HM. From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its critical applications. *Anat Rec* 2001; 262:398-419.
 61. Qiu S, Rao DS, Fyhrie DP, Palnitkar S, Parfitt AM. The morphological association between microcracks and osteocyte lacunae in human cortical bone. *Bone* 2005; 37:10-5.
 62. Frost HM. Does bone design intend to minimize fatigue failures? A case for the affirmative. *J Bone Miner Metab* 2000; 28:278-82.
 63. Ferretti JL, Capozza RF, Zanchetta JR. Mechanical validation of a tomographic (pQCT) index for the noninvasive assessment of rat femur bending strength. *Bone* 1996; 18:97-102.
 64. Currey JD, Pitchford JW, Baxter PD. Variability of the mechanical properties of bone, and its evolutionary consequences. *J R Soc Interface* 2007; 4:127-35.
 65. Ferretti JL, Frost, HM. Osteopenias and osteoporoses - Muscle-bone interactions, absorptiometry, safety factors, and fracture risk. An overview. Cap.11. In: An YH (ed). *Orthopaedic Issues in Osteoporosis*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2002, p. 203-17.
 66. Ferretti JL, Capozza R, Cointy G, et al. Densitometric and tomographic analyses of musculoskeletal interactions in humans. *J Musculoskel Neuron Interact* 2000; 1:18-21.
 67. Ferretti JL, Cointy GR, Capozza RF, Frost HM. Bone mass, bone strength, muscle-bone interactions, osteopenias and osteoporoses. *Mech Ageing Devel* 2003; 124:269-79.
 68. Feldman S, Cointy GR, Sarrió L, Ferretti JL, Capozza RF. Effects of hypophysectomy and growth hormone replacement on cortical bone structure and biomechanics in rats. *Bone* 2004; 34:203-15.
 69. Capozza RF, Cointy GR, Ferretti SE, et al. Absorptiometric assessment of muscle-bone relationships in humans. Reference, validation, and application studies. *J Bone Miner Metab* 2005; 23(S):109-14.
 70. Cointy GR, Capozza RF, Negri AL, Roldán



- EJA, Ferretti JL. Biomechanical background for a noninvasive assessment of bone strength and muscle-bone interactions. *J Musculoskel Neuron Interact* 2004; 4:1-11.
71. Maganaris CN, Rittweger J, Narici MV. Adaptive processes in human bone and tendon. In: Cardinale M, Newton R, Nosaka K (eds). *Strength and Conditioning Biological Principles and Practical Applications*. Oxford: Wiley-Blackwell; 2011, p. 137-47.
72. Rittweger J, Beller G, Ehrig J, et al. Bone-muscle strength indices for the human lower leg. *Bone* 2000; 27:319-26.
73. Capozza RF, Cointy GR, Cure-Ramírez R, Ferretti JL, Cure-Cure C. A DXA study of muscle-bone relationships in the whole body and limbs of 2,512 normal men and pre- and post-menopausal women. *Bone* 2004; 35:283-95.
74. Capozza RF, Cure-Cure C, Cointy GR, et al. Association between low lean body mass and osteoporotic fractures after menopause. *Menopause* 2008; 15:1-9.
75. Cure-Cure C, Capozza RF, Cointy GR, et al. Reference charts for the relationships between DXA-assessed bone mineral content and lean mass in 3,063 normal men and pre- and post-menopausal women. *Osteopor Int* 2005; 16:2095-106.
76. Ferretti JL, Schiessl H, Frost HM. On new opportunities for absorptiometry (Editorial). *J Clin Densitom* 1998; 1:41-53.
77. Ferretti JL, Capozza RF, Cointy GR, et al. Gender-related differences in the relationships between densitometric values of whole-body bone mineral content and lean mass in humans between 2 and 87 years of age. *Bone* 1998; 22:683-90.
78. Ferretti JL, Cointy GR, Capozza RF, Zanchetta JR. Dual-energy X-ray absorptiometry. Cap. 41. In: Preedy VR, Peters TJ (eds). *Skeletal Muscle: Pathology, Diagnosis and Management of Disease*. London: Greenwich Medical Media; 2001, p. 451-8.
79. Ferretti JL, Cointy GR, Capozza RF, Capiglion R, Chiappe MA. Analysis of biomechanical effects on bone and on the bone-muscle interactions in small animal models. *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 1:263-74.
80. Rittweger J, Felsenberg D, Maganaris C, Ferretti JL. Vertical jumping performance after 90 days bed rest with and without flywheel resistive exercise, including a 180 days follow-up. *Eur J Appl Physiol* 2007; 100:427-36.
81. Rittweger J, Ferretti JL. Imaging muscle-bone relationships - how to see the invisible. *Clin Rev Bone Miner Metab*, en prensa, 2014.
82. Schiessl H, Ferretti JL, Tysarczyk-Niemeyer G, Willnecker J, Wilhelm G. The role of muscles in the mechanical adaptation of bone. In: Lyritis G (ed), *Advances in Osteoporosis*. Vol 1. Atenas: Hylonome; 1998, p. 53-62.
83. Frost HM. Defining osteopenias and osteoporoses: another view (with insights from a new paradigm). *Bone* 1997; 20:385-91.
84. Schneider P, Biko J, Reiners C, Demidchik YE, Drozd VM, Capozza RF, Cointy GR, Ferretti JL. Impact of parathyroid status and Ca and vitamin-D supplementation on bone mass and muscle-bone relationships in 208 Belarussian children after thyroidectomy because of thyroid carcinoma. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2004; 112:444-50.
85. Ulla MR, Stivala M, Noriega R, Cointy GR, Ferretti JL. Altered relationships between mineral and lean masses in obese, euglycemic, hyperinsulinemic women (Abstract). *J Bone Miner Res* 2001; 16(S1): 402.
86. Claus-Hermberg H, Fideleff H, Chervin A, et al. Effects of GH on the mineral, lean, and fat masses in pan-hypopituitary men and women (Abstract). *J Bone Miner Res* 2001; 16(S1):403.
87. Negri AL, Cointy GR, Salica D, Zanchetta JR, Ferretti JL. Bone/lean mass relationships in peritoneally-dialysed and haemodialysed men and women (Abstract). *J Bone Miner Res* 2001; 16(S1):544.
88. Ferretti JL, Mazure R, Tanoue P, et al. Analysis of the structure and strength of bones in celiac disease patients. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:382-90.

89. Roldán EJA, Ferretti JL, Cointry GR, Tau C. Bone structure and strength and muscle-bone interactions in 15 children with osteogenesis imperfecta. A pQCT study (Abstract). *J Bone Miner Res* 2002; 17(S1):379.
90. Ferretti JL, Cointry G, Plotkin H, Zanchetta JR. Structural-biomechanical pQCT analysis of the distal human radius in males and females aged 6 to 84 years. *Bone* 2000; 26:401.
91. Ferretti JL, Capozza RF, Cointry GR, et al. Menstruating women accumulate bone mineral per unit muscle mass in skeletal regions of little mechanical relevance (Abstract). *Bone* 1998; 22:705.
92. Ferretti JL, Capozza RF, Cointry GR, et al. Bone mass is higher in women than men per unit of muscle mass but bone mechanostat would compensate for the difference in the species (Abstract). *Bone* 1998; 23(5S):S471.
93. Schiessl H, Ferretti JL, Tysarczyk-Niemeyer G, Willnecker J. Noninvasive Bone Strength Index as analyzed by peripheral quantitative computed tomography (pQCT). In: Schönau E (ed). *Paediatric Osteology. New Developments in Diagnostics and Therapy*. Amsterdam: Elsevier; 1996, p. 141-5.
94. Capozza RF, Rittweger J, Reina PS, et al. pQCT-assessed relationships between diaphyseal design and cortical bone mass density in the tibiae of healthy sedentary and trained men and women. *J Musculoskel Neuron Interact* 2013; 13:195-205.
95. Ferretti JL, Spiaggi EP, Capozza R, Cointry G, Zanchetta JR. Interrelationships between geometric and mechanical properties of long bones from three rodent species with very different biomass. Phylogenetic implications. *J Bone Miner Res* 1992; 7(S2):423-5.
96. Ferretti JL, Capozza RF, Mondelo N, Montuori E, Zanchetta JR. Determination of femur structural properties by geometric and material variables as a function of body weight in rats. Evidence of a sexual dimorphism. *Bone* 1993; 14:265-70.
97. Ferretti JL, Capozza RF, Mondelo N, Zanchetta JR. Interrelationships between densitometrical, geometric and mechanical properties of rat femurs. Inferences concerning mechanical regulation of bone modeling. *J Bone Miner Res* 1993; 8:1389-96.
98. Ferretti JL. Perspectives of pQCT technology associated to biomechanical studies in skeletal research employing rat models. *Bone* 1995; 17(4S):353-64.
99. Ferretti JL, Frost HM, Gasser J, et al. Perspectives on osteoporosis research: Its focus and some insights from a new paradigm (Editorial). *Calcif Tissue Int* 1995; 57:399-404.
100. Tommasini SM, Nasser P, Schaffler M, Jepsen KJ. Relationship between bone morphology and bone quality in male tibias: implications for stress fracture risk. *J Bone Miner Res* 2005; 20:1372-80.
101. Riggs BL, Melton LJ-III, Robb RA, et al. Population-based study of age and sex differences in bone volumetric density, size, geometry, and structure at different skeletal sites. *J Bone Miner Res* 2004; 19:1945-54.
102. Russo CR, Lauretani F, Seeman E, et al. Structural adaptations to bone loss in aging men and women. *Bone* 2006; 38:112-8.
103. Sugiyama T, Takaki T, Sakanaka K, et al. Warfarin-induced impairment of cortical bone material quality and compensatory adaptation of cortical bone structure to mechanical stimuli. *J Endocrinol* 2007; 194:213-22.
104. Boyce TM, Bloebaum RD. Cortical aging differences and fracture implications for the human femoral neck. *Bone* 1993; 14:769-78.
105. Akhter MP, Cullen DM, Recker RR. Bone adaptation response to sham and bending stimuli in mice. *J Clin Densitom* 2002; 5:207-16.
106. Peng ZQ, Väänänen HK, Zhang HX, Tuukkanen J. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone* 1997; 20:207-12.
107. Negri AL, Barone R, Lombas C, Bogado CE, Zanchetta JR. Evaluation of cortical



- bone by peripheral quantitative computed tomography in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Hemodial Int* 2006; 10:351-5.
108. Martin RB, Pickett JC, Zinaich S. Studies of skeletal remodeling in aged men. *Clin Orthop* 1980; 149:268-82.
109. Ward KA, Roy DK, O'Neill TW, et al. Forearm bone geometry and mineral content in UK women of European and South-Asian origin. *Bone* 2007; 41:117-21.
110. Hasegawa Y, Schneider P, Reiners C, et al. Estimation of the architectural properties of cortical bone using peripheral quantitative computed tomography. *Osteopor Int* 2000; 11:36-42.
111. Jepsen KJ, Centi A, Duarte GF, et al. Biological constraints that limit compensation of a common skeletal trait variant lead to inequivalence of tibial function among healthy young adults. *J Bone Miner Res* 2011; 26:2872-5.
112. Svejme O, Ahlborg HG, Karlsson MK. Changes in forearm bone mass and bone size after menopause. A mean 24-year prospective study. *J Musculoskel Neuronal Interact* 2012; 12:192-8.
113. Weidauer LA, Eilers MM, Binkley TL, Vukovich MD, Specker BL. Effect of different collegiate sports on cortical bone in the tibia. *J Musculoskel Neuronal Interact* 2012; 12:68-73.
114. Smith RW, Walker RR. Femoral expansion in aging women: implications for osteoporosis and fractures. *Science* 1964; 145:156-7.
115. Kiebzak GM, Smith R, Gundberg CC, Howe JC, Sacktor B. Bone status of senescent male rats: chemical, morphometric, and mechanical analysis. *J Bone Miner Res* 1988; 3:37-45.
116. Nicholson CL, Firth EC. Assessment of bone response to conditioning exercise in the radius and tibia of young thoroughbred horses using pQCT. *J Musculoskel Neuron Interact* 2012; 10:199-206.
117. Xia X, Kar R, Gluhak-Heinrich J, et al. Glucocorticoid-induced autophagy in osteocytes. *J Bone Miner Res* 2010; 25:2479-88.
118. Yao W, Dai W, Jiang JX, Lane NE. Glucocorticoids and osteocyte autophagy. *Bone* 2013; 54:279-84.
119. Jilka RL, Noble B, Weinstein RS. Osteocyte apoptosis. *Bone* 2013; 54:264-71.
120. Ferretti JL, Vázquez SO, Delgado CJ, Capozza R, Cointry G. Biphasic dose-response curves of cortisol effects on rat diaphyseal bone biomechanics. *Calcif Tissue Int* 1992; 50:49-54.
121. Ferretti JL, Capozza RF, Cointry GR, et al. Differential effects of cortisol, deflazacort, betamethasone and dexamethasone on rat femur biomechanics (Abstract). *Calcif Tissue Int* 1994; 4:349 (Premio ICCRH 1994).
122. Ferretti JL, Capozza RF, Cointry GR, Delgado CJ, Zanchetta JR. Monophasic dose-response curves of betamethasone on geometric and mechanical properties of femur diaphyses in growing rats. *Bone* 1995; 16:103-8.
123. Cointry GR, Mondelo N, Zanchetta JR, Montuori E, Ferretti JL. Intravenous olpadronate restores ovariectomy-affected bone strength. A mechanical, densitometric and tomographic (pQCT) study. *Bone* 1995; 17(4S):373-8.
124. Ferretti JL, Cointry G, Capozza R, Montuori E, Roldán E, Pérez Lloret A. Biomechanical effects of the full range of useful doses of (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1,1-bisphosphonate (APD) on femur diaphyses and cortical bone tissue in rats. *Bone Miner* 1990; 11:111-22.
125. Ferretti JL. Effects of bisphosphonates on bone biomechanics. Cap.14. In: Bijvoet OLM, Canfield R, Fleisch H, Russell RGG (eds). *Bisphosphonate on Bones*. Amsterdam: Elsevier; 1995, p. 211-29.
126. Ferretti JL, Delgado CJ, Capozza RF, et al. Protective effects of disodium etidronate and pamidronate against the biomechanical repercussion of betamethasone-induced osteopenia in growing rat femurs. *Bone Miner* 1993; 20:265-76.

127. Cointry GR, Negri AL, Ferretti JL. Biomechanical impact of aluminum accumulation in rat cortical bone. *J Bone Miner Metab* 2005; 23:15-23.
128. Di Masso R, Font MT, Capozza RF, Detarsio G, Sosa F, Ferretti JL. Long-bone biomechanics in mice selected for body conformation. *Bone* 1997; 20:539-45.
129. Capozza RF, Feldman S, Mortarino P, et al. Structural analysis of the human tibia by tomographic (pQCT) serial scans. *J Anat* 2010; 216:470-81.
130. Feldman S, Capozza RF, Mortarino PA, et al. Site and sex effects on tibia structure in distance runners and untrained people. *Med Sci Sports Exerc* 2012; 44:1580-8.
131. Wilks DC, Winwood K, Gilliver SF, et al. Bone mass and geometry of the tibia and the radius of Master sprinters, middle and long distance runners, race-walkers, and sedentary control participants: A pQCT study. *Bone* 2009; 45:91-7.
132. Rittweger J, Goosey-Tolfrey VL, Cointry GR, Ferretti JL. Structural analysis of the human tibia in men with spinal cord injury by tomographic (pQCT) serial scans. *Bone* 2012; 47:511-8.
133. Ferretti SE, Capozza RF, Cointry GR, et al. Different influence of the clinical condition, degree of cholestasis, alcohol abuse and serum calcium on the musculoskeletal system in chronic cirrhotics (Abstract). *J Bone Miner Res* 2008; 23(Suppl):477.
134. Davy DT. Basic principles in bone biomechanics. *Curr Opin Orthop* 1997; 8:48-57.
135. Cointry GR, Ferretti JL, Reina PS, Nocciolino LM, Rittweger J, Capozza RF. The pQCT "Bone Strength Indices" (BSI's, SSI's). Relative mechanical impact and diagnostic value of the indicators of bone tissue and design quality employed in their calculation in healthy men and pre- and post-menopausal women. *J Musculoskel Neuron Interact*, en prensa, 2014.
136. Schneider P, Reiners C, Cointry GR, Capozza RF, Ferretti JL. Bone quality parameters of the distal radius as assessed by pQCT in normal and fractured women. *Osteopor Int* 2001; 12:639-46.
137. Ahlborg HG, Johnell O, Turner CH, Rannevik G, Karlsson MK. Bone loss and bone size after menopause. *N Engl J Med* 2003; 349:327-34.
138. Martin DE, Severns AE, Kabo JM. Determination of mechanical stiffness of bone by pQCT measurements: Correlation with non-destructive mechanical four-point bending test data. *J Biomech* 2004;37:1289-93.
139. Macdonald H, Kontulainen S, Petit M, Janssen P, McKay H. Bone strength and its determinants in pre- and early pubertal boys and girls. *Bone* 2006;39:598-608.
140. Rauch F, Schönau E. Peripheral quantitative computed tomography of the proximal radius in Young subjects. New reference data and interpretation of results. *J Musculoskel Neuron Interact* 2008;8:217-26.
141. Engelke K, Adams JE, Armbrrecht G, et al. Clinical use of quantitative computed tomography and peripheral quantitative computed tomography in the management of osteoporosis in adults: the 2007 ISCD official positions. *J Clin Densitom* 2008;11:123-62.
142. Kokoroghiannis C, Charopoulos I, Lyritis G, Raptou P, Karachalios T, Papaioannou N. Correlation of pQCT bone strength index with mechanical testing in distraction osteogenesis. *Bone* 2009;45:512-6.
143. Ashby RL, Ward KA, Roberts SA, Edwards L, Mughal LZ, Adams JE. A reference database for the Stratec XCT-2000 peripheral quantitative computed tomography (pQCT) scanner in healthy children and young adults aged 6-19 years. *Osteopor Int* 2009;20:1337-46.
144. Sheu Y, Zmuda JM, Boudreau RM, et al. Bone strength measured by peripheral quantitative computed tomography and the risk of nonvertebral fractures: the Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study. *J Bone Miner Res* 2011;26: 63-71.
145. Webster DJ, Schneider P, Dallas SL,



- Müller R. Studying osteocytes within their environment. *Bone* 2013; 54:285-95.
146. Feng JQ, Clickenbeard EL, Yuan B, White KE, Drezner MK. Osteocyte regulation of phosphate homeostasis and bone mineralization underlies the pathophysiology of the heritable disorders of rickets and osteomalacia. *Bone* 2013; 54:213-21.
147. Wesseling-Perry K, Jüppner H. The osteocyte in CKD: new concepts regarding the role of FGF23 in mineral metabolism and systemic complications. *Bone* 2013; 54:222-9.
148. Lieben L, Carmaliet G. Vitamin D signalling in osteocytes: effects on bone and mineral homeostasis. *Bone* 2013; 54:237-43.
149. Manolagas SC, Parfitt AM. For whom the bell tolls: distress signals from long-lived osteocytes and the pathogenesis of metabolic bone diseases. *Bone* 2013; 54:272-8.
150. Shahar R, Dean MN. The enigmas of bone without osteocytes. *BoneKey Rep* 2013; 2: Art No. 343.

RECONOCIMIENTOS

- Los trabajos referidos de los autores fueron apoyados por sucesivos subsidios del CONICET, de la SECyT/MinCyT, y del Consejo de Investigaciones de la UNR.

- La Fundación de Investigaciones Metabólicas (FIM) de Buenos Aires, dirigida por el Dr José R Zanchetta, apoyó la concreción de los doctorados de dos de los autores (GRC, RFC) en la UBA, la vinculación internacional

de todo el Grupo, y la presentación de más de 400 ponencias fuera del País, relativas a la temática de este artículo.

Entre los eventos referidos destacan los Sun Valley Workshops on Hard Tissue Biology”, en los cuales uno de nosotros (JLF) tuvo ocasión de discutir directamente con el Dr. HM Frost, durante una semana cada año desde 1991 hasta 2005, todos los aspectos de este artículo referidos con su autoría.

“Macondo era entonces una aldea de 20 casas de barro y cañabrava construidas a la orilla de un río de aguas diáfanas que se precipitan por un lecho de piedras pulidas, blancas enormes como huevos prehistóricos. El mundo era tan reciente, que muchas cosas carecían de nombre, y para mencionarlas había que señalarlas con el dedo”.

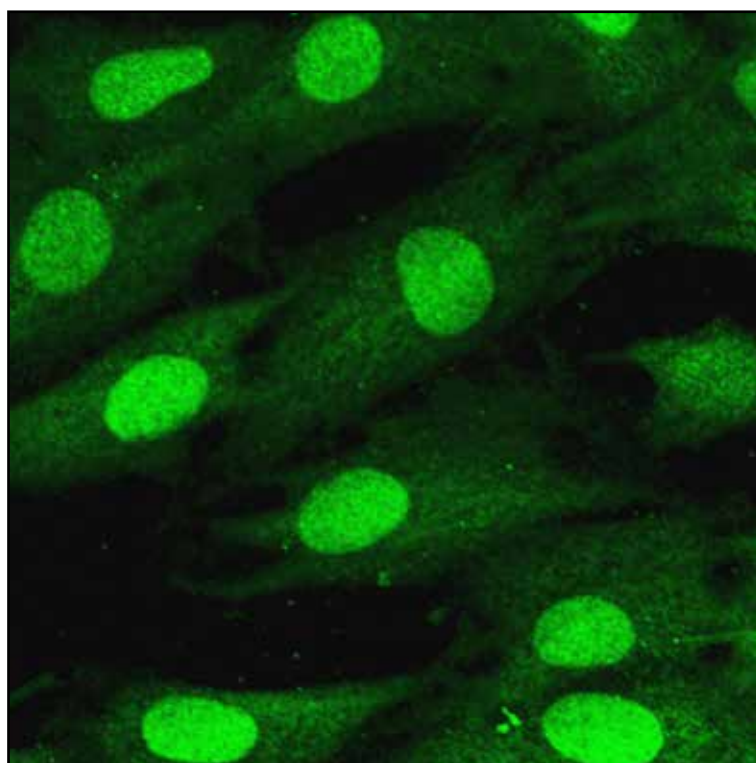
Cien años de Soledad (1967)
Gabriel García Márquez (1927-2014)

IMÁGENES EN OSTEOLOGÍA / *Imaging in Osteology*

EL RECEPTOR DE LA VITAMINA D EN CÉLULAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

Ana Paula Irazoqui, Ricardo Boland, Claudia Buitrago

Laboratorio de Química Biológica, Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-INBIOSUR (CONICET).



Células C2C12 en estadio proliferativo estimuladas con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que fueron incubadas con un anticuerpo primario antirreceptor de vitamina D (VDR) y un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo verde. La foto obtenida en un microscopio confocal muestra la localización intracelular, predominantemente nuclear, del VDR.

* Correo electrónico: cbuitrag@criba.edu.ar



IMÁGENES EN OSTEOLOGÍA / *Imaging in Osteology*

DIAGNÓSTICO DE LAS CALCIFICACIONES VASCULARES POR MÉTODOS RADIOLÓGICOS SEMICUANTITATIVOS

Guillermo Rosa Diez,¹ María Soledad Crucelegui,¹ Griselda Irina Bratti,¹ María Diehl,² Ana María Galich²

1. Servicio de Nefrología y 2. Servicio de Endocrinología del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Las calcificaciones vasculares se observan determinadas mediante la radiología convencional. Este método constituye una herramienta de bajo costo y de vital importancia para la toma de decisiones terapéuticas en pacientes con enfermedad renal crónica.¹

La radiología permite evaluar la presencia o ausencia de las calcificaciones vasculares, y realizar diferentes índices para transformar este método cualitativo en uno semicuantitativo, de esta manera, valorar el desarrollo de la afección, así como también su evolución. Para tal propósito se han descrito dos formas de evaluar las calcificaciones vasculares, uno es el Score de Adragao² y el otro es el Índice de Kauppila.³

Para una adecuada interpretación y seguimiento, se requiere considerar, por un lado, una técnica apropiada para la adquisición de las radiografías (determinación del foco y extensión) y, por el otro, una evaluación semicuantitativa para determinar el grado de calcificación.

1) Score de Adragao

a) Técnica

Se requieren radiografías (Rx) de frente de mano y una panorámica de pelvis.

En la Rx de pelvis el foco debe situarse sobre el punto medio de la línea que une ambas espinas ilíacas anterosuperiores; y la extensión debe iniciarse 2 a 3 cm por encima de las crestas ilíacas hasta 2 cm por debajo del borde inferior de ambos isquiones. En el caso de las manos, las radiografías se toman por separado (una por cada mano), haciendo foco en el carpo y con una extensión que incluya toda la mano, el carpo y el tercio distal radiocubital.

b) Evaluación

La Rx de pelvis se divide en cuatro cuadrantes con dos líneas imaginarias, una vertical que pasa por las apófisis espinosas de la columna y otra horizontal, por encima de la cabeza de los fémures (Figura 1).

La Rx de ambas manos, de frente, también

* Correo electrónico: guillermo.rosadiez@hospitalitaliano.org.ar

se divide en cuatro cuadrantes con una línea imaginaria vertical entre ambas manos y una línea horizontal situada a la altura de los huesos del carpo (Figura 2). De esta manera obtenemos ocho cuadrantes. En cada uno de ellos se debe observar si existe calcificación vascular. Su presencia en cada cuadrante nos da 1 punto, y su ausencia, 0; el índice comprende

de 0 a 8 puntos. El diagnóstico de las calcificaciones vasculares mediante este índice con un valor mayor de 3 se correlacionó con un importante grado de enfermedad vascular, internación y muerte por causa cardiovascular.² Con la aplicación de este método es posible diagnosticar las calcificaciones en la arteria femoral, la ilíaca, la radial y las digitales.



Figura 2. Rx de frente de mano. Se observan las líneas que delimitan los cuatro cuadrantes (ver texto).



Figura 2. Rx de frente de mano. Se observan las líneas que delimitan los cuatro cuadrantes (ver texto).

2) Índice de Kauppila

a) Técnica

Se requiere una Rx de perfil de abdomen, con foco en lumbar 4 y con una extensión desde dorsal 11/12 hasta el coxis.

b) Evaluación

La arteria aorta con calcificación debe ser identificada como una estructura tubular por delante de la cara anterior de la columna vertebral (Figura 3). Solo se considera el segmento de la aorta abdominal correspondiente a la altura de la primera a cuarta vértebra lumbar. La puntuación va de 1 a 3 (1 = leve, 2 = moderada, 3 = grave) de acuerdo con la

longitud de cada placa calcificada, identificada a lo largo del perfil anterior y posterior de la aorta, situado a nivel de cada vértebra lumbar considerada (Figura 4). Por lo tanto, el índice puede variar desde 0 a un máximo de 24 puntos, lo que corresponde a un máximo por vértebra de 6 puntos (grave = 3 de anterior + 3 de posterior) teniendo en consideración las cuatro vértebras lumbares.

Bellasi y cols. demostraron una buena correlación entre las calcificaciones vasculares diagnosticadas mediante el índice Kauppila y las calcificaciones coronarias diagnosticadas mediante tomografía computarizada por haz de electrones.⁴



El diagnóstico de las calcificaciones vasculares debe ser incluido dentro de la evaluación y decisión terapéutica de los trastornos del metabolismo fosfocálcico de los pacien-

tes con enfermedad renal crónica.⁵ Una adecuada técnica radiológica es una herramienta útil y accesible para lograrlo.



Figura 3. Rx de perfil de abdomen. Se visualiza raquis lumbar y aorta calcificada.

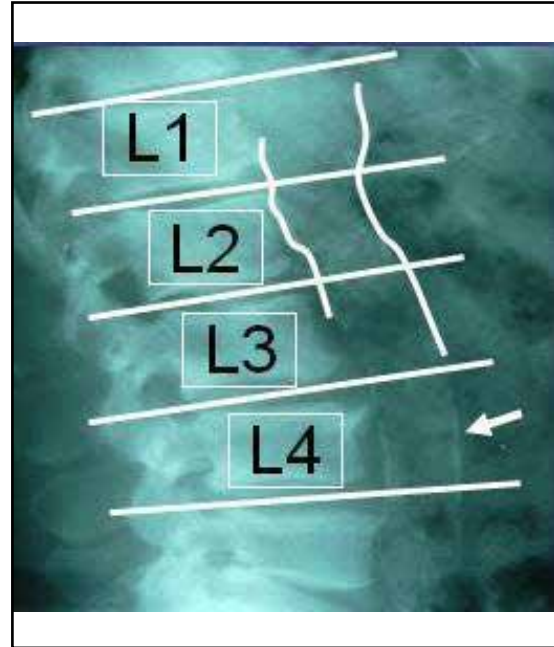


Figura 4. Identificación de longitud de cada placa calcificada según posición de las vértebras (ver texto).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: marzo de 2014.

Aceptado: marzo de 2014)

Referencias

1. Alles A, Aralde A, Carreras R, et al. Consenso Metabolismo Óseo y Mineral. *Nefrología Argentina* 2010; 8 (1): 13-46.
2. Adragao T, Pires A, Lucas C, et al. A Simple Vascular Calcification Score Predicts Cardiovascular Risk in Haemodialysis Patients. *Nephrol Dial Transpl* 2001; 19: 1480-8.
3. Kauppila LI, Polak JF, Cupples LA. New indices to classify location, severity and progression of calcific lesion in the abdominal aorta: a 25-years follow-up study. *Atherosclerosis* 1997; 132: 245-50.
4. Bellasi A, Ferramosca E, Muntner P, et al. Correlation of simple imaging test and coronary artery calcium measured by computed tomography in hemodialysis patients. *Kid Int* 2006; 70: 1623-8.
5. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group KDIGO. Clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009; 113: S1-130.

CONTROVERSIAS / *Controversies*

CONTROVERSIAS EN LA MEDICIÓN DE 25-HIDROXIVITAMINA D

Erich Fradinger*

Instituto de Investigaciones Metabólicas, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

En los últimos años ha habido un importante incremento en la demanda a los laboratorios de determinaciones de vitamina D. Como consecuencia se han desarrollado varios ensayos automatizados para tratar de cubrir esa demanda, reemplazando los ensayos manuales. Los ensayos automatizados afrontan dificultades técnicas, como la naturaleza hidrofóbica de la 25-hidroxivitamina D, múltiples compuestos relacionados circulantes, fuerte afinidad a proteínas, linealidad de los ensayos, etc. La utilización de un método de referencia internacional, materiales estándar de referencia y procedimientos específicos proveen los medios para que los fabricantes estandaricen sus métodos. No hay duda de que los últimos ensayos automatizados y cromatográficos han mejorado sus *performances* pero aún existen discrepancias, lo que obliga a analizar cada ensayo con precaución. Dados los múltiples problemas que afectan el desempeño de los ensayos de 25-hidroxivitamina D sería esencial que los laboratorios implementaran estrictos procedimientos de control de calidad. La participación en con-

troles de calidad externos es también esencial, así como recomendable que los pacientes sean monitorizados en el mismo laboratorio y con la misma metodología.

Summary

CONTROVERSIES IN MEASURING 25-HYDROXYVITAMIN D

There has been an important increase in demand for the laboratory assessment of vitamin D. As a consequence, a number of automated assays have been developed to cope with that demand, replacing manual techniques. Automated assays confront with technical difficulties such as hydrophobic nature of 25-hydroxyvitamin D, multiple related compounds in serum, strong binding to proteins, assay linearity, etc. The use of an International Reference Method, Standard Reference Materials and specific procedures provide the means for manufacturers to accurately standardize their methods. There is no doubt that the latest automated

* Correo postal: Instituto de Investigaciones Metabólicas, Buenos Aires, Argentina. Libertad 836 1er piso. CABA. Correo electrónico: efradinger@idim.com.ar



and chromatographic assays have improved their performances, but discrepancies are still present so that each assay must be analyzed carefully. Given the multiple problems affecting the performance of 25-hydroxyvitamin D assays it would be essential that laboratories implement strict quality control procedures. Participation in external quality assessment schemes is also essential and it is recommended that each patient must be followed always at the same laboratory and with the same methodology.

Introducción

La vitamina D₃ (colecalfiferol) se sintetiza en piel a partir de su precursor 7-dehidrocolesterol por acción de los rayos ultravioleta tipo B, o se absorbe a nivel intestinal por ingesta. Circula en sangre unida a su proteína ligadora (DBP). En el hígado es hidroxilada en carbono 25 por la 25-hidroxilasa (enzima que no tiene regulación homeostática) generando 25-hidroxivitamina D (25OHD). Esta molécula tiene vida media larga y es utilizada como indicador del estado nutricional de vitamina D.

La vitamina D₂ (ergocalciferol) es de origen vegetal, se absorbe a nivel intestinal por ingesta y se hidroxila de forma similar a la vitamina D₃.

La 25OHD también circula unida a DBP y en riñón es hidroxilada en carbono 1 por la enzima 1 alfa-hidroxilasa generando la 1,25-dihidroxivitamina D. Si bien esta última es el metabolito activo, no se lo utiliza como marcador de estado nutricional por su vida media corta y porque su síntesis está estrictamente regulada por la hormona paratiroidea, el calcio, el fósforo y el FGF23.

El primer ensayo de 25OHD fue desarrollado por Haddad y col. en 1971¹; usaba como ligando la DBP y 25OHD tritiada como trazador, aislando la 25OHD con cromatografía a baja presión. Belsey y col.² lo simplificaron eliminando el paso cromatográfico (lo que se llamó ensayo directo), pero este tenía muchos

problemas de matriz y daba como resultado valores más elevados por interferencias de metabolitos que no eran purificados en la cromatografía. Este dato no es menor, ya que trabajos muy conocidos y citados a lo largo de los años usaron este método de análisis.³

El primer radioinmunoensayo que utilizó un anticuerpo específico para 25OHD₂ y 25OHD₃ fue desarrollado por Hollis usando como trazador 25OHD tritiada.⁴ Luego se modificó usando 25OHD yodada como trazador.⁵

Este ensayo se ha usado durante años para informar el estado nutricional de vitamina D internacionalmente y con él se han definido los actuales niveles de corte de deficiencia o suficiencia de vitamina D.⁶

Paralelamente también se desarrollaron técnicas como cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y cromatografía líquida asociada a espectrometría de masa (LC-MS/MS). Ambos métodos pueden cuantificar por separado la 25OHD₂ y la 25OHD₃.

Con el avance del conocimiento científico asociando niveles circulantes de 25OHD a acciones clásicas (metabolismo fosfocálcico) y no clásicas (enfermedad cardiovascular, diabetes, esclerosis múltiple, cáncer de mama, de colon, de próstata, etc.), las solicitudes de determinaciones de 25OHD a los laboratorios se ha incrementado en niveles difíciles de manejar con técnicas manuales. Por eso se han desarrollado ensayos comerciales adaptables a plataformas automáticas de más fácil acceso para facilitar la tarea a los laboratorios. La mayoría de estos ensayos usan anticuerpos coespecíficos para 25OHD₂ y 25OHD₃ y sus principales características se hallan bien descriptas.⁷

Las controversias que rodean la medición de 25OHD están directamente relacionadas con los problemas que existen para determinarla en el laboratorio: su naturaleza altamente hidrofóbica, su fuerte unión a la DBP, la presencia de múltiples metabolitos de vitamina D que pueden interferir en los ensayos, la estandarización adecuada, la linealidad de los ensayos, etcétera.

Disociación de la 25OHD de su proteína ligadora

Este paso es clave en el ensayo ya que se requiere para el análisis que la 25OHD no esté unida a su proteína ligadora. Con el radioinmunoanálisis (RIA) la precipitación de la muestra con acetonitrilo asegura la liberación de la 25OHD y el ensayo se lleva a cabo en un tubo distinto de aquel en el cual se hace la separación.

En los ensayos automatizados, cada proveedor tiene su propio sistema de liberación (cambios de pH, reactivos en concentraciones no divulgadas, etc.) y aseguran que la disociación de la 25OHD es total. Cabe destacar aquí que el ensayo se hace en la misma copa en la que se realiza la disociación, lo que hace que sea susceptible de interferencia con otros compuestos. Un estudio muy interesante demuestra que la misma DBP puede interferir en los ensayos automatizados al observarse una relación inversa entre concentración de DBP y 25OHD.⁸ Es decir, no todos los ensayos existentes podrían utilizarse en pacientes con distintas patologías en las que se encuentre alterada la concentración de DBP. Tener muy en cuenta a los pacientes hemodializados, pacientes críticos y embarazadas.

Especificidad

Este problema también es central. Resulta indispensable que el anticuerpo reconozca a la 25OHD₃ y la 25OHD₂ ya que en varios países medican a los pacientes con vitamina D₂. Cruzamientos menores con 25OHD₂ pueden subestimar los valores de 25OHD total. El caso más conocido fue el del inmunoensayo automatizado de Nichol's, que al poco tiempo de comercializado tuvo que ser dado de baja por subestimar la concentración de 25OHD₂.

Todos los ensayos (RIA y automatizados) cruzan 100% o más con el metabolito 24, 25 (OH)₂ D cuyos valores oscilan entre 10 y 15% del valor total de 25OHD. Esto obviamente sobreestima los valores de 25OHD total.

Los epímeros son moléculas con estruc-

tura idéntica pero con configuración estereoquímica diferente. Se ha informado que el C-3 epi-25OHD circula tanto en niños como en adultos. El cruzamiento con este compuesto está descrito según los fabricantes⁷ y la mayoría de los ensayos basados en LC-MS/MS cruzan con él.

Los isóbaros son moléculas con el mismo peso molecular que la 25OHD y que interfieren específicamente en los ensayos LC-MS/MS, ya que generan pares iónicos con la misma relación carga/masa que la 25OHD. Ejemplos de isóbaros son el 7 α -hidroxi-4-colesten-3-uno (precursor de ácido biliar) y el 1 α -OHD₃, fármaco utilizado en pacientes renales crónicos.⁹

Estandarización

Según informes recientes del Programa de Control de Calidad Externo DEQAS (*Vitamin D External Quality Assessment Scheme*), se ha verificado una mejora en la precisión entre todas las metodologías utilizadas en los laboratorios participantes.¹⁰ Sin embargo, esto no implica una mayor exactitud en los resultados. Para avanzar en el tema se necesitan un método de referencia internacional, materiales de referencia estándar (SRM) y procedimientos específicos para asegurar la estandarización. Estos temas ya han sido publicados y explicados en detalle.¹¹⁻¹³

El SRM 972 ha sido suplantado por el SRM 972a por problemas de conmutabilidad para los inmunoensayos, pero el SRM 2972 (calibradores en solución alcohólica) sigue vigente.

Un problema muy común en el análisis bioquímico de esteroides es la preparación de los estándares utilizados en cada ensayo. Algunos se presentan como "basados en suero humano" ("human serum based"), preparados con sueros a los que se les efectuó la remoción de los esteroides con carbón activado, técnica que requiere la acidificación de estos. Esto crea una matriz distinta del suero del paciente y puede ser otra causa de diferencias entre métodos.



Para proseguir con el proceso de mejora continua, el NIH (*National Institute of Health*) en colaboración con el NIST (*National Institute for Standards and Technology*), el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) y la Universidad de Ghent en Bélgica han lanzado el Programa de Estandarización de Ensayos de vitamina D (VDSP), con el que se espera que todos los proveedores de reactivos y laboratorios con ensayos propios (*in-house*) logren una adecuada estandarización.¹⁴

Ensayos

La literatura en los últimos dos años es abundante en cuanto a comparaciones entre los recientes ensayos automatizados vs. RIA o vs. HPLC o vs. LC-MS/MS.¹⁵⁻²³ Es esperable que por todo lo planteado anteriormente se compruebe variabilidad entre los ensayos automatizados, variabilidad con respecto a LC-MS/MS, variabilidad en respuesta a los SRM, distinta linealidad, etc. Diferentes cálculos estadísticos: regresiones Passing-Bablok u otras, análisis de Bland-Altman, coeficientes de correlación de concordancia (CCC), análisis Kappa, confirman esas diferencias. Es imprescindible que cada método sea evaluado con precaución, ya que dos métodos pueden ser comparables en ciertos rangos de concentración de 25OHD y no en otros rangos. Las diferencias entre métodos ponen en duda el uso de un único valor de corte y sugieren que la prevalencia de déficit es dependiente del ensayo. Es decir, un paciente puede ser clasificado como suficiente o insuficiente según el método que se use. Más aún, debido a estas diferencias se ha propuesto calcular un valor de corte específico para cada ensayo, lo que dificultaría también el seguimiento del paciente en el tiempo, ya que el laboratorio puede cambiar el método.

Es muy interesante observar el comportamiento de los ensayos en programas conducidos por organismos especializados. El NIST instauró el "*Vitamin D Metabolites Quality Assurance Program*" (VitDqap). En forma gratuita, los laboratorios pueden inscribirse, re-

cibir las muestras del programa y evaluar sus resultados comparando con valores medidos en el NIST con métodos de referencia.²⁴ Para casi todos los SRM enviados por VitDqap, los laboratorios que usan inmunoensayos y los que usan LC-MS/MS informan resultados más altos que el NIST; muy probablemente este desvío se deba a los factores anteriormente expuestos.

La clínica

Con todas las fuentes de variables expuestas, la pregunta que puede surgir en la comunidad médica es qué hacer ante un resultado de vitamina D. Por supuesto que lo ideal es que los proveedores continúen (y lo hacen) mejorando sus ensayos para lograr mayor precisión, mayor exactitud, trazabilidad a métodos y utilización de estándares de referencia, reformulación de sus curvas de calibración, disminución de la variabilidad lote a lote, etc. Se debe considerar que todo valor que se obtiene de una técnica analítica es solo una estimación del valor real, debido a la incertidumbre de la medida.²⁵ Si hablamos de un valor de corte, siempre es importante conocer la incertidumbre alrededor de ese valor de corte. Mientras tanto, las Guías Clínicas de la Endocrine Society⁶ sugieren textualmente: "todas las metodologías son adecuadas si uno apunta a valores más altos que los actuales puntos de corte". Esto concuerda con Cavalier y col.,²⁶ en un trabajo de 2009 en el cual (por la fecha en que se realizó) no se evaluaron todos los ensayos hoy disponibles. Considerando la incertidumbre de la medida, sugirieron que el valor "real" de un paciente va a ser mayor de 32 ng/ml, si el valor medido es mayor de 40 ng/ml. Textualmente: "si el médico considera que el status adecuado de vitamina D es definido como mayor a 32 ng/ml, deberá asegurarse que el paciente tenga un valor mayor a o igual a 40 ng/ml". En un editorial reciente, un reconocido experto en el tema²⁷ sugiere que no hay mayores problemas (desde el punto de vista clínico) si los informes del control de cali-

dad de cada laboratorio entran en la media del control externo DEQAS, sumado a un estricto control interno (CV interensayo <10%).

En esta misma sección y revista, Mastaglia y col.²⁸ describieron perfectamente las diferencias de criterios entre el IOM (*Institute of Medicine*) y la CMI (Comunidad Médica Internacional especializada en vitamina D) acerca de los niveles adecuados de vitamina D. Un análisis muy detallado sobre la base de Medicina Basada en la Evidencia se ha publicado recientemente.²⁹ Asimismo, Sánchez y col.³ publicaron la *Guía práctica de diagnóstico, prevención y tratamiento de la hipovitaminosis D*, donde también se analizan estos temas. Cuando se habla de valores de corte tan definidos (20 ng/ml o 30 ng/ml) sería muy importante tener en cuenta todos los factores aquí enunciados.

Cabe hacerse otra pregunta: con el advenimiento del método de referencia LC-MS/MS establecido por organismos especializados, ¿no sería necesario reevaluar el corte de 30 ng/ml? ¿o el de 20 ng/ml? Es una tarea extremadamente difícil, ya que habría que volver a estudiar la 25OHD poblacional (medida por ese método) y relacionarla con absorción de calcio, supresión de hormona paratiroidea, densidad mineral ósea, reducción del riesgo de caídas y fracturas, riesgo de osteomalacia, acciones no clásicas, etcétera.

Conflicto de intereses

El autor declara no tener conflictos de intereses.

(Recibido: enero 2014.

Aceptado: marzo 2014)

Referencias

1. Haddad JG, Chyu KJ. Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33: 992-5.
2. Belsey RE, DeLuca HF, Potts JT Jr. A rapid assay for 25OHvitamin D without preparative chromatography. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38: 1046-51.
3. Sánchez A, Oliveri B, Mansur JL, Fradinger E, Mastaglia S. Diagnóstico, prevención y tratamiento de la hipovitaminosis D. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo* 2013; 50: 140-56.
4. Hollis B, Napoli JL. Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D status. *Clin Chem* 1985; 31: 1815-9.
5. Hollis B, Kamerud JQ, Selvaag SR, Lorenz JD, Napoli JL. Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an ¹²⁵I-labeled tracer. *Clin Chem* 1993; 39: 529-33.
6. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, y col. Evaluation, Treatment, and Prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1911-30.
7. Farrell CJ, Herrmann M. Determination of vitamin D and its metabolites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27: 675-88.
8. Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. *Clin Chem* 2012; 58: 543-8.
9. Shah I, James R, Barker J, Petroczi A, Naughton D. Misleading measures in vitamin D analysis: a novel LC-MS/MS assay to account for epimers and isobars. *Nutr J* 2011; 10:46.
10. Carter GD. 25-hydroxyvitamin D: a difficult analyte. *Clin Chem* 2012; 58:486-8.
11. Tai SS, Bedner M, Phinney KW. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ in human serum using isotope-dilution liquid chromatog-



- raphy/tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2010; 82: 1942-8.
12. Phinney K. Development of a standard reference material for vitamin D in serum (review). *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 511-2S.
 13. Thienpont L, Stepman H, Vesper H. Standardization of measurements of 25-hydroxyvitamin D3 and D2. *Scand J Clin Lab Invest* 2012; 72:41-9.
 14. Sempos CT, Vesper H, Phinney K, Tienpoint L, Coates P. Vitamin D status as an international issue. National surveys and the problem of standardization. The VDSP. *Scand J Clin Lab Invest* 2012; 242:32-40.
 15. Farrell SJ, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State of the art Vitamin D assays. Comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem* 2012; 58:531-42.
 16. Ong L, Saw S, Sahabdeen N, Tey K, Ho C, Sethi S. Current 25-hydroxyvitamin D assays: Do they pass the test? *Clin Chim Acta* 2012; 413:1127-34.
 17. Moon H, Cho J, Song J, Park C, Yun Y, Kim J. Comparison of four current 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Biochem* 2012; 45:326-30.
 18. Chen Y, Kinney L, Bozovic A, et al. Performance evaluation of Siemens ADVIA Centaur and Roche MODULAR analytix E170 total 25-OH vitamin D assays. *Clin Biochem* 2012; 45:1485-90.
 19. Tahsin-Swafiri A, Blanco Navarro I, Pérez Sacristán B, Millán I, Granado-Lorencio F. The prevalence of vitamin D deficiency in clinical practice is assay-dependent. *Clin Nutr* 2012; 6: 1011-4.
 20. Shu I, Pina Oviedo S, Quiroga Garza G, Meng Q, Wang P. Influence of vitamin D2 percentage on accuracy of 4 commercial total 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Chem* 2013; 59:1273-5.
 21. Glendenning P, Inderjeeth C. Vitamin D: Methods of 25 hydroxyvitamin D analysis, targeting at risk populations and selecting thresholds of treatment. *Clin Biochem* 2012; 45:901-6.
 22. Janssen M, Wielders J, Bekker C, et al. Multicenter comparison study of current methods to measure 25-hydroxyvitamin D in serum. *Steroids* 2012; 77:1366-72.
 23. Farrell C, Soldo J, Williams P, Herrmann M. 25-hydroxyvitamin D testing: challenging the performance of current automated immunoassays. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50:1953-63.
 24. Bedner M, Lippa K, Tai S. An Assessment of 25-hydroxyvitamin D measurements in comparability studies conducted by the Vitamin D Metabolites Quality Assurance Program. *Clin Chim Acta* 2013; 426:6-11.
 25. Cembal S, Ambrosio J, Aranda C, et al. Intra-assay total uncertainty of results in immunoassay techniques. *J Immunoassay Immunochem* 2004; 25: 1-15.
 26. Cavalier E, Rozet E, Gadisseur R, Carlisi A, Monge M, Chapelle J, et al. Measurement uncertainty of 25-OH vitamin D determination with different commercially available kits: impact on the clinical cut offs. *Osteoporosis Int* 2010; 21:1047-52.
 27. Vieth R. The future of vitamin D, i.e. 25-hydroxyvitamin D, testing. *Clin Biochem* 2013; 46: 189.
 28. Mastaglia S, Watson D, Oliveri B. Controversia sobre los niveles adecuados de vitamina D para la salud ósea propuestos por el Instituto de Medicina de los Estados Unidos y la Comunidad Internacional. *Actual Osteol* 2013; 9:207-16.
 29. Bouillon R, Van Schoor N, Gielen E, Boonen S, Mathieu C, Vanderschueren D, Lips P. Optimal vitamin D status: a critical analysis on the basis of evidence-based medicine. *J Clin Endoc Metab* 2013; 8:1283-304.

CASUÍSTICAS / Case Reports

HIPOFOSFATEMIA E HIPERFOSFATEMIA ESPURIAS EN UNA PACIENTE CON MIELOMA MÚLTIPLE

María Diehl,^{1*} Carolina L. Carrizo,¹ Dorotea Fantl,² Graciela B. Jiménez³

1. Sección Osteopatías Metabólicas. Servicio de Endocrinología y Medicina Nuclear; 2. Sección Hematología. Servicio de Clínica Médica; 3. Laboratorio Central. Hospital Italiano de Buenos Aires.

Resumen

El mieloma múltiple se asocia con insuficiencia renal e hiperfosfatemia y también menos frecuentemente con síndrome de Fanconi e hipofosfatemia. Sin embargo, en aisladas ocasiones, se han descrito hipofosfatemia e hiperfosfatemia espurias por interferencia de paraproteínas en el análisis bioquímico.

Se presenta una paciente de 64 años con diagnóstico de mieloma múltiple con valores basales de calcemia y fosfatemia normales, que evoluciona con hipofosfatemia severa ($< 0,5$ mg/dl). Se indica tratamiento con fosfato intravenoso que se suspende a las 8 horas ante la rápida normalización (3,8 mg/dl). Un control posterior muestra un valor de fosfatemia >16 mg/dl. Se repite la determinación con dilución de la muestra con resultado normal (3,8 mg/dl). A los dos meses, una fosfatemia menor de 0,5 mg/dl fue normal posdilución (3,5 mg/dl). En pacientes con hipofosfatemia severa sin causa clara se debería descartar la presencia de hipergammaglobulinemia. Existen casos en los que esta alteración llevó al diagnóstico de mieloma múltiple. Por otra

parte es importante considerar la posibilidad de interferencia en la medición del fosfato en pacientes con paraproteinemia para evitar estudios diagnósticos y tratamientos innecesarios y potencialmente peligrosos. Este caso clínico es la primera descripción de hipofosfatemia e hiperfosfatemia espurias por interferencia de paraproteínas en una misma paciente, según nuestro conocimiento.

Palabras clave: mieloma múltiple, hiperfosfatemia espuria, hipofosfatemia espuria, pseudohipofosfatemia, pseudohiperfosfatemia, paraproteínas.

Summary

SPURIOUS HYPOPHOSPHATEMIA AND HYPERPHOSPHATEMIA IN A PATIENT WITH MULTIPLE MYELOMA

Patients with multiple myeloma may present either hypophosphatemia as a consequence of proximal tubular dysfunction or hyperphosphatemia in the setting

* Correo electrónico: maria.diehl@gmail.com



of renal failure. Nonetheless, spurious hypophosphatemia and hyperphosphatemia due to paraprotein-interfering serum phosphate assays have been occasionally described. A 64 year-old female with multiple myeloma and phosphatemia within the normal range at the time of diagnosis developed severe hypophosphatemia (<0.5 mg/dl). Potassium phosphate was administered intravenously and withdrew 8 hours later when serum phosphate levels normalized (3.8 mg/dl). Some days later serum phosphate was >16 mg/dl. A diluted blood sample displayed a real value of 3.8 mg/dl. Two months later, a laboratory control showed hypophosphatemia <0.5 mg/dl again but when the sample was diluted the phosphate level was 3.5 mg/dl. In patients with paraproteinemia and hyper or hypophosphatemia we must consider interference in the determination of phosphate. On the other hand when severe hypophosphatemia or hyperphosphatemia of unclear origin is present multiple myeloma should be ruled-out. This is the first description of spurious hypophosphatemia and hyperphosphatemia attributable to reading-interfering effect of paraproteins occurring in a single individual.

Key words: multiple myeloma, spurious hyperphosphatemia, spurious hypophosphatemia, pseudohypophosphatemia, pseudohyperphosphatemia, paraproteins.

Introducción

El fósforo es un componente esencial del hueso y otros tejidos y participa en múltiples procesos celulares como el almacenamiento de energía, la composición de las membranas y las señales de transducción. El fosfato es un anión predominantemente intracelular y el 85% del fósforo corporal total se encuentra en el esqueleto. Sus concentraciones séricas se mantienen entre 2,5 y 4,5 mg/dl y están reguladas por el pH, la dieta y factores hormonales.¹

El descenso de los valores de fosfatemia

puede estar mediado por disminución de la absorción intestinal de fósforo, aumento de la pérdida urinaria o pasaje del líquido extracelular al intracelular. La hipofosfatemia severa (menor de 1 mg/dl) es infrecuente. Sus consecuencias son potencialmente graves ya que puede producir, entre otras alteraciones, disfunción de los glóbulos rojos (hemólisis), de leucocitos (infecciones) y plaquetas, rabdomiólisis e insuficiencia cardíaca.¹

El mieloma múltiple se asocia con síndrome de Fanconi e hipofosfatemia por pérdida tubular renal de fósforo y también con insuficiencia renal e hiperfosfatemia. Sin embargo, en aisladas ocasiones se describió la interferencia de las paraproteínas en la determinación de la fosfatemia con hiperfosfatemia o hipofosfatemia espurias.²⁻²²

Se presenta el caso clínico de una paciente con mieloma múltiple y valores de fosfatemia normales, por debajo del rango normal o elevado por interferencia de paraproteínas en su medición.

Caso clínico

Una paciente de sexo femenino, de 64 años, con diagnóstico de mieloma múltiple estadio III (componente monoclonal de tipo inmunoglobulina G lambda) y osteoporosis asociada se interna en el año 2006 para iniciar tratamiento quimioterápico.

En los análisis de laboratorio al momento del diagnóstico presenta: hematocrito 26% (VR: 37-47%), hemoglobina 8 mg/dl (VR: 11,5-16 g/dl), creatinina 1,3 mg/dl (VR: 0,5-1,2 mg/dl), eritrosedimentación 104 mm (VR: 2-20), fosfatasa alcalina 46 UI/L (VR: 31-100UI/L), proteínas totales 15,2 g/dl (VR: 6,3-7,8), albúmina 2,5 g/dl (VR: 3,2-5), banda monoclonal 10,4 g/dl, IgG sérica 13.400 mg/dl (VR: 800-1700), calcemia 9,3 mg/dl (VR: 8,5-10,5), fosfatemia 4,3 mg/dl (VR: 2,5-4,5). Las determinaciones de fosfatemia fueron realizadas por un equipo Beckman-Coulter de la línea Synchron LX20 (metodología: cinética- cronometrada).

Se indica tratamiento con vincristina, adria-

micina, prednisona, infusión de pamidronato 90 mg intravenoso (IV) y suplemento de calcio elemental 1 g/día. Comienza con episodios de diarrea que se autolimitan y suspende el aporte de calcio. Evoluciona con hipocalcemia e hipofosfatemia con astenia como único síntoma, que fueron atribuidas a pérdida digestiva y al tratamiento con bifosfonatos. Recibe tratamiento con calcio y calcitriol vía oral y evoluciona con normalización de la calcemia pero con fosfatemias bajas: 0,9 y menor de 0,5 mg/dl (valor confirmado). Se indica infusión de fosfato de potasio 30 mmol/día IV que se suspende a las 8 horas por normalización de la fosfatemia (3,8 mg/dl). Presenta posteriormente fosfatemias ligeramente elevadas sin medicación. En un control al alta con un valor de fosfatemia mayor de 16 mg/dl se realiza una dilución de la muestra; siendo el resultado real normal (3,5 mg/dl). A los dos meses, en un control de rutina, se advierte una fosfatemia menor de 0,5 mg/dl, pero fue normal posdilución: 3,5 mg/dl (Tabla 1).

Discusión

Los pacientes con mieloma múltiple pueden presentar hipofosfatemia por tubulopatía asociada o hiperfosfatemia por insuficiencia renal secundaria a la enfermedad de base. Sin embargo, la hipofosfatemia y la hiperfosfatemia pueden ser espurias por interferencia de las paraproteínas.

En esta paciente, la rápida normalización de los niveles séricos a las pocas horas del inicio de la reposición de fósforo y la llamativa variación de sus valores séricos motivaron la búsqueda de causas de interferencia en la medición de la fosfatemia.

En la determinación de la fosfatemia, el fosfato reacciona con el molibdato de amonio para formar un compuesto amarillo (fosfomolibdato) que es detectado por espectrofotometría. En los métodos manuales, la prueba se realiza en muestras desproteinizadas, para evitar la interferencia generada por precipitación de proteínas. Con los autoanalizadores, la interferencia originada por las proteínas es minimizada por dilución de la muestra.^{12,23}

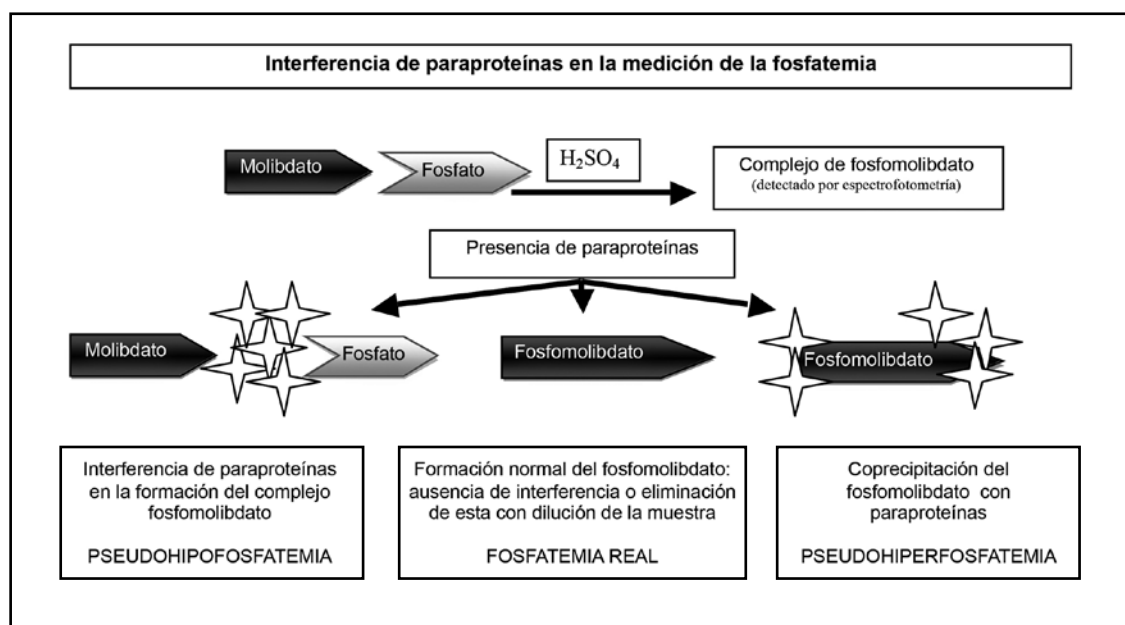


Figura 1. Influencia de las paraproteínas en la medición de la fosfatemia.



Tabla 1. Valores de calcemia y fosfatemia (predilución y posdilución) en paciente con mieloma múltiple e hiperfosfatemia/hipofosfatemia espurias por interferencia de paraproteínas en la medición de la fosfatemia.

Laboratorio	5/09/06	26/09/06	27/09/06	29/09/06	30/09/06	02/10/06	06/10/06	21/11/06
Fosfatemia VR: 2,5-4,5 mg/dl	4,3	2,0	0,9	<0,5 Confirmado con nueva muestra	3,8	5,3	>16 Posdilución: 3,8	<0,5 Posdilución: 3,5
Calcemia iónica VR: 1-1,35 mmol/l		0,96	1,07	1,09			1,07	
Creatininemia VR: 0,5-1,2 mg/dl	1,3	1,0			0,8	0,8		0,8
Proteínas totales VR: 6,3-7,8 g/l	15,2	8,9	10		9,4	9,7		9,7
Banda monoclonal g/l	10,4	6,38				6,7		4,56

La presencia de altas concentraciones de inmunoglobulinas puede coprecipitar con los reactivos causando un aumento de la densidad óptica e hiperfosfatemia espuria. El mecanismo causante de hipofosfatemia se adscribe a la interferencia en la formación del fosfomolibdato (Figura 1). Estas alteraciones se vinculan a las características características específicas de las globulinas anómalas, dado que el agregado de globulinas humanas normales no origina alteraciones de gran magnitud.²

Para evitar esta interferencia se puede reanalizar la muestra de tres maneras diferentes: con dilución de la muestra (método más utilizado), después de la remoción de las proteínas con sulfosalicilatos que producen precipitación de estas, o con ultrafiltrado de proteínas.

En una reciente investigación fueron evaluadas las fosfatemias en 55 pacientes con proteínas totales elevadas (> 8 g/dl) y se ob-

servó interferencia con hipofosfatemia espuria en el 7,3% de esta población. Se recomienda la dilución de la muestra al medio o al tercio, cuando las proteínas totales superen los 8,0 g/dl para así asegurar un resultado de fosfatemia fiable y fidedigno y también considerarla en aquellos pacientes que presenten bandas monoclonales.²² Sería de utilidad alertar al personal del laboratorio, respecto de los pacientes con antecedente de mieloma o gammapatías.

En la mayoría de los casos, la interferencia se observa en pacientes con mieloma múltiple con aumento monoclonal de IgG o IgA,^{5,8,16,20} pero también se ha informado en casos de gammapatía monoclonal de significado incierto y en hipergammaglobulinemia policlona. No es posible predecir su aparición ya que no se ha encontrado correlación entre la magnitud de la paraproteinemia y el hallazgo de hiperfosfatemia o hipofosfatemia espurias.

En esta paciente con mieloma múltiple y aumento de la inmunoglobulina G sérica, la hipofosfatemia inicial fue interpretada como verdadera. Sin embargo, los valores normales posdilución demostraron que tanto la hiperfosfatemia como la hipofosfatemia eran atribuibles a interferencia de las paraproteínas. La presencia de valores de fosfatemia normales, bajos o elevados muestra que la interferencia no es constante. No encontramos relación entre la magnitud de la paraproteinemia y la aparición de alteraciones espurias en la fosfatemia (Tabla 1).

En pacientes con hipofosfatemia severa sin causa clara se debería descartar la presencia de hipergammaglobulinemia monoclonal o policlonal. Existen casos descritos en los que esta alteración llevó al diagnóstico de mieloma múltiple.⁶

Por otra parte, es importante considerar la posibilidad de interferencia en la medición del fosfato en pacientes con paraproteinemia para evitar estudios diagnósticos y tratamientos innecesarios y potencialmente peligrosos.

Existen múltiples publicaciones de pacientes con mieloma múltiple e hiperfosfatemia o hipofosfatemia espurias pero no encontramos otras descripciones de ambas alteraciones en una misma paciente; este sería el primer caso referido.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: enero 2014.

Aceptado: febrero 2014)L

Referencias

1. Vokes TJ. Blood calcium, phosphate and magnesium. In: Christakos S, Holick M (editors). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and disorders of Mineral Metabolism*. 6th edition. Washington DC: American Society of Bone and Mineral Research; 2006.
2. Loghman-Adham M, Walton D, Iverius PH, Deiss A, Knight JA, Cheung AK. Spurious hypophosphatemia in a patient with multiple myeloma. *Am J Kidney Dis* 1997; 30(4):571-5.
3. Caras JA. Spurious hypophosphatemia associated with multiple myeloma. *Endocr Pract* 1997; 3:135-6.
4. Dash T, Parker MG, Lafayette MA. Profound hypophosphatemia and isolated hyperphosphaturia in two cases of multiple myeloma. *Am J Kidney Dis* 1997; 29(3):445-8.
5. Malhotra A, Koduli PR. Polyclonal hyperglobulinemia and spurious hypophosphatemia. *Ann Intern Med* 1999; 131(4):314.
6. Pujol I, Sabater J, González L, Pérez R. Hypophosphatemia as diagnostic clue in multiple myeloma. *Nefrología* 2000; 20(1):83-4.
7. Weisbord SD, Chaudhuri A, Blauth K, DeRubeis FR. Monoclonal gammopathy and spurious hypophosphatemia. *Am J Med Sci* 2003;325(2):98-100.
8. Kerr S, Kindt J, Daram SR. Hypophosphatemia associated with paraproteinemia: a case report and review of the literature. *WMJ* 2007; 106(8):490-3.
9. Mao Z, Ong AC. Spurious hypophosphatemia associated with monoclonal paraproteinemia. *Q J Med* 2012; 105:693-6.
10. Polak R, Huisman A, Sikma MA, Kersting S. Spurious hypokalemia and hypophosphatemia due to extreme hyperleukocytosis in a patient with a haematological malignancy. *Ann Clin Biochem* 2010; 47:179-81.
11. Mc Clure D, Lai LC, Cornell C. Pseudohyperphosphatemia in patients with multiple myeloma. *J Clin Pathol*. 1982; 45(8):731-2.



12. Sonnenblick M, Eylath U, Brisk R, Eldad C, Hershko C. Paraprotein interference with colorimetry of phosphate in serum of some patients with multiple myeloma. *Clin Chem* 1986; 32:1537-9.
13. Adler SG, Laidlaw SA, Lubran MM, Kopple JD. Hyperglobulinemia may spuriously elevate measured serum inorganic phosphate levels. *Am J Kidney Dis* 1988; 11(3):260-3.
14. Hawkins RC. Pseudohyperphosphatemia in multiple myeloma. *Ann Clin Biochem* 1991; 28:226-8.
15. Mandry JM, Posner MR, Tucci JR, Eil C. Hyperphosphatemia in multiple myeloma due to a phosphate-binding immunoglobulin. *Cancer* 1991; 68(5):1092-4.
16. Oren S, Feldman A, Turkot S, Lugassy G. Hyperphosphatemia in multiple myeloma. *Ann Hematol* 1994; 69(1):41-3.
17. Adler SG, Laidlaw SA, Lubran MM, Kopple JD. Hyperglobulinemia may spuriously elevate measured serum inorganic phosphate levels. *Am J Kidney Dis* 1998; 11(3):260-3.
18. Barutcuoglu B, Parildar Z, Mutaf I, Habif S, Bayindir O. Spuriously elevated inorganic phosphate level in a multiple myeloma patient. *Clin Lab Haematol* 2003; 25(4):271-4.
19. Marcu CB, Hotchkiss M. Pseudohyperphosphatemia in a patient with multiple myeloma. *Conn Med* 2004; 68(2):71-2.
20. Sinclair D, Smith H, Woodhead P. Spurious hyperphosphataemia caused by an Ig A paraprotein: a topic revisited. *Ann Clin Biochem* 2004; 41:119-24.
21. Izzedine H, Camous L, Bourry E, Azar N, Leblond V, Deray G. Make your diagnosis. Multiple myeloma- associated with spurious hyperphosphatemia. *Kidney Int* 2007; 72(8):1035-6.
22. Rubino GC, Jiménez GB, Nardi MA, Oyhamburu JM. Interferencia metodológica en la determinación de fósforo. XIX Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica, Chile, 2010, código 239/sección 2. p. 107.
23. Gamst O. Determination of serum-phosphate without deproteinization by ultraviolet spectrophotometry of the phosphomolybdic acid complex. *Scand J Clin Lab Invest* 1980; 40(5):483-6.

"Las cosas tienen vida propia, pregonaba el gitano con áspero acento, todo es cuestión de despertarles el ánimo".

Cien años de Soledad (1967)
Gabriel García Márquez (1927-2014)

COMENTARIOS BIBLIOGRÁFICOS / Bibliographical Comments

Glucocorticoid dose determines osteocyte cell fate.

Jia J, Yao W, Guan M, Dai W, Shahnazari M, Kar R, Bonewald L, Jiang JX, Lane NE.

FASEB J 2011; 25: 3366-76.

Carola B. Bozal*

Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Odontología, UBA, Argentina.

Es interesante observar que, en cuadros de osteoporosis inducida por glucocorticoides (GC), la pérdida de masa ósea no explica el incremento del riesgo de fracturas que presentan los pacientes, en tanto estos sufren fracturas en condiciones de mayor densidad mineral ósea que pacientes con osteoporosis posmenopáusica.

El cuadro de osteoporosis inducida por glucocorticoides se caracteriza por presentar disminución en el volumen óseo trabecular, en el grosor trabecular y en la formación ósea.¹ Los GC también afectan en forma directa la función de osteoblastos y osteocitos en tanto inhiben la proliferación y diferenciación del linaje osteoblástico, disminuyen la maduración y actividad osteoblástica e inducen la apoptosis de osteoblastos y osteocitos.² En este sentido, la pérdida de los osteocitos por apoptosis inducida por los GC³ provocaría una disrupción en la red de intercomunicación osteocitaria dando lugar a una falla para dirigir la remodelación ósea en sitios de microfracturas.

Los tratamientos con GC se asocian con acumulación intracitoplasmática de radicales

libres y macromoléculas destruidas. El proceso de autofagia es uno de los procesos biológicos más importantes que permiten que una célula sobreviva al estrés y se mantenga la homeostasis celular mediante la degradación/digestión de organelas dañadas.⁴ Este proceso se caracteriza por la formación de autofagosomas, cuando estos se unen con los lisosomas y forman los autolisosomas; luego ocurre la digestión de la organela y las moléculas que se producen son liberadas al citoplasma para el reciclaje y la obtención de energía celular. Sin embargo, la autofagia es considerada como “un cuchillo de doble filo” en tanto es un proceso involucrado no solo en la protección de una célula sino también en la muerte celular.⁵ La función protectora de la autofagia ocurre bajo condiciones de estrés moderado o períodos cortos de estrés. La autofagia es un mecanismo probable por el cual los osteocitos podrían reparar sus organelas celulares o la membrana plasmática dañadas. Sin embargo, si la condición de estrés se prolonga en el tiempo, se comenzarían a acumular autofagosomas en el citoplasma, lo cual podría llevar a la muerte celular.

* Dirección postal: Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Odontología, UBA. Marcelo T. de Alvear 2142 1ºA. CABA (1122), Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: carolaboza@yahoo.com



Si bien se conoce que los GC inducen apoptosis en los osteocitos,⁶ los autores del presente trabajo sostienen que el tratamiento prolongado con GC en ratones provocó un incremento del mecanismo de autofagia en los osteocitos.⁷ Es por ello que la hipótesis del trabajo que estamos comentando postula que la autofagia es uno de los mecanismos con los que responde el osteocito ante la exposición a GC. En tal sentido, el objetivo del trabajo consistió en caracterizar el tipo de falla celular de los osteocitos tanto *in vivo* como *in vitro* que provocan los GC dependiendo de la dosis a la que se exponen estas células.

El estudio *in vivo* se realizó con ratones de 3 meses a los que se les implantaron *pellets* de liberación lenta durante 28 días de prednisona en dosis de 1,4 mg/kg/d; 2,8 mg/kg/d y 5,6 mg/kg/d. Se detectaron osteocitos en autofagia y/o apoptosis mediante el anticuerpo monoclonal para el marcador de autofagia LC3 y un kit para la detección de muerte celular. En el ensayo *in vitro* se sometió a los cultivos de células MLO-Y4 (linaje osteocítico) a una dosis de 10^{-8} a 10^{-6} M de dexametasona durante 24 horas; se las transfundió con un vector de GFP-LC3 para cuantificar la autofagia y se las incubó con LysoSensor Blue para colocalizar el GFP-LC3 (marcador de autofagia) y los lisosomas. Se realizó RT-PCR para determinar genes relacionados con los procesos antioxidantes, autofagia y apoptosis.

Luego de 28 días de tratamiento con bajas dosis de GC en ratones se produjo una activación significativa del mecanismo autofágico, que aumentó la autofagia en osteocitos localizados principalmente en la zona de hueso cortical. Con las mayores dosis de GC, disminuyó la respuesta antiapoptótica y se incrementó el número de osteocitos en apoptosis. Además se encontró una disminución en la activación de la expresión de genes responsables del estrés oxidativo dosis-dependiente de GC. En este sentido, las dosis más bajas de GC activaron la expresión de los genes relacionados con el estrés oxidativo y la auto-

fagia en mucho mayor medida que las dosis más altas de GC.

Si bien numerosos trabajos en la literatura han reportado apoptosis en los osteocitos en animales tratados con GC^{3,6} y en osteocitos *in vitro*,⁸ hay que destacar que no se disponía hasta ese momento de reactivos para determinar la presencia de autofagia. Sin embargo, los estudios previos no se contraponen con el presente trabajo, en tanto con altas dosis de GC los autores encuentran apoptosis en los osteocitos, confirmando los resultados de Weinstein y cols.^{3,6,8} En este trabajo demuestran que no se ha evidenciado expresión de genes proapoptóticos, o la presencia de osteocitos apoptóticos con bajas dosis de GC (1,4 mg/kg/día). Por el contrario, los ratones tratados durante 28 días con altas dosis de GC (2,4 mg/kg/día) presentaron osteocitos apoptóticos en el hueso cortical. Además se sabe que los GC activan el mecanismo oxidativo y aceleran el envejecimiento del tejido óseo.⁹ Si bien en el presente trabajo el tratamiento con GC *in vitro* no activó el mecanismo antioxidante aunque sí incrementó significativamente los niveles de estrés oxidativo, parecería que la respuesta antioxidante que se observó *in vivo* estaría provocada por el estrés oxidativo inducido por los GC, y los osteocitos responderían a esto con autofagia.

Cuando las células se exponen durante periodos prolongados al estrés que provocan los GC se produce un exceso de reciclaje de organelas dañadas que pueden llevar a la muerte celular. En una línea celular osteocitaria (MLO-Y4) se pudo determinar que el tratamiento con dexametasona incrementa la expresión de marcadores de autofagia y la acumulación de autofagosomas.⁷ En el mismo trabajo, los autores determinaron que la dexametasona provocó una disminución en el número de osteocitos metabólicamente normales, y este efecto se incrementó aún más cuando se inhibió el proceso de autofagia. Esto estaría indicando que la autofagia sería un intento de los osteocitos para atenuar el

efecto que los GC provocan sobre su propio metabolismo. Con el incremento de las dosis de GC las defensas antioxidantes de las células se encuentran desbordadas, y la capacidad de supervivencia de los osteocitos disminuye, lo cual direcciona a la célula hacia la apoptosis.

Queda ahora por determinar si, en condiciones de tratamiento con dosis bajas de GC que induce la autofagia de los osteocitos, el hueso resulta con menor fragilidad que la observada luego del tratamiento prolongado con altas dosis. Si se comprobara que las bajas dosis de GC que inducen autofagia en los osteocitos no afectan la formación ósea y la resistencia del hueso, en contraposición con las altas dosis de GC, que inducen apoptosis

de los osteocitos incrementando la fragilidad ósea, estaríamos frente a un nuevo paradigma en relación con la fragilidad ósea inducida por GC. De ser así, la modulación de los mecanismos oxidativos y de autofagia en el tratamiento de pacientes con osteoporosis inducida por GC podría ser nuevo blanco para conservar la formación ósea a fin de prevenir la fragilidad y el incremento de fracturas en estos pacientes.

Conflicto de intereses

La autora declara no tener conflictos de intereses.

(Recibido: enero 2014.
Aceptado: marzo 2014)

Referencias

1. Dempster DW. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1989; 4: 137-41.
2. Weinstein RS. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2001; 2: 65-73.
3. O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, et al. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* 2004; 145: 1835-41.
4. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* 2009; 16: 966-75.
5. Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* 2005; 12(Suppl. 2): 1528-34.
6. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 1998; 102: 274-82.
7. Xia X, Kar R, Gluhak-Heinrich J, Yao W, Lane NE, Bonewald LF, Biswas SK, Lo WK, Jiang JX. Glucocorticoid induced autophagy in osteocytes. *J Bone Miner Res* 2010; 25: 2479-88.
8. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999; 104: 1363-74.
9. Komatsu F, Kudoh H, Kagawa Y. Evaluation of oxidative stress and effectiveness of low-dose glucocorticoid therapy on exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62: 459-64.



INSTRUCCIONES PARA AUTORES

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

El artículo podrá ser redactado en **castellano** o en **inglés** y deberán ser enviados a actualizaciones@osteologia.org.ar.

Los trabajos enviados deben estar incluido en alguna de las secciones de la revista: **Actualizaciones, Artículos Originales, Comunicaciones Breves, Casuísticas, Imágenes en Osteología, Editoriales, Cartas al Editor, Comentarios Bibliográficos, Consensos y Educación en Osteología, Controversias, Sección Cultural.**

GUÍA DE PRESENTACIÓN DE MANUSCRITOS

Los trabajos se prepararán en un procesador de textos (preferiblemente en una versión reciente de Microsoft Word), en hoja A4, con márgenes de al menos 25 mm, a doble espacio, en letra de tipo *Arial* 10. Las páginas deben numerarse en forma consecutiva.

Abreviaturas, siglas y símbolos: sólo se utilizarán abreviaturas estandarizadas. Se evitará su uso en el título y en el resumen. La primera vez que se use una abreviatura o sigla irá precedida del término completo, salvo que se trate de una unidad de medida estándar.

Unidades de medida: se emplearán unidades del Sistema Internacional de Unidades (SI), empleando comas para los decimales. http://www.bipm.org/en/si/base_units/

La **primer página** deberá contener la siguiente información: (a) el título del trabajo en castellano e inglés; (b) un título abreviado para cabeza de página; (c) nombre y apellido de los autores; éste último debe estar subrayado; (d) nombre de las instituciones en que se desempeñan; (e) dirección postal y correo electrónico del autor con quien se deba mantener correspondencia; (f) sección de la revista a la cual corresponde el trabajo; (g) Conflicto de intereses.

Los **Artículos Originales** estarán divididos en *Introducción, Materiales y métodos, Resultados y Discusión*, sin incluir numeración de los mismos. Los títulos se escribirán en negrita. La extensión máxima recomendada del texto es de 5.000 palabras y se admitirán hasta 6 figuras y 6 tablas. Se sugiere no incluir más de 45 referencias bibliográficas. Se presentará también un **Resumen** en castellano y otro en inglés (**Summary**), precedido por el correspondiente título. Cada resumen no deberá exceder las 250 palabras, sin incluir tablas o figuras.

Las **Actualizaciones y Consensos y Educación en Osteología** tendrán una extensión máxima recomendada del texto es de 6.000 palabras y se admitirán hasta 6 figuras y 6 tablas. Se sugiere no incluir más de 60 referencias bibliográficas. Se presentará también un Resumen en castellano y otro en inglés (**Summary**), precedido por el correspondiente título. Cada resumen no deberá exceder las 250 palabras

Las **Comunicaciones Breves, Controversias** y las **Casuísticas** tendrán una extensión máxima recomendada del texto de 3.000 palabras y se admitirán hasta 4 figuras y 4 tablas. Se sugiere no incluir más de 30 referencias bibliográficas.

En todos los casos previamente descriptos deberá presentarse un **Resumen** en castellano y otro en inglés (**Summary**), precedido por el correspondiente título. Cada resumen no deberá exceder las 250 palabras, sin incluir tablas o figuras. Se requieren de 3 a 6 **palabras clave** en inglés y en castellano; se sugiere incluir términos incluidos en la lista del Index Medicus (*Medical Subject Headings, MeSH*). Para comprobarlo ingrese a la dirección siguiente y compruebe si las palabras keywords existen <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/>

Las **Cartas al editor y Comentarios bibliográficos** tendrán una extensión máxima recomendada de 1000 palabras y se admitirán hasta 2 figuras o tablas. Se sugiere no incluir más de 10 referencias bibliográficas.

Las **Imágenes en Osteología** se enviarán en formato de imagen (.jpg o .tif) con una resolución no menor de 300 dpi. No se aceptarán imágenes en archivos de Word. Se deberán acompañar de un texto con una extensión máxima recomendada de 500 palabras. Se sugiere no incluir más de 5 referencias bibliográficas.

Agradecimiento. Cuando se considere necesario se citará a las personas, centros o entidades que hayan colaborado o financiado la realización del trabajo.

Conflicto de intereses. Los autores deberán indicar cualquier relación financiera que pudiera dar lugar a un conflicto de intereses en relación con el artículo publicado.

Las **Referencias bibliográficas.** Se limitarán a aquellos artículos directamente relacionados con el trabajo mismo, evitándose las revisiones bibliográficas extensas.

En el texto se numerarán consecutivamente mediante el formato "superíndice". Al final del manuscrito se colocarán en el orden en que se las menciona en el texto. Se incluirán todos los autores cuando sean seis o menos; si fueran más, el tercero será seguido de la expresión et al. (et alia: y otros). Los títulos de las revistas serán abreviados según el estilo empleado en el *Index Medicus como NLM Title Abbreviation* (la lista puede obtenerse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>). Los nombres de las revistas deben ir en *bastardilla*.

En la lista de referencias, las revistas, los libros y los capítulos de libros, actas de reuniones científicas *deben presentarse* de acuerdo con los siguientes ejemplos:

Revistas

Schroeder JS, Hunt SA. Chest pain in heart transplanted recipients. *N Engl J Med* 1991; 324:1805-7.

Libros

Philips DJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM (eds). Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press, 1995, p. 465-78.

Congresos

DuPont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R (eds). *Proceedings of the third annual meeting*



of the International Society for Experimental Hematology. Houston: International Society for Experimental Hematology; 1974: 44-6.

Sitios de internet

World Health Organization (WHO). The Stop TB Web Alert. (2000 December 6- 12, week 48) <http://www.stoptb.org/updates/index.html>

Las **Tablas** se presentarán en hojas individuales al final del texto y numeradas con números arábigos; éstas deben ser indispensables y comprensibles por sí mismas y poseer un título claramente explicativo de su contenido. No se emplearán líneas verticales de separación entre columnas ni líneas horizontales, salvo, en general, tres: las que separan el título de la Tabla, los encabezamientos del resto, y la que indica la terminación de la Tabla.

En el texto se indicará el lugar aproximado de ubicación con la leyenda "Inserte Tabla número xxx en este sitio"

Las **Figuras** deben enviarse en forma separada del parte del texto. Sólo se incluirá en el manuscrito una leyenda explicativa. El formato de imágenes requerido es ".jpg o .tif" con una resolución no menor de 300 dpi. No se aceptarán imágenes en archivos de Word. En las microfotografías se indicará la escala o el aumento utilizado. *Considerar que, si bien en la versión on line la imagen se muestra en color, en la versión impresa se presentará en escala de grises.* En el texto se indicará el lugar aproximado de ubicación con la leyenda "Inserte Figura número xxx en este sitio".

Todos los artículos que publica **Actualizaciones en Osteología** son enviados a **revisión por pares (peer-review)**. La revisión está a cargo del Editor y por lo menos dos revisores con amplia experiencia en el tema. La identidad de los autores y de los revisores se mantiene en forma confidencial. El Editor devolverá a los autores, sin pasar por el proceso de arbitraje, aquellos manuscritos que no se ajusten a las normas de preparación o que no coincidan con los propósitos y orientación de **Actualizaciones en Osteología**.

El tiempo de evaluación durará entre 30 y 60 días. Se notificará por correo electrónico al autor responsable sobre la aceptación (con correcciones o sin ellas) o el rechazo del manuscrito. La decisión de este será inapelable. El Comité de Redacción se reserva el derecho de introducir, con conocimiento de los autores, todos los cambios editoriales exigidos por las normas gramaticales y las necesidades de compaginación. Los trabajos aceptados con modificaciones serán devueltos a sus autores para eventuales correcciones y se les otorgará para la devolución un plazo no mayor de 30 días. Luego de su aceptación y diagramación se otorgará a los autores 72 horas para revisar la prueba de galera.

Acordamos con los lineamientos expuestos por el *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE, [http:// www.icmje.org](http://www.icmje.org)) éstos guiarán las resoluciones del Comité Editorial en lo referente a **Conflicto de intereses** de revisores, autores y editores, relaciones con la industria, apoyo financiero, confidencialidad de los manuscritos, relaciones entre revistas médicas, los medios populares de difusión y otros aspectos no mencionados en estas instrucciones.

POLÍTICA EDITORIAL

Transferencia de Derechos de Autor

Una vez aceptado el manuscrito y antes de su publicación, se debe enviar al editor una carta de concesión de los derechos de autor y consentimiento de publicación, firmada por los autores la cual puede obtenerse del sitio web www.osteologia.org.ar. En el caso de que los autores certifiquen que el artículo arriba mencionado es trabajo original y no ha sido previamente publicado excepto en forma de resumen, y sea aceptado para publicación en

Actualizaciones en Osteología, los derechos de autor serán transferidos a la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

Actualizaciones en Osteología es una publicación de Acceso Abierto, sin embargo los derechos de propiedad intelectual deberán ser reconocidos. La transcripción por cualquier medio de los contenidos de la revista será **debidamente referenciado**, indicando la autoría y la fuente bibliográfica. Asimismo, para la reproducción escrita del material de la revista se solicitará la autorización pertinente.

Autoría: La lista de autores debe estar conformada únicamente por aquellas personas que hayan participado en la concepción y realización del trabajo, participado en la redacción del texto y que hayan aprobado la versión del texto que será publicada.

Responsabilidades éticas. Cuando se describen experimentos realizado en **seres humanos** se debe indicar si los procedimientos realizados siguieron las normas éticas del comité de experimentación humana (institucional o regional), y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki. Asimismo se debe enviar el modelo de consentimiento informado utilizado para la realización del estudio. Cuando se describen experimentos en **animales** se debe indicar si se han seguido las pautas de una institución o consejo de investigación sobre cuidado y la utilización de animales de laboratorio.

La revista **Actualizaciones en Osteología** apoya las políticas para registro de ensayos clínicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE), reconociendo la importancia de esas iniciativas para el registro y divulgación internacional de información sobre estudios clínicos, en acceso abierto. En consecuencia, solamente se aceptarán para publicación, a partir de 2007, los artículos de investigaciones clínicas que hayan recibido un número de identificación en uno de los Registros de Ensayos Clínicos validados por los criterios establecidos por la OMS y el ICMJE, cuyas direcciones están disponibles en el sitio del ICMJE (www.icmje.org). El número de identificación se deberá registrar al final del resumen.



INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Manuscripts may be written in Spanish or in English and should be sent to actualizaciones@osteologia.org.ar.

“Actualizaciones en Osteología” contributions for publication in the following categories: ***Original Articles, Reviews, Brief Communications, Case Reports, Images in Osteology, Editorials, Letters to the Editor, Bibliographic Comments, Consensus and Education in Osteology, Controversies, Cultural Section.***

MANUSCRIPT SUBMISSION GUIDELINES

Manuscripts should be prepared in a word processor (preferably a recent version of Microsoft Word), on A4 paper size, with margins of at least 25 mm, double-spaced, in an Arial 10 font. Pages should be numbered consecutively.

Abbreviations, acronyms and symbols. Only standard abbreviations, acronyms and symbols must be used. Their use in the title and abstract should be avoided. The first time an abbreviation or acronym is used it will be preceded by the full name, except when it is a standard unit of measurement.

Measuring units: Units of the International System of Units (SI) http://www.bipm.org/en/si/base_units/ must be used; for decimals, use commas in Spanish, and periods in English.

The ***first page*** should contain the following information: (a) title of the work in Spanish and English, (b) abbreviated title for running head, (c) author/s' first and last name/s, the latter must be underlined; (d) name of the institutions in which they work, (e) address and email of the corresponding author, (f) section of the journal to which paper corresponds; (g) conflict of interest.

Original Articles will be divided into *Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion*, without numbering them. Titles must be written in bold type. The recommended maximum text length is 5,000 words and up to 6 figures and 6 tables will be accepted. It is suggested not to include more than 45 references. A 250-word ***Abstract*** in Spanish and in English, not including tables or figures, preceded by an appropriate heading, must also be included.

Reviews and Consensus and Education in Osteology have a recommended maximum text length of 6,000 words and up to 6 figures and 6 tables will be accepted. It is suggested not to include more than 60 references. A 250-word Abstract in Spanish and in English, preceded by an appropriate heading, must also be included.

Brief Communications, Controversies and **Case Reports** will have a recommended maximum of 3,000 words of text extension and up to 4 figures and 4 tables will be accepted. It is suggested not to include more than 30 references.

In all these cases, an **Abstract** must also be submitted in Spanish and in English, preceded by an appropriate heading. Each abstract should not exceed 250 words, not including tables or figures. Also, 3 to 6 key words in English and Spanish are required as listed in *Medical Subject Headings, MeSH*. To check them go to the following link <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/>.

Letters to the editor and **Bibliographic Comments** have a recommended maximum of 1000 words and up to 2 figures or tables will be accepted. It is suggested not to include more than 10 references.

Images in Osteology must be submitted in image format (.jpg or .tif) with no less than 300 dpi resolution. Images in Word files will not be accepted. They must be accompanied by a text with a recommended maximum of 500 words length. It is suggested not to include more than 5 references.

Acknowledgments. When necessary, people, institutions or organizations that have collaborated or financed the work will be acknowledged.

Conflict of interest statement. Authors must disclose any financial relationship that could lead to a conflict of interest in relation to the published article.

References. These will be limited to items directly related to the work itself, avoiding extensive literature reviews. They will be consecutively numbered in the text using the "superscript" format. They will be placed at the end of the manuscript in the order they are mentioned in the text. All authors may be included when they are six or less; if there are more, the third name will be followed by *et al.* (et alia: and others). Titles of journals must be abbreviated according to the style used in *Index Medicus* as *NLM Title Abbreviation* (the list may be obtained at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>). The names of journals should be in italics

In the list of references, journals, books and book chapters, and proceedings of scientific meetings should be submitted according to the following examples

Journals

Schroeder JS, Hunt SA. Chest pain in heart transplanted recipients. *N Engl J Med* 1991; 324:1805-7.

Books

Philips DJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM (eds). Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press, 1995, p. 465-78.

Congresses

DuPont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R (eds). *Proceedings of the third annual meeting*



of the *International Society for Experimental Hematology*. Houston: International Society for Experimental Hematology; 1974: 44-6.

Websites

World Health Organization (WHO). The Stop TB Web Alert. (2000 December 6- 12, week 48) <http://www.stoptb.org/updates/index.html>

Tables will be presented on separate pages at the end of the text and numbered in Arabic numerals; they must be essential and understandable by themselves and have a clear explanatory title of their content. No vertical lines between columns and horizontal lines will be used, except in general three lines: one separating the Table title, another for the headings of the rest, and the last one indicating the end of the Table.

The manuscript text will indicate the approximate location with the legend "Insert Table number xxx here."

Figures should be submitted separately from the text. The manuscript text will only include an explanatory legend. The required format of images is ".jpg or .tif" no less than 300 dpi resolution. Images in Word files will not be accepted. In the micrographs the scale or magnification used must be indicated. *Take into account that while in the online version the image is shown in color, in the printed version it will be presented in grayscale.* The manuscript text will indicate the approximate location with the legend "Insert Figure number xxx here."

All articles published in "**Actualizaciones en Osteología**" are subject to peer review. The review is made by the Editor and at least two reviewers with extensive experience in the subject. The identity of the authors and reviewers is kept confidential. The Editor will return to the authors, without going through the arbitration process, those manuscripts that do not conform to the standards of preparation or that do not match the purposes and orientation of "**Actualizaciones en Osteología**".

Evaluation time takes between 30 and 60 days. The corresponding author will be notified by email on the acceptance (with or without corrections) or rejection of the manuscript. This decision is final. The Editorial Committee reserves the right to introduce, to the authors' knowledge, all editorial changes required by grammatical rules and layout needs. Accepted papers will be returned with modifications to authors for any corrections and they will be granted a return period of not more than 30 days. After acceptance and layout, authors will be awarded 72 hours to review the galley proof.

We agree with the guidelines set out by the *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE, <http://www.icmje.org>) to guide the resolutions of the Editorial Committee regarding **Conflict of interest** of reviewers, authors and publishers, relations with the industry, financial support, confidentiality of manuscripts, relationships between medical journals, popular media and other aspects not mentioned in these instructions

PUBLISHING POLICY

Transfer of Copyright

Upon acceptance of the manuscript and prior to publication, a letter to the editor must be sent to grant copyright and publication consent, signed by the authors, which can be obtained from the **www.osteologia.org.ar** website. In case the authors certify that the above mentioned article is original work, it has not been previously published except in abstract form, and is accepted for publication in “**Actualizaciones en Osteología**”, copyright will be transferred to the Argentine Association of Osteology and Mineral Metabolism.

Actualizaciones en Osteología is an Open Access publication, however, intellectual property rights must be acknowledged. Transcription by any means of the contents of the journal will be **properly referenced**, indicating the author and the source. Also, for the written reproduction of material from the journal proper authorization will be requested.

Authorship: The list of authors should be made up only by those who have participated in the conception and realization of the work, been involved in drafting the text and have approved the text version to be published.

Ethical responsibilities. When experiments performed in humans are described, indicate whether the procedures performed followed ethical standards of the (institutional or regional) committee on human experimentation, and in accordance with the World Medical Association and the Declaration of Helsinki. You must also send the informed consent model used for the study. When animal experiments are described, indicate whether you followed the guidelines of an institution or research council on care and use of laboratory animals.

Actualizaciones en Osteología journal supports policies for registry of clinical trials of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), recognizing the importance of such initiatives for the registration and international dissemination of information on clinical studies in open access. Therefore, since 2007, it only accepts for publication clinical research articles that have received an identification number in one of the Clinical Trials Registry validated by the criteria established by WHO and ICMJE, whose addresses are available at the ICMJE site (**www.icmje.org**). The identification number must be recorded at the end of the abstract.

GRAPHIC TEAM
COMUNICACION VISUAL
DISEÑO, E IMPRESION GRAFICA / ROTULACION Y ESTAMPADO

www.graphicteam.com.ar
graphicteam@ciudad.com.ar
Cel: (0341) 156-960595
Tel. (0341) 458-2617

TIRADA: 1.000 Ejemplares