

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLÓGÍA

Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral

VOL. 14, Nº 3 - septiembre / diciembre 2018

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



A.A.O.M.M.

(Asociación Argentina de Osteología
y Metabolismo Mineral)

ISSN 1669-8975 (Print) ;
ISSN 1669-8983 (Online)
Revista Cuatrimestral
Rosario, Santa Fe, Argentina
www.osteologia.org.ar

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLÓGÍA

Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral



Jorge Dándolo
"Grises del Riachuelo"
Óleo sobre lienzo, 50 x 60 cm. 2017
Colección Zurbarán, Cerrito 1522, Tel. 4815-1556

VOL. 14, Nº 3

septiembre /diciembre 2018

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

www.osteologia.org.ar

Rosario, Santa Fe , Argentina

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



ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Publicación de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

VOL. 14, Nº 3

septiembre / diciembre 2018

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

www.osteologia.org.ar

Rosario, Santa Fe, Argentina

Aparición: cuatrimestral

Editoras responsables:

Alicia Bagur: MAUTALEN, Salud e Investigación. Azcuénaga 1860 6to. piso. CABA, (C1128AAF), Argentina.

Virginia Massheimer: Cátedra Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670, Bahía Blanca (B8000ICN), Argentina. Investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). 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

Perfil de la revista

Actualizaciones en Osteología es el órgano científico de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Actualizaciones en Osteología acepta 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 (Actualizaciones, Artículos Originales, Comunicaciones Breves, Casuísticas, Editoriales, Cartas al Editor). Los artículos son revisados por pares, expertos nacionales e internacionales.

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), SciELO (Scientific Electronic Library Online), Scopus & Embase (Elsevier Bibliographic Databases) y SIIC Data Bases (Sociedad Iberoamericana de Información Científica).

Actualizaciones en Osteología 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, siempre que no se pretenda su utilización para uso comercial. Para el correcto ejercicio de este derecho por parte de los usuarios, es condición necesaria que los derechos de propiedad intelectual sean reconocidos. Para ello, cualquier reproducción de los contenidos de cualquier artículo de la revista debe ser debidamente referenciada, indicando la autoría y la fuente bibliográfica. Por otra parte, para la reproducción escrita del material de la revista se deberá solicitar la autorización pertinente. El contenido y las opiniones expresadas en los trabajos publicados en la revista son de entera responsabilidad del(los) autor(es).

Scope

Actualizaciones en Osteología is the official scientific journal of the Argentinean Association of Osteology and Mineral Metabolism (AAOMM). Actualizaciones en Osteología publishes manuscripts written in Spanish or English describing clinical and experimental aspects within osteology and mineral metabolism. The articles should be original, meet the uniform requirements for manuscript submission and be comprised in one of the sections of the journal (Original Articles, Review Articles, Short Communications, Case Reports, Editorials, Letters to the Editor). Articles are peer-reviewed by national and international experts in the field.

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), SciELO (Scientific Electronic Library Online), Scopus & Embase (Elsevier Bibliographic Databases) and SIIC data Bases (Iberoamerican Society Scientific Information).

Actualizaciones en Osteología is an Open Access journal. All its content is available free of charge. Users can read, download, copy, distribute, print, search or link the complete article texts from this journal without requiring permission from the editor or author, as long as it is not for commercial use. Users should recognize the intellectual property rights. For this, any reproduction of the contents of any article published in the journal should be properly referenced, indicating the authors and bibliographic source.

On the other hand, authorization should be requested for written reproduction of the journal material. The content and opinions expressed in the manuscripts published by the journal are the sole responsibility of the author(s).

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Publicación de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

EDITORAS RESPONSABLES

Alicia Bagur

MAUTALEN, Salud e Investigación. Buenos Aires, Argentina.

editora-responsable@osteologia.org.ar

Virginia Massheimer

Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR, CONICET-UNS). Universidad Nacional del Sur. Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Bahía Blanca, Argentina.

EDITORAS ASOCIADAS

Silvina Mastaglia

Laboratorio de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEN). CONICET-UBA, Buenos Aires, Argentina

Gabriela Picotto

Bioquímica y Biología Molecular, INICSA (CONICET-UNC), Córdoba, Argentina.

Lilian I. Plotkin

Department of Anatomy & Cell Biology. Indiana University School of Medicine. Indianapolis, USA.

María Josefina Pozzo

Servicio de Endocrinología, Hospital Alemán. Buenos Aires, Argentina.

EDITOR ASOCIADO SENIOR

Julio Ariel Sánchez

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

SECRETARIA DE REDACCIÓN

Patricia Mandalunis

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

COORDINACIÓN EDITORIAL

Mariana Rapoport

asistente-editorial@osteologia.org.ar

CORRECCIÓN DE TEXTOS

Prof. María Isabel Siracusa

CUERPO EDITORIAL

Ricardo A. Battaglini

Harvard School of Dental Medicine. Mineralized Tissue Biology Department. The Forsyth Institute. USA.

Teresita Bellido

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

Lucas R. M. Brun

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina. Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Rosario, Argentina

David Burr

Professor of Anatomy and Cell Biology. Indiana University School of Medicine. USA.

Marilia Buzalaf

Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru-SP, Brazil.

Jorge B. Cannata Andía

Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral. Hospital Universitario Central de Asturias. España.

Haraldo Claus Hermberg

Servicio de Endocrinología, Hospital Alemán. Buenos Aires, Argentina.

Gustavo Duque

Division of Geriatric Medicine, Department of Medicine & Director, Musculoskeletal Ageing Research Program. Sydney Medical School Nepean, University of Sydney. Australia.

Adriana Dusso

Laboratorio de Nefrología Experimental. IRB Lleida (Instituto de Investigaciones Biomédicas de Lleida). Facultad de Medicina. Universidad de Lleida. Lleida. España.

Pedro Esbrit

Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo. Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) - Fundación Jiménez Díaz. Madrid. España.



José Luis Ferretti

Centro de Estudios de Metabolismo Fosfocálcico (CEM-FoC). Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina.

Ana María Galich

Sección Osteopatías Metabólicas del Servicio de Endocrinología. Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.

Diana González

MAUTALEN, Salud e Investigación. Buenos Aires, Argentina.

Maria Luisa Gonzalez Casaus

Laboratorio de Nefrología y Metabolismo Mineral. Hospital Central de Defensa de Madrid. España.

Arancha R. Gortázar

Instituto de Medicina Molecular Aplicada. Facultad de Medicina. Universidad CEU San Pablo, Madrid, España.

Nuria Guañabens

Servicio de Reumatología del Hospital Clínic de Barcelona. España.

Suzanne Jan de Beur

Johns Hopkins University School of Medicine. Division of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism. Johns Hopkins Bayview Medical Center. USA.

Patricia Jaurez Camacho

Unidad Biomédica. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. México.

Carlos Mautalen

MAUTALEN, Salud e Investigación. Buenos Aires, Argentina.

Michael McClung

Oregon Osteoporosis Center, Portland, OR, USA.

José Luis Millán

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

Armando Negri

Instituto de Investigaciones Metabólicas. Buenos Aires, Argentina.

Beatriz Oliveri

MAUTALEN, Salud e Investigación. Laboratorio Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas, INIGEM. Inves-

tigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina.

Luisa Carmen Plantalech

Sección Osteopatías Metabólicas. Servicio de Endocrinología y Metabolismo. Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.

Hans L Porias Cuéllar

Nuevo Sanatorio Durango. México.

Rodolfo Puche

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina.

Alfredo Rigalli

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Rosario, Argentina.

Emilio Roldán

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

Ana Russo de Boland

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

Helena Salerni

División Endocrinología del Hospital Durand. Buenos Aires, Argentina.

Eduardo Slatopolsky

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

Nori Tolosa de Talamoni

Laboratorio de Metabolismo Fosfocálcico y Vitamina D "Dr. Fernando Cañas". Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina.

José R. Zanchetta

Instituto de Investigaciones Metabólicas (IDIM), Buenos Aires, Argentina.

AUTORIDADES DE AAOMM COMISIÓN DIRECTIVA 2018-2019

Presidente

Dra. Susana Zeni

Vicepresidente

Dr. Lucas Brun

Secretaria

Dra. Graciela Brito

Tesorera

Dra. Mariana Seijo

Vocales

Dra. Carola Bozal

Dr. Adrián Campelo

Dra. Silvana Di Gregorio

Dra. Sara Feldman

Dra. Gabriela Picotto

Dra. Gloria Rovai

Dr. Fernando Saravi

Dra. Ana Wittich

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Vol. 14, N° 3, septiembre / diciembre 2018

ÍNDICE

EDITORIAL / Editorial

DNI óseo: cuando los huesos hablan

Bone ID: when the bones speak

María Belén Rauschemberger

165

ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

Zoledronic acid effect on bone of growing rats.

Efecto del ácido Zoledrónico en el hueso de ratas en crecimiento.

Patricia M. Lupión, Lucas R. Brun, Verónica E. Di Loreto.

168

Evidencia original directa (Dinamométrico-Tomográfica) de la influencia sitio-específica de la musculatura sobre la estructura ósea.

Hacia una concepción más amplia del Mecanostato.

Original Dynamometric and Tomographic evidence of site-specific muscle effects on bone structure.

Towards a wider scope on the bone Mechanostat concept.

Laura M. Nocciolino, Sergio H. Lüscher, Nicolás Pilot, Leandro Pisani, Leandro Mackler, Gustavo R. Cointry, Alex Ireland, Jörn Rittweger, José L. Ferretti, Ricardo F. Capozza

178

Las diferencias antropométricas entre sexos de la columna lumbar, medidas por DXA, no afectan a todas las vértebras en forma uniforme: probable implicancia en la incidencia de fracturas

Gender anthropometric differences of the lumbar spine, measured by DXA, do not involve all vertebrae uniformly: probable implication in the incidence of fractures.

Haraldo Claus-Hermberg, María Pía Lozano, Magdalena Rey, Silvana Boffa, María Josefina Pozzo

184

**ACTUALIZACIONES / Reviews**

- Normal physiological functions in two animal species with highly different vitamin D status compared to that of humans**
Funciones fisiológicas normales en dos especies animales con estatus de vitamina D muy diferentes del actual en seres humanos.
Rodolfo C. Puche 190

- Mecanismos involucrados en la fragilidad ósea en Diabetes Mellitus.**
Mechanisms involved in the bone fragility in diabetes Mellitus.
Luis Agustín Ramírez Stieben, María Lorena Brance 205

REPORTE DE CASOS / Case Report

- Síndrome de Klippel-Feil: a propósito de un caso en Ecuador.**
Klippel-Feil syndrome: about a case in Ecuador.
Cristian Carlos Ramírez Portilla, Roberto Michael Ramírez Guamán, Rosa Andrea Espinoza Ramírez, Luis Damián Ponce López, Katherine Michelle Samaniego Vásquez 219

NOVEDADES 223

ÍNDICE ACUMULADO / Cumulative Index 224

INSTRUCCIONES PARA AUTORES / Authors guidelines 229

EDITORIAL / Editorial

DNI ÓSEO: CUANDO LOS HUESOS HABLAN

María Belén Rauschemberger*

Cátedra de Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. INBIOSUR (CONICET-UNS). Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

Ante la pregunta: ¿Qué función cumplen nuestro esqueleto, nuestros huesos?, probablemente, las primeras respuestas que surgen sean sostén mecánico, mantenimiento postural, contención y protección de órganos, metabolismo mineral, hematopoyesis, entre otras. Pero sumado a estas múltiples funciones, ¿nos hemos puesto a pensar que nuestros huesos también nos identifican?

La antropología (*del griego $\acute{\alpha}\nu\theta\rho\omicron\pi\omicron\varsigma$, "hombre", y $\log\omicron\varsigma$, "conocimiento"*) es la ciencia que estudia al ser humano de una forma integral, teniendo en cuenta sus características tanto físicas como culturales. En particular, los antropólogos forenses suelen especializarse inicialmente en antropología física, biología, anatomía, odontología u osteología humanas. Su principal labor está relacionada principalmente con la recuperación, descripción e identificación de restos esqueléticos humanos. Los objetos de estudio pueden ser casos individuales, desastres colectivos, restos históricos o de individuos desconocidos que pueden presentarse en distintos estados de conservación (*restos de cremación, fragmentados o desarticulados con diferentes grados de descomposición*). La antigüedad de las muestras analizadas puede abarcar un amplio rango, desde restos de poblaciones arcaicas hasta de homicidios recientes.¹⁻³ La investigación antropológica suele solaparse con la actuación del investigador criminal y del médico forense debido a la similitud en los objetivos perseguidos, como la identificación de los restos hallados, la causa y forma de muerte, la estimación del momento del suceso y/o la captación de toda evidencia física que contribuya a obtener la mayor información posible ya sea con fines científicos o médico-legales.

Entre los interrogantes básicos que surgen cabe mencionar: ¿son restos humanos?, ¿pertenecen a un solo individuo o a varios?, ¿qué aspecto tenía el individuo?, ¿se pueden inferir sexo, edad, raza, talla, lateralidad funcional: derecha/izquierda?, ¿de quién se trata?, ¿presenta rasgos esqueléticos o anomalías que puedan orientar en la identificación?

Ante todos estos interrogantes es inevitable orientar nuestra atención hacia los múltiples métodos y equipamiento con que en la actualidad se cuenta para resolver estas "incógnitas óseas", y resulta interesante distinguirlos con algunos ejemplos.

El 17 de julio del corriente año, 2018, se cumplieron 100 años de uno de los mayores misterios del siglo XX, el destino de la familia Romanov. Tras abdicar, Nicolás II, último zar de Rusia, se exilió en la ciudad de Ekaterimburgo junto a su esposa, Alexandra, y sus cinco hijos. La familia real rusa, junto con cuatro miembros leales de su personal (*el médico, un ayudante del zar, su sirvienta y su cocinero*) estuvo cautiva hasta que, en la madrugada del 17 de julio de 1918, todos fueron ejecutados por un pelotón de fusilamiento. En 1991 se informó oficialmente el descubrimiento de una fosa común con varios restos óseos. Ante la sospecha de que podía tratarse de la familia real se inician los estudios pertinentes sobre los restos hallados. Se comienza con la reconstrucción antropológica observándose que las piezas óseas halladas estaban rotas y tenían marcas de bayonetazos. Los restos se clasificaron por sexo, edad y sobre posición fotográfica, lo que evidenció la presencia de 9 esqueletos. Durante la década del 90 comienzan a tomar relevancia los estudios de marcadores genéticos con fines de identificación de individuos y establecimiento de vínculo biológico.

* E-mail: mbrausch@criba.edu.ar



A partir de ADN nuclear obtenido de muestras de huesos de los 9 esqueletos hallados se realizan estudios de marcadores autosómicos.

Los resultados indican la presencia de 2 progenitores, 3 hijas y 4 individuos sin relación de parentesco entre sí. Un nuevo interrogante surgía: ¿Cómo saber si se trataba de miembros de la familia real rusa? Y en caso afirmativo: ¿Qué había sucedido con los dos miembros restantes?

Pues bien, la primera pregunta pudo resolverse con estudios de ADN mitocondrial (herencia materna) y STR-Y (herencia paterna) en muestras de descendientes vivos y restos exhumados de familiares de la Pareja Real. Los resultados fueron concluyentes, se trataba del zar, la zarina y 3 de sus hijas. Hasta ese momento, solo parte del misterio había sido develado. En el verano de 2007, 44 fragmentos óseos y dientes fueron hallados en una fosa ubicada a tan solo 70 m de la descripta originalmente. Se trataba de huesos correspondientes a dos esqueletos, una mujer de entre 15 y 19 años y un varón de entre 12 y 15 años. El análisis de ^{14}C indicó una data de al menos 60 años en el lugar. El estudio de piezas dentales arrojó como resultado la presencia de 3 amalgamas de plata dando indicio del estatus aristocrático de las víctimas. Los estudios se complementaron con los análisis genéticos comparativos realizados con los miembros de la familia del zar encontrados en la primera fosa; esto permitió establecer vínculo biológico positivo y arribar a la conclusión de que toda la familia Romanov había sido ejecutada.^{4,5}

A la valiosa información que brindan los estudios antropológicos y genéticos, el diagnóstico por imágenes se suma a la tarea de develar las incógnitas que los distintos casos ofrecen. En 1999, en la cima del volcán Llullaillaco (6739 m sobre el nivel del mar), en el noroeste de la Argentina, se descubrieron tres cuerpos, sepultados dentro de un santuario, lo que constituye el mejor conjunto de momias, conservadas naturalmente, halladas en todo el mundo⁶. "La Doncella", de 13 años de edad, "El Niño" de entre 4 y 5 años y "La Niña del Rayo" de similar edad brindaron oportunidades analíticas inusuales y valiosas. Para abordar el análisis de la práctica inca de sacrificio de niños, conocido como "capacocha", la tomografía computarizada (TC) y la radiología formaron parte de las técnicas científicas no invasivas o mínimamente destructivas empleadas. Los datos segmentados de tomografías computarizadas mostraron que "La Doncella" estaba sentada con las piernas cruzadas, la cabeza inclinada hacia adelante y los brazos descansando libremente sobre su regazo sugiriendo su colocación allí en estado de alta sedación. La evidencia radiológica indica que sus huesos estaban intactos, y mostró además alimentos dentro del tracto gastrointestinal y un "acullico" (bolo de hojas de coca) entre sus dientes. Los más pequeños estaban radiológicamente en igualdad de condiciones, lo que indica que los niños se han mantenido sin signos de violencia y degradación desde su muerte.⁷

La reconstrucción tridimensional de rostros a partir de cráneos y la información sobre la alimentación o las regiones habitadas por individuos mediante estudios con radioisótopo también avalan la utilidad de los huesos en la identificación de individuos, hábitos de vida, origen racial, entre otros aspectos.⁸⁻¹⁰ Nuestros huesos constituyen un sustrato relevante en investigación forense pues brindan información externa como dimensiones acordes con el sexo y edad, marcas de fracturas, rasgos asociados a origen racial, entre otros. En su interior, guardan de manera celosa la molécula responsable de la herencia humana, el ADN, al que protege de ambientes adversos y del paso del tiempo. Por su resistencia, los huesos son los principales órganos que, de manera natural, nos permiten trascender, por más tiempo, más allá de nuestra existencia... hablan por nosotros, constituyendo una especie de DNI óseo que nos hace únicos.

Recibido: diciembre de 2018

Aceptado: diciembre de 2018

Referencias

1. Posth C, Nakatsuka N, Lazaridis I, Skoglund P, Mallick S, Lamnidis TC, et al. Reconstructing the Deep Population History of Central and South America. *Cell* 2018; 175(5):1185-97.
2. Gaya-Sancho B, Alemán Aguilera I, Navarro-Muñoz J, Botella López M. Sex determination in a Spanish population based on sacrum. *J Forensic Leg Med* 2018; 60:45-9.
3. Hlavaty L, Sung L. Strangulation and Its Role in Multiple Causes of Death. *Am J Forensic Med Pathol* 2017; 38(4):283-8.
4. Ivanov P. The expert identification of the remains of the imperial family by means of molecular genetic verification of genealogical relations. *Sud Med Ekspert* 1998; 41(4):30-47.
5. Coble M, Loreille O, Wadhams M, Edson SM, Maynard K, Meyer CE, et al. Mystery Solved: The Identification of the Two Missing Romanov Children Using DNA Analysis. *Plos One* 2009; 4(3):e4838.
6. Reihard J, Ceruti MC. Inca rituals and Sacred Mountains: A study of the world's Highest Archaeological Sites. Los Angeles: UCLA Cotsen Institute of Archaeology Press; 2010.
7. Wilson A, Brown E, Villa C, Lynnerup, Healey A, Ceruti M, et al. Archaeological, radiological, and biological evidence offer insight into Inca child sacrifice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(33):13322-7.
8. Prada Marcos M, De la Puente Rico R, González Fernández M, Etxeberria Gabilondo F. Aplicación de la reconstrucción facial a dos individuos de un recinto funerario romano en Astúrica Augusta. Servicio de Arqueología. Universidad del País Vasco. http://www.uam.es/otros/sepal/actas/actas_files/trabajos/09/797-808.pdf.
9. Färber D. Recovery of latent fingerprints and DNA on dead bodies. *Science & Justice* 2010;50(1): 35. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2009.11.039>
10. Santana F, Herrera M, Uribe M. Acercaamiento a la paleodieta en la costa y quebradas tarapaqueñas durante el período formativo: análisis de isótopos estables a partir de tres casos de estudio. *Boletín de la Asociación Chilena de Arqueología* 2012; 41-42: 109-126.



ARTÍCULOS ORIGINALES / *Originals*

ZOLEDRONIC ACID EFFECT ON BONE OF GROWING RATS

Patricia M. Lupión,¹ Lucas R. Brun,^{1,2} Verónica E. Di Loreto.^{1*}

¹ Laboratorio de Biología Osea, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Santa Fe.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

Abstract

Zoledronic acid (ZA) is an antiresorptive drug used in children with bone diseases like osteogenesis imperfecta, juvenile osteoporosis, fibrous dysplasia and primary bone tumors. The aim of the present study was to evaluate the effects of ZA dose accumulation on growing bone during different periods of treatment in normal rats. Methods: A 4x2 factorial design was used to study the effect of the dose of ZA (D: 0-2.5-12.5-25 μ g Z/kg body weight/s.c. weekly) and the length of treatment (T: 15-30 days) in normal female Sprague Dawley rats. Bone morphometric, histomorphometric, densitometric and biomechanical studies were performed.

Results: Femoral length and cross-sectional area were affected by both D and T. A significant interaction between D and T was observed in length with a lower value at higher dose and 30 days of treatment. Growth plate of the tibia showed a decrease in total thickness with D and T. Histomorphometric and connectivity parameters of trabecular bone were significantly increased with D and several parameters were also affected by T. Cortical bone strength was increased only with T. Biomechanical parameters of trabecular bone showed significant interaction with greater effect at higher D and T.

Conclusion: Even though a mild negative effect of the highest dose of ZA on linear and appositional growth was observed, the other bone parameters evaluated were improved. A careful risk/benefit analysis would lead us to conclude that the mild deleterious effects of ZA during growth are outweighed by the benefit obtained with treatment.

Key words: bone growth, bone diseases, bone strength, cartilage growth, zoledronic acid.

Resumen

EFFECTO DEL ACIDO ZOLEDRÓNICO EN EL HUESO DE RATAS EN CRECIMIENTO

El ácido zoledrónico (AZ) es un fármaco antirresortivo utilizado en niños con enfermedades óseas como osteogénesis imperfecta, osteoporosis juvenil, displasia fibrosa y tumores óseos primarios. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de las dosis acumuladas de AZ en el hueso en crecimiento de ratas hembras normales durante diferentes períodos de tratamiento.

Métodos: se utilizó un diseño factorial de 4x2 para estudiar el efecto de la dosis de AZ (D: 0-2,5-12,5-25 μ g Z / kg de peso corporal /sc semanalmente) y el período de tratamiento (T: 15-30 días) en ratas Sprague Dawley. Se realizaron estudios óseos morfométricos, histomorfométricos, densitométricos y biomecánicos. Resultados: la longitud y el área de sección transversal del fémur se vieron afectadas tanto por D como por T. Se observó una interacción significativa entre D y T en la longitud obteniéndose un valor más bajo a la dosis más alta y a 30 días de tratamiento. El cartílago de crecimiento de la tibia mostró una disminución en el espesor total con D y T. Los parámetros histomorfométricos y de conectividad del hueso trabecular aumentaron significativamente con D y varios parámetros también se vieron afectados por T. La fortaleza ósea cortical aumentó solo con T. Los parámetros biomecánicos del hueso trabecular mostraron una interacción significativa con un mayor efecto a mayor D y T. Conclusión: a pesar que se observó un leve efecto negativo de la dosis más alta de AZ sobre el crecimiento lineal y aposicional, el resto de los parámetros óseos evaluados mejoraron. Un análisis cuidadoso del riesgo /

*E-mail: vediloreto@yahoo.com.ar

beneficio permite concluir que los efectos negativos leves del AZ durante el crecimiento son superados por el beneficio obtenido con el tratamiento.

Introduction

Bisphosphonates (BP) are antiresorptive drugs widely used in clinical practice for the treatment of bone diseases associated with high bone turnover in adults^{1,2}. BP are structural analogs of pyrophosphate that bind to bone mineral and inhibit bone resorption by acting on osteoclasts³ and also show positive effects on the viability of osteoblasts and osteocytes⁴. They are increasingly used in pediatric patients with osteogenesis imperfecta, juvenile osteoporosis, fibrous dysplasia and primary bone tumors⁵⁻⁷.

Although they have been an effective option for childhood bone diseases, as they showed decrease in pain and fractures, their use in children and adolescents continues to be controversial. The most used BP in children is pamidronate but zoledronic acid (ZA) is being increasingly used because of its higher antiresorptive potency and reduced frequency of administration⁸. Moreover, ZA has several antitumor effects on various tissues and prevents skeletal complications in different tumors⁹. It is used with the usual chemotherapy in the treatment of primary tumors, like osteosarcoma and Ewing's sarcoma, in children and adolescents¹⁰. However, the information about safety and efficacy of ZA in young patients is limited and there are few published data about long-term use¹¹⁻¹³.

Experimental studies have suggested that BP administration may result in changes in the growing skeleton. A study carried out on healthy rats showed that alendronate causes a significant decrease in femoral and tibial length, tibial growth plate thickness, and longitudinal growth of hemi-mandibles¹⁴. Also, alendronate prevents the removal of calcified cartilage and maturation of trabeculae¹⁵. Experiments in rabbits treated with ZA showed bone resorption alterations associated with cartilage matrix retention and a decrease in tibial length¹⁶. Moreover, ZA has been found to induce marked osteosclerosis in primary and secondary spongiosa in a murine model of metastatic tumor, which generates a bone growth arrest during treatment¹⁷. Pre-clinical observations are consistent with the case of a patient who showed growth arrest for 10 months during treatment with ZA with normal gain in size once the treatment had ended¹⁸.

Palabras clave: crecimiento 3seo, enfermedades 3seas, fortaleza 3sea, cartilago de crecimiento, 3cido zoledr3nico.

Munns et al showed that bone formation rate per bone surface of children with osteogenesis imperfecta treated with pamidronate, was only 17% that of untreated osteogenesis imperfecta patients and 25% of healthy controls¹⁹. Further, endochondral growth was transiently disturbed by high doses of ZA under primary bone tumors treatment in pediatric patients¹⁸. However, it was found that ZA decreased the number of bone fractures and pain in children with osteogenesis imperfecta and osteoporosis, and improved their functional status^{20,21}. In addition, ZA showed higher Z-scores for areal bone mineral density (BMD) in lumbar spine and vertebral reshaping in children with severe osteogenesis imperfecta, but long-bones fracture rates were still high²². Moreover, a recent study showed an increase in lumbar spine areal BMD and a higher final height z-score in patients with osteogenesis imperfecta after BP treatment during growth¹³.

In summary, the data reported suggested that BP may have a negative impact on bone growth. As bone fragility in pediatric patients is different from adults, making difficult the data extrapolation, the clinical use of BP should be carefully evaluated. Studies with antiresorptive agents as BP in children are insufficient to address all the concerns about its efficacy and safety. There is not even a consensus on which BP, dose, and treatment duration to use, although experts recommend their limited use for bone diseases^{8,9}. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of ZA dose accumulation on growing bone during different periods of treatment in normal rats.

Materials and methods

Animals

Twenty-one day old female Sprague Dawley rats (n=24) provided by the School of Medicine, Rosario National University (Argentina) were used. Rats were housed in a room with 12-h light and dark cycles, and constant temperature of 24±1°C. All the experiments were conducted in accordance with international guidelines for animal care²³ and have been approved by the Bioethics Committee of our Institution. A 4x2 factorial arrangement consisting of two



factors (ZA dose [D] and length of treatment [T]) and its respective levels [D:0, 2.5, 12.5 y 25 $\mu\text{g/kg}$ body weight, subcutaneously once a week and T: 15 y 30 days] was performed. Animals were randomly assigned into 8 groups (each containing 3 animals). The period of treatment factor had implicit the cumulative dose of ZA and the animal growth. At the end of each period of treatment, rats were euthanized in a CO_2 chamber and tibias and femurs were obtained.

Bone mineral density

At the end of experiment, total BMD (mg Ca/cm^2) was determined on left tibias using X-ray absorptiometry (Work Ray 70 KV, Workman SRL, Argentina) simultaneously with an aluminum step wedge, which was previously calibrated with known calcium concentrations²⁴. The total BMD was calculated using Image J 1.48 software (NIH, Maryland, USA).

Bone histomorphometry

The proximal epiphysis of the right tibias were fixed in 10% phosphate buffered formaldehyde and decalcified in 10% EDTA before embedded in paraffin. Five- μm longitudinal sections were stained with hematoxylin and eosin and 3 sections per rat were examined. Digitalized images were obtained with a light microscope (Mikoba 320, China) and a digital camera (Olympus SP-350, China). Analyses were performed in a 2 mm^2 area at 1 mm from growth plate-metaphyseal junction. The following measurements were performed²⁵: 1) total tissue volume, TV (μm^2); 2) trabecular bone volume, BV (μm^2); and 3) trabecular bone surface, BS (μm). With these values, histomorphometrical variables were calculated: 1) bone volume, $\text{BV/TV} (\%) = [\text{BV} \cdot 100 / \text{TV}]$; 2) trabecular thickness, $\text{Tb.Th} (\mu\text{m}) = [2 / (\text{BS} / \text{BV})]$; 3) trabecular number, $\text{Tb.N} (1/\text{mm}) = [(\text{BV} / \text{TV}) / (\text{Tb.Th})]$; and 4) trabecular separation, $\text{Tb.Sp} (\mu\text{m}) = [(1 / \text{Tb.N}) - \text{Tb.Th}]$. On the same sections, growth plate thickness (GPC.Th, μm), hypertrophic cartilage thickness (HpZ.Th) and resting and proliferative cartilage thickness (R&PZ.Th) were measured on digital images. Measurements were performed at three location (25, 50 and 75 % of cartilage width) within the growth plate (3 measurements per location, see figure 1)²⁶. All the measurements were carried out by the same operator in a blind fashion using the software Image J 1.48 and they were averaged to obtain a single value per tibia.

The analysis of trabecular interconnectivity was performed as previously published^{24,27},

and the following parameters were measured using ImageJ 1.48 software: total number of nodes (Nd), number of node-to-node branches (NNd), number of node-to-termini branches (NNdTm), number of trees (T.N), number of terminals (Tm), and number of branches with two terminals (NTm). With these parameters, we calculate the interconnectivity parameters: interconnectivity index [$\text{ICI} = \text{Nd} \cdot \text{NNd} / \text{T.N} \cdot (\text{NNdTm} + 1)$]; node-to-termini ratio [$\text{R} = \text{Nd} / \text{Tm}$] and mean size of branches [$\text{Dist} (\text{mm}) = \sum \text{branches size} / (\text{NNdTm} + \text{NNd} + \text{NTm})$].

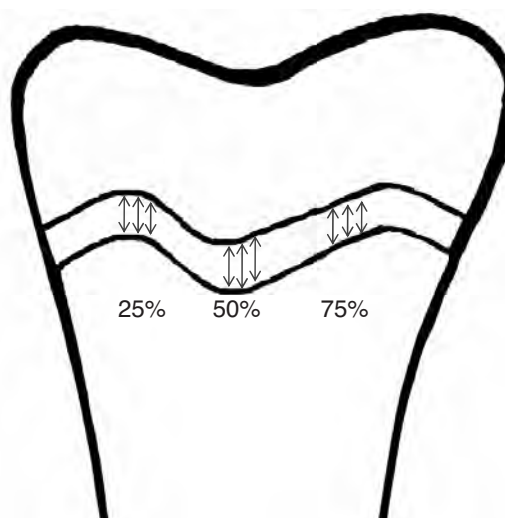


Figure 1. Scheme of measurement sites on cartilage.

Bone measurements

Longitudinal growth was assessed by measuring the femoral and tibia length using a digital caliper (accurate $\pm 0.01 \text{ mm}$). In order to assess bone appositional growth, cross sections -500 μm in thickness- of right femoral diaphyses were cut with a low speed saw (IsoMet. Buehler Ltd. Illinois, USA). A digital image was obtained at 40x magnification and the following measurements were performed using Image J 1.48 software: 1) cross-sectional area (CS.Ar: the area of bone tissue bounded by the periosteal surface, mm^2), 2) medullary area (Me.Ar: the area delineated by the endocortical surface, mm^2), 3) Cortical width (Ct.W, mm) and 4) Cross sectional moment of inertia (CSMI, mm^4) was calculated as $[(\text{periosteal diameter} / 2)^4 - (\text{medullary diameter} / 2)^4] \cdot \pi / 64$ ²⁴.

Mechanical testing

Femurs were stored at -20°C wrapped in saline-soaked gauze. For mechanical testing, they were thawed at 37°C . Cortical bone strength at the femoral mid-diaphysis was determined using a three-point bending test and

trabecular bone strength was evaluated by a compression test on a 2.5-mm thickness transversal section from distal epiphysis^{28,29}. Mechanical testing was performed on a machine designed at the engineering department of the Bone Biology Laboratory, with a 300 N load cell with 0.01 N of discrimination and an accuracy of 10 μ m in displacements. The two-bar distance for the three-point bending test was 12 mm at T15 and 13 mm at T30. The compression test was performed with a compression cone of 7.07 mm² and a speed of 0.01 mm/s was used for both tests. Load vs. displacement plots were recorded by a software (Biomedical Data Acquisition Suite 1.0, Argentina, 2011) to determine bone structural properties. The software data acquisition rate was 10 Hz. Ultimate load (N) was defined as the highest load and the fracture load (N) was recorded just before the first decline in load. The stiffness (N/mm) was determined as the slope of the linear portion of the load vs. displacement curve. Absorbed energy (mJ) was defined as the area under the curve until the fracture load point.

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ SD. Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed with D of ZA and T as analyzed factors. The multiple comparison Bonferroni post-test was performed if significant interaction was found. If there was no interaction between variables, it was indicated only if there was D or T effect. Differences were considered significant if $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using the software R 2.14.0.

Results

Bone and growth plate growth

Femoral length was affected by both D and T. As expected, a significant increase in femoral length was observed at 30 days compare to 15 days at all doses. However, a significant interaction between D and T was observed and after 30 days of treatment, femur length was lower at D25 than D0, D2.5 and D12.5. In addition, tibial length and most cartilage parameters were significantly affected by both D and T (Figure 2). Although no interaction between D and T was found, tibial length and GPC.Th showed lower values at D25 than D0, D2.5 and D12.5 after 30 days of treatment. Moreover, GPC.Th showed the lowest value at D25 also after 15 days of treatment. The R&PZ.Th and HpZ.Th was affected by D and T in a similar way as GPC (data not shown).

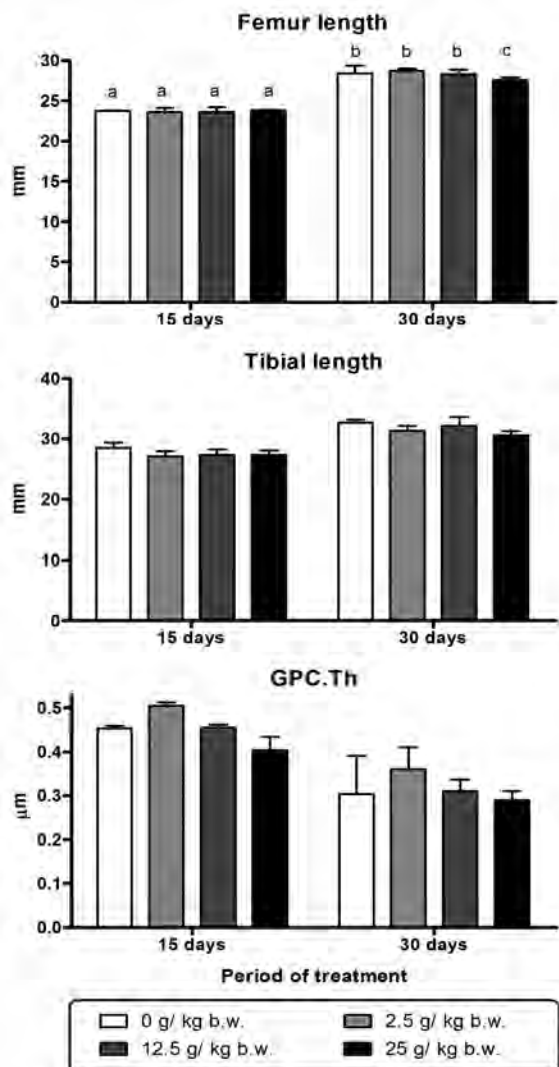


Figure 2. Effects of ZA dose accumulation on bone and growth plate growth. All parameters were significantly affected by the period of treatment. Two-way ANOVA, $p < 0.05$. Values bearing different letters between bars are significantly different (Bonferroni post-test, showed in case of interaction only).

Table 1 shows that all parameters that evaluate appositional growth were affected by the period of treatment. Moreover, the D also affected CS, Ar, Me, Ar and Ct.W. Interaction between D and T was observed only for Me. Ar where lower values were found at the highest dose in both periods of treatment. Even though there was no significant interaction between D and T in CS, Ar lower values were also observed at D25. However, the Ct.W was not negatively affected since higher values were found at all ZA doses than D0 at both period of treatment.



Table 1. Morphometric parameters

Period of treatment	15 days				30 days				Two-way ANOVA		
Dose	0	2.5	12.5	25	0	2.5	12.5	25	D	T	D-T
CS.Ar (mm²)	5.61±0.59	5.07±0.57	5.34±0.50	4.94±0.42	7.47±1.52	7.53±0.64	7.63±0.36	6.65±0.44	p<0.05	p<0.05	ns
Me.Ar (mm²)	2.87±0.47 ^a	2.26±0.23 ^{bc}	2.39±0.25 ^{bc}	2.07±0.18 ^c	2.70±0.47 ^{ab}	2.98±0.49 ^a	2.93±0.25 ^a	2.39±0.25 ^c	p<0.05	p<0.05	p<0.05
Ct.W (mm)	0.61±0.10	0.62±0.14	0.80±0.21	0.68±0.08	1.00±0.15	1.05±0.23	1.17±0.16	1.15±0.25	p<0.05	p<0.05	ns

Two-way ANOVA, Bonferroni post-test (for interaction only). Values bearing different letters between columns are significantly different ($p<0.05$). Abbreviation = D: ZA doses; T: period of treatment; D-T: dose and time interaction; CS.Ar: cross-sectional area; Me.Ar: medullary area; Ct.W: Cortical width.

BMD measurement

Radiographs showed the characteristic radiodense lines in the metaphyses of ZA treated rats that corresponded to the number of administered doses (2 or 4). BMD was only affected by T (Two-way ANOVA, $p<0.05$) and no interaction between D and T was observed (T15 days: D0=10.34±3.67 mg Ca/cm², D2.5=7.84±2.97, D12.5=11.56±2.39,

D25=11.10±2.88; T30 days: D0=14.31±2.14, D2.5=15.02±2.54, D12.5=16.93±5.26, D25=17.89±4.15).

Bone histomorphometry

D but not T had effect on most histomorphometric parameters (Table 2). A significant effect of T was found only on Tb.N. The higher BV/TV in D12.5 and D25 after 15 and 30 days of treatment was due to an increased in Tb.Th and Tb.N.

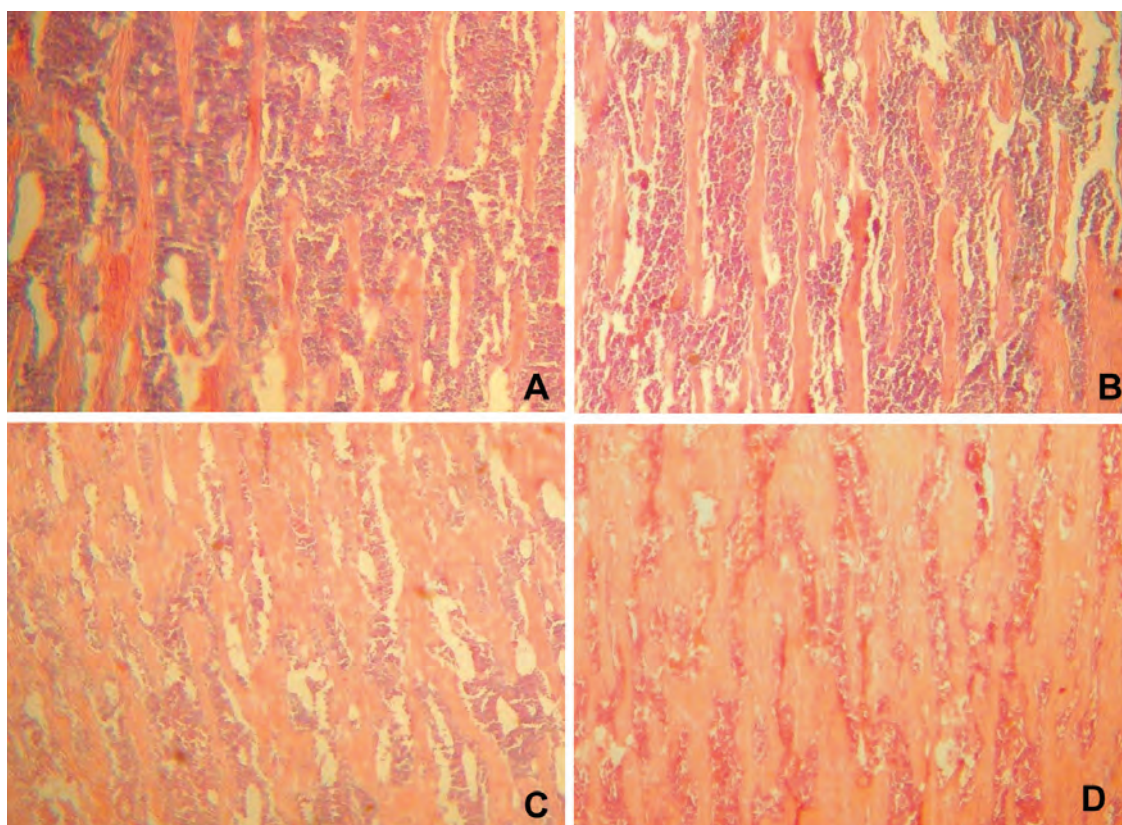


Figure 3. Representative images (40x) of trabecular bone of tibiae showing the effect of dose at 30 days of treatment. A: D0, B: D2.5, C: D12.5 and D: D25.

Table 2. Bone histomorphometry measurements

Period of treatment	15 days				30 days				Two-way ANOVA		
Dose	0	2.5	12.5	25	0	2.5	12.5	25	D	T	D-T
BV/TV (%)	29.02±11.68	30.96±9.63	41.08±0.65	49.90±9.48	31.36±7.10	39.20±6.27	50.20±7.41	50.14±1.98	p<0.05	ns	ns
Tb.Th (µm)	36.50±8.02	35.50±5.99	44.80±6.33	47.30±9.11	37.30±1.85	39.40±1.17	43.00±2.65	44.00±6.03	p<0.05	ns	ns
Tb.N (mm ⁻¹)	7.81±1.44	8.63±1.40	9.26±1.16	10.57±0.56	8.43±1.94	9.90±1.57	11.69±1.51	11.49±1.05	p<0.05	p<0.05	ns
Tb.Sp (µm)	94.90±29.30	82.80±25.30	64.10±7.39	47.40±9.37	85.20±24.7	65.30±21.4	43.60±12.4	43.70±2.10	p<0.05	ns	ns

Two-way ANOVA. Abbreviation = D: ZA doses; T: period of treatment; D-T: dose and time interaction; BV/TV: bone volume; Tb.Th: trabecular thickness; Tb.N: trabecular number; Tb.Sp: trabecular separation

Table 3. Trabecular connectivity assessment

Period of treatment	15 days				30 days				Two-way ANOVA		
Dose	0	2.5	12.5	25	0	2.5	12.5	25	D	T	D-T
ICI	0.35±0.11	0.63±0.40	0.41±0.01	1.05±0.06	0.59±0.39	0.78±0.28	1.64±0.51	2.70±1.18	p<0.05	p<0.05	ns
R	0.31±0.09	0.40±0.11	0.36±0.07	0.58±0.01	0.34±0.07	0.54±0.13	0.61±0.11	0.72±0.13	p<0.05	p<0.05	ns
Dist (mm)	0.13±0.05	0.15±0.01	0.22±0.01	0.20±0.04	0.14±0.01	0.17±0.01	0.18±0.01	0.17±0.02	p<0.05	ns	ns
NTm	17.5±8.85	6.33±1.15	6.25±6.01	4.00±3.61	16.8±2.47	9.50±6.06	6.67±0.76	5.67±3.51	p<0.05	ns	ns

Two-way ANOVA. Abbreviation = D: ZA doses; T: period of treatment; D-T: dose and time interaction; ICI: interconnectivity index; R: node-to-termini ratio; Dist: mean size of branches; NTm: number of branches with two terminals.

Connectivity parameters were affected by D and T except for Dist which only was affected by the D (Table 3). Despite no interaction between both factors, higher ICI and R values were found in groups with D12.5 and D25 after 15 and 30 days of treatment showing an increase in trabecular connectivity. Moreover, the NTm parameter, which provides information about loss of connectivity in the bone architecture, was decreased in all groups treated with ZA independently of the length of treatment.

Mechanical testing

Biomechanical parameters of cortical bone, analyzed with three-point bending test and the CSMI were affected only by length of treatment (Table 4), except for absorbed energy, which was affected by both factors. On the other hand, trabecular biomechanical parameters such as fracture load and stiffness were affected by the D and T. Also, significant interaction between D and T was observed, with higher values in fracture load and stiffness at all ZA doses compared with D0 after 30 days of

treatment. No effect on the absorbed energy was found in the compression test (Table 4).

Discussion

The use of BP in children and adolescents with bone diseases is increasing since they have provided significant clinical improvements such as decreased of pain, lower incidence of fractures, and better mobility^{5,6,13,20}. However, their use in childhood is still controversial because there are very few preclinical experiments and clinical trials³⁰. Despite the pamidronate intravenous infusion is being the most used treatment in children and adolescents with bone diseases, ZA is being used more frequently because of its higher potency and reduced frequency of infusion. However, the ZA efficacy and safety have not been thoroughly evaluated³¹, raising concerns on whether the drug may interfere with normal bone growth^{18,32}.

Here, we investigate the effects of ZA on bone properties in growing female normal rats using increasing doses, equivalent to different therapeutic situations in humans^{18,30,33} after two

**Table 4.** Mechanical testing

Period of treatment	15 days				30 days				Two-way ANOVA		
Dose	0	2.5	12.5	25	0	2.5	12.5	25	D	T	D-T
Three-point bending test											
Fracture load (N)	32.87±3.55	34.34±5.38	34.85±3.29	35.97±1.70	57.18±5.49	56.00±13.89	64.17±6.93	64.39±10.37	ns	p<0.05	ns
Ultimate load (N)	37.24±2.68	37.73±2.06	38.64±3.64	37.49±1.70	59.70±6.45	62.94±5.33	65.85±5.34	66.45±10.89	ns	p<0.05	ns
Stiffness (N/mm)	71.39±19.06	71.20±7.23	102.50±38.47	85.28±37.47	158.40±38.4	133.50±39.10	149.70±60.74	289.90±239.60	ns	ns	
Absorbed energy (mJ)	29.48±7.16	27.37±5.73	30.13±6.05	27.44±1.98	48.07±9.35	55.66±11.85	62.72±6.01	44.27±13.82	p<0.05	p<0.05	ns
CSMI (mm ⁴)	1.27±0.62	0.97±0.49	1.41±0.58	1.11±0.58	2.23±0.62	2.68±1.30	2.84±0.50	3.14±0.36	ns	p<0.05	ns
Compression test											
Fracture load (N)	25.45±5.94 ^a	37.61±35.12 ^a	53.49±22.91 ^a	37.75±25.49 ^a	35.75±7.96 ^a	106.90±35.07 ^b	111.20±34.12 ^b	126.40±33.57 ^b	p<0.05	p<0.05	p<0.05
Stiffness (N/mm)	162.00±99.75 ^a	197.00±141.90 ^a	254.80±132.80 ^a	154.80±109.40 ^a	209.40±84.13 ^a	572.00±291.30 ^{ab}	885.10±534.40 ^{bc}	1085.80±813.30 ^c	p<0.05	p<0.05	p<0.05
Absorbed energy (mJ)	12.63±18.62	11.46±10.53	9.12±10.80	6.85±11.54	5.55±3.79	12.83±7.59	16.98±12.85	14.82±9.08	ns	ns	ns

Two-way ANOVA, Bonferroni post-test (for interaction only). Values bearing different letters between columns are significantly different ($p<0.05$). Abbreviation = D: ZA doses; T: period of treatment; D-T: dose and time interaction.

periods of treatment in order to analyze the effect of dose accumulation. In spite of the increasing cumulative dose of ZA, all bone parameters were improved according to the expected growth through the experiment. However, linear and appositional growth were negatively affected under the treatment with the highest cumulative dose of ZA. Femoral and tibial length were lower at D25 compared to D0, D2.5 and D12.5 after 30 days of treatment, an effect that was not found after 15 days of treatment indicating that the cumulative dose of ZA could affect bone growth. On the other hand, GPC.Th was affected by the highest ZA dose from 15 days of treatment. These early effects on the growth plate could explain the ZA effect on femur and tibia growth after 30 days of treatment. These findings are consistent with previous studies. Thus, Oyhanart et al showed that alendronate interferes with long-bone and mandibular growth¹⁴. In addition, a study in mice with osteosarcoma treated with ZA showed a decrease in tibial length¹⁸. Moreover, a decrease in tibial longitudinal growth rate was observed after pamidronate or ZA administration in growing rats³⁴. The effect on longitudinal growth might be due to the ZA action on osteoclasts since they play an important role in the process of endochondral ossification.

Nevertheless, studies in pediatric patients with osteoporosis treated with ZA showed that longitudinal growth was unaffected during treatment^{33,21}. This is consistent with our results because at low doses -similar to those used for osteoporosis- no longitudinal growth alteration was observed, independently of the length of treatment evaluated in this study. However, the effect of BP on bone length might depend on type, dose, and frequency of BP and age or medical history of the patient and the possibility of a decrease in children height should be considered and monitored.⁹

Linear growth has been a concern in pediatric patients treated with BP, but the appositional growth has received less attention, although it is important for the development of the skeleton, being one of the determinants of bone strength³⁵. During bone growth, bone formation is uncoupled to resorption to shape the bone through modeling. Consistent with this action of osteoclasts, it has been observed in patients with osteogenesis imperfecta treated with pamidronate that this drug interferes with periosteal resorption, process that is normally responsible for the shape of the distal femoral metaphysis³⁶. Also BP inhibit endosteal resorption but not periosteal apposition resulting in an increased cortical thickness and a higher

strength³⁷. In our study all morphometric parameters -used to evaluate appositional growth- were affected by D and T. Only D25 showed a mild negative effect on CS. Ar but that was counteracted by a decreased of Me. Ar avoiding affect Ct.W and achieving a better distribution of material as shown by CSMI after 30 days of treatment. At the shorter period of treatment (15 days), an 11.8% decrease on Cs. Ar and a 27% decrease on Me. Ar were found indicating a rapid inhibition of bone resorption. This led to an increase of Ct.W indicating that bone resorption was inhibited by ZA therapy but activity on periosteal surfaces was less affected as determined in modeling. The mechanical properties of cortical bone were increased by the period of treatment and only the absorbed energy was negatively affected by the ZA dose. However, this negative effect of the highest ZA accumulated dose on absorbed energy and CS. Ar was not enough to decrease bone strength. This could be due to the greater CSMI shown at D25 after 30 days of treatment indicating a better spatial distribution of material that is highly correlated with bone strength as mentioned above³⁸.

The bone mass acquired during the growth was evaluated by BMD and the percentage of bone volume. BMD was only affected by the period of treatment. The lack of significant dose effect could be due to the low sensitivity of the technique and would be a limitation of this study. However, ~20% increase in a BMD was observed at D25 after 30 days of treatment which could be explain by the increase in trabecular bone volume. Furthermore, the trabecular bone volume was increased with all ZA doses after 15 and 30 days of treatment as a consequence of increase in both trabecular thickness and, mainly, in trabecular number. The latter could be due to the fact that antiresorptive therapy led to a lesser resorption of primary trabeculae that, necessarily, became secondary trabeculae³⁹. In addition, the connectivity indexes also increased with dose and the length of treatment, indicating an improved bone architecture, which could impact on the biomechanical evaluation. These finding matched the observations by Pataki et al.³⁴ but were different to those conducted in children with osteogenesis imperfecta where the increase in bone volume was due only to an increased in trabecular number but without any effect on trabecular thickness³⁹.

On the other hand, the compression test, which evaluates the trabecular mechanical properties, showed a favorable effect of dose and the length of treatment on fracture load and stiffness –without changes in absorbed energy. In addition, an interaction of both factors was found in fracture load and stiffness. The improved trabecular mechanical properties could be attributable not only to the increased bone volume but also to the bone microarchitecture since better connectivity parameters were found. Although not significant, a borderline p value ($p=0.07$) for interaction was found in ICI parameter indicating that the trabecular connectivity would be greater at the highest dose of ZA. In summary, our results indicate that ZA treatment would not have significant negative effects on the mechanical properties of the growing bone. Moreover, an improved on trabecular parameters were observed in all ZA doses.

Some limitations of this study must be pointed out. The experiment was carried out with healthy animals and these findings should be confirmed using experimental models of bone diseases. On the other hand, the conversion of equivalent doses between human and rats, and the possible different pharmacodynamics of ZA between them should be highlighted. However, in spite of limitations, this work carried out a complete bone analysis assessment, including morphometric, densitometric, histomorphometric and biomechanical analysis. Therefore it contributes to current knowledge on the effects of ZA dose accumulation on bone growth.

In conclusion, even though a mild negative effect of the highest dose of ZA on linear and appositional growth were observed; bone volume, trabecular connectivity and trabecular mechanical properties of growing bone were improved also at the highest cumulative ZA dose. As the highest dose was comparable to those used in models of bone pathologies related to primary tumors or bone metastasis, a careful risk/benefit analysis would lead us to conclude that the mild deleterious effects of ZA during growth are outweighed by the benefit obtained with treatment.

Conflict of interest: None to declare

Recibido: septiembre de 2018
Aceptado: noviembre de 2018



Referencias

1. Adler RA, El-Hajj Fuleihan G, Bauer DC et al. Managing osteoporosis in patients on long-term bisphosphonate treatment: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 2016; 31:16-35.
2. Black DM, Rosen CJ. Clinical Practice. Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med* 2016; 374:2542-62.
3. Rogers MJ. From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 2004; 75:451-61.
4. 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; 104:1363-1374.
5. Rauch F, Glorieux FH. Bisphosphonates treatment in osteogenesis imperfecta: which drug, for whom, for how long? *Ann Med* 2005; 37:295-302.
6. Majoor BC, Appelman-Dijkstra NM, Fiocco M, van de Sande MA, Dijkstra PD, Hamdy NA. Outcome of long-term bisphosphonate therapy in McCune-Albright syndrome and polyostotic fibrous dysplasia. *J Bone Miner Res* 2017; 32:264-276.
7. Aapro M, Abrahamsson PA, Body JJ et al. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: recommendations of an international expert panel. *Ann Oncol* 2008; 19:420-432.
8. Bachrach L, Ward L. Clinical Review: bisphosphonate use in childhood osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:400-409.
9. Eghbali-Fatourechi G. Bisphosphonate therapy in pediatric patients. *J Diabetes Metab Disord* 2014; 13:109.
10. Odri GA, Dumoucel S, Picarda G et al. Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. *Cancer Res* 2010; 70:7610-7619.
11. Al-Agha AE, Hayatalhazmi RS. Osteoporosis treatment with zoledronic acid in pediatric population at a university hospital in Western Saudi Arabia. A 13-year experience. *Saudi Med J* 2015; 36:1312-1318.
12. Kumar C, Panigrahi I, Somasekhara Aradhya A, Meena BL, Khandelwal N. Zoledronate for Osteogenesis imperfecta: evaluation of safety profile in children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2016; 29:947-52.
13. Trejo P, Palomo T, Montpetit K, Fassier F, Sato A, Glorieux FH, Rauch F. Long-term follow-up in osteogenesis imperfecta type VI. *Osteoporos Int* 2017; 28:2975-2983.
14. Oyhanart SR, Escudero ND, Mandalunis PM. Effect of alendronate on the mandible and long bones: an experimental study in vivo. *Pediatr Res* 2015; 78:618-625.
15. Bradaschia-Correa V, Barrence FA, Ferreira LB, Massa LF, Arana-Chavez VE. Effect of alendronate on endochondral ossification in mandibular condyles of growing rats. *Eur J Histochem* 2012; 56:e24.
16. Smith EJ, Little DG, Briody JN, McEvoy A, Smith NC, Eisman JA, Gardiner EM. Transient disturbance in physal morphology is associated with long-term effects of nitrogen-containing bisphosphonates in growing rabbits. *J Bone Miner Res* 2005; 20:1731-1741.
17. Nyangoga H, Blouin S, Libouban H, Baslé MF, Chapard D. A single pretreatment by zoledronic acid converts metastases from osteolytic to osteoblastic in the rat. *Microsc Res Tech* 2010; 73:733-740.
18. Battaglia S, Dumoucel S, Chesneau J et al. Impact of oncopediatric dosing regimen of zoledronic acid on bone growth: preclinical studies and case report of an osteosarcoma pediatric patient. *J Bone Miner Res* 2011; 26:2439-2451.
19. Munns CF, Rauch F, Travers R, Glorieux FH. Effects of intravenous pamidronate treatment in infants with Osteogenesis Imperfecta: clinical and histomorphometric outcome. *J Bone Miner Res* 2005; 20:1235-1243.
20. Vuorimies I, Toivainen-Salo S, Hero M, Mäkitie O. Zoledronic acid treatment in children with osteogenesis imperfecta. *Horm Res Paediatr* 2011; 75:346-353.
21. Brown JJ, Zacharin MR. Safety and efficacy of intravenous zoledronic acid in paediatric osteoporosis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2009; 22:55-63.
22. Palomo T, Fassier F, Ouellet J, Sato A, Montpetit K, Glorieux FH, Rauch F. Intravenous bisphosphonate therapy of young children with osteogenesis imperfecta: skeletal findings during follow up throughout the growing years. *J Bone Miner Res* 2015; 30:2150-2157.
23. Canadian Council on Animal Care Guidelines. Guide to the care and use of experimental animal. 2nd ed. 1998.
24. Brun LR, Brance ML, Lombarte M, Maher C, Di Loreto VE, Rigalli A. Effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on histomorphometry, biomechanics, and densitometry on bones in the rat. *Calcif Tissue Int* 2015; 97:527-534.
25. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013; 28:2-17.
26. Evans KD, Sheppard LE, Grossman DI, Rao SH, Martin RB, Oberbauer AM. Long term cyclic pamidronate reduces bone growth by inhibiting osteoclast mediated cartilage-to-bone turnover in the mouse. *Open Orthop J* 2008; 2:121-125.
27. Harrar K, Hamami L. An interconnectivity index for osteoporosis assessment using X-Ray images. *J Med Biol Eng* 2012; 33:569-575.
28. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993; 14:595-608.
29. Hogan HA, Ruhmann SP, Sampson HW. The mechanical properties of cancellous bone in the proximal tibia of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2000; 15:284-292.

30. Zhu ED, Louis L, Brooks DJ, Bouxsein ML, Demay MB. Effect of bisphosphonates on the rapid growing male murine skeleton. *Endocrinology* 2014; 155(4):1188-1196.
31. Barros ER, Saraiva GL, de Oliveira TP, Lazaretti-Castro M. Safety and efficacy of a 1-year treatment with zoledronic acid compared with pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012; 25:485-491.
32. Lézot F, Chesneau J, Battaglia S et al. Preclinical evidence of potential craniofacial adverse effect of zoledronic acid in pediatric patients with bone malignancies. *Bone* 2014; 68:146-152.
33. SimmPJ, Johannesen J, Briody J et al. Zoledronic acid improves bone mineral density, reduces bone turnover and improves skeletal architecture over 2 years of treatment in children with secondary osteoporosis. *Bone* 2011; 49: 939-943.
34. Pataki A, Müller K, Green JR, Ma YF, Li QN, JeeWS. Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during, and after treatment. *Anat Rec* 1997; 249:458-468.
35. Turner CH. Bone strength: current concepts. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1068:429-446.
36. Land C, Rauch F, Glorieux FH. Cyclical intravenous pamidronate treatment affects metaphyseal modeling in growing patients with osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Res* 2006; 21:374-379.
37. Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis Imperfecta. *Lancet* 2004; 636:1377-1385.
38. Augat P, Reeb H, Claes LE. Prediction of fracture load at different skeletal sites by geometric properties of the cortical shell. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1356-1363.
39. Rauch F, Travers R, Plotkin H, Glorieux FH. The effects of intravenous pamidronate on the bone tissue of children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *J Clin Invest* 2002; 110:1293-1299.



ARTÍCULOS ORIGINALES / *Originals* / Premio AAOMM 2018

EVIDENCIA ORIGINAL DIRECTA (DINAMOMÉTRICO-TOMOGRÁFICA) DE LA INFLUENCIA SITIO-ESPECÍFICA DE LA MUSCULATURA SOBRE LA ESTRUCTURA ÓSEA. HACIA UNA CONCEPCIÓN MÁS AMPLIA DEL MECANOSTATO

Laura M. Nocciolino,^{1,2} Sergio H. Lüscher,¹ Nicolás Pilot,² Leandro Pisani,² Leandro Mackler,¹ Gustavo R. Cointry,³ Alex Ireland,⁴ Jörn Rittweger,⁴ José L. Ferretti,^{1,2*} Ricardo F. Capozza^{1,2}

¹ Centro de Estudios de Metabolismo Fosfocálcico (CEMFoC), Hospital Provincial del Centenario y Facultad de Ciencias Médicas, UNR, Rosario, Argentina. ² Unidad de Estudios Biomecánicos Osteo-Musculares (UDEBOM), Centro Universitario de Asistencia, Docencia e Investigación (CUADI), Universidad Gran Rosario (UGR), Rosario, Argentina. ³ School of Healthcare Science, Manchester Metropolitan University (MMU), Manchester, UK. ⁴ Division of Space Physiology, German Space Agency (DLR), Institute of Aerospace Medicine, Colonia, Alemania.

Resumen

Para analizar el impacto directo de la musculatura sobre la estructura ósea se determinaron el área (CtA), la densidad mineral ósea volumétrica (vDMOc) y los momentos de inercia corticales para flexión anteroposterior y lateral (MI_{ap}, MI_{lat}) ajustados a CtA, y las relaciones entre MI y vDMOc (de 'distribución/calidad', d/c, que describen la eficiencia de la optimización biomecánica del diseño cortical por el mecanostato) en 18 cortes seriados a lo largo de todo el peroné del lado hábil (pQCT), y la fuerza de salto y de rotación externa del pie (dinamometría computarizada) de 22 hombres sanos de 18 a 33 años entrenados en fútbol competitivo por más de 4 años, y de 9 controles etarios no entrenados. Los entrenados tuvieron valores más altos de MI en función de la fuerza de rotación del pie (no de salto), con un ajuste homogéneo para MI_{ap} pero variable (más pobre distalmente y más alto proximalmente, en la región de inserción de los peroneos) para MI_{lat}, coincidiendo este último con pobres ajustes de las relaciones d/c (efecto arquitectónico independiente de la rigidez del tejido). Esto evidencia la influencia directa de la tracción de la musculatura peronea sobre la estructura cortical proximal subyacente del hueso y también sugiere que el mecanostato procedería, en este caso, fuera de su conocida concepción como mecanismo regulador de la resistencia ósea.

Palabras clave: peroné, interacciones músculo-hueso, mecanostato, dinamometría, pQCT.

Abstract

**ORIGINAL DYNAMOMETRIC AND TOMOGRAPHIC EVIDENCE OF SITE-SPECIFIC MUSCLE EFFECTS ON BONE STRUCTURE.
TOWARDS A WIDER SCOPE ON THE BONE MECHANOSTAT CONCEPT**

To analyze the direct impact of muscle contractions on the structure of bones, we determined the cortical cross-sectional area (CtA), volumetric mineral density (vBMDc) and the CtA-adjusted moments of inertia for anterior-posterior and lateral bending (MI_{ap}, MI_{lat}), and the 'distribution/quality' (d/c) relationships between MIs and vBMDc (which describe the efficiency of the biomechanical optimization of cortical design by bone mechanostat) in 18 serial scans taken throughout the fibula of the dominant side (pQCT), and the jump and the foot-lateral-rotation forces (computed dynamometry) of 22 healthy men aged 18-33 years, who had been trained in competitive soccer for more than 4 years, and of 9 untrained, age-matched controls. Trained individuals showed higher MI values as a function of the rotative force of the foot (not the jumping force). The adjustment of these relationships was homogeneous for MI_{ap} throughout the bone, but

*E-mail: joseferretti@gmail.com

variable (poorer distally and higher proximally, at the insertion area of peroneus muscles) for MI_{lat} , this latter being paralleled by poor adjustments of the corresponding, d/c relationships (architectural effect independent of tissue stiffness). These findings, 1. Show the direct influence of the traction force of peroneal

muscles on proximal fibula structure close to the insertion area, and 2. Suggest that, in the studied conditions, the bone mechanostat would proceed beyond its known conception as a regulatory mechanism of structural bone strength.
Key words: fibula, muscle-bone interactions, bone mechanostat, dynamometry, pQCT.

Introducción

No es fácil evidenciar directamente la influencia puntual de la fuerza muscular sobre la estructura del hueso sometido a la tracción ejercida. Hemos demostrado que el peroné humano ofrece un modelo adecuado. Las respuestas de la estructura cortical peronea difieren de lo esperable conforme la Teoría del Mecanostato, en total contraste con la vecina tibia¹ que responde tradicionalmente al sistema.² El peroné es insensible al desuso,³ en tanto que la tibia pierde 20% de su masa cortical y de su rigidez a la compresión, flexión y torsión por inmovilización crónica. Además, a diferencia de la estructura tibial normal, que se refuerza homogéneamente desde el tobillo a la rodilla en todas las direcciones de deformación, el peroné muestra 5 regiones sucesivas de diferente estructura,⁴ que parecen responder de distintas formas a sollicitaciones mecánicas variables respecto del comportamiento del pie, al menos en dos instancias características:

1. Respuesta 'negativa': el entrenamiento en carrera, que solicita al pie solo en flexión/ extensión (músculos tibial anterior y sóleo), robustece (rigidiza) la tibia progresivamente en sentido proximal, como es esperable, en todas las direcciones de sollicitación mecánica.² En contraste, el mismo entrenamiento flexibiliza el peroné hacia el centro de sus medio-diáfisis proximal y distal, especialmente en sentido lateral, y no lo rigidiza en ningún punto.

2. Respuesta 'positiva': un estudio preliminar de dos cortes tomográficos del peroné mostró, en contraste con 1, que el entrenamiento en fútbol, que solicita la rotación externa y la eversion del pie (músculos peroneos laterales), parece robustecer el peroné proximal. Este comportamiento particular del peroné nos sugirió que el mecanostato - naturalmente 'orientado' a la optimización de la rigidez estructural ósea en relación con la dirección predominante de las cargas usuales (principalmente musculares) - 'debería funcionar distinto de como lo hace en otros huesos, según el tipo de deformación inducida por el uso, y con cierta especificidad

regional'. Para verificarlo, analizamos la respuesta de la arquitectura cortical a lo largo de todo el peroné al entrenamiento prolongado en fútbol, en relación con la fuerza entrenada específicamente para la musculatura rotadora y la extensora del pie, y con la resistencia regional del tejido cortical peroneo a ser deformado.

Materiales y métodos

Estudiamos integralmente la estructura seccional del peroné (18 cortes tomográficos seriados por hueso, efectuados cada 5% de la longitud tibial, desde 5% proximal al tobillo (sitio S5) hasta 10% distal a la rodilla (S90), en 22 varones sanos de 18 a 33 años, entrenados en fútbol competitivo (F) por un período no menor de 4 años, y en 9 controles etarios sanos, no entrenados previamente en forma específica (NE). Se realizaron en total 248 cortes. Se determinaron indicadores corticales de masa (área cortical, CtA), rigidez específica (DMO volumétrica, vDMOc) y diseño (momentos de inercia calculados para la resistencia a la flexión anteroposterior, MI_{ap} , y lateral, MI_{lat}) del peroné (pQCT, XCT-2000, Stratec), y, además, la fuerza máxima (F_{max}) de rotación externa (dinamómetro computarizado de diseño y construcción propios) y de extensión del pie (plataforma computarizada de salto). Los MI se expresaron por unidad de CtA, para neutralizar su correlato alométrico, manteniendo su condición de indicadores de la eficiencia de distribución del tejido cortical por el mecanostato (modelación orientada en relación con los ejes de deformación) por unidad de masa cortical presente para resistir a cada clase de desafío.

Análisis estadístico

Ambos MI (y) se correlacionaron con la F_{max} de rotación y de extensión del pie (x_1), para analizar su dependencia de la musculatura, y con la vDMOc (x_2) para obtener las llamadas 'curvas de distribución/calidad' (d/c)⁵, cuyo coeficiente r estima la eficiencia de la distribución del tejido por el mecanostato para optimizar la resistencia del hueso a la flexión anteroposterior o lateral, en función inversa de su rigidez intrínseca.



Resultados

La vDMOc fue leve pero significativamente menor (aproximadamente 2%, $p < 0,01$) solo en la mitad proximal del peroné en F; pero ambos MI fueron mucho mayores en F que en NE en todos los sitios estudiados (ANOVA factorial, siempre $p < 0,001$).

Los valores de ambos MI (y) correlacionaron exponencialmente con la Fmax de rotación del pie (ejemplo para MI_{lat} en S80 en Figura 1), pero no con la de salto (no mostrado), con distintos grados de ajuste para cada indicador y para cada sitio. Para MI_{ap} , la relación mantuvo un ajuste homogéneo para todo el hueso (Figura 2).

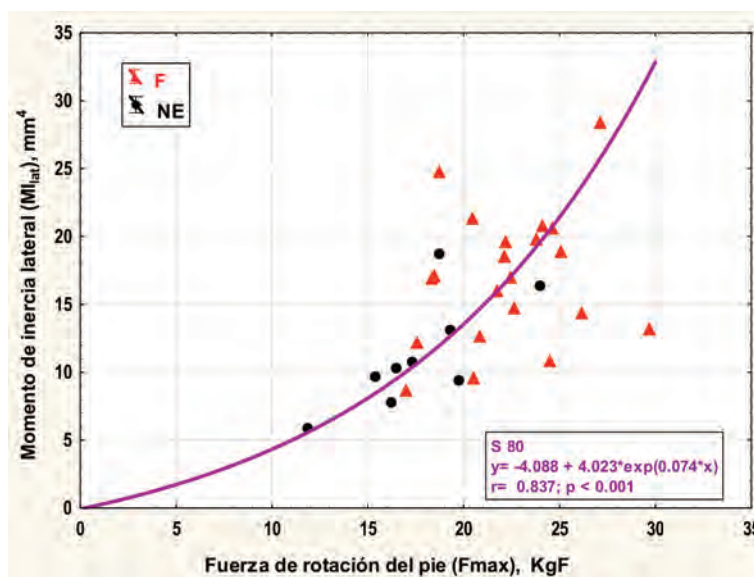


Figura 1. Correlación entre la aptitud del diseño seccional peroneo para resistir a la deformación en flexión lateral (MI_{lat}) (y) y la fuerza máxima de rotación externa del pie (x) para el sitio S80 del hueso.

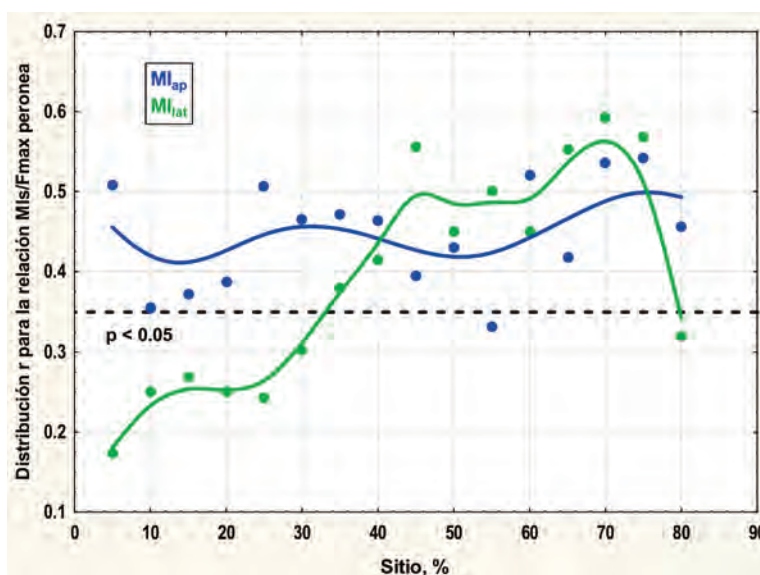


Figura 2. Variación de los ajustes estadísticos (coeficientes r) de las relaciones de los indicadores de la eficiencia del diseño seccional peroneo para resistir la deformación en flexión lateral (MI_{lat}) y anteroposterior (MI_{ap}) (y) con la fuerza máxima de rotación externa del pie (x), a lo largo de todo el peroné. Se indica el nivel de significación $p < 0,05$ del coeficiente como referencia.

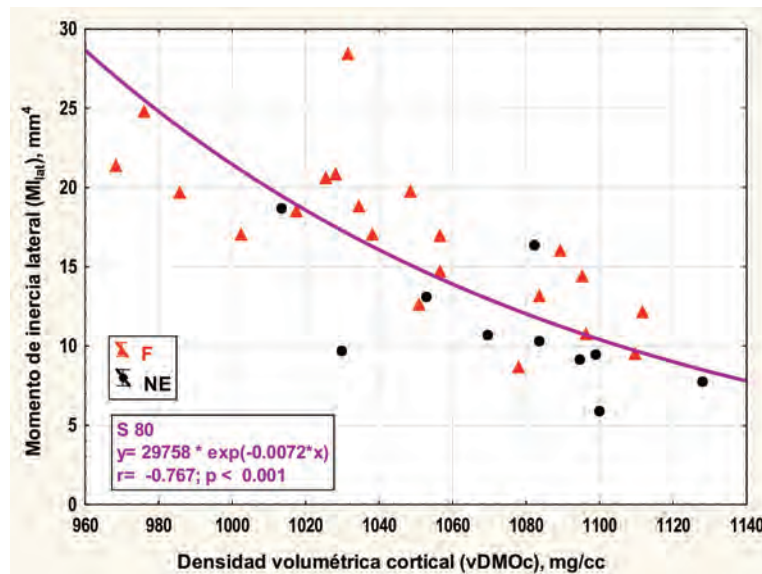


Figura 3. Correlación entre la aptitud del diseño seccional peroneo para resistir a la deformación en flexión lateral (MI_{lat}) (y) y la rigidez específica del tejido óseo cortical, estimada por su densidad mineral volumétrica (x).

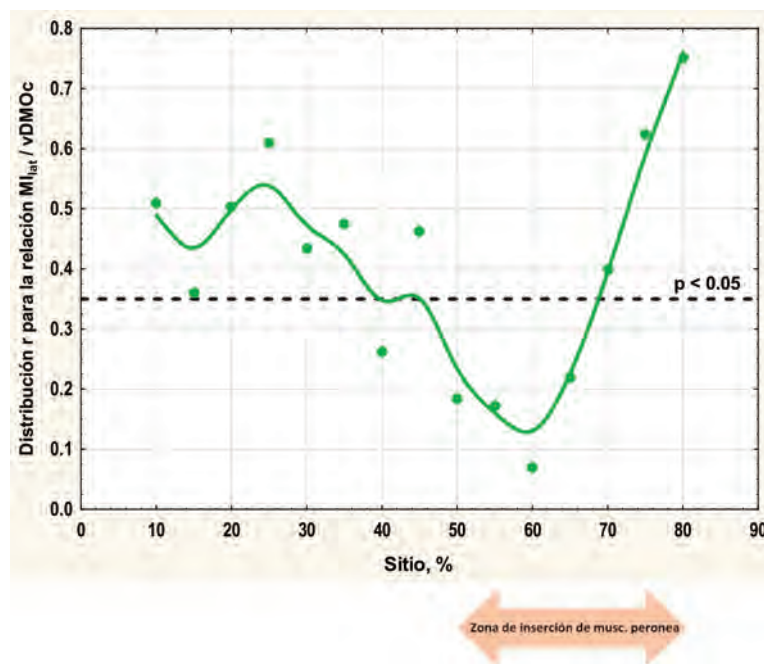


Figura 4. Variación de los ajustes estadísticos (coeficientes r) de la relación entre el indicador de la eficiencia del diseño seccional peroneo para resistir la deformación en flexión lateral (MI_{lat}) y la densidad volumétrica cortical ($vDMOc$), a lo largo de todo el peroné. Se indican, como referencia, el nivel de significado $p < 0,05$ del coeficiente. La flecha indica la extensión de las regiones de inserción de los músculos peroneos laterales.

Para MI_{lat} , en cambio, el ajuste fue similar o mayor hacia la región S45-S75, correspondiente

al área de inserción de los peroneos laterales largo y corto, y llamativamente bajo distalmente.



Las relaciones d/c (típicamente hiperbólicas) describieron el comportamiento de MI_{ap} y MI_{lat} de ambos grupos en función de la rigidez específica del tejido duro como curvas globales únicas (ejemplo para S80 en Figura 3). El ajuste estadístico de estas curvas (coeficientes r , Figura 4) varió a lo largo del hueso en forma casi especular respecto de lo observado para la relación entre el MI_{lat} (no el MI_{ap}) y la fuerza peronea (Figura 3) (efecto arquitectónico independiente de la rigidez del tejido).

Discusión

En contraste con la referida respuesta peronea 'negativa' al entrenamiento en carrera, los resultados confirman la respuesta estructural 'positiva' al entrenamiento en F para todo el hueso, y presentan, además, evidencias originales respecto de: 1) la importancia de la direccionalidad de la estimulación mecánica para la determinación de la estructura ósea y 2) los diferentes modos de acción del mecanostato en distintos sitios de un mismo hueso.

1) El sentido de deformación peronea más específicamente solicitado por el entrenamiento en F para rotar el pie es el lateral, producto de la tracción hacia afuera del peroné medio-distal por los músculos peroneos. Concordando con esto, las correlaciones con la fuerza de los peroneos muestran una distinta eficiencia de las cargas para la determinación modelatoria indicada por cada MI estudiado. Para MI_{ap} , esa eficiencia fue homogénea a lo largo de todo el hueso. En cambio, para MI_{lat} fue muy baja en la mitad distal (libre de inserciones) y alcanzó valores iguales o mayores que los correspondientes al MI_{ap} en la región de inserción de los peroneos. Esto no implica necesariamente que las diferencias en MI_{lat} entre F y NE hayan sido fisiológicamente más significativas que las observadas para MI_{ap} en esa región, sino que las primeras dependieron más claramente de la tracción de la musculatura sobre sus inserciones óseas que las segundas. Este efecto contrastó con la falta de relación entre las mejoras de los MI y la fuerza de salto, ajena al entorno mecánico peroneo, a lo largo de todo el hueso. Con la obvia excepción de las entesis, este hallazgo constituiría la primera evidencia directa (dinamométrico-tomográfica) de un efecto determinante, sitio-específico, del entorno mecánico (tracción ejercida por el músculo sobre su área de inserción) sobre la estructura subyacente de un hueso.

2) El mecanostato tendería a optimizar la resistencia ósea a la fractura distribuyendo el tejido cortical según la dirección predominante de sus deformaciones usuales.⁶ Las curvas d/c reflejan la relación negativa entre la distribución del tejido cortical para resistir deformaciones (MI) y su resistencia a deformarse (rigidez intrínseca, $vDMOc$). El entrenamiento en F respetó la relación d/c natural manifestada por el grupo NE en todo el hueso respecto de MI_{ap} , pero no de MI_{lat} , justamente en la región de inserción de los peroneos. Esto indica que, en esa región, direccionalmente crítica, la eficiencia del mecanostato no dependería de la docilidad del tejido a deformarse lateralmente; es decir, privilegiaría otras funciones relativas a la actividad entrenada (robustez de la inserción muscular, para el caso), independientemente del mantenimiento de una resistencia adecuada al uso en esa dirección.⁷ Los referidos efectos negativos en corredores, algunas evidencias filogenéticas (desarrollo peroneo en euterios predadores)⁸ y algunas opiniones relevantes de otros autores⁹ apoyan esta interpretación original, que sugiere que la defensa de la resistencia ósea por el mecanostato sería solo un subconjunto dentro de un grupo de funciones más amplias del sistema, con connotaciones selectivas de mayor prioridad relativa.

Conclusiones

Los resultados ofrecen evidencias directas originales del efecto direccional (positivo) de la tracción de la musculatura sobre la estructura ósea subyacente, y sugieren una interpretación más amplia del accionar del mecanostato, que podría contribuir a regular, más allá de la resistencia a la fractura, otras propiedades esqueléticas de alto valor selectivo.

Reconocimientos

Este trabajo formó parte del Proyecto de Investigación Plurianual (PIP) 435/15 financiado por el CONICET, efectuado por el CEMFoC (UNR) y el CUADI (UGR) dentro de la UDEBOM (UGR) en colaboración con los investigadores europeos Dres. Alex Ireland y Jörn Rittweger.

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

Recibido: noviembre de 2018

Aceptado: diciembre de 2018

Referencias

1. Capozza RF, Feldman S, Mortarino P, et al. Structural analysis of the human tibia by tomographic (pQCT) serial scans. *J Anat* 2010; 216(4):470-81.
 2. 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(8):1580-8.
 3. Ireland A, Capozza RF, Cointy GR, Nocciolino L, Ferretti JL, Rittweger J. Meagre effects of disuse on the human fibula are not explained by bone size or geometry. *Osteoporos Int* 2017; 28(2):633-41.
 4. Cointy GR, Nocciolino L, Ireland A, et al. Structural differences in cortical shell properties between upper and lower human fibula as described by pQCT serial scans. A biomechanical interpretation. *Bone* 2016; 90(1):185-94.
 5. Capozza RF, Rittweger J, Reina PS, et al. pQCT-assessed relationships between diaphyseal design and cortical bone mass and density in the tibiae of healthy sedentary and trained men and women. Hylonome Publications; *J Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 2013; (2):195-205.
 6. Frost HM. The Utah Paradigm of skeletal physiology. Athens: ISMNI; 2005.
 7. Huiskes R. If bone is the answer, then what is the question? *J Anat* 2000; 197(Pt 2):145-56.
 8. Marchi D. Relative strength of the tibia and fibula and locomotor behavior in hominoids. *J Hum Evol* 2007; 53(6):647-55.
 9. Pearson OM, Lieberman DE. The aging of Wolff's "law": ontogeny and responses to mechanical loading in cortical bone. *Am J Phys Anthropol* 2004; Suppl 39:63-99.
-



ARTÍCULOS ORIGINALES / *Originals* / Premio AAOMM 2018

LAS DIFERENCIAS ANTROPOMÉTRICAS ENTRE SEXOS DE LA COLUMNA LUMBAR, MEDIDAS POR DXA, NO AFECTAN A TODAS LAS VÉRTEBRAS EN FORMA UNIFORME: PROBABLE IMPLICANCIA EN LA INCIDENCIA DE FRACTURAS

Haraldo Claus-Hermberg,^{1*} María Pía Lozano,¹ Magdalena Rey,¹ Silvana Boffa,² María Josefina Pozzo¹

¹ Servicio de Endocrinología. ² Sección Densitometría. Hospital Alemán, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Las fracturas vertebrales osteoporóticas son más frecuentes en la mujer. El segmento toracolumbar es el preferentemente comprometido, en especial las vértebras D11 a L2, mientras que L4 contribuye en una proporción mínima a este evento. El objetivo del presente estudio fue investigar si el menor tamaño de las vértebras lumbares en las mujeres con respecto a los varones, involucra a todas las vértebras por igual o solamente a las que con más frecuencia se fracturan. Se analizaron en forma aleatoria las densitometrías óseas (DXA) de la región lumbar de 48 mujeres y 45 varones adultos. Se consideró el ancho del segmento L1-L2 (S L1-L2) y de L4 como un subrogado del área de sus cuerpos vertebrales.

Resultados: ancho S L1-L2 Hombres: $4,32 \pm 0,33$ cm; Mujeres: $3,78 \pm 0,23$ cm, $p < 0,001$. Ancho L4 Hombres: $5 \pm 0,37$ cm; Mujeres: $4,66 \pm 0,38$ cm, $p < 0,001$.

Diferencia de L4 menos S L1-L2: Hombres: $0,69 \pm 0,25$ cm, Mujeres: $0,88 \pm 0,27$ cm $p < 0,001$.

Ancho relativo (S L1-L2/L4): Hombres: $0,86 \pm 0,04$, Mujeres $0,81 \pm 0,04$ $p < 0,001$.

Conclusiones: en el presente estudio observamos, en consonancia con lo ya conocido, que las mujeres tienen en promedio vértebras más pequeñas que los hombres. La diferencia de tamaño no es uniforme en las vértebras lumbares, siendo el segmento L1-L2 particularmente menor comparado con L4.

Estas diferencias estructurales entre mujeres y hombres deben ser consideradas para explicar, dentro del contexto multifactorial de las fracturas vertebrales, la mayor incidencia de éstas en el sexo femenino, en particular de L1 y L2.

Palabras clave: fracturas vertebrales, tamaño vertebral, DXA (densitometría de doble haz de rayos X).

Abstract

GENDER ANTHROPOMETRIC DIFFERENCES OF THE LUMBAR SPINE, MEASURED BY DXA, DO NOT INVOLVE ALL VERTEBRAE UNIFORMLY: PROBABLE IMPLICATION IN THE INCIDENCE OF FRACTURES

Vertebral fractures occur most frequently in thoracolumbar region, especially D11- L2, while L4 contributes minimally to this event. That cannot be explained by differences in loading during daily activities or bone quality between vertebrae. Differences exist in vertebral size.

The aim of the study was to evaluate in female lumbar spines if vertebrae which most frequently fracture are smaller than L4.

We analyzed BMD (DXA) of 48 women (W) and 45 men (M). The width of the segment L1-L2 (S L1-L2) and of L4 was considered a surrogate of vertebral bodies

Results: Width S L1-L2: Men: $4,32 \pm 0,33$ cm; Women: $3,78 \pm 0,23$ cm, $p < 0,001$.

Width L4: Men: $5 \pm 0,37$; Women: $4,66 \pm 0,38$ cm, $p < 0,001$.

Difference between L4 and S L1-L2: Men: $0,69 \pm 0,25$ cm, Women: $0,88 \pm 0,27$ cm $p < 0,001$.

Relative width (S L1-L2/L4) Men: $0,86 \pm 0,04$ Women: $0,81 \pm 0,04$ $p < 0,001$.

Conclusions: the study shows, as already known, that women have smaller vertebrae than men. The differences are not uniform in the lumbar spine, L1 and L2 being particularly smaller compared to L4. These structural differences between women and men should be considered to explain, within the multifactorial

*E-mail: hclaus@fibertel.com.ar

context of vertebral fractures, the greater incidence in female, particularly L1 and L2.

Key words: vertebral fractures, vertebral size, DXA (Dual-Energy X- Ray Absorptiometry).

Introducción

A partir de la menopausia aumenta el riesgo de fracturas osteoporóticas vertebrales y no vertebrales. La incidencia y prevalencia de fracturas vertebrales es varias veces mayor en la mujer que en el hombre. Las regiones más afectadas son la mediotorácica y toracolumbar, siendo relativamente poco frecuente la fractura de L4.¹ Desde un punto de vista estrictamente mecánico, la fractura es el resultado de la acción de una fuerza sobre una estructura que no es suficientemente fuerte en sus propiedades mecánicas. Un mayor conocimiento de la relación entre ambos factores podría explicar las características epidemiológicas mencionadas previamente.

Los estudios relativos al patrón de cargas compresivas y de cizallamiento que las diversas actividades diarias ejercen sobre las estructuras de la columna (vértebras incluidas) son de difícil realización en forma directa in vivo.² Mejores resultados se obtienen aplicando modelos biomecánicos computacionales que predicen el patrón de carga sobre la columna mediante simulaciones.² Aplicado a mujeres, este modelo muestra que las cargas en la región toracolumbar difieren poco entre vértebras. Por lo tanto cabe preguntar cuáles son las diferencias estructurales por las que L4 exhibe una mayor fortaleza que D11-L2. No existen diferencias demostradas en la calidad del material óseo entre vértebras. Entre las múltiples diferencias estructurales y funcionales de importancia biomecánica entre el segmento D11-L2 y L4 cabe mencionar el mayor tamaño de L4, lo que le confiere una mayor rigidez estructural y fortaleza mecánica para soportar las cargas.²⁻⁴

Esta diferencia de tamaño para explicar la menor propensión a la fractura de L4 también puede servir para explicar la menor incidencia y prevalencia de fracturas vertebrales en los hombres, al tener éstos vértebras en general más grandes que las mujeres sin diferencia en la densitometría ósea (DMO) volumétrica entre ambos.²⁻⁴ Evidencias de la importancia del tamaño vertebral surgen de un estudio en mujeres en las que se compara el área seccional y la DMO volumétrica del cuerpo vertebral por tomografía axial computarizada (TAC) de mujeres con y sin fractura, en las que la diferencia más significativa está en el área

de las vértebras.^{5,6} Todos los estudios de tamaño vertebral mencionados se efectuaron con TAC. En un estudio de correlación entre el área del cuerpo vertebral medido por TAC y el ancho medido por DXA se obtuvo una buena correlación entre el área seccional de L3 por TAC y el ancho de la misma vértebra por DXA ($r = 0,7$).⁷

En base a esta observación se consideró el promedio del ancho del segmento L1-L2 y de L4 como un subrogado del tamaño de sus cuerpos vertebrales.

Los objetivos del estudio fueron: 1) Reproducir con DXA las diferencias entre sexos obtenidas con TAC. 2) Investigar si el menor tamaño de las vértebras lumbares en las mujeres con respecto a los varones, involucra a todas las vértebras por igual o solamente a las que con más frecuencia se fracturan.

Material y métodos

Se ingresaron en forma aleatoria 48 mujeres y 45 hombres adultos que efectuaron una densitometría de columna con las pautas de la ISCD para considerarla evaluable (se excluyeron estudios en los que las variaciones intervertebrales del Z score eran mayores a 1 DS). Los estudios se efectuaron con un densitómetro Lunar Prodigy Advance. Se midió el promedio del ancho del segmento L1-L2 (S L1-L2) y de L4. Con el propósito de evaluar si las diferencias de S L1-L2 son simplemente una manifestación más de las diferencias antropométricas entre mujeres y hombres se consideraron las siguientes covariables: talla (dada su relación con el distinto hábito corporal entre mujeres y hombres y con los distintos segmentos corporales en general) y ancho de L4 (como vértebra de referencia por su menor propensión a fracturas) con el propósito de evaluar eventuales diferencias puntuales en la proporcionalidad de S L1-L2 en relación a esa vértebra. Los anchos vertebrales mencionados se obtuvieron de los datos auxiliares del protocolo de informe del equipo DXA.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva. Los resultados se expresaron como media $\pm$ SD.

Test t de Student para la significación estadística de la comparación entre sexos de



las medias de todas las variables y los siguientes parámetros: diferencia L4 menos S L1-L2 y de S L1-L2 relativo a L4 (cociente S L1-L2/L4). Análisis de covarianza para comparación de medias de ancho S L1-L2 entre sexos ajustadas a talla y ancho L4.

Regresiones univariadas para ancho S L1-L2 vs talla y ancho L4 en toda la población y en cada grupo según sexo. Regresión univariada de S L1-L2/L4 vs L4 en cada sexo.

Regresión multivariada para S L1-L2 como variable dependiente vs sexo, talla y L4.

Se consideró resultado significativo con una $p < 0.05$.

Resultados

La talla, S L1-L2 y L4 son significativamente mayores en los hombres (Tabla 1).

El ancho del S L1-L2 correlaciona significativamente con la talla y con el ancho de L4 en toda la población: $r = 0,5$ y $r = 0,75$ respectivamente ($p < 0,001$). Dicha regresión deja de ser significativa con respecto a la talla al separar por sexos. Por el contrario ancho S L1-L2 correlaciona con L4 ($r = 0,73$ hombres, $r = 0,69$ mujeres, $p < 0,001$ para ambos, con un mayor coeficiente de regresión en hombres (Figura 1).

Tabla 1. Talla, ancho S L1-L2 y L4 en toda la población y en cada sexo (Media $\pm$ DS)

	Todos	Hombres	Mujeres	p*
Talla (cm)	164 $\pm$ 8	169 $\pm$ 7	159,3 $\pm$ 80	<0,001
Ancho S L1-L2 (cm)	4 $\pm$ 0,40	4,32 $\pm$ 0,23	3,78 $\pm$ 0,23	<0,001
L4 (cm)	4,8 $\pm$ 0,40	5 $\pm$ 0,37	4,66 $\pm$ 0,38	<0,001

*Diferencias entre hombres y mujeres

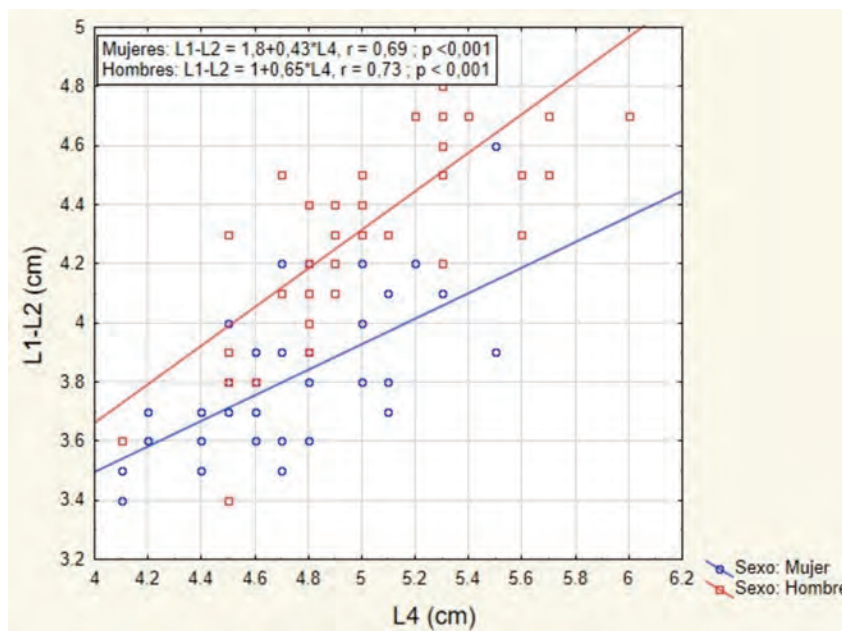


Figura 1. Regresión S L1-L2 vs L4 en mujeres y hombres. Ambos sexos tienen similar coeficiente “r” de correlación, pero la variación de S L1-L2 por cada unidad de variación de L4 expresada en los respectivos coeficientes de regresión, es mayor en hombres que en mujeres.

Tabla 2. Ancho S L1-L2 en distintos modelos de ajuste además de sexo (Media $\pm$ ES)

	Hombres	Mujeres	p*
Sexo +talla (cm)	4,28 $\pm$ 0,05	3,81 $\pm$ 0,04	< 0,001
Sexo + L4 (cm)	4,22 $\pm$ 0,03	3,87 $\pm$ 0,03	< 0,001
Sexo + talla y L4 (cm)*	4,22 $\pm$ 0,03	3,86 $\pm$ 0,03	< 0,001

*La talla deja de ser un determinante del ancho de L1-L2 en este modelo de ajuste

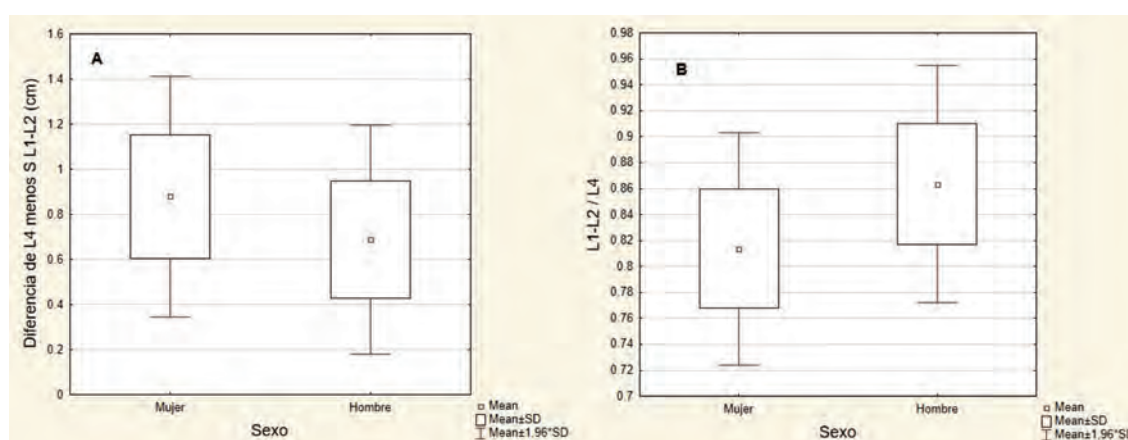


Figura 2. A. Media $\pm$ DS de la diferencia L4 menos S L1L2 en hombres y mujeres. B. Media $\pm$ DS del cociente S L1L2 / L4 en hombres y mujeres.

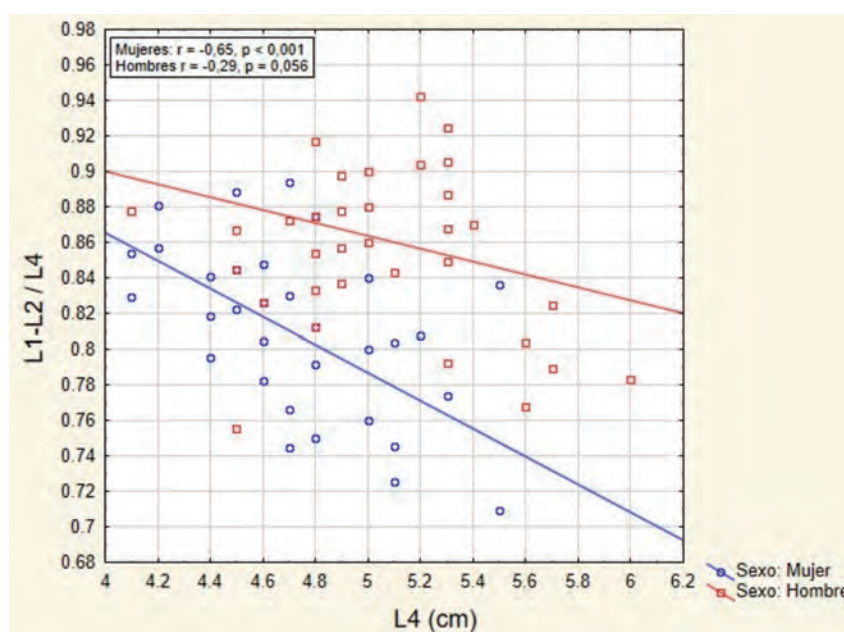


Figura 3. Regresión del cociente SL1-L2 / L4 vs L4 en hombres y mujeres. El ancho relativo de S L1-L2 con respecto a L4 disminuye más en mujeres a medida que aumenta L4.



La regresión multivariada de L1-L2 como variable dependiente vs sexo, talla y L4 como variables explicativas, mejora el coeficiente de correlación ($R = 0.86$) con los siguientes coeficientes de regresión $\beta \pm ES$: L4 0.56 ± 0.062 $p < 0.001$, sexo: 0.46 ± 0.069 $p < 0.001$, talla: NS. La diferencia de ancho entre L4 y el S L1-L2 es 0.88 ± 0.27 cm en las mujeres y 0.69 ± 0.26 cm en los varones; $p < 0.001$ (Figura 2 A), diferencia que continua significativa ajustando ancho de S L1-L2 a L4 y talla (Tabla 2).

El ancho relativo de S L1-L2 con respecto al ancho de L4 (S L1-L2/L4) es significativamente menor en las mujeres que en los hombres (0.81 ± 0.04 y 0.86 ± 0.04 respectivamente, $p < 0.001$) (Figura 2 B). La regresión de ese parámetro (ancho S L1-L2/L4) vs L4 tiene signo negativo en ambos sexos pero con un valor absoluto del coeficiente de regresión mayor en las mujeres (Figura 3).

Discusión

Las diferencias entre sexos del ancho del segmento L1-L2 (SL1-L2) y L4 medidos por DXA del presente estudio están en consonancia con la diferencias del área vertebral medida por TAC en estudios de otros autores.^{3,4} Esto, además de la buena correlación entre ambas mediciones observada en un estudio previo⁷ avala la posibilidad de utilizar el ancho vertebral medido por DXA como un subrogado confiable de su área.

Las vértebras son más pequeñas en las mujeres que en los hombres y esta diferencia no está determinada por la talla. El presente trabajo presenta evidencia original de una diferencia ontogénica en el desarrollo de la columna, por lo menos, a nivel toracolumbar (SL1-L2) con respecto a L4, vértebra que muestra la menor diferencia entre sexos. Efectivamente ambos sexos muestran que SL1-L2 es menor que L4, manteniendo una significativa proporcionalidad con esa vértebra pero con un coeficiente de regresión menor en las mujeres como lo muestra la figura 1. La figura 3 permite ilustrar esa relación mediante un análisis diferente, al mostrar que a medida que L4 aumenta, el SL1-L2 lo hace en menor medida en las mujeres que en los hombres.

Esto tendría implicancias biomecánicas, por las que las fracturas vertebrales son más frecuentes en la región toracolumbar en las mujeres.³⁻⁵ Dentro de lo multifactorial de las

fracturas vertebrales, esta particularidad sería un factor más que justificaría la mayor susceptibilidad a las fracturas en las mujeres.

El área de la sección axial de las vértebras es un atributo fundamental que contribuye a la fortaleza para soportar fuerzas compresivas a las que son sometidas en su historia funcional cotidiana. El riesgo de colapso de las vértebras aumenta cuando la relación: máxima capacidad de soportar una fuerza compresiva/fuerza ejercida (cociente conocido como "factor de seguridad") se acerca a 1 o es menor de 1.^{2,3}

El numerador de este cociente está determinado por la calidad del material óseo (que entre otros factores incluye la DMO volumétrica) y el área de la menor sección axial vertebral (centro de la vértebra).³ Las vértebras aumentan el área en sentido caudal por lo que L4 es más fuerte que sus vecinas en sentido cefálico.⁸ A igual calidad del material el aumento del área aumenta la rigidez estructural de la vértebra y disminuye el stress (fuerza por unidad de área) de la fuerza actuante.^{2,3,9} Estimaciones con respecto al denominador calculan que las cargas resultantes del peso del tronco corporal y de la actividad muscular de diversas actividades cotidianas, también aumentan en sentido caudal y son de mayor magnitud en varones que en mujeres, pero en virtud que las vértebras de la transición toracolumbar son más pequeñas en mujeres, el factor de seguridad se encuentra particularmente comprometido en ellas.² Estos argumentos están basados en la "teoría de la compresión de columnas (vigas)". Por otra parte la fuerza requerida por los músculos paraespinales y transmitidas a las vértebras para estabilizar la columna vertebral durante la flexión anterior es inversamente proporcional al tamaño de las mismas^{4,5}, contribuyendo también a disminuir el factor de seguridad mencionado.

Conclusiones

El presente estudio se distingue de los demás en llegar con la metodología DXA, más ampliamente disponible, a conclusiones similares a las obtenidas utilizando TAC.

En consonancia con lo ya conocido, observamos, que las mujeres tienen en promedio vértebras más pequeñas que los hombres. La diferencia de tamaño no es uniforme en las vértebras lumbares, siendo el segmento L1-L2 particularmente menor comparado con L4.

Estas diferencias estructurales entre mujeres y hombres deben ser consideradas para explicar, dentro del contexto multifactorial de las fracturas vertebrales, la mayor incidencia de éstas en el sexo femenino, en particular de L1 y L2.

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

Recibido: noviembre de 2018
Aceptado: diciembre de 2018

Referencias

1. Siminoski K, Lee K-C, Jen H, et al. Anatomical distribution of vertebral fractures: comparison of pediatric and adult spines. *Osteoporosis Int.* 2012; 23: 1999-2008.
 2. Bruno AG, Burkhardt K, Allaire B, Anderson DE, Buxsein ML. Spinal loading patterns from biomechanical modeling explain the high incidence of vertebral fractures in the thoracolumbar region. *J Bone Miner Res.* 2017; 32(6):1282-1290
 3. Buxsein ML, Melton LJ 3rd, Riggs BL, Muller J, Atkinson EJ, Oberg AL, et al. Age and sex-specific difference in the factor of risk for vertebral fracture: A population-based study using QCT. *J Bone Miner Res* 2006; 21:1475-1482.
 4. Gilsanz V, Boechat R, Gilsanz R, Loro ML, Roe TF, Goodman WG. Gender differences in vertebral size in adults: biomechanical implications. *Radiology* 1994; 190: 678-83.
 5. Gilsanz V, Loro ML, Roe TF, Sayre J, Gilsanz R, Schulz EE. Vertebral size in elderly women with osteoporosis: Mechanical implications and relationship to fractures. *J Clin Invest* 1995; 95: 2332-37.
 6. Bruno AG, Broe KE, Zhang X, Samelson EJ, Meng CA, Manoharan R, et al. Vertebral size, bone density, and strength in men and women matched for age and areal spine BMD. *J Bone Miner Res* 2014; 29: 562-569
 7. Claus-Hermberg H, De Luca S, Troncoso F, Lozano MP, Rey M, Boffa S, et al. Densidad Ósea Volumétrica vertebral obtenida sin fantoma en estudios de rutina de tomografía computada de abdomen: correlación con los valores medidos por densitometría ósea areal por rayos X. *Actual. Osteol.* 2016; 12:180 -187.
 8. Buck A M, Price RI, Sweetman IM, Oxnard CE. An investigation of thoracic and lumbar cancellous vertebral architecture using power-spectral analysis of plain radiographs. *J Anat* 2002; 200: 445-456.
 9. Turner CH, Burr DB. Basic bio mechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone* 1993; 15: 595-608.
-



ACTUALIZACIONES / Review

NORMAL PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS IN TWO ANIMAL SPECIES WITH HIGHLY DIFFERENT VITAMIN D STATUS COMPARED TO THAT OF HUMANS

Rodolfo C. Puche*

Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Santa Fe, Argentina.

Abstract

Mole rats live in permanent darkness, in networks of underground tunnels (which extend up to 1 km in the subsoil), excavated with their incisors, in warm and semi-arid areas of South Africa. Mole rats have an unusually impoverished vitamin D₃ status with undetectable and low plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D₃ and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, respectively. They express 25-hydroxylase in the liver and 1-hydroxylase and 24-hydroxylase in their kidneys. The presence of specific receptors (VDR) was confirmed in the intestine, kidney, Harder's glands and skin. In spite of their poor vitamin D₃ status, the apparent fractional intestinal absorption of calcium, magnesium and phosphate was high, always greater than 90%. Oral supplementation with cholecalciferol to mole rats did not improve the efficiency of gastrointestinal absorption of these minerals. Mole rats do not display the typical lesion of rickets: hypertrophic and radiolucent growth cartilages. Histological studies reported normal parameters of trabecular and cortical bone quality.

Marmosets (monkeys of the New World) are not hypercalcaemic, even though they exhibit much higher levels of 25-hydroxyvitamin D₃, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and parathyroid hormone than that of rhesus monkeys and humans. Fed a high vitamin D₃ intake (110 IU/day/100 g of body weight), a fraction of the experimental group was found to display osteomalacic changes in their bones: distinct increases in osteoid surface, relative osteoid volume, and active osteoclastic bone resorption. These findings suggest that some marmosets appear to suffer vitamin D-dependent rickets, type II.

The maximum binding capacity of the VDR or the dissociation constant of VDR-1 α ,25(OH)₂D₃ complex of mole rats and New World monkeys are distinctly different of VDR isolated from human cells. Health status of those species appears to be adaptations to the mutations of their VDR. Though rare, as mutations may occur at any time in any patient, the overall message of this review to clinicians may be: recent clinical studies strongly suggest that the normality of physiological functions might be a better indicator of the health status than the serum levels of vitamin D metabolites.

Key words: vitamin D₃, 25-(OH) vitamin D₃, 1,25-(OH)₂ vitamin D₃, 1 α -hydroxylase, 25-hydroxylase, VDR, vitamin D₃ receptor.

Resumen

FUNCIONES FISIOLÓGICAS NORMALES EN DOS ESPECIES ANIMALES CON ESTATUS DE VITAMINA D MUY DIFERENTES DEL ACTUAL EN SERES HUMANOS.

Las ratas topo viven en la oscuridad permanente, en redes de túneles subterráneos excavadas con sus incisivos (que se extienden hasta 1 km en el subsuelo), en áreas cálidas y semiáridas de Sudáfrica. Las ratas topo tienen un estatus de vitamina D₃ inusualmente empobrecido con concentraciones plasmáticas indetectables de 25-hidroxivitamina D₃ y bajas de 1 α , 25-dihidroxivitamina D₃. Poseen 25-hidroxilasa en el hígado y 1-hidroxilasa y 24-hidroxilasa en sus riñones. La presencia de receptores específicos (VDR) ha sido confirmada en el intestino, el riñón, las glándulas de Harder y la piel. A pesar de su pobre estatus de vitamina D₃, la absorción fraccional intestinal aparente de calcio, magnesio y fosfato fue alta,

*E-mail: rodolfopuche@gmail.com

siempre superior al 90%. La suplementación oral con colecalciferol a las ratas topo no mejoró la eficacia de la absorción gastrointestinal de estos minerales. No muestran la lesión típica del raquitismo: cartílagos de crecimiento hipertróficos y radiolúcidos. Varios estudios histológicos confirman los hallazgos radiológicos y se informan parámetros normales de la calidad ósea trabecular y cortical.

Los titíes (monos del Nuevo Mundo) exhiben calcemias normales con niveles más elevados de 25-hidroxivitamina D_3 , $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D_3 y hormona paratiroidea que los monos rhesus y los seres humanos. Un tercio de un grupo de titíes alimentados con una alta ingesta de vitamina D_3 (110 UI/día/100 g de peso corporal) exhibió cambios osteomalácicos en sus huesos: aumento en la superficie osteoide, volumen osteoide y activa reabsorción

osteoclástica. Estos hallazgos sugieren que una fracción de la población de titíes padece raquitismo dependiente de vitamina D, tipo II.

Debido a mutaciones ocurridas hace millones de años, las máximas capacidades de ligamiento del VDR o los valores de la constante de disociación del complejo $VDR-1\alpha,25(OH)_2D_3$ de las ratas topo o monos del Nuevo Mundo son muy diferentes de los verificables en receptores aislados de células humanas actuales. El mensaje de esta revisión a los médicos clínicos podría ser: varios estudios clínicos recientes indican que la normalidad de las funciones fisiológicas de un paciente es un mejor indicador de su salud que los niveles séricos de los metabolitos de la vitamina D.

Palabra clave: vitamina D_3 , 25-(OH) vitamina D_3 , $1,25$ -(OH) $_2$ vitamina D_3 , 1α -hidroxilasa, 25 -hidroxilasa, VDR, vitamina D_3 receptor.

Introduction

The contents of this review support the hypothesis that robust compensatory mechanisms exist that create tolerance for a wide variation in circulating concentrations of 25(OH) vitamin D ($25(OH)D_3$) and $1\alpha,25(OH)_2$ vitamin D_3 ($1\alpha,25(OH)_2D_3$) across species populations, suggesting the existence of a complex evolutionary relation between sun exposure, skin color and the vitamin D pathway.

The vitamin D–endocrine system is thought to play multiple roles in physiologic pathways, such as bone mineral metabolism and the modulation of immune response. In addition, potential links to several chronic conditions, such as hypertension, cancer, and obesity have been described ¹⁻⁵.

Vitamin D is acquired from dietary intake and endogenous synthesis after sun exposure. In the liver, vitamin D_3 is converted to $25(OH)D_3$ ¹, which circulates in both bound and unbound fractions and is the metabolite usually measured to determine vitamin D status. Serum $25(OH)D_3$ reflects the combination of exposure to sunlight and diet.

Policy guidance with regard to $25(OH)D_3$ concentrations is further complicated by large variation between racial-ethnic groups in many countries in the temperate latitudes and by the dearth of information on the concentrations of unbound (bioavailable) fraction of $25(OH)D_3$. Part of $25(OH)D_3$ is converted by the kidneys to $1\alpha,25(OH)_2D_3$, the biologically active form of

vitamin D that acts as a hormone. In spite of the latter fact, because of its greater complexity and cost, the measurement of plasma concentration of $1\alpha,25(OH)_2D_3$ is reserved to complex cases.

This paper review the characteristics of vitamin D status in two species: mole rats (healthy specimens exhibit an unusually impoverished vitamin D_3 status with undetectable and low plasma concentrations of $25(OH)D_3$ and $1\alpha,25(OH)_2D_3$) and New World healthy monkeys (with much higher levels of $25(OH)D_3$ and $1\alpha,25(OH)_2D_3$ than those found in humans with normal accepted indicator values for Vitamin D nutritional status). These examples emphasize the fact that normal physiological functions can be observed with “abnormal” $1\alpha,25(OH)_2D_3$ levels, if the dissociation constant of the complex $VDR-1\alpha,25(OH)_2D_3$ allows the normal performance of those functions. It is expected that the information contained in this review will increase the awareness toward the importance and the as yet poorly known aspects of vitamin D metabolism.

The case of the mole rats

The mole rats inhabit warm and semi-arid areas of South Africa. They live in networks of underground tunnels excavated with their incisors, which extend up to 1 km in the subsoil. The tunnels have no permanent opening on the surface and develop their own microclimate: warm and humid air, with low levels of oxygen. They are herbivores, feeding on tubers and



Figure 1. Mole rats. A: *Cryptomys damarensis*, B: *Heterocephalus glaber*, C: *Cryptomys hottentotus*).

bulbs. They do not drink, they get all the water from their food, which is also a source of minerals.

Mole rats form eusocial colonies. A eusocial colony consists of a single reproductive pair and offsprings with repressed reproductive capacity. The non-reproductive members of the colony spend their time searching for food and maintaining the tunnel system. The colony has a clearly defined hierarchy, with the dominant breeding male, followed by the breeding female, then the non-breeding males and females. In vertebrates, the only known eusocial mammals are the mole rats *Cryptomys damarensis*⁶ y *Cryptomys hottentotus*⁷ of the family Bathyergidae, and the hairless or *Heterocephalus glaber*⁸ of the family Heterocephalidae. Due to its confirmed longevity (ca. 30 years), the latter has become a very attractive experimental model for studies on cancer resistance and senescence research⁹.

In captivity, naked mole rats are fed a vegetarian diet. At the San Diego Zoo¹⁰ naked mole rats are fed a commercial pellet made with water, yams, carrots, corn, leafy greens, and fruit. To absorb more of the nutrients from their food, naked mole rats eat their own feces. The vegetarian diet is hard to digest, so their intestinal flora aid with digestion.

Plasma levels of metabolites, enzymes of the biosynthetic pathway and Vitamin D receptor (VDR)

Research on the vitamin D₃ status of mole rats followed the publications on the characteristics of this most interesting experimental model¹¹. Mole rats have a particularly impoverished vitamin D₃ status. The averaged plasma levels of 25(OH)D₃ and 1α,25(OH)₂D₃¹²⁻¹⁴ are: <5 ng/ml (n=68) and 17.3.0±6.1 pg/ml (n=68), respectively.

Buffenstein et al.¹⁴ investigated whether the

naked mole rat (*H. glaber*) had the same enzymes present in mammals exposed to UVB radiation. Hepatic 25-hydroxylase and kidney 1-hydroxylase and 24R-hydroxylase were detected. The activity of 1-hydroxylase predominates over that of 24R-hydroxylase. After receiving a supra-physiological vitamin D₃ supplement, the 1-hydroxylase activity was repressed and the activity of 24R-hydroxylase increased. The administration of phorbol esters (activators of protein-kinase C) produced similar effects to those caused by vitamin D₃ supplementation. The data confirmed that mole rats can convert cholecalciferol in 1α,25(OH)₂D₃. In addition, the enzymes 1-hydroxylase and 24R-hydroxylase present in the kidneys of these mammals are independently regulated by intracellular signaling pathways involving the protein kinase C.

According to Pitcher et al.¹² when Damara mole rats were housed in the dark, the ratio of the activities of 1-hydroxylase to 25-hydroxylase in the kidney corresponded with those of a vitamin D₃ deficient animal. When these rats received an oral supplement of vitamin D₃ or when they were exposed to sunlight (Table 1), they increased the plasma concentration of 1α,25 (OH)₂D₃ with a proportional decrease (P<0.05) in the 1-hydroxylase activity and a resulting decrease (P<0.05) in the activity ratio 1-hydroxylase /24R-hydroxylase. Despite these changes, the intestinal mode of calcium uptake, plasma levels of total and ionized calcium and phosphate remained unchanged.

Sergeev et al. (1993)¹⁵ investigated whether the tissues of naked mole rats (*H. glaber*) had the 1α,25(OH)₂D₃ receptor (VDR) and whether the biological responses mediated by VDR in the intestine and the kidney correspond to those found in similar tissues of other mammals. The presence of VDR was investigated in the intestine, kidney, Harder's glands and skin.

Tabla 1. Metabolites of vitamin D₃ reported by Pitcher et al.¹² in control, vitamin D₃ supplemented and sunlight exposed Damara mole rats.

Metabolites	Experimental groups		
	Controls n=10	Vit D ₃ †	Sunlight exposure ‡
25(OH)D ₃ , ng/ml	<5	30±3	<5
1α,25(OH) ₂ D ₃ , pg/ml	12±2	35±2	25±3

Figures indicate the mean ± standard error. † 2.5 ng Vit D₃/g of food eaten; n=5. ‡ 15 min/day/3 weeks, n=5.

The isolated VDRs were biochemically characterized by saturation, sucrose density gradient, DNA binding and competitive ligand analysis. In addition, the homologous positive regulation of the VDR in these tissues and the induction of 25-hydroxylase in the kidney were studied as indicators of the biological responses mediated by VDR. Naked mole rats have VDR in the intestine, kidneys and Harder's glands (a retro-orbital, light-responsive neuroendocrine gland with a similar secretion to that of the pineal gland) but not in the skin. The biochemical characterization of the VDR and the biological responses mediated by VDR in the intestine and the kidney correspond to those found in similar tissues of other mammals. The VDR of Harder's gland is present at a lower concentration, but shows a markedly higher affinity and selectivity towards 1α,25 (OH)₂D₃ than that of the intestine and kidneys. Supplementation with vitamin D₃ resulted in a positive regulation of VDR in the intestine and kidney and induced renal 24R-hydroxylase, but had no effect on VDR in Harder's glands. These data showed that naked mole rats had VDR in intestine, kidney and Harder's glands; these VDRs differ in their biochemical characteristics.

Intestinal absorption of calcium, magnesium and phosphate

The mole rats lead a strictly subterranean existence and survive with a strictly herbivorous diet. As stated above (Table 1) they have a naturally impoverished vitamin D status with low plasma concentrations of both 25(OH)D₃ and 1α,25(OH)₂D₃.

Published studies in *C. damarensis* report that the apparent fractional intestinal absorption of calcium, magnesium and phosphate was high, always greater than 90%¹⁶. The high positive retention observed for these elements is attributed to their incisor teeth, which grow without interruption throughout their lives.

These teeth wear constantly during the excavation of the tunnels and it is speculated that they represent a mineral "sink", which together with the deposition of excess calcium in the skin (which is regularly renovated), contributes to the maintenance of mineral homeostasis.

The absorption of minerals in the gastrointestinal tract was further investigated in *H. Glaber* and *C. damarensis*¹⁷, measuring the relative rates of transport of radioactive markers, the mode of calcium uptake (Ca), the para-cellular movement and the opening of voltage sensitive Ca channels throughout the gastrointestinal tract. The relative absorption ratio of ⁴⁵Ca respect to the unabsorbable marker (14C-polyethylene glycol) indicated that more than 88% of the Ca in the diet had been absorbed per day. The greatest absorption occurred in the duodenum within 12 hours of intake. The contribution of the large intestine (caecum and proximal and distal colon) to total Ca absorption was small (<11%). There was only a passive uptake of ⁴⁵Ca in the duodenum (ratio serous: mucosa, S:M = 1). Active uptake occurred in the hindgut (S:M > 2). The absorption of the distal intestine seems to play a role secondary in the absorption of calcium.

Effects of oral administration of cholecalciferol on intestinal absorption of calcium and phosphate in mole rats

Oral supplementation with cholecalciferol¹⁸ to naked mole rats did not improve the efficiency of gastrointestinal absorption of these minerals, but exerts indirect effects on mineral metabolism by increasing food intake. This, in turn, results in a concomitant increase in the daily rate of absorption of calcium and phosphate. The urinary excretion of calcium is reduced by half, while the excretion of inorganic phosphate does not change. The mineral balance is positive, without any obvious pathology.



In fact, serum calcium and phosphate concentrations remain strictly regulated regardless of vitamin D₃ status. They concluded that the mineral balance in naked mole rats is not directly influenced by cholecalciferol administration.

Are mole rats “clinically” vitamin D deficient?

The reviewed evidence support the hypothesis that mole rats have adapted to an environment lacking UV radiation and vitamin D₃ intake, and can obtain enough calcium and other minerals for their needs through processes not dependent on Vitamin D₃.

The expression “vitamin D-deficient animals” appears several times in the above quoted reports. Two papers^{19,20} however, report that they do not display the typical lesion of rickets: hypertrophic growth cartilages at the end of their long bones (Figure 2A). The report of

Henry et al.¹⁸ contain a series of radiographs (Figure 2B) of male and female naked mole rats (*Heterocephalus glaber*) that do not display the typical lesion of rickets.

In agreement with the radiological images, histological studies confirm the good quality of bone tissue of adult mole rats bone^{19,20}. The growth plate at the epiphyses of long bones are evident in a 2-year-old but is completely resorbed in older animals. This is clear evidence of a well-structured remodeled trabecular bone that extends from the metaphysis to the epiphysis. Trabecular bone morphology is sustained in a 24-years-old naked mole rat; it shows maintenance of trabecular connectivity and no trabecular thinning. Very efficient bone remodeling and maintenance of cortical bone quality was observed. This long term remodeling allows older animals to carry out the same activities

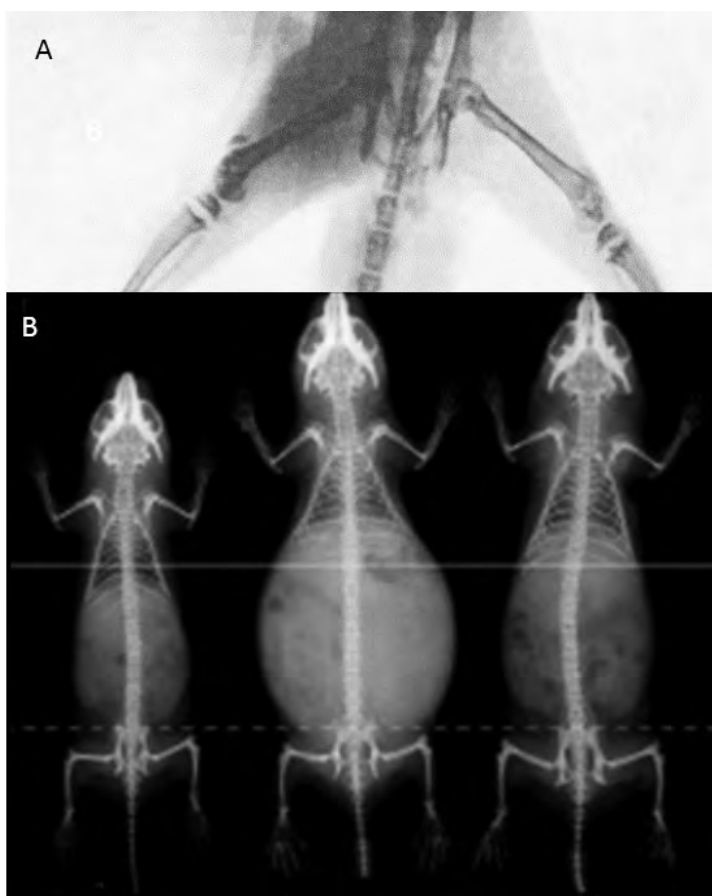


Figure 2. A: Radiograph of hind limbs of a 6 weeks old rat, made rachitic by feeding a rachitogenic diet. **B:** Radiographs of naked mole rats (*Heterocephalus glaber*) of both sexes¹⁸. Compare with A and note the absence of the typical lesion of rickets.

they did in their youth and may contribute to sustained bone quality in breeding females that continue to reproduce throughout their long lives despite the high mineral demands of both pregnancy and lactation. Cortical bone area and density do not change with age.

The report of Gallagher et al.²¹ who treated rachitic rats with $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ gives some probable explanation for the absence of hypertrophic growth plates: "At low levels (1 ng/day) $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ sustained a healing response. Above 5 ng/day administration of $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ resulted in an accumulation of osteoid, giving a histological appearance similar to vitamin D deficiency". The low levels of plasma $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ may explain, paradoxically, the absence of the typical rickets lesions in naked mole rats. The presence of VDR in growth cartilage cells have been reported by Klaus et al.²². As referred above, the serum levelsof 25(OH)D_3 were undetectable and those of $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ were low. Vitamin D deficiency is an identified condition among high-risk pregnant women²³, though the effects of vitamin D deficiency in human pregnancy are not entirely known²⁴. Extrapolating these findings to the mole rats it is evident that if they were clinically vitamin D-deficient, their reproduction might be severely impaired, which is not the case: dominant female breeds continuously through the year, producing approximately every 76 days litters of up to 27 young, with a mean litter size of 9 ± 1 ²⁵. The dominant female could have calvings with 1 to 27 pups. The average was 9.

The physiology of the mole rats points out to two important questions: 1.- The mystery of the synthesis of vitamin D in the obscurity. 2.-How normal physiological functions such as reproduction and breeding are attained with undetectable levels of 25(OH)D_3 and low levels of $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$. It is likely that the explanation

resides in the affinity of $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ to the vitamin D receptor (see Table 4).

Synthesis of vitamin D in mammals exposed to UVB irradiation²⁶

7-dehydrocholesterol, present in the skin, is a precursor of both cholesterol and vitamin D_3 . Normally, one square centimeter of skin contains 25-50 μg of 7-dehydrocholesterol, sufficient to meet the requirements of vitamin D_3 . The skin is composed of two main layers: the dermis, formed largely by connective tissue and the epidermis, thinner. The epidermis is 80 to 600 microns thick, it has five cellular strata (from outside to inside): corneal, lucid, granular, spinous and basal. The highest concentrations of 7-dehydrocholesterol in the skin are found in the basal and spinouslayers.

The production of vitamin D_3 will occur mainly at the wavelengths effectively absorbed by 7-dehydrocholesterol. The two most important factors that govern the generation of pre-vitamin D_3 are the amount (intensity) and quality (appropriate wavelength) of the UVB irradiation that receives 7-dehydrocholesterol. During exposure to sunlight, UVB 290-315 nm penetrates the skin and is absorbed by proteins, DNA and RNA, and 7-dehydrocholesterol. When epidermal 7-dehydrocholesterol absorbs solar radiation (Figure 3), the double bonds of the previtamin- D_3 are activated to become vitamin D_3 . 7-dehydrocholesterol exists mainly in the plasma membrane of skin cells, associated with the aliphatic chain of fatty acids linked to glycerides.

In this position, the flat and rigid structure of 7-dehydrocholesterol interspersed between the tails of the glycerides is conditioned to become the planar conformer of previtamin- D_3 after exposure to UVB radiation, which is rapidly isomerized to vitamin D_3 .

Because vitamin D_3 is thermodynamically

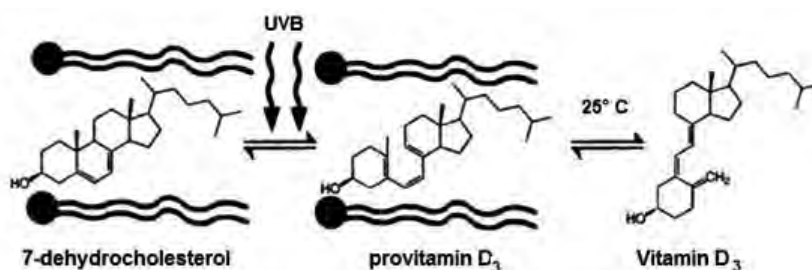


Figure 3. Conversion of 7-dehydrocholesterol to pre-vitamin D_3 . Redrawn from Wackerand Holick²⁶.



more stable and also more flexible, it is expelled from the plasma membrane into the extracellular space and diffuses into the capillary bed of the dermis where it binds to the vitamin D₃ transport protein (DBP) for transport to the liver. In approximately 8 hours, the previtamin-D₃ of the skin is converted to vitamin D₃^{26,27}. The totality of vitamin D₃ produced in the skin binds to the DBP and remains in the circulation 2-3 times more than the one incorporated by oral intake.

By exposure to sunlight only ca. 15% of 7-dehydrocholesterol can be converted to previtamin-D₃. Any additional exposure will result in the conversion into lumisterol₃ and tachysterol₃. Therefore, the excessive exposure of a human being to the sun will not produce vitamin D₃ poisoning.

Its biosynthesis has two stages. The first stage occurs in the skin and requires UV irradiation. In a first step 7-dehydrocholesterol is converted into previtamin D₃, a second step is the thermal isomerization to vitamin D₃. In the second stage, the liver transform cholecalciferol into 25(OH)-vitamin D₃, which will become 1 α ,25-(OH)₂D₃ in the kidney (Figure 4).

As shown in Figure 3, Vitamin D in nature can only come from the sunlight-mediated photolysis of 7-dehydrocholesterol to provitamin D. Holick et al.²⁷ published results of experiments emphasizing the evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D₃ in the skin of poikilothermic animals: "As vertebrates evolved

in the fertile oceans and began to venture onto the earth's surface, they were confronted with a major problem. Whereas the fertile oceans contained a high amount of calcium, thereby satisfying their calcium requirement, the earliest vertebrates on land ventured into an environment that was deficient in calcium. Vitamin D was absolutely essential to enhance the efficiency of the gastrointestinal track to absorb dietary calcium to maintain a structurally sound, mineralized skeleton. However, the first terrestrial vertebrates were cold-blooded (poikilothermic), and therefore, were faced with a problem in making vitamin D in their skin".

Living in the obscurity, can mole rats produce vitamin D₃ by a non-photochemical pathway? Norman and Norman²⁸ suggested four possible mechanisms. It should be appreciated that their proposal is based upon an understanding of organic chemistry: there is as yet no evidence to support their existence though they have been shown to occur in other biological systems. Their suggestions may serve as the basis for discussion and study of the synthesis of vitamin D₃ in these animals.

The first example of an enzyme-catalyzed pericyclic process came with the characterization of chorismate mutase [which catalyzes the (3,3)-sigmatropic rearrangement of chorismic acid to prephenate in microorganisms]. Two other mechanisms are described that depend upon the enzymatic epoxidation of 7-dehydrocholesterol. A second enzyme could then catalyze the opening of the epoxides by acid

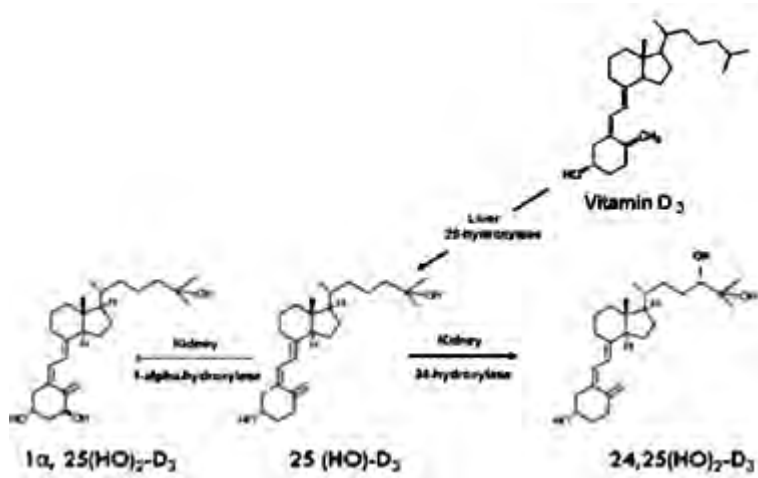


Figure 4. Scheme of the second stage in the synthesis of 1 α ,25(OH)₂D₃ in mammals exposed to sunlight. Redrawn from Wacker and Holick²⁶.

catalysis. In both mechanisms, the product of the enzymatic process is previtamin D₃, which could then thermally isomerize to vitamin D₃. Taking into account that steroid biosynthesis has been shown to proceed from squalene via a selective enzymatic epoxidation, and acid-catalyzed cyclization. It appears reasonable to assume that such pathways may have also evolved in animals lacking access to light to catalyze the conversion of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃. Their proposal invoke the binding of previtamin D₃ to enzymes that could replace the effect of UVB radiation. The result of enzyme binding is the formation of a complex in which the attractive forces holding the components together are generally non-covalent and, thus, energetically weaker than covalent bonds. The presence of the necessary enzymes has yet to be demonstrated in the skin of these animals.

Once formed, previtamin D₃, a thermodynamically unstable molecule, undergoes a temperature-dependent isomerization to vitamin D, investigated by Holick et al.²⁷. The temperature requirement is satisfied by mole rats. According Roberts²⁹ these animals do not use automatic metabolic control means to regulate body temperature. Their core temperature is in the range of 29-32°C. Urison and Buffenstein³⁰ reported that body temperature in early pregnancy was similar to non-pregnant animals. Only at the 8th week of pregnancy the body temperature was

2.5±0.6 °C greater than in non-pregnant mates. Herold et al.³¹, through the implantation of an intra-peritoneal radio-telemetry system, reported that the naked mole rat has a distinct body temperature and activity rhythm that is not coupled to environmental conditions. Under their experimental conditions, body temperature ranged from 30 to 32°C. The slow rate of conversion of previtamin D₃ to vitamin D₃ in cold-blooded vertebrates would have had disastrous consequences because the vitamin D₃ formation rate most likely would have been below the rate of previtamin D₃ degradation.

The case of the primates of the New World

A very brief overview on the serum levels of 1α,25(OH)₂D₃ in primates of the New World (first 5 genus in Figure 5) shows the opposite picture reported above for the vitamin D metabolism of mole rats³². Please note that the levels of 1α,25(OH)₂D₃ are shown in a logarithmic scale.

A report by Ziegler et al.³² (Table 2) confirm the difference in the levels of blood metabolites between New and Old World monkeys and humans, using the most sensitive, specific and reliable method available for measuring vitamin D and its metabolites (liquid chromatography in tandem with mass spectrometry (LC-MS/MS)). These methods are superior to the usual assays, which cannot distinguish between vitamin D₂, vitamin D₃ and their hydroxylated forms.

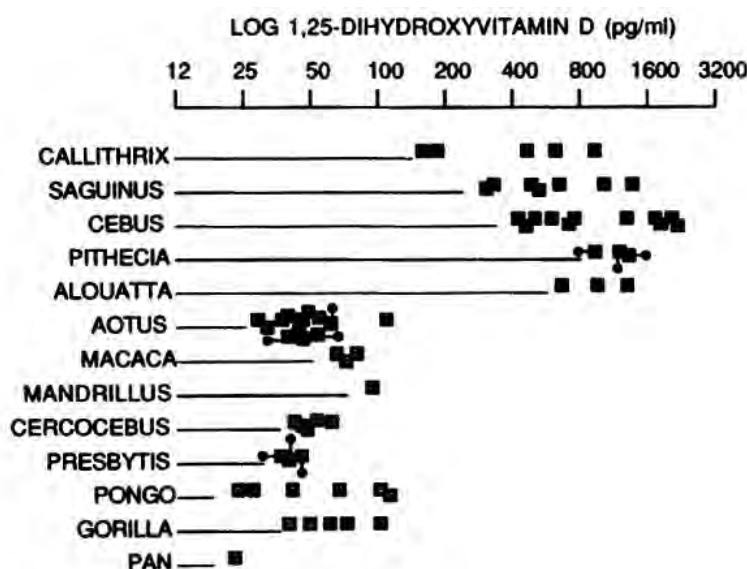


Figure 5.- Serum levels of 1α,25-dihydroxyvitamin D in primates of the New World (first five listed genus) and the Old World. Redrawn from Gacadand Adams³³.



As shown in Table 3, compared with the rhesus monkeys, marmosets are not hypercalcemic though exhibit very high levels of 25-hydroxyvitamin D₃, 1α,25(OH)₂D₃ and parathyroid hormone. Some histological details of bone tissue are discussed below.

It is known that in higher vertebrates, renal bio-synthesis of 1α,25(OH)₂D₃ is tightly regulated by the circulating levels of calcium, phosphorus, parathyroid hormone, estrogens, 1α,25(OH)₂D₃ and other peptide and steroid hormones. All the factors involved in the 1α,25(OH)₂D₃ increased serum levels in the marmosets have not yet been identified (Takahashi et al. ³⁴).

Relationship between the biological effects of 1α,25(OH)₂D₃ and characteristics of its receptor

1α,25(OH)₂D₃ (and many other steroid hormones) generate biological responses both by regulating gene transcription (the classic genomic responses) and by rapidly activating a variety of signal transduction pathways at or near the plasma membrane (rapid or non-genomic responses). The genomic responses

to 1α,25(OH)₂D₃ result from its stereospecific interaction with its nuclear receptor which binds 1α,25(OH)₂D₃ with high affinity constant.

Immunohistochemical and physicochemical characterization of 1α,25(OH)₂D₃ receptors. Despite some differences in molecular weight of VDRs, certain domains have conserved structure and function. Antisera against the chick avian protein display extensive cross reactivity with the mammalian forms of the protein³⁵. An examination of the recognition patterns of 3 monoclonal antibodies interacting with the avian receptor revealed that only one of them was unique for the chick protein, the other two were equally reactive with receptors from human, primate, porcine, rat and mouse sources^{35,36}. In addition, investigated with immunochemical techniques, VDRs appears to be identical in all tissues.

Extensive research has shown that 1α,25(OH)₂D₃ receptors sediment in high salt sucrose gradients as molecules of 3.0 to 3.7 S^{37,38}. The avian receptor sediments between 3.3-3.7 S whereas mammalian receptors display lower sedimentation coefficients 3.1-3.2 S^{39,40}. Once isolated the protein from tissues or cell cultures

Tabla 2. Plasma levels of 25-hydroxyvitamin D₃ and 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ measured by LC-MS/MS] in primates of the New and Old World. Ziegler et al. ³²

Species	Individuals	25(OH)D ₃ , ng/ml	1α,25(OH) ₂ D ₃ , pg/ml
Marmoset	Callithrix jacchus (NWm)	394.8±43.5 (25)	694.8±52.3 (25)
Rhesus	Macaca mulata (OWm)	154.8±5.5 (25)	205.9±18.5 (25)
Cynomolgus	Macaca fascicularis (OWm)	164.8±639 25)	192.8±14.9 (25)
Human	Homo sapiens	57.0±6.6 (14)	55.3±6.1 (20)

Figures indicate the mean ± standard error (N). NWm: New World monkeys. OWm: Old World monkeys

Tabla 3. Serum concentrations of calcium, phosphorus, vitamin D metabolites and parathyroid hormone in Rhesus monkeys and marmosets (Takahashi et al. ³⁴).

Plasma levels	Rhesus monkeys (n=5)	Marmosets (n=15)
Calcium, mg/dl	9.4±0.3	8.4±0.2†
Phosphorus, mg/dl	4.3±0.5	4.5±0.2†
25(OH)D ₃ , ng/ml	50±4	478±108†
1α,25(OH)D ₃ , pg/ml	93±17	491±93†
Parathyroid hormone ng/ml	0.23±0.06	1.75±0.2‡

Figures indicate the mean ± standard error.

† P<0.05 and ‡ P<0.005 when compared with rhesus monkeys, respectively.

(leukocytes, skin fibroblasts) the following characteristics can be determined. A) the dissociation constant of the complex steroid-receptor 40 (Kd; units: nM, the smaller the dissociation constant value, the higher the affinity between ligand and protein); B) the minimum and maximum ligand binding capacities ($\beta_{\max}$, fmoles of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /mg of protein), and C) binding of the complex steroid-receptor to DNA in vitro.

Comparison of the dissociation constant of the complex receptor- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and their maximum ligand binding capacity between the marmosets and mole rats.

Inspection of Table 4 reveals that differences between the dissociation constant of the complex receptor- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and their maximum ligand binding capacity between marmosets and mole rats, which that appears related to the differences in circulating levels of the secosteroid.

The average Kd of marmosets is nearly ten times larger than that for humans (0.24) with a lower maximum binding capacity. In other terms the affinity between $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and the receptor and the maximum binding capacity is lower for marmosets than for humans. This may be an argument to explain the health status of marmosets with a vitamin D status very different with that of humans. The case

of mole rats is not easy to evaluate with the available data.

The marmoset is not hypercalcemic in spite of the extremely high circulating levels of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. The resistance to the high levels of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was investigated by Takahashi et al.³⁴ concluding that the intestinal epithelium of the marmosets contain a receptor for the hormone which was very similar to that from the rhesus monkeys, but a) it was only one-sixth as abundant in the marmosets as in the rhesus monkeys, b) occupied receptors appear to be a small fraction of the total number of receptors, and c) the activity of the $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -receptor complex bound to DNA-cellulose was very low.

Yamaguchi et al.⁴⁸, compared the bones (X-rays and histological examinations) of common marmosets fed a high vitamin D₃ intake (110 IU/day/100 g of body weight) vs. rhesus monkeys (Old World monkey) fed a diet with normal vitamin D content (5 IU/day/100 g of body weight). Three out of 20 marmosets were found to have osteomalacic changes in their bones distinct increases in osteoid surface, relative osteoid volume, and active osteoclastic bone resorption, whereas non-osteomalacic marmosets had no increase in osteoid tissues in their bones. None of the marmosets, either osteomalacic or non-osteomalacic, was

Tabla 4. Dissociation constants (Kd, nM) and their maximum ligand binding capacity ($\beta_{\max}$, fmoles/mg of protein) of the binding of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ to its receptor in cells of several species.

References	Species	Tissue	Kd	$\beta_{\max}$
Liberman et al. ⁴¹	Marmosets	Lymphocytes	2.20	7
Sergeev et al. ¹⁵	Mole rats	Intestinal mucosa	0.75	380
		Kidney	0.18	80
		Harderian glands	0.97	28
		Skin	<0.015	nd
Li et al. ⁴³	Homo	Skin	0.22	nr
Costa et al. ⁴⁴	Homo	Muscle, myoblasts	0.11	nr
		Muscle, myotubes	0.08	nr
Liberman et al. ⁴²	Homo	Lymphocytes	0.27	45
Norman AW ⁴⁵	Homo	Not indicated	≈ 0.5	nr
Megoouh F et al. ⁴⁶	Homo	Adenocarcinoma	0.15	10
Eisman et al. ⁴⁷	Homo	MCF 7, breast cancer cell line	0.11	nr

Figures indicate the mean $\pm$ standard error (N). NWm: New World monkeys. OWm: Old World monkeys



hypercalcemic despite the extremely high circulating levels of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. However, the serum $25(\text{OH})\text{D}_3$ and $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ levels were significantly lower in the osteomalacic than in the non-osteomalacic marmosets. These results suggest that the marmoset is likely to exhibit osteomalacic bone changes despite the high daily production of vitamin D_3 . These changes resemble those in vitamin D-dependent rickets, type II.

The vitamin D-dependent rickets type II⁴⁹, which occurs in humans and in marmosets, points to the importance of the $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ receptor in mediating the biologic effects of vitamin D^{50} . The disorder is characterized by rickets or osteomalacia, which is present despite marked increases in circulating $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and results from abnormalities in the receptor for $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Studies with cultured skin fibroblasts demonstrated that vitamin D-dependent rickets type II is a heterogeneous disorder. Liberman et al.⁴² concluded that in spite of consanguinity, severe resistance to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ resulted from five or six distinct genetic mutations in six kindreds (Table 5).

Closing remarks

Nearly half of the papers quoted in this review, reporting data of the mole rats and New World monkeys, were published before 1998 by investigators with easy access to these animals.

The plasma $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ levels of New World monkeys is higher than that of humans and Old World primates. At first sight, this datum suggests end-organ resistance to the hormone.

However, the dissociation constant of VDR- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ complex or the maximum ligand binding capacity of VDR in mole rats and New World monkeys are distinctly different from the receptors isolated from cell types obtained from humans (Table 4). Health status (and survival) of these species, then, appears to be due to mutations in the VDR. For New World monkeys, the necessary mutation is presumed to have occurred approximately 60 million years ago⁴².

Though rare, as mutations may occur at any time (Table 5), the message of this review to clinicians may be stated as: regarding the health status of a patient, the normality of physiological functions is a better indicator than the levels of vitamin D metabolites. In support of this assertion I would like to call the attention of the reader to a large, well-designed clinical Vida Study designed to evaluate basic health history with focus of cardiovascular conditions and diabetes⁵⁰.

The report of Durazo et al.⁵⁰ and the literature quoted therein (which includes the NHANES 2003-2005 study) show that robust compensatory mechanisms exist that create tolerance for wide variation in plasma concentrations of $25(\text{OH})\text{D}$ across populations. Concern therefore exists as to whether relatively low concentrations are associated with adverse health effects (see Table 7), a fact that explains the inclusion of the word "challenge" in the title of Durazo et al. paper⁵⁰.

Inspection of Table 6 confirms the correlation between latitude (directly related to UV irradiation) and the average plasma concentration of $25(\text{OH})\text{vitamin D}_3$.

Table 5. Summary of the nuclear uptake and cytosol binding of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ by fibroblasts cultured from human skin of normal subjects and six kindred suffering of vitamin D-dependent rickets type II⁴².

		Intact Normal fibroblasts		Cytosol of fibroblasts	
		Affinity* nM	Nuclear uptake, sites per cell	Affinity* nM	Nuclear uptake, sites per cell
Normal subjects	n=20	0.5	10300	0.13	8900
Six kindred with rickets resistance type II	n=2	unmeasurable	unmeasurable	unmeasurable	unmeasurable
	n=1	decreased	Decreased	decreased	Decreased
	n=2	unmeasurable	Unmeasurable	≈ normal	≈ normal
	n=1	normal	Normal	normal	Normal

*The method used probably solubilizes receptors from the cytosolic or nuclear compartments of the cell.

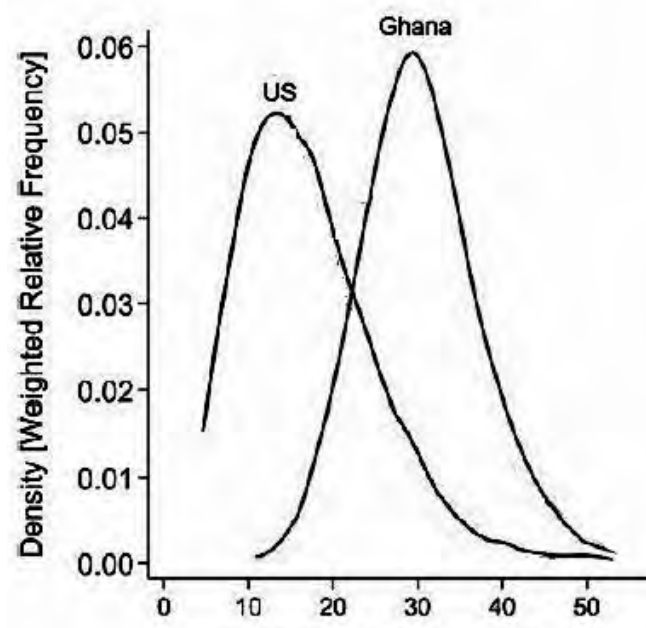


Figure 6. Distribution of plasma values of 25(OH) vitamin₃ (expressed as weighted relative frequencies), in subsamples of subjects from Kumasi (Ghana) and Chicago (USA).

Tabla 6. Serum 25(OH)Vitamin D₃ *, Erythema index‡ and Melanin index‡ values in populations of African origin at different latitudes (Durazo et al., 2014)

City, country, latitude	SERUM 25(OH)D ₃		SKIN COLOUR		
	N	ng/ml	N	E-index	M-index
Chicago, USA, 41° N	323	16.5±7.6	235	96.3±10.9	21.0±4.0
Cape Town, South Africa, 34°S	452	23.2±8.1			
Kingston, Jamaica, 17°N	238	28.9±7.1			
Kumasi, Ghana, 6° N	490	29.8±6.8	148	66.6±15.1	19. 4±6.4
Victoria, Seychelles, 4°S	419	29.2±7.8			

*25(OH)Vitamin D₃ values exclude 25(OH)Vitamin D₂ and 3-epimer of 25(OH)Vitamin D₃.

‡ Measurements of these indexes were performed in the axillary fossa, a sun non exposed area.

Tabla 7. Prevalences of three levels of total plasma 25(OH) vitamin D* in a sample of inhabitants of Chicago (USA) and Kumasi (Ghana). (Durazo et al., 2014).

City	At risk of deficiency,% <12 ng/mL	At risk of inadequacy,% ≥12 ng/mL and <20 ng/mL	Sufficiency,% ≥20 ng/mL
Chicago, USA, n=497	28.8	39.8	31.4
Kumasi, Ghana, n=494	0.2	4.6	95.2

*Total 25(OH)vitamin D is the sum of 25(OH)Vitamin D₃ , 25(OH)Vitamin D₂ and 3-epimer of 25(OH)Vitamin D₃.



Durazo et al. also measured skin pigmentation from a non-sun-exposed area of the body (the axillary fossa) in a subsample of inhabitants of Kumasi (Ghana) and Chicago (USA). No significant correlation ($P>0.05$) was observed between the E-index (erythema-index) or M-index (melanin index) measured on the axillary fossa and the plasma concentration of 25(OH) vitamin D₃ (Figure 6) suggesting a more complex, and yet undefined,

evolutionary relationship between skin color and the vitamin D pathway.

Acknowledgement: The critical reading of this revision by Dr. Ariel Sanchez is gratefully acknowledged.

Conflict of interest: none to declare

Recibido: julio de 2018
Aceptado: octubre de 2018

REFERENCES

1. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 491S-9S.
2. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-81.
3. Michos ED. Vitamin D deficiency and the risk of incident type 2 diabetes. *Future Cardiol* 2009; 5:15-84.
4. Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TR. Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6:621-30.
5. Reis AF, Hauache OM, Velho G. Vitamin D endocrine system and the genetic susceptibility to diabetes, obesity and vascular disease: a review of evidence. *Diabetes Metab* 2005; 31:318-25.
6. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Damaraland_mole-rat.
7. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Common_mole-rat.
8. Wikipedia. https://es.wikipedia.org/wiki/Heterocephalus_glaber.
9. Schuhmacher LN, Husson Z, St. John Smith E. The naked mole-rat as an animal model in biomedical research: current perspectives. *Open Access Animal Physiology* 2015; 7:137-48.
10. San Diego Zoo. Animals and Plants. Naked Mole-rat (*Heterocephalus glaber*). <http://animals.sandiegozoo.org/animals/naked-mole-rat>.
11. Bennett NC. Behaviour and social organization in a colony of the Damaraland mole-rat *Cryptomys damarensis*. *J. Zool. (Lond.)* 1990; 220:225-48. Jarvis JUM, Bennett NC. Behaviour and ecology of the family Bathyergidae In: The Biology of the Naked Mole rat. Sherman PW, Jarvis JUM, Alexander R D (eds). Princeton University Press; 1991. pp. 66-96.
12. Pitcher T, Sergeev IN, Buffenstein R. Vitamin D metabolism in the Damara mole-rat is altered by exposure to sunlight yet mineral metabolism is unaffected. *J Endocrinol* 1994; 143:367-74.
13. Buffenstein R, Jarvis JU, Opperman LA, et al. Subterranean mole rats naturally have an impoverished calcium status yet synthesize calcium metabolites and calbindins. *Eur J Endocrinol* 1994; 130:402-9.
14. Buffenstein R, Sergeev IN, Pettifor JM. Vitamin D hydroxylases and their regulation in a naturally vitamin D-deficient subterranean mammal, the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*). *J Endocrinol* 1993; 138:59-64.
15. Sergeev IN, Buffenstein R, Pettifor JM. Vitamin D receptors in a naturally vitamin D-deficient subterranean mammal, the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*): biochemical characterization. *Gen Comp Endocrinol* 1993; 90:338-45.
16. Skinner EDC, Moodley G, Buffenstein R. Is Vitamin D, Essential for Mineral Metabolism in the Damara Mole-Rat (*Cryptomys damarensis*)? *Gen Comp Endocrinol* 1991; 81:500-5.
17. Yahav S, Buffenstein R, Pettifor JM. Calcium and inorganic phosphorus metabolism in naked mole rats *Heterocephalus glaber* is only indirectly affected by cholecalciferol. *Gen Comp Endocrinol* 1993; 89:161-6.
18. Henry EC, Dengler-Criss CM, Catania KC. Growing out of a caste - reproduction and the making of the queen mole-rat. *J Exp Biol* 2007; 210:261-8.

19. E drey YH, Hanes M, Pinto M, Mele J, Buffenstein R. Successful Aging and Sustained Good Health in the Naked Mole Rat: A Long-Lived Mammalian Model for Biogerontology and Biomedical Research. *ILAR Journal* 2011; 52:41-53.
20. Pinto M, Jepsen K, Terranova C, Buffenstein R. Lack of sexual dimorphism in femora of the eusocial and hypogonadic naked mole rat: A novel animal model for the study of delayed puberty on the skeletal system. *Bone* 2010; 46:112-20.
21. Gallagher JA, Beneton M, Harvey L, Lawson DE. Response of rachitic rat bones to 1,25-dihydroxyvitamin D₃: biphasic effects on mineralization and lack of effect on bone resorption. *Endocrinology* 1986; 119:1603-9.
22. Klaus G, Merke J, Hügel P, et al. 1,25(OH)₂D₃ receptor regulation and 1,25(OH)₂D₃ effects in primary cultures of growth cartilage cells of the rat. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 340-8.
23. Schuhmacher LN, Husson Z, St. John Smith E. The naked mole-rat as an animal model in biomedical research: current perspectives. *Open Access Animal Physiology* 2015;7 137-148.
24. Urrutia-Pereira M, Solé D. Vitamin D deficiency in pregnancy and its impact on the fetus, the newborn and in childhood. *Rev Paul Pediatr* 2015; 33(1):104-13.
25. Hood-Nichols SK, Linnemore D, Huan RR, Napolitano P, Ippolito DL. Vitamin D deficiency in early pregnancy. *PLoS ONE* 10(4): e0123763.
26. Wacker M, Holick MF. Sunlight and Vitamin D. A global perspective for health. *Dermato-Endocrinology* 2013; 5:51-108.
27. Holick MF, Xiao QT, Allen M. Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D₃ in the skin of poikilothermic animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3124-6.
28. Norman TC, Norman AW. Consideration of chemical mechanisms for the nonphotochemical production of vitamin D₃ in biological systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1993;3: 1785-88.
29. Roberts JB. Are naked mole rats cold blooded? (NSG-d Nanotechnology Study group. Open Discussion). <https://www.marshome.org/pipermail/nsg-d/2011-October/000188.html>.
30. Urison NT, Buffenstein RB. Metabolic and Body Temperature Changes during Pregnancy and Lactation in the Naked Mole Rat (*Heterocephalus glaber*). *Physiol & Biochem Zool* 1995; 68:402-20.
31. Herold N, Spray S, Horn T, Henriksen SJ. Measurements of behavior in the naked mole-rat after intraperitoneal implantation of a radio-telemetry system. *Journal of Neuroscience Methods* 1998; 81:151-8.
32. Ziegler TE, Kapoor A, Hedman CJ, Binkley N, Kemnitz JW. Measurement of 25-hydroxyvitamin D(2&3) and 1,25-dihydroxyvitamin D(2&3) by tandem mass spectrometry: A primate multispecies comparison. *Am J Primatol* 2015; 77:801-10.
33. Gacad MA, Adams JS. Endogenous blockade of 1,25-Dihydroxyvitamin D-receptor binding in New World primate cells. *J Clin Invest* 1991; 87:996-1001.
34. Takahashi N, Suda S, Shinki T, et al. The mechanism of end-organ resistance to 1alpha, 25-dihydroxycholecalciferol in the common marmoset. *Biochem J* 1985; 227: 555-63.
35. Pike JW, Marion SL, Donaldson CA, Haussler MR. Serum and monoclonal antibodies against the chick intestinal receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Generation by a preparation enriched in a 64,000-dalton protein. *J Biol Chem* 1983; 258:1258-1296.
36. Pike JW, Sleator NM, Haussler MR. Development of hybridomas secreting monoclonal antibodies to the chicken intestinal 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:7719-23.
37. DeLuca HF, Schnoes HK. Vitamin D: recent advances. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 411-39.
38. Pike JW. Intracellular receptors mediate the biologic action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Nutr Rev* 1985; 43:161--68.
39. Kream BE, Yamada S, Schnoes HK, DeLuca HF. A specific cytosol binding protein for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in rat intestine. *J Biol Chem* 1977; 252:4501-5.
40. Feldman D, McCain TA, Hirst MA, Chen TL, Colston K. Characterization of a cytoplasmic receptor-like binder for a 10,25-dihydroxycholecalciferol in rat intestinal mucosa. *J Biol Chem* 1979; 254:10378-84.
41. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(suppl):491S.
42. Liberman UA, DeGrange D, Marx SJ. Low affinity of the receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the marmoset, a New World monkey. *FEBBS LETTERS* 1985; 182:385-8.



43. Li XL, Boudjelal M, Hao JM, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Increases Nuclear Vitamin D₃ Receptors by Blocking Ubiquitin/Proteasome-Mediated Degradation in Human Skin. *Molec Endocr* 1999; 13:1686-694.
44. Costa EM, Blai HM, Feldman D. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Receptors and Hormonal Responses in Cloned Human Skeletal Muscle Cells. *Endocrinol* 1986; 119:2214-20.
45. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(suppl):491S.
46. Meggouh F, Lointier P, Pezet D, Saez S. Evidence of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-receptors in human digestive mucosa and carcinoma tissue biopsies taken at different levels of the digestive tract, in 152 patients. *J Steroid Biochem*. 1990;36(1-2):143-7.
47. Eisman JA, Martin TJ, MacIntyre I, Frampton RJ, Moseley JM, Whitehead R. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in a cultured human breast cancer cell line (MCF 7 cells). *Biochem Biophys Res Comm* 1980; 93:9-15.
48. Yamaguchi A, Kohno Y, Yamazaki T, et al. Bone in the marmoset: A resemblance to vitamin D-dependent rickets, type II. *Calc Tiss Int* 1986; 39:22-7.
49. BrooksMH, BellNH, LoveL, et al. Vitamin-D-dependent rickets type II. Resistance of target organs to 1,25-dihydroxyvitamin D. *N Eng. J Med* 1978;298: 996-9.
50. Durazo-Arvizu RA, Camacho P, Bovet P, et al. 25-Hydroxyvitamin D in African-origin populations at varying latitudes challenges the construct of a physiologic norm. *Am J Clin Nutr* 2014;100:908-14.

ACTUALIZACIONES / Review

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA FRAGILIDAD ÓSEA EN DIABETES MELLITUS

Luis Agustín Ramírez Stieben,^{1*} María Lorena Brance²

¹ Endocrinología. Centro de Coloproctología y Enfermedades Digestivas. ² Centro de Reumatología. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Resumen

La diabetes es una enfermedad crónica asociada con importantes comorbilidades. El sistema esquelético parece ser un objetivo adicional de daño mediado por diabetes. Se acepta que la diabetes tipo 1 y tipo 2 se asocian con un mayor riesgo de fractura ósea. Varios estudios han demostrado que los cambios metabólicos causados por la diabetes pueden influir en el metabolismo óseo disminuyendo la calidad y la resistencia del hueso. Sin embargo, los mecanismos subyacentes no se conocen por completo pero son multifactoriales y, probablemente, incluyen los efectos de la obesidad, hiperglucemia, estrés oxidativo y acumulación de productos finales de glicosilación avanzada. Estos darían lugar a un desequilibrio de varios procesos y sistemas: formación de hueso, resorción ósea, formación y entrecruzamiento de colágeno. Otros factores adicionales como la hipoglucemia inducida por el tratamiento, ciertos medicamentos antidiabéticos con un efecto directo sobre el metabolismo óseo y mineral, así como una mayor propensión a las caídas, contribuirían al aumento del riesgo de fracturas en pacientes con diabetes mellitus. Esta revisión tiene como objetivo describir los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la fragilidad ósea en pacientes diabéticos.

Palabras clave: diabetes mellitus, osteoporosis, fracturas óseas.

Abstract

MECHANISMS INVOLVED IN THE BONE FRAGILITY IN DIABETES MELLITUS

Diabetes is a chronic disease associated with important comorbidities. The skeletal system seems to be an additional target of diabetes mediated damage. It is accepted that type 1 and type 2 diabetes are associated with an increased risk of bone fracture. Several studies have shown that metabolic changes caused by diabetes can influence bone metabolism by decreasing bone quality and resistance.

However, the underlying mechanisms are not completely known but they are multifactorial and probably include the effects of obesity, hyperglycemia, oxidative stress and accumulation of advanced glycosylation end products. These would lead to an imbalance of several processes and systems: bone formation, bone resorption, formation and collagen cross-linking. Other additional factors such as treatment-induced hypoglycemia, certain antidiabetic medications with a direct effect on bone and mineral metabolism, as well as an increased propensity for falls, would contribute to the increased risk of fractures in patients with diabetes mellitus. This review aims to describe the pathophysiological mechanisms underlying bone fragility in diabetic patients.

Key words: diabetes mellitus, osteoporosis, bone fractures.

* Correspondencia: Centro de Coloproctología y Enfermedades Digestivas. Alvear 629. Rosario (2000). Argentina.

E-mail: ramirez.stieben@gmail.com



Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica asociada con importantes comorbilidades. En América Central y del Sur se calcula que entre 21,7 y 31,9 millones de personas adultas tenían diabetes en 2017.¹ En nuestro país, la 3ª Encuesta Nacional de factores de riesgo demostró que la prevalencia de DM en mayores de 18 años fue del 9,8% en 2011.²

Se ha estimado que una de cada tres mujeres y uno de cada cinco varones mayores de 50 años experimentarán una fractura osteoporótica durante su vida.³

Recientemente, varios estudios epidemiológicos han demostrado que el sistema musculoesquelético puede afectarse por la DM. El efecto que la DM presenta sobre el tejido óseo es diferente en diabetes tipo 1 (DM1) y diabetes tipo 2 (DM2), a causa de diferentes factores que producen alteración del tejido óseo. En la presente revisión abordaremos la epidemiología de las fracturas por fragilidad en pacientes con diabetes, tanto DM1 como DM2, y los mecanismos patogénicos involucrados.

Epidemiología

Densidad mineral ósea y fracturas en DM1

Se ha establecido una clara asociación entre DM1, osteopenia y osteoporosis. La DM1 aumenta el riesgo de fracturas clínicas de 1 a 2 veces en la columna vertebral, 1,5 a 2,5 veces en la cadera y 2 veces en el radio distal.⁴ Un meta-análisis demostró una reducción significativa del puntaje Z en pacientes con DM1 en comparación con pacientes sin diabetes, tanto en cadera (media -0,37) como en columna lumbar (media -0,22).⁵ Sin embargo, el incremento del riesgo de fractura, particularmente las fracturas de cadera, es mucho mayor que el esperado en función del descenso de la DMO, lo que implicaría factores adicionales involucrados. Un estudio de casos y controles de 82 pacientes con DM1 y 82 pacientes sin diabetes demostró que la presencia de fracturas vertebrales (FxV) morfométricas se asocia a la presencia de DM1 y no la DMO de columna lumbar.⁶ A la fecha, no se ha publicado ningún estudio lo suficientemente potente que examine la capacidad de la DMO para predecir fracturas en DM1.

Densidad mineral ósea y riesgo de fracturas en DM2

El efecto de la DM2 sobre la DMO es controvertido. Algunos meta-análisis demostraron

una DMO normal tanto en cadera como en columna lumbar en pacientes con DM2. Sin embargo, se ha observado un incremento del riesgo de fracturas en algunos estudios,⁷ pero no en todos.⁸ Un meta-análisis de Janghorbani y col. describió un incremento del riesgo de fracturas no vertebrales (RR 1.2; IC95% 1.01-1.5).⁹ Otro meta-análisis demostró que la DM2 se asoció con un incremento del riesgo de fracturas de cadera (OR 1.296; IC95% 1.069-1.571).¹⁰ Vestergaard informó un aumento del riesgo relativo de fractura de cadera (RR 1.38, IC95% 1.25-1.53) en pacientes con DM2.⁵ Esto contrasta con un RR 0,7 esperado (es decir, un riesgo 30% menor) basado en el grado de elevación de la DMO en la DM2. Los resultados analizados agrupadamente de tres estudios observacionales demostraron que el riesgo de fractura para cualquier puntaje T de cuello femoral aumentaba en pacientes con DM2 en comparación con controles.¹¹ Esto pone de relieve la dificultad de confiar solo en la DMO para evaluar el riesgo de fractura en DM2.

Los reportes sobre la asociación entre la DM2 y las fracturas vertebrales han sido contradictorios.¹²

Mecanismos implicados en la fragilidad ósea en la diabetes

La DM puede incrementar la fragilidad del hueso afectando negativamente la competencia de la matriz mediante la glicosilación del colágeno, dañando la microarquitectura ósea, alterando el remodelado, incrementando la adipogénesis de la médula ósea o afectando los procesos que concluyen en la mineralización de la matriz ósea. El propósito de esta descripción narrativa es explorar la comprensión actual de algunas vías fisiopatológicas involucradas en la fragilidad ósea observada en pacientes con diabetes mellitus.

Hiper glucemia

La hiperglucemia, resultante de una deficiencia de insulina o de su acción, tiene un efecto perjudicial, directa o indirectamente, sobre el hueso. *In vitro* se ha demostrado un efecto negativo directo de la hiperglucemia sobre los osteoblastos.¹³ La hiperglucemia aguda y la hiperosmolaridad resultante suprimen la expresión de osteocalcina¹⁴ y otros genes implicados en la maduración de osteoblastos.¹⁵ La hiperglucemia crónica regula negativamente la expresión del gen de la osteocalcina y la absorción de calcio por los osteoblastos.¹⁶ La acidosis inducida por la hiperglucemia también

podría incrementar la resorción ósea. La hiperglucemia y el estrés oxidativo podrían influir en la diferenciación de las células madre mesenquimales favoreciendo la adipogénesis sobre la osteogénesis.¹⁷ Un modelo de DM en ratones demostró reducción en los marcadores de formación (osteocalcina y osteoprotegerina) y un incremento de los marcadores de resorción ósea IL-6 y RANKL en médula ósea y sangre.¹⁸ Sin embargo, otro estudio *in vitro* demostró que la osteoclastogénesis se suprime en condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia.¹⁹ Por lo tanto, los osteoblastos y osteoclastos se verían afectados por la hiperglucemia. También se demostró que la alteración en la maduración osteoblástica causada por la hiperglucemia daría lugar a un estado de resistencia a los efectos de 1,25-hidroxivitamina D₃ a través de una regulación a la baja de los receptores de vitamina D.²⁰

Otro efecto indirecto de la hiperglucemia es la glucosuria que incrementa la calciuria generando un balance corporal negativo de calcio e incrementando la pérdida ósea.²¹

La relación entre hiperglucemia y riesgo de fractura no parece ser lineal.²² Tampoco se ha establecido una relación entre HbA_{1c} y el riesgo de fracturas.²³ El control glucémico deficiente se asoció a un mayor riesgo de fracturas y algunos estudios observacionales sugieren que un nivel de HbA_{1c} inferior a 8% podría reducir el riesgo de fracturas en los pacientes con DM.²⁴

Hipoglucemia

Una mayor frecuencia de hipoglucemias severas inducidas por insulina, que derivan en un incremento en la frecuencia de caídas, podría ser el mecanismo involucrado entre hipoglucemias y fracturas. Una mayor incidencia de fracturas ha sido reportada en pacientes tratados con insulina.²⁵ Se ha reportado que la mitad de los pacientes que han experimentado hipoglucemias severas presentan fracturas de cadera dentro de los dos años.²⁶

Insulina

La insulina estimula directa e indirectamente la proliferación y diferenciación de osteoblastos, inactiva p27 (responsable de la osteoclastogénesis), promueve la síntesis de colágeno e incrementa la captación de glucosa.²⁷

El efecto directo se produce por la estimulación del receptor de insulina (RI) que da lugar a la activación del sustrato de receptor de insulina (SRI), seguidos por la activación de las vías intracelulares MAPK y PI3-K/Akt, ambas nece-

sarias para el crecimiento, diferenciación y supervivencia osteoblástica.^{28,29} Los preosteoblastos expresan el subtipo RI-A, los osteoblastos maduros, el subtipo RI-B, y la relación RI-B:RI-A aumenta progresivamente a lo largo de la diferenciación osteogénica de los precursores mesenquimatosos.³⁰ Varios datos recientes sugieren que estos efectos sobre la diferenciación osteoblástica estimularían la producción de osteocalcina que, a su vez, estimularía la secreción de insulina y una mayor sensibilidad a la insulina en músculo esquelético.³¹

La insulina también puede afectar la función osteoclástica indirectamente a través de las vías de señalización osteoblástica. Particularmente, se necesita el SRI-1 para generar factores de diferenciación osteoclástica como el ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) y el factor de diferenciación de los osteoclastos (FDO).³² Un estudio con clamp hiperinsulínico-euglucémico demostró que la insulina suprime la resorción ósea (CTX) y disminuye los niveles de osteocalcina total y descarboxilada. Estos hallazgos podrían sugerir que la insulina actuaría como un agente anabólico para el metabolismo óseo al cambiar el equilibrio a favor de la formación de hueso sobre la resorción.

Los efectos indirectos estarían mediados por el control de la glucemia y sus efectos sobre la hormona paratiroidea, IGF-1 y vitamina D.³⁴

En DM1, las deficiencias de insulina e IGF-1, presentes desde el momento del diagnóstico, dan lugar a alteraciones en la formación ósea,³⁵ mineralización y microarquitectura ósea, reduciendo el pico de masa ósea. En un modelo de DM inducida por estreptozotocina en ratas se demostró que la terapia con insulina restauró las alteraciones en las funciones osteoblásticas y osteoclásticas.³⁶ En consonancia, un estudio en 62 pacientes con DM1 de reciente diagnóstico demostró que la insulinoterapia intensificada durante 7 años se asoció con estabilización de la DMO en todos los sitios.³⁷ En DM2, el hiperinsulinismo asociado a resistencia a la insulina incrementa la masa ósea a través de la formación ósea a través de receptores de superficie SRI-1 y SRI-2 en osteoblastos y mediante la reducción de la concentración de globulinas transportadoras de hormonas, incrementando las concentraciones libres de estradiol y testosterona.³⁸

Factor de crecimiento insulino-símil 1 (IGF-1)

El IGF-1 es una proteína que se une al



receptor de IGF-1 y, con menor afinidad, al receptor de insulina. El IGF-1 incrementa la deposición de matriz ósea al disminuir la degradación de colágeno tipo 1 e incrementar el reclutamiento de osteoblastos. Asimismo, los osteoblastos expresan el receptor de IGF-1 en su superficie. Diversos estudios experimentales en animales han demostrado que IGF-I modula la mineralización ósea, el crecimiento óseo lineal y transversal. Se ha constatado una relación entre IGF-1 y DMO.⁴⁰

Los adolescentes con DM1 presentan menores niveles de IGF-1 en comparación con sujetos sanos; un diagnóstico a temprana edad y un mal control metabólico predicen valores bajos de IGF-1.⁴¹ Estudios *in vivo* demostraron que las acciones estimulantes de IGF-1 sobre los osteoblastos se ven atenuadas por altas concentraciones de los productos de glicosilación avanzada.^{42,43} Los niveles bajos de IGF-1 se asocian con una menor DMO femoral y de columna lumbar en pacientes con DM1. En dos estudios se demostró que los niveles de IGF-1 se asocian inversamente con FxV en mujeres DM2 posmenopáusicas independientemente de la DMO.^{44,45} Finalmente, los niveles elevados de la proteína transportadora de IGF-1 (IGFBP-I) han sido asociados con un incremento del riesgo de fracturas independientemente de los niveles de IGF-1 e IMC.⁴⁶

Sistema incretina

Este sistema incluye varios péptidos, aunque el 90% de los efectos fisiológicos se deben al péptido insulínico (*glucose-dependent insulintropic peptid [GIP]*) dependiente de glucosa y al péptido similar al glucagón tipo 1 (*glucagon-like peptide-1 [GLP-1]*). Los niveles de GIP se encuentran normales o incluso elevados en pacientes con DM2; sin embargo, los niveles de GLP-1 estimulados por las comidas se encuentran considerablemente reducidos en pacientes con intolerancia a la glucosa o DM2.

A nivel óseo, GIP estimula la proliferación osteoblástica, incrementa la expresión de colágeno tipo I y la actividad de la fosfatasa alcalina. También inhibe la actividad osteoclástica, aunque la evidencia sobre potenciales efectos antirresortivos es inconsistente.⁴⁷ Sin embargo, un estudio donde se evaluaron los marcadores de recambio óseo en 12 pacientes varones sanos tras la realización de una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) *versus* una infusión de glucosa endovenosa isoglucémica (IGE) demostró que tras la

PTOG se redujeron un 50% los niveles séricos de CTX y solo un 30% tras la IGE. El pico plasmático máximo de GIP predijo significativamente el nadir de CTX. No se constataron cambios en los niveles del propéptido aminoterminal del colágeno tipo I (PINP). Estos hallazgos indicarían que las hormonas intestinales, especialmente el GIP, tendrían un efecto agudo sobre el remodelado óseo dando lugar a una disminución de la resorción ósea.⁴⁸

El GLP-1 interactúa directamente con osteoblastos. Incluso podría inducir diferenciación osteogénica en hueso, ya que se ha descrito la expresión de su receptor en células madre derivadas de tejido adiposo.⁴⁹ Se demostró que GLP-1 incrementa la masa ósea trabecular y la expresión de marcadores osteoblásticos en ratas con diabetes.⁵⁰ Un estudio aleatorizado en mujeres con obesidad ha reportado un efecto positivo de los agonistas de GLP-1 en la formación ósea y prevención de la pérdida ósea asociada al descenso de peso.⁵¹ Los mecanismos subyacentes no se han esclarecido, aunque una explicación posible es que el GLP-1R expresado en las células tiroideas C promueven la secreción de calcitonina inhibiendo, de esta manera, la resorción ósea.⁵²

Metabolismo del calcio y vitamina D

La mayoría de los estudios han demostrado que la insuficiencia de vitamina D es más frecuente en pacientes con DM2. En un estudio publicado recientemente donde evaluamos 108 pacientes con DM2 y 89 sin DM demostramos que el grupo de DM2 presentó mayor proporción de deficiencia de vitamina D respecto del grupo control (50.9% vs. 28.1%, OR 2.7, IC95%: 1.5-4.8; χ^2 p=0,0013), mayor proporción de deficiencia severa (6.5% vs. 1.1%) y menor proporción de niveles óptimos de 25OHD (Figura 1), a expensas, preferentemente, de la elevada prevalencia de síndrome metabólico y mayor IMC.⁵³ Otros mecanismos que explicarían la mayor deficiencia de vitamina D son la predisposición genética (DM1), la albuminuria concurrente (DM1 y DM2) o la elevada excreción renal de metabolitos de la vitamina D y de sus proteínas transportadoras.⁵⁴

La poliuria inducida por hiperglucemia puede causar una pérdida urinaria de calcio, fósforo y magnesio, dando lugar a un desequilibrio en el eje paratohormona (PTH)/vitamina D. Se ha demostrado que los pacientes con DM2 presentan menores niveles de PTH y osteocalcina y, consecuentemente, menor formación y

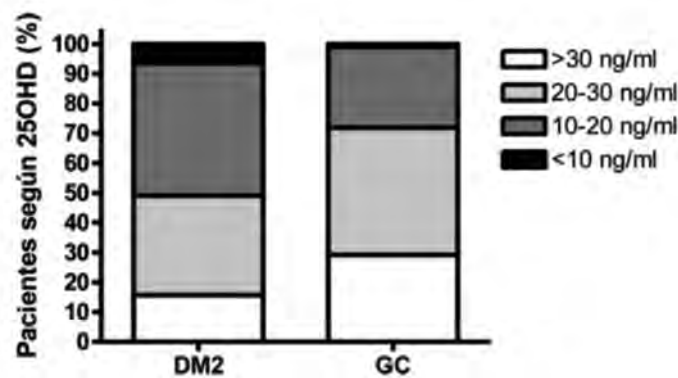


Figura 1. Porcentaje de pacientes diabéticos tipo 2 (DM2) y controles (GC) según niveles de 25OHD.⁵³

resorción ósea.⁵⁵ Los reportes previos mostraron que los pacientes con hipoparatiroidismo primario tienen mayor DMO, reducción del remodelado óseo y un aumento de los parámetros morfométricos.⁵⁶ Este bajo recambio óseo reduce las propiedades mecánicas del hueso debido a una acumulación de microdaños, disminuyendo la calidad ósea. Esto explicaría el mayor riesgo de FxV en mujeres con diabetes y bajos niveles de PTH y osteocalcina. En pacientes con DM1 se ha descrito mayor hipercalcemia y, paradójicamente, un hipoparatiroidismo funcional durante momentos de mal control glucémico que revierten parcialmente con la mejoría de la glucemia.⁵⁷

Varios estudios *in vitro* demostraron que tanto la hiperglucemia⁵⁸ como los AGE⁵⁹ inhiben la secreción de PTH por las células paratiroides.

Obesidad

Se ha reportado que en mujeres sanas premenopáusicas y posmenopáusicas la grasa corporal total se correlaciona positivamente con la DMO. La mayoría de los estudios respaldan un menor riesgo de fracturas vertebrales, de muñeca y de fémur proximal en adultos obesos.⁶⁰ Sin embargo, el riesgo no es menor en todos los sitios del esqueleto; el riesgo de fracturas de húmero proximal (RR 1.28), de pierna (OR 1.7) y de tobillo (OR 1.5) es mayor.^{61,62} Un gran número de fracturas de bajo trauma ocurren en hombres y mujeres con sobrepeso y obesidad, siendo similar la prevalencia de fracturas de bajo trauma en mujeres obesas y no obesas.⁶³ Por lo tanto, la obesidad no protege completamente contra el riesgo de fractura.

En la actualidad, la obesidad se considera una afección inflamatoria sistémica debido a que el tejido adiposo secreta diversas

citoquinas proinflamatorias, principalmente, interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). El aumento de estas citoquinas podría promover la actividad de los osteoclastos y la resorción ósea mediante modificaciones en la vía RANK/RANKL/osteoprotegerina (OPG).⁶⁴ La adiponectina es una adipocitocina expresada específicamente por el tejido adiposo visceral, subcutáneo y de la médula ósea. Se ha demostrado que los osteoblastos presentan receptor de adiponectina y que esta puede estimular su proliferación, diferenciación y mineralización.⁶⁵ El aumento de IL-6 y TNF- α se asocia a una disminución en la producción de adiponectina. Asimismo, la elevación de estas citoquinas se asocia a resistencia a la insulina, DM2 y aterosclerosis.⁶⁶ Finalmente, una ingesta elevada de grasas podría interferir con la absorción intestinal de calcio y, por lo tanto, disminuir su biodisponibilidad para la formación de hueso.

Si bien los reportes de un mayor riesgo de fracturas de húmero, pie y tobillo en pacientes con DM2 serían consistentes con un efecto de la obesidad per se, el mayor riesgo de fracturas de cadera y muñeca en DM2 muestra un patrón opuesto al observado en individuos obesos, lo que indicaría una divergencia en los mecanismos implicados. La obesidad podría desempeñar un papel en la patogénesis de las fracturas asociadas a la DM2 a través de diferentes factores, como un mayor riesgo e impacto de caídas, inmovilidad, inflamación, insuficiencia de vitamina D, hipogonadismo (en hombres) y efectos adversos del tejido adiposo sobre el remodelado óseo.^{67,68,69} Un estudio que examinó la relación entre la concentración de adiponectina sérica, la distribución de grasa corporal, la sensibilidad a la insulina, la insulinoemia y la tolerancia a la glucosa en indios



pima y caucásicos demostró que la DM2 y la obesidad se asocian con hipoadiponectinemia debido, preferentemente, a la hiperinsulinemia o a la resistencia a la insulina o a ambas (Figura 2).⁷⁰ En consonancia, en otro estudio se demostró una asociación inversa entre adiponectinemia y riesgo de FxV en pacientes masculinos con DM2.⁷¹

Inflamación

Tanto la DM1 como la DM2 se consideran enfermedades inflamatorias. La susceptibilidad a la DM1 implica una interacción compleja de factores genéticos y ambientales, pero alguna evidencia reciente sugiere que la inflamación innata presenta un papel en su génesis. La interleuquina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) han sido involucrados en el inicio de la DM1 y en el daño de células β pancreáticas, alterando la síntesis de insulina. Ambas pueden promover la osteoclastogénesis e incrementar la actividad osteoclástica por inducción del RANKL y un efecto antiapoptótico sobre estas células.⁷² También se demostró que el TNF- α puede regular la baja RUNX2 y osterix, incrementando la expresión de esclerostina y Dkk1.⁷³

Se ha propuesto que una inflamación crónica de bajo grado está involucrada en los procesos patogénicos que causan DM2.⁷⁴ La interleuquina-6 (IL-6), liberada por el tejido adiposo, es una de las citoquinas relacionadas con la obesidad y la DM2 y estaría implicada en el incremento de la osteoclastogénesis.⁷⁵

Médula ósea

Las células adiposas residen en la médula ósea junto con los osteoblastos y sus precursores mesenquimatosos comunes. La conversión de la adiposidad medular es un fenómeno fisiológico relacionado con la edad, que consiste en la transformación de una médula activa, hematopoyética, en una menos activa, adiposa. La DM altera la composición celular aumentando la adipogénesis de la médula ósea y reduciendo la osteoblastogénesis.

También induce un remodelado microvascular a nivel de la médula ósea responsable de disfunción endotelial y reducción del número de células madre.⁷⁶ Un estudio realizado en mujeres diabéticas y no diabéticas demostró una relación inversa entre adiposidad de la médula ósea y la DMO. En ese mismo estudio, la presencia de fracturas y la DM se asoció a

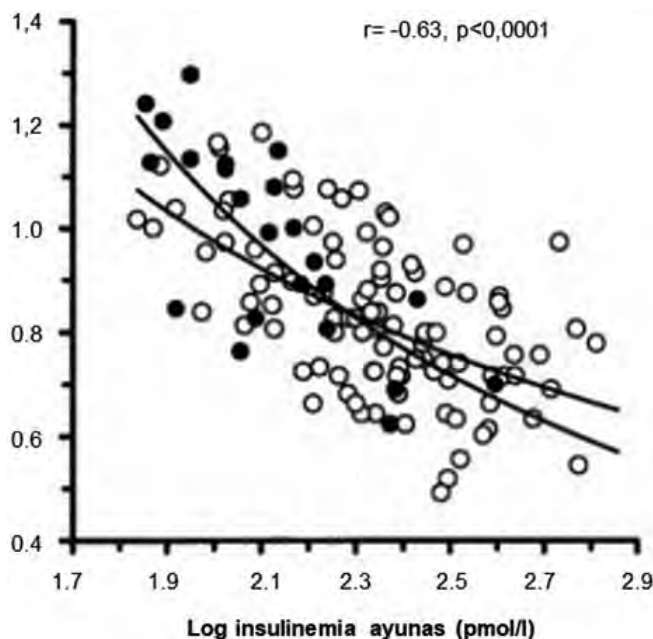


Figura 2. Concentración de adiponectina en función de insulinemia en ayunas. Círculos blancos: indios pima no diabéticos. Círculos negros: caucásicos. Modificado de Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86(5):1930-5.

menores niveles de ácidos grasos insaturados y a mayores de ácidos grasos saturados.⁷⁷

Músculo

La sarcopenia, tres veces mayor en sujetos con DM2, incrementa el riesgo de caídas y fracturas.⁷⁸ La inflamación crónica, la reducción de síntesis de proteínas musculares y el incremento de la degradación proteica debido a resistencia a la insulina podrían estar implicados en su desarrollo. Un incremento en los niveles séricos de pentosidina y la disminución de IGF-1 son factores de riesgo independientes de la sarcopenia en mujeres posmenopáusicas con DM2.⁷⁹

Complicaciones de la DM

Los pacientes con retinopatía, arteriopatía y neuropatía presentan mayor riesgo de caídas y pueden presentar alteraciones en la microarquitectura ósea. Se ha demostrado que los pacientes con complicaciones microvasculares muestran menor DMO volumétrica cortical, mayor porosidad y menor espesor cortical a nivel del radio.⁸⁰

RANKL y osteoprotegerina

El ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) es un factor clave para la diferenciación de los precursores osteoclastícos en osteoclastos multinucleados y para la activación de los osteoclastos maduros. Las especies de oxígeno reactivo (ROS) también

son cruciales para la osteoclastogénesis inducida por RANKL.

La señalización de RANKL induce la expresión de *caspasa-3*, una enzima necesaria para la diferenciación de osteoclastos inducida por RANKL. La diferenciación terminal de los osteoclastos se caracteriza por la adquisición de marcadores fenotípicos maduros, como el receptor de calcitonina (RCT), la fosfatasa ácida resistente a tartrato (FART) y la capacidad de reabsorber hueso. Un estudio *in vitro* demostró que la exposición a niveles elevados de glucosa inhibe la señalización mediada por RANKL sobre células progenitoras de osteoclastos, inhibiendo la actividad de FART y la expresión de RCT. Esto produciría una reducción en la producción de ROS e inhibición de caspasa 3 y de la activación de factor nuclear κ B (Figura 3).⁸¹ Otro estudio *in vitro* realizado en osteocitos demostró que la exposición a productos de glicosilación avanzada disminuye la expresión del ARNm y de la proteína RANKL (véase el apartado “Sistema Wnt”).⁸²

Sin embargo, los estudios en seres humanos demostraron mayores niveles de RANKL. Se ha documentado una menor DMO junto a niveles elevados de RANKL y osteoprotegerina (OPG) en pacientes jóvenes con DM1.⁸³ Los niveles elevados de RANKL podrían asociarse a un incremento inicial de la señalización

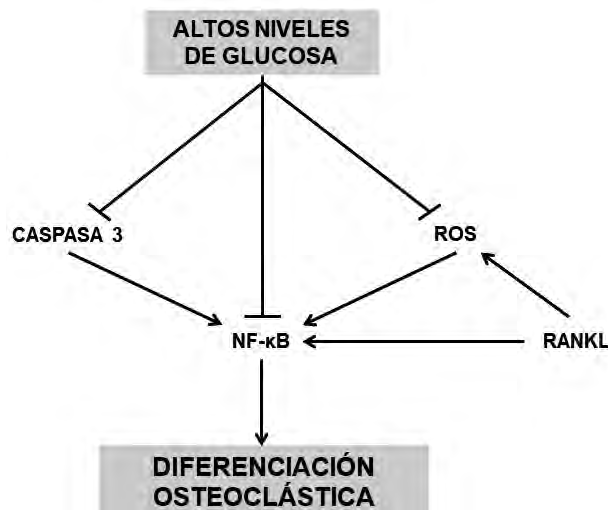


Figura 3. Posibles mecanismos implicados en la inhibición de la osteoclastogénesis mediada por hiperglucemia. Modificado de Wittrant Y, Gorin Y, Woodruff K, et al. High d(+)glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. Bone 2008; 42(6):1122-30.



osteoclástica, mientras que los niveles altos de OPG podrían reflejar la respuesta del organismo a la señalización osteoclástica inversa con la finalidad de mantener la masa ósea funcional suficiente y promover el crecimiento en niños y adolescentes. El efecto neto de estas alteraciones sería un menor pico de masa ósea en la adolescencia y mayor riesgo posterior de fractura. La terapia con insulina disminuiría los niveles de OPG, revirtiendo la activación del sistema RANK/RANKL/OPG.⁸⁴

Sistema Wnt

Se ha demostrado que la vía canónica de señalización de Wnt desempeña un papel importante en el control de la osteoblastogénesis y la formación de hueso. Los ligandos Wnt se unen al complejo receptor frizzled y a las proteínas relacionadas con los receptores de lipoproteínas de baja densidad LRP5 o LRP6 y estimulan la proliferación de osteoblastos. Una cascada de eventos da como resultado la activación intracelular y la translocación de β -catenina al núcleo celular, uniéndose así a factores transcripcionales y conduciendo a la regulación positiva de la expresión de genes diana.⁸⁵ Los Wnt están regulados por varias familias de antagonistas, como esclerostina y Dickkopf-1, sintetizados principalmente por los osteocitos. Dickkopf-1 (DKK-1), producto del gen DKK1, inhibe la vía de señalización de Wnt y reduce la osteoblastogénesis.^{86,87} La esclerostina es un ligando del complejo LRP5/LRP6 y compite con Wnt evitando su unión y la consiguiente activación de la vía (4).⁸⁸

Se ha demostrado una reducción de la actividad de la vía Wnt/ β -catenina en el hueso de animales con diabetes inducida por estreptozotocina debido al aumento de esclerostina y DKK-1.⁸⁹ Algunos estudios demostraron un incremento en la expresión del gen de esclerostina en modelos animales de DM1,⁹⁰ mientras que otro estudio en un modelo animal de DM2 no encontró tal asociación.⁹¹ Estudios *in vitro* de osteocitos tratados con niveles elevados de glucosa (22 mM) o con productos finales de glicosilación avanzada demostraron mayor expresión del ARNm y de la proteína esclerostina, junto a una mayor apoptosis de osteocitos.⁸² Por el contrario, se ha demostrado que el tratamiento con anticuerpos anti-esclerostina revierte la deficiencia de masa ósea e incrementa la resistencia ósea en modelos de animales con diabetes.⁹² La hiperglucemia y los productos de glicosilación avanzada probablemente suprimen la formación de hueso al

aumentar la expresión de esclerostina en osteocitos, mientras que los productos de glicosilación avanzada suprimen la resorción ósea al disminuir la expresión de RANKL. Ambos procesos podrían ser la causa del bajo recambio óseo en la DM. Además, la hiperglucemia y los productos de glicosilación avanzada pueden deteriorar el hueso cortical al inducir apoptosis de osteocitos.

Algunos estudios han reportado un incremento de los niveles de esclerostina en pacientes adultos con DM1,⁹³ pero no en niños con DM1.⁹⁴ Se reportaron niveles elevados de esclerostina en pacientes adultos con DM2 y prediabetes^{95,96} con una reducción de β -catenina circulante (Figura 4).⁹⁷ Otro estudio en pacientes con DM2 demostró que los marcadores de formación correlacionaron negativamente con esclerostina, mientras que los de resorción correlacionaron positivamente con DKK-1. Además, DKK-1 tendría un efecto directo sobre la osteoclastogénesis al disminuir la expresión de RANKL o al aumentar la expresión de osteoprotegerina. En el mismo estudio, los niveles elevados de esclerostina y DKK-1 se asociaron a menor DMO.⁹⁸

Los niveles de DKK-1 se asocian positivamente con la glucemia en ayunas en pacientes jóvenes con DM1.⁹⁹ En DM2, la esclerostina se correlaciona positivamente con la HbA_{1c} y con índices de resistencia a la insulina, y negativamente con fosfatasa alcalina específica de hueso. Los mecanismos por los cuales la DM

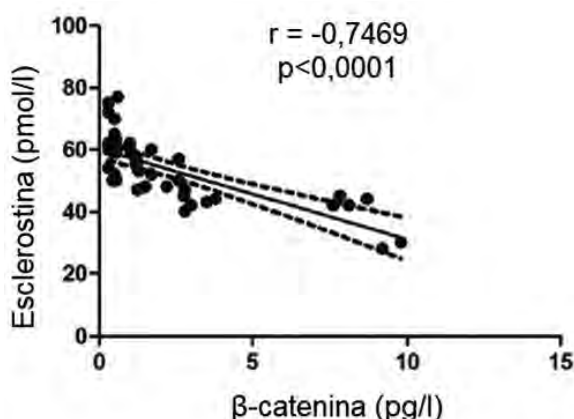


Figura 4. Correlación univariada entre β -catenina y esclerostina. Modificado de Gaudio A, Privitera F, Battaglia K, et al. Sclerostin levels associated with inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling and reduced bone turnover in type 2 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 2012; 97(10):3744-50.

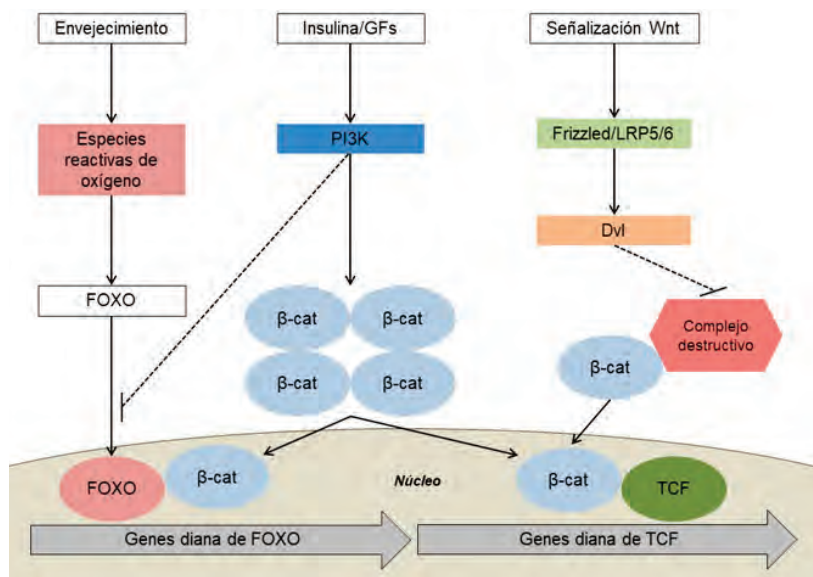


Figura 5. Vía de señalización Wnt: balance entre expresión de genes FOXO y TCF. GF: Growth factors. FOXO: Forkhead box O. LRP6/6: proteína relacionada con el receptor de LDL-5/6. Dvl: Disheveled. TCF: factor de transcripción específico de células T. -cat: -catenina. Complejo destructivo: GSK-3, CK-1 y pERK. Modificado de Jin T. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* 2008; 51: 1771-1780.

incrementa los niveles de esclerostina no se han dilucidado aunque podría estar implicada la PTH.

En contraste con varios estudios en mujeres posmenopáusicas que demuestran una relación entre niveles de esclerostina y riesgo de fracturas, un estudio reciente en pacientes con DM1 indicó que aquellos pacientes con el tercil más elevado de esclerostina tenían un 81% menos riesgo de fracturas en comparación con el tercil más bajo.¹⁰⁰ Por otra parte, los niveles elevados de esclerostina se asociaron con fracturas vertebrales en pacientes con DM2, independientemente de la DMO y del remodelado óseo.^{45,101}

El estrés oxidativo en los tejidos también contribuiría a los efectos deletéreos de la DM sobre el hueso. Se ha sugerido que el antagonismo de la señalización Wnt por el estrés oxidativo en progenitores mesenquimatosos desviaría la β-catenina del TCF-4 hacia Forkhead box O (FOXO) daría lugar a una menor osteoblastogénesis al desviar β-catenina de la señalización Wnt (Figura 5).^{101,102}

Conclusión

Existe evidencia creciente que demuestra que ambos tipos de diabetes tienen un efecto

negativo sobre el hueso dando lugar a un mayor riesgo de fractura. Aunque la hiperglucemia y la acumulación de AGE tendrían un papel preponderante, los diferentes mecanismos actuarían colectivamente para afectar la calidad ósea. Considerando estos datos, se sugiere una detección sistemática de osteoporosis en los pacientes con diabetes utilizando las normativas actuales de osteoporosis.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las fracturas pueden ocurrir con valores más altos de DMO, especialmente en pacientes con DM2. Un procedimiento sencillo consiste en interrogar a los pacientes con DM sobre sus antecedentes de fracturas. Es posible que la mitad de sus fracturas sean por fragilidad ósea y necesiten tratamiento antiosteoporótico. Finalmente, es fundamental lograr un control glucémico adecuado para reducir la incidencia de hipoglucemias y complicaciones microvasculares y macrovasculares y así el número de caídas y fracturas posteriores.

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

Recibido: mayo de 2018
Aceptado: diciembre de 2018



Referencias

1. IDF. Atlas de Diabetes. 8.^a edición. 2017.
2. Ministerio de Salud de la Nación. 3.^a Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. 2011.
3. International Osteoporosis Foundation. The global burden of osteoporosis: a fact sheet. Available at: <https://www.iofbonehealth.org/data-publications/fact-sheets/global-burden-osteoporosis>.
4. Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, et al. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J Bone Miner Res* 2007; 22:1317-28.
5. Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007; 18:427-44.
6. Zhukouskaya VV, Eller-Vainicher C, Vadzianava VV, et al. Prevalence of morphometric vertebral fractures in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2013; 36(6):1635-40.
7. Leslie WD, Lix LM, Prior HJ, et al. Biphasic fracture risk in diabetes: a population-based study. *Bone* 2007; 40(6):1595-601.
8. Dobnig H, Piswanger-Solkner JC, Roth M, et al. Type 2 diabetes mellitus in nursing home patients: effects on bone turnover, bone mass, and fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(9):3355-63.
9. Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, et al. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol* 2007; 166(5):495-505.
10. Dytfeld J, Michalak M. Type 2 diabetes and risk of low-energy fractures in postmenopausal women: meta-analysis of observational studies. *Aging Clin Exp Res* 2017; 29(2):301-9.
11. Schwartz AV, Vittinghoff E, Bauer DC, et al. Association of BMD and FRAX score with risk of fracture in older adults with type 2 diabetes. *JAMA* 2011; 305(21):2184-92.
12. Ensrud KE, Thompson DE, Cauley JA, et al, and the Fracture Intervention Trial Research Group. Prevalent vertebral deformities predict mortality and hospitalization in older women with low bone mass. *J Am Geriatr Soc* 2000; 48:241-9.
13. Cunha JS, Ferreira V M, Maquigussa E, et al. Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function invitro. *Cell Tissue Res* 2014; 358:249-56.
14. Zayzafoon M, Stell C, Irwin R, et al. Extracellular glucose influences osteoblast differentiation and c-Jun expression. *J Cell Biochem* 2000; 79:301-10.
15. Botolin S, McCabe LR. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. *J Cell Biochem* 2006; 99:411-24.
16. Wei J, Ferron M, Clarke CJ, et al. Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation. *J Clin Invest* 2014; 124:1-13.
17. Aguiari P, Leo S, Zavan B, et al. High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. *Proc. Natl Acad Sci* 2008; 105:1226-31.
18. Won HY, Lee JA, Park ZS, et al. Prominent bone loss mediated by RANKL and IL-17 produced by CD4+ T cells in TallyHo/Jng J mice. *PLoS One* 2011; 256(3):e18168.
19. Xu F, Ye YP, Dong YH, et al. Inhibitory effects of high glucose/insulin environment on osteoclast formation and resorption in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2013; 33(2):244-9.
20. Inaba M, Terada M, Koyama H, et al. Influence of high glucose on 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced effect on human osteoblast-like MG-63 cells. *J Bone Miner Res* 1995; 10(7):1050-6.
21. Gregorio F, Cristallini S, Santeusano F, et al. Osteopenia associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus: what are the causes? *Diabetes Res Clin Pract* 1994; 23(1):43-54.
22. Gagnon C, Magliano DJ, Ebeling PR, et al. Association between hyperglycaemia and fracture risk in non-diabetic middle-aged and older Australians: a national, population based prospective study (AusDiab). *Osteoporos Int* 2010; 21(12):2067-74.
23. Viégas M, Costa C, Lopes A, et al. Prevalence of osteoporosis and vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus and their relationship with duration of the disease and chronic complications. *J Diabetes Complications* 2011; 25(4):216-21.
24. Oei L, Zillikens MC, Dehghan A, et al. High bone mineral density and fracture risk in type 2 diabetes as skeletal complications of

- inadequate glucose control: the Rotterdam Study. *Diabetes Care* 2013; 36:1619-28.
25. Nicodemus KK, Folsom AR. Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. *Diabetes Care* 2001; 24(7):1192-7.
 26. Hung YC, Lin CC, Chen HJ, et al. Severe hypoglycemia and hip fracture in patients with type 2 diabetes: a nationwide population-based cohort study. *Osteoporos Int* 2017; 28(7):2053-60.
 27. Klein GL. Insulin and bone: recent developments. *World J Diabetes* 2014; 15;5(1):14-6.
 28. Yang J, Zhang X, Wang W, et al. Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through erk and pi3k in mg-63 cells. *Cell Biochem Funct* 2010; 28(4):334-41.
 29. Fulzele K, DiGirolamo DJ, Liu Z, et al. Disruption of the insulin-like growth factor type 1 receptor in osteoblasts enhances insulin signaling and action. *J Biol Chem* 2007; 282:25649-58.
 30. Avnet S, Perut F, Salerno M, Sciacca L, Baldini N. Insulin receptor isoforms are differently expressed during human osteoblastogenesis. *Differentiation* 2012; 83:242-8.
 31. Wei J1, Hanna T, Suda N, et al. Osteocalcin promotes β -cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a. *Diabetes* 2014; 63(3):1021-31.
 32. Ogata N, Chikazu D, Kubota N, et al. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J Clin Invest* 2000; 105:935-43.
 33. Ivaska KK, Heliövaara MK, Ebeling P, et al. The effects of acute hyperinsulinemia on bone metabolism. *Endocr Connect* 2015; 4(3):155-62.
 34. Blakytyn R, Spraul M, Jude EB. Review: The diabetic bone: A cellular and molecular perspective. *Int J Low Extrem Wounds* 2011; 10(1):16-32.
 35. Valerio G, del Puente A, Esposito-del Puente A, et al. The lumbar bone mineral density is affected by long-term poor metabolic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Horm Res* 2002; 58(6):266-72.
 36. Hie M, Tsukamoto I. Increased expression of the receptor for activation of NF-kappaB and decreased runt-related transcription factor 2 expression in bone of rats with streptozotocin induced diabetes. *Int J Mol Med* 2010; 26:611-8.
 37. Campos Pastor MM, López-Ibarra PJ, Escobar-Jiménez F, et al. Intensive insulin therapy and bone mineral density in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. *Osteoporos Int* 2000; 11:455-9.
 38. Räkel A, Sheehy O, Rahme E, et al. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2008; 34(3):193-205.
 39. Niu T, Rpsse CJ. The insulin-like growth factor-1 gene and osteoporosis: a critical appraisal. *Gene* 2005; 361:38-56.
 40. Rucker D, Ezzat S, Diamandi A, et al. IGF-I and testosterone levels as predictors of bone mineral density in healthy, community-dwelling men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60:491-9.
 41. Moyer-Mileur LJ, Slater H, Jordan KC, et al. IGF-1 and IGF-binding proteins and bone mass, geometry, and strength: relation to metabolic control in adolescent girls with type 1 diabetes. *J Bone Miner Res* 2008; 23:1884-91.
 42. McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo, A. M. Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: role in osteoblast development. *Acta Diabetol* 2001; 38:113-22.
 43. Terada M, Inaba M, Yano Y, et al. Growth-inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. *Bone* 1998; 22:17-23.
 44. Kanazawa I, Yamaguchi T, Sugimoto T. Serum insulin-like growth factor-1 is a marker for assessing the severity of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 2011; 22:1191-8.
 45. Ardawi MS, Akhbar DH, Alshaikh A, et al. Increased serum sclerostin and decreased serum IGF-1 are associated with vertebral fractures among postmenopausal women with type-2 diabetes. *Bone* 2013; 56(2):355-62.
 46. Lundin H, Sääf M, Strenger LE, et al. High serum Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 1 (IGFBP-1) is associated with high fracture risk independent of Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-I). *Calcif Tissue Int* 2016; 99(4):333-9.
 47. Tsukiyama K, Yamada Y, Yamada C, et al. Gastric Inhibitory Polypeptide as an Endogenous Factor Promoting New Bone Formation after Food Ingestion. *Mol Endocrinol* 2006; 20:1644-51.



48. Westberg-Rasmussen S, Starup-Linde J, Hermansen K, et al. Differential impact of glucose administered intravenously or orally on bone turnover markers in healthy male subjects. *Bone* 2017; 97:261-6.
49. Jeon YK, Bae MJ, Kim JI, et al. Expression of Glucagon-Like Peptide 1 Receptor during Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. *Endocrinol Metab* 2014; 29:567-73.
50. Kim JY, Lee SK, Jo KJ, et al. Exendin-4 increases bone mineral density in type 2 diabetic OLETF rats potentially through the down-regulation of SOST/sclerostin in osteocytes. *Life Sci* 2013; 92:533-40.
51. Iepsen EW, Lundgren JR, Hartmann B, et al. GLP-1 receptor agonist treatment increases bone formation and prevents bone loss in weight-reduced obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100:2909-17.
52. Nuche-Berenguer B, Portal-Núñez S, Moreno P, et al. Presence of a functional receptor for GLP-1 in osteoblastic cells, independent of the cAMP-linked GLP-1 receptor. *J Cell Physiol* 2010; 225:585-92.
53. Ramírez Stieben LA, Brance ML, Dobry R y col. Niveles de 25(OH)vitamina D en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con y sin síndrome metabólico. *Actual Osteol* 2017; 13(3):214-22.
54. Diaz VA, Mainous AG 3rd, Carek PJ, et al. The association of vitamin D deficiency and insufficiency with diabetic nephropathy: implications for health disparities. *J Am Board Fam Med* 2009; 22(5):521-7.
55. Yamamoto M, Yamaguchi T, Nawata K, et al. Decreased PTH levels accompanied by low bone formation are associated with vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:1277-84.
56. Rubin MR, Dempster DW, Zhou H, et al. Dynamic and structural properties of the skeleton in hypoparathyroidism. *J Bone Miner Res* 2008; 23:2018-24.
57. Thalassinou NC, Hadjiyanni P, Tzanela M, et al. Calcium metabolism in diabetes mellitus: effect of improved blood glucose control. *Diabet Med* 1993; 10:341-4.
58. Sugimoto T, Ritter C, Morrissey J, et al. Effects of high concentrations of glucose on PTH secretion in parathyroid cells. *Kidney Int* 1990; 37:1522-7.
59. Yamamoto T, Ozono K, Miyauchi A, et al. Role of advanced glycation end products in a dynamic bone disease in patients with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001; 38:S161-S164.
60. De LC, Kanis JA, Oden A, et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2005; 16(11):1330-8.
61. Compston JE, Watts NB, Chapurlat R, et al. Obesity is not protective against fracture in postmenopausal women: GLOW. *Am J Med* 2011; 124(11):1043-50.
62. Prieto-Alhambra D, Premaor MO, Fina Aviles F, et al. The association between fracture and obesity is site-dependent: a population-based study in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2012; 27(2):294-300.
63. Premaor MO, Comim FV, Compston JE. Obesity and fractures. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2014; 58(5):470-7.
64. Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res* 2011; 6:30.
65. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, et al. Adiponectin and AMP kinase activator stimulate proliferation, differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *BMC Cell Biol* 2007; 8:51.
66. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112(12):1821-30.
67. Bredella MA, Torriani M, Ghomi RH, et al. Determinants of bone mineral density in obese premenopausal women. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19:49-53.
68. Herrera-Rangel AB, Aranda-Moreno C, Mantilla-Ochoa T, et al. Influence of the body mass index on the occurrence of falls in patients with type 2 diabetes mellitus. *Obes Res Clin Pract* 2015; 9(5):522-6.
69. Yang Y, Hu X, Zhang Q, Zou R. Diabetes mellitus and risk of falls in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Age Ageing* 2016; 45(6):761-7.
70. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5):1930-5.
71. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, et al. Relationships between serum adiponectin levels versus bone mineral density, bone metabolic markers, and vertebral fractures in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2009; 160:265-73.

72. Jules J, Feng X. In vitro investigation of the roles of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α and interleukin-1 in murine osteoclastogenesis. *Methods Mol Biol* 2014; 1155:109-23.
73. Diarra D, Stolina M, Polzer K, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007; 13:156-63.
74. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 2005; 54(Suppl 2):S114-S124.
75. Park JH, Park KH, Cho S, et al. Concomitant increase in muscle strength and bone mineral density with decreasing IL-6 levels after combination therapy with alendronate and calcitriol in postmenopausal women. *Menopause* 2013; 20:747-53.
76. Piccinin MA, Khan ZA Pathophysiological role of enhanced bone marrow adipogenesis in diabetic complications. *Adipocyte* 2014; 3:263-72.
77. Patsch JM, Li X, Baum T, et al. Bone marrow fat composition as a novel imaging biomarker in postmenopausal women with prevalent fragility fractures. *J Bone Miner Res* 2013; 28:1721-8.
78. Macgilchrist C, Paul L, Ellis BM, et al. Lower-limb risk factors for falls in people with diabetes mellitus. *Diabet Med* 2010; 27:162-8.
79. Tanaka K, Kanazawa I, Sugimoto T. Elevated serum pentosidine and decreased serum IGF-I levels are associated with Loss of muscle mass in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2016; 124(3):163-6.
80. Shanbhogue VV, Hansen S, Frost M, et al. Compromised cortical bone compartment in type 2 diabetes mellitus patients with microvascular disease. *Eur J Endocrinol* 2015; 174:115-24.
81. Wittrant Y, Gorin Y, Woodruff K, et al. High d(+)glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bone* 2008; 42(6):1122-30.
82. Tanaka K, Yamaguchi T, Kanazawa I, et al. Effects of high glucose and advanced glycation end products on the expressions of sclerostin and RANKL as well as apoptosis in osteocyte-like MLO-Y4-A2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 461(2):193-9.
83. Tsentidis C, Gourgiotis D, Kossiva L, et al. Higher levels of s-RANKL and osteoprotegerin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus may indicate increased osteoclast signaling and predisposition to lower bone mass: a multivariate cross-sectional analysis. *Osteoporos Int* 2016; 27(4):1631-43.
84. Pater A, Sypniewska G, Pilecki O. Biochemical markers of bone cell activity in children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2010; 23:81-6.
85. Burgers TA, Williams BO. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling within and from osteocytes. *Bone* 2013; 54(2):244-9.
86. Voorzanger-Rousselot N, Goehrig D, Facon T, et al. Platelet is a major contributor to circulating levels of Dickkopf-1: clinical implications in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2009; 145(2):264-6.
87. Drake MT, Srinivasan B, Mödder UI, et al. Effects of parathyroid hormone treatment on circulating sclerostin levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(11):5056-62.
88. Honasoge M, Rao AD, Rao SD. Sclerostin: recent advances and clinical implications. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014; 21(6):437-46.
89. Hie M, Iitsuka N, Otsuka T, et al. Insulin-dependent diabetes mellitus decreases osteoblastogenesis associated with the inhibition of Wnt signaling through increased expression of Sost and Dkk1 and inhibition of Akt activation. *Int J Mol Med* 2011; 28(3):455-62.
90. Kim JH, Lee DE, Woo GH, et al. Osteocytic Sclerostin Expression in Alveolar Bone in Rats With Diabetes Mellitus and Ligature-Induced Periodontitis. *J Periodontol* 2015; 86(8):1005-11.
91. Pereira M, Gohin S, Lund N, et al. Sclerostin does not play a major role in the pathogenesis of skeletal complications in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 2017; 28(1):309-20.
92. Yee CS, Xie L, Hatsell S, et al. Sclerostin antibody treatment improves fracture outcomes in a Type I diabetic mouse model. *Bone* 2016; 82:122-34.
93. Neumann T, Hofbauer LC, Rauner M, et al. Clinical and endocrine correlates of circulating sclerostin levels in patients with type 1 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014; 80(5):649-55.
94. Tsentidis C, Gourgiotis D, Kossiva L, et al. Sclerostin distribution in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and



- correlation with bone metabolism and bone mineral density. *Pediatr Diabetes* 2016; 17(4):289-99.
95. García-Martín A, Rozas-Moreno P, Reyes-García R, et al. Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(1):234-41.
96. Daniele G, Winnier D, Mari A, et al. Sclerostin and Insulin Resistance in Prediabetes: Evidence of a Cross Talk Between Bone and Glucose Metabolism. *Diabetes Care* 2015; 38(8):1509-17.
97. Gaudio A, Privitera F, Battaglia K, et al. Sclerostin levels associated with inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling and reduced bone turnover in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(10):3744-50.
98. Wang N, Xue P, Wu X, et al. Role of sclerostin and dkk1 in bone remodeling in type 2 diabetic patients. *Endocr Res* 2018; 43(1):29-38.
99. Lattanzio S, Santilli F, Liani R, et al. Circulating dickkopf-1 in diabetes mellitus: association with platelet activation and effects of improved metabolic control and low-dose aspirin. *J Am Heart Assoc* 2014; 3(4).
100. Starup-Linde J, Lykkeboe S, Gregersen S, et al. Bone Structure and Predictors of Fracture in Type 1 and Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(3):928-36.
101. Yamamoto M, Yamauchi M, Sugimoto T. Elevated sclerostin levels are associated with vertebral fractures in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(10):4030-7.
102. Jin T. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* 2008; 51:1771-80.
103. Manolagas SC, Almeida M. Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *Mol Endocrinol* 2007; 21:2605-14.

REPORTE DE CASOS / Case Report

Síndrome de Klippel-Feil: a propósito de un caso en Ecuador

Cristian Carlos Ramírez Portilla,¹ Roberto Michael Ramírez Guamán,^{2*} Rosa Andrea Espinoza Ramírez,² Luis Damián Ponce López,³ Katherine Michelle Samaniego Vásquez³

¹ Médico genetista, Hospital General Teófilo Dávila, Machala, Ecuador. ² Médicos rurales, Ministerio de Salud Pública del Ecuador. ³ Médicos generales en funciones hospitalarias del servicio de medicina interna Hospital Teófilo Dávila, Machala, Ecuador.

Resumen

El síndrome de Klippel-Feil (KFS) es un grupo heterogéneo de malformaciones a nivel vertebral que presentan un componente genético monogénico; se caracteriza por presentar un defecto en la formación o segmentación de las vértebras cervicales, que da como resultado una apariencia fusionada. La tríada clínica consiste en un cuello corto, una línea de implantación baja del cabello y un movimiento limitado del cuello. Presentamos el caso de un paciente masculino de 17 años que manifiesta los hallazgos clínicos y radiológicos de esta anomalía.

Palabras clave: síndrome de Klippel-Feil, cuello corto, fusión cervical, implantación capilar baja, escoliosis.

Abstract

KLIPPEL-FEIL SYNDROME: ABOUT A CASE IN ECUADOR

Klippel-Feil syndrome (KFS) is a heterogeneous group of vertebral malformations that presents a monogenic genetic component, characterized by a defect in the formation or segmentation of the cervical vertebrae, which results in a fused appearance. The clinical triad consists of a short neck, a low hairline and a limited movement of the neck. We present the case of a 17 year-old male patient who presented the clinical and radiological findings of this anomaly.

Key words: Klippel-Feil syndrome, short neck, cervical fusion, low hairline, scoliosis.

Introducción

En 1912 Maurice Klippel y André Feil describieron por primera vez el trastorno en un francés de 46 años que tenía el cuello corto e inmóvil con una fusión masiva de vértebras cervicales y torácicas superiores.^{1,2} En 1986 Shaver y cols. informaron de una familia en la que 31 individuos de 5 generaciones tenían el síndrome de Klippel-Feil heredado en un patrón autosómico dominante. El probando fue una mujer de 24 años con pérdida auditiva neurosensorial unilateral desde la adolescencia, inclinación de la cabeza, escoliosis, anomalía de Sprengel leve y asimetría facial. El examen radiográfico mostró fusión C2-C3. Cinco de los 12 miembros de la familia afectados que se examinaron mostraron pérdida de audición, escoliosis con anomalía de Sprengel y asimetría facial.²

Las malformaciones se deben a una alteración en la migración del tejido mesodérmico en

el momento de la formación de los discos cervicales entre la tercera y cuarta semana de desarrollo embrionario.³ El diagnóstico puede sospecharse por la presencia de cuello corto y ancho, implantación baja de la línea de cabello posterior y reducción de la movilidad del cuello.^{2,4} Se realiza mediante radiografías a nivel de la columna cervical donde se pueden apreciar fusiones de las vértebras y otras alteraciones óseas, como discos vertebrales ausentes o hipoplásicos, pérdida de altura del cuerpo de las vértebras y raramente hemivértebra.⁵

Caso clínico

Se trata de un paciente masculino, producto de primer embarazo; al momento del nacimiento, la madre tenía 19 años. El embarazo-controlado por profesionales médicos- mostró antecedentes de infección de tracto urinario reiterados durante todo su transcurso, para lo

*E-mail: roberto_rg92@hotmail.com



cual recibió tratamiento con analgésicos, antihipertéticos y antibióticos cuyos nombres no recuerda. El nacimiento fue por parto eutócico sin complicaciones. A través del test de Capurro se estima una edad gestacional de 36 semanas; el conteo APGAR fue: 7 al minuto y 9 a los cinco minutos; peso: 2200 gramos, talla: 45 centímetros, perímetro cefálico: 31 centímetros, perímetro torácico: 29 centímetros. Fue dado de alta conjuntamente con su madre a las 48 horas de vida.

A los 8 meses de edad fue valorado por su médico pediatra por dificultad al sentarse y con presencia de desviación del cuello hacia la izquierda, motivo por el cual se le realizó radiografía dorsolumbar y se diagnosticó escoliosis congénita (Figura 1).



Figura 1. Implantación baja del cabello posterior y cuello corto.

El primer contacto con nosotros lo realizó a la edad de 17 años referido al Servicio de Genética por presentar talla baja para la edad más escoliosis congénita. Al examen físico presentaba: estatura de 1,49 cm, peso de 55 kilos, implantación baja del cabello posterior, cuello corto (véase Figura 1), dificultad a la rotación del cuello y escoliosis dorsolumbar. Se realizaron exámenes complementarios como radiografías de columna cervical, dorsal y

lumbosacra, donde se observó fusión de vértebras cervicales, primeras dorsales y escoliosis lumbar (Figura 2). Por este motivo se decidió realizar tomografía axial computarizada de columna, en la cual se puede observar: fusión atlantoaxoidea con C1, fusión de cuerpos vertebrales C5, C6 y C7 (Figura 3) y vértebras lumbares con evidencia de hemivértebras (Figura 4). La ecografía de abdomen y pelvis reveló agenesia renal izquierda.



Figura 2. Radiografía de vértebras lumbares donde se evidencia escoliosis.

Se llegó al diagnóstico de síndrome de Klippel-Feil ya que el paciente presentaba la tríada clásica de esta enfermedad. Es evaluado conjuntamente por un equipo multidisciplinario conformado por genetistas, fisiatras, neurocirujanos y traumatólogos, quienes recomiendan natación tres veces por semana en sesiones de 30 minutos, utilización de medios físicos para dolor de leve intensidad, control de función renal cada 3 meses y además utilización de analgésicos no esteroides cuando el dolor sea moderado. Actualmente, el paciente continúa con fisioterapia y analgésicos ya que el Servicio de Neurocirugía no consideró necesaria la intervención quirúrgica.

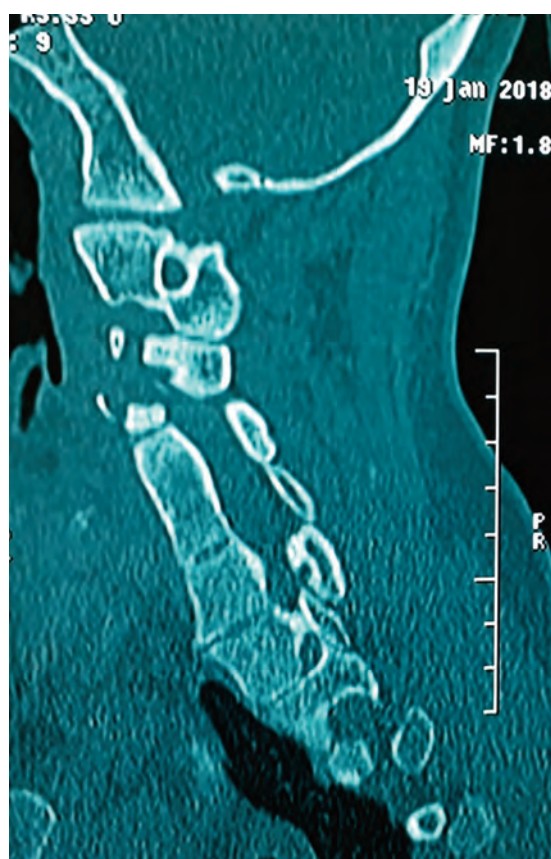


Figura 3. Tomografía de vértebras cervicales donde se evidencia fusión de cuerpos vertebrales C5 a C7.

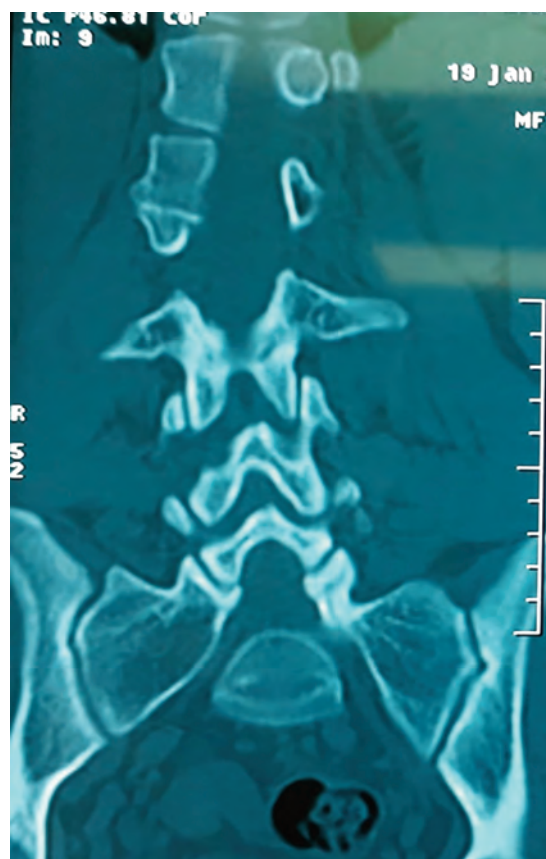


Figura 4. Tomografía de columna vertebral con presencia de hemivértebras.

Discusión

Este síndrome comprende un grupo heterogéneo de casos en donde el patrón predominante es la fusión de 2 vértebras cervicales. Su incidencia no se ha establecido, pero se cree que afecta a 1 de cada 42 000 nacimientos aproximadamente, aunque la prevalencia puede ser mayor debido a su diagnóstico erróneo.^{1,2} Presenta una tríada caracterizada por cuello corto, línea de implantación capilar posterior baja y rango limitado de movimientos del cuello.^{2,3}

La etiología no está totalmente aclarada, ya que esta entidad consta de varios defectos en la formación de segmentos cervicales. La heterogeneidad de sus manifestaciones nos orienta a alteración en distintas interacciones de genes, o incluso entre genes y ambiente. Se ha realizado la búsqueda de etiología genética de este síndrome y se ha observado que usualmente son casos con patrón de herencia heterogénea con varias deleciones descritas: la forma de fusión vertebral aislada es AR con

locus en 5q 11.2. Existen mutaciones demostradas de genes GDF3 y GDF6 relacionados con la génesis osteocartilaginosa (GDF: growth differentiation factor).^{2,4}

Las manifestaciones clínicas de estos defectos en la formación ósea suelen ser dolor cervical, radiculopatías, rango de movimientos cervicales disminuido y anomalías espinales siendo la más frecuente la escoliosis congénita.^{2,5} Otros reportes asocian además anomalías renales, malformaciones costales, sordera, malformaciones cardiovasculares, asimetría facial, asimetría escapular y lesiones medulares secundarias: inestabilidad occipitocervical o atlantoaxial como hemiparesia, tetraparesia, hiperreflexia, espasticidad, parestesias y dolor referido.^{3,6} La severidad de los síntomas depende del grado de deformidad: en los leves se diagnostica únicamente por hallazgos radiográficos incidentales y estos no tienen ninguna consecuencia para las actividades diarias, mientras que aquellos en los que la deformidad es mayor presentan síntomas incapacitantes y



se asocian a estenosis cervical y compresión medular.^{7,8}

Se ha podido clasificar en 4 diferentes tipos dependiendo del nivel en el cual se encuentre la osificación. El tipo I tiene fusión total de las vértebras cervicales hasta las dorsales superiores, el tipo II se localiza en una o dos vértebras cervicales, generalmente acompañado de fusión occipitoatlantoidea y de hemivértebras. El tipo III es la fusión cervical similar al trastorno a nivel dorsolumbar y el IV, fusión cervical, torácica superior, dorsal inferior o lumbar.^{2,4}

Sobre la base de todo lo descripto, podemos incluir a nuestro paciente en este síndrome ya que presenta la tríada clásica, malformaciones asociadas como la escoliosis congénita, agenesia renal, y a partir de la evidencia radiográfica de la fusión vertebral cervical y lumbar correspondería al tipo IV.

El diagnóstico de este síndrome se sospecha mediante la anamnesis y la valoración clínica del paciente y se confirma posteriormente mediante radiografía simple de columna cervical dorsal y lumbosacra. La resonancia magnética⁷ permite una mejor visualización de las osificaciones y además es útil para descartar la asociación con otras anomalías congénitas.^{2,6} El tratamiento depende del grado de severidad del defecto: en aquellos en quienes no hay dolor cervical ni signos de compresión neurológica (como en nuestro caso), el tratamiento consiste únicamente en la administración de analgésicos y fisioterapia.^{2,3} En aquellos con síntomas progresivos y defecto cervical mayor,

la cirugía es una opción debido a que tienen mayor riesgo de lesiones considerables (traumatismo espinal) con pronóstico poco favorable; entre estas opciones se pueden mencionar las artrodesis occipitocervical, atlantoaxial, subaxial y vertebral (dependiendo del nivel de fusión).⁸

Aspectos bioéticos

El paciente dio el visto bueno a los autores de este trabajo para que se compartiera su descripción en medios científicos, con la condición de que se protegieran sus datos de identidad y se respetara su integridad.

Conclusiones

El síndrome de Klippel-Feil es un trastorno poco frecuente que comprende una serie de malformaciones congénitas además de las clásicas características que dificultan muchas veces su diagnóstico a temprana edad. El diagnóstico es clínico y radiográfico y su manejo comprende seguimiento multidisciplinario (genetistas, traumatólogos, neurocirujanos, neurólogos, fisioterapeutas, etc.) con el objetivo de prevenir complicaciones neurológicas y orgánicas a largo plazo. Según la severidad del cuadro puede requerir desde fisioterapia y analgésicos hasta reparación quirúrgica del segmento vertebral fusionado.

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

Recibido: mayo de 2018

Aceptado: noviembre de 2018

Referencias

1. Kim JB, Park SW, Lee YS, Nam TK, Park YS, Kim YB. Two Cases of Klippel-Feil Syndrome with Cervical Myelopathy Successfully Treated by Simple Decompression without Fixation. *Korean J Spine* 2015;12(3):225-9.
2. Tracy MR, Dormans JP, Kusumi K. Klippel-Feil syndrome: clinical features and current understanding of etiology. *Clin Orthop* 2004; 424:183-90.
3. Samartzis D, Kalluri P, Herman J, Lubicky JP, Shen FH. "Clinical triad" findings in pediatric Klippel-Feil patients. *Scoliosis Spinal Disord* 2016;11:15.
4. Samartzis D, Kalluri P, Herman J, Lubicky JP, Shen FH. Cervical scoliosis in the Klippel-Feil patient. *Spine* 2011; 36(23):E1501-1508.
5. Xue X, Shen J, Zhang J, et al. Klippel-Feil syndrome in congenital scoliosis. *Spine* 2014; 39(23):E1353-1358.
6. Gruber J, Saleh A, Bakhsh W, Rubery PT, Mesfin A. The Prevalence of Klippel-Feil Syndrome: A Computed Tomography-Based Analysis of 2,917 Patients. *Spine Deform* 2018; 6(4):448-53.
7. Agarwal AK, Goel M, Bajpai J, Shukla S, Sachdeva N. Klippel Feil Syndrome: A Rare Case Report. *J Orthop Case Rep* 2014; 4(3):53-5.
8. Samartzis D, Lubicky JP, Herman J, Kalluri P, Shen FH. Symptomatic cervical disc herniation in a pediatric Klippel-Feil patient: the risk of neural injury associated with extensive congenitally fused vertebrae and a hypermobile segment. *Spine* 2006 ; 31(11):E335-338.

|| NOVEDADES ||

REUNIONES CIENTÍFICAS 2019

■ **International Conference on Fragility & Sarcopenia Research (ICFSR)**

20-22 Febrero - Miami Beach, USA

■ **Rare 2019- 2 nd International Congress on Advanced Treatments in Rare Diseases**

4-5 Marzo - Viena, Austria

■ **25th Annual International Society for Clinical Densitometry (ISCD)**

- 19-23 Marzo - Kuala Lumpu, Malasia

■ **The 19th World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO)**

4-7 Abril - Paris, Francia

■ **European Calcified Tissue Society (ECTS)**

11-14 Mayo - Budapest, Hungría

■ **Annual Meeting American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR).**

20-23 Septiembre - Orlando, USA



ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGIA

Vol. 14, N° 1, enero / abril 2018

ÍNDICE

DESPEDIDA Y AGRADECIMIENTO A LA DRA. LUISA PLANTALECH

María Josefina Pozzo

7

ACERCA DE NUESTRA SOCIEDAD

Susana Zeni

9

ARTÍCULOS ORIGINALES / *Originals*

Estudio comparativo de la absorción neta de calcio de dos formulaciones distintas de carbonato de calcio en mujeres posmenopáusicas

Comparative study of net calcium absorption of two different pharmaceutical formulations of calcium carbonate in postmenopausal women

Silvina Mastaglia, Dana Watson, Julia Somoza, Rosana Gianotti, Graciela Brito, Beatriz Oliveri

10

ACTUALIZACIONES / *Reviews*

Miopatía por estatinas y vitamina D

Statin-related myopathy and vitamin D

José Luis Mansur

22

Statins and bone health: a mini review

Estatinas y salud ósea: una minirevisión

Leslie R. Morse, Jennifer Coker, Ricardo A. Battaglino

31

REPORTE DE CASOS / *Case report*

Caso clínico: Hipofosfatasia de la niñez. Seguimiento clínico

Clinical case: Childhood hypophosphatasia. Clinical Follow-Up

Mariana Seijo, Beatriz Oliver

36

SECCIÓN CULTURAL / *Cultural Section*

El extraño esqueleto de ATA

Strange Ata skeleton

Ariel Sánchez

44

CARTAS AL COMITÉ DE REDACCIÓN / Letter to the Editor

Los antidepresivos no causan osteopenia

Antidepressants do not cause osteopenia

Ariel Sánchez

45

NOVEDADES / News

46

INSTRUCCIONES PARA AUTORES / Authors Guidelines

47



ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGIA

Vol. 14, N° 2, mayo / agosto - suplemento octubre 2018

ÍNDICE

COMITÉ EVALUADOR	59
INVITADOS EXTRANJEROS Y NACIONALES	60
AGRADECIMIENTOS y AUSPICIOS	61
PALABRAS DE BIENVENIDA: 2.º CONGRESO ARGENTINO DE OSTEOLÓGIA Dra. Susana Zeni y Dra. Rosa María Scuteri	62
PROGRAMA CIENTÍFICO	64
COMUNICACIONES LIBRES	73
ÍNDICE DE AUTORES	121

EDITORIAL / Editorial

Miembros de AAOMM Distinguidos por la American Society for Bone and Mineral Research <i>AAOMM'S members distinguished by the American Society for Bone and Mineral Research</i> Comité Editorial, Actualizaciones en Osteología	123
---	-----

ACTUALIZACIONES / Reviews

De la osteología a la osteomiología: Tres décadas de aportes originales continuos al análisis biomecánico osteomuscular <i>From osteology to osteo-myology: three decades of continuous, original contributions to musculoskeletal biomechanical analysis</i> José Luis Ferretti, Gustavo Roberto Cointy, Ricardo Francisco Capozza	125
---	-----

REPORTE DE CASOS / Case report

Distrofia ósea esclerosante mixta <i>Mixed-sclerosing-bone-dystrophy</i> Silvina Mastaglia	148
--	-----

SECCIÓN CULTURA / Cultural section

Una momia devela que en el antiguo Egipto ya se usaba cirugía "moderna" <i>A mummy reveals that in the ancient Egypt modern surgery was already in use</i> Ariel Sánchez	151
--	-----

INSTRUCCIONES PARA AUTORES / Authors Guidelines	152
---	-----

ACTUALIZACIONES EN OSTEOLOGÍA

Vol. 14, N° 3, septiembre / diciembre 2018

ÍNDICE

EDITORIAL / Editorial

DNI óseo: cuando los huesos hablan

Bone ID: when the bones speak

María Belén Rauschemberger

165

ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

Zoledronic acid effect on bone of growing rats.

Efecto del ácido Zoledrónico en el hueso de ratas en crecimiento.

Patricia M. Lupión, Lucas R. Brun, Verónica E. Di Loreto.

168

Evidencia original directa (Dinamométrico-Tomográfica) de la influencia sitio-específica de la musculatura sobre la estructura ósea.

Hacia una concepción más amplia del Mecanostato.

Original Dynamometric and Tomographic evidence of site-specific muscle effects on bone structure.

Towards a wider scope on the bone Mechanostat concept.

Laura M. Nocciolino, Sergio H. Lüscher, Nicolás Pilot, Leandro Pisani, Leandro Mackler, Gustavo R. Cointry, Alex Ireland, Jörn Rittweger, José L. Ferretti, Ricardo F. Capozza

178

Las diferencias antropométricas entre sexos de la columna lumbar, medidas por DXA, no afectan a todas las vértebras en forma uniforme: probable implicancia en la incidencia de fracturas

Gender anthropometric differences of the lumbar spine, measured by DXA, do not involve all vertebrae uniformly: probable implication in the incidence of fractures.

Haraldo Claus-Hermberg, María Pía Lozano, Magdalena Rey, Silvana Boffa, María Josefina Pozzo

184



ACTUALIZACIONES / *Reviews*

- Normal physiological functions in two animal species with highly different vitamin D status compared to that of humans**
Funciones fisiológicas normales en dos especies animales con estatus de vitamina D muy diferentes del actual en seres humanos.
Rodolfo C. Puche 190

- Mecanismos involucrados en la fragilidad ósea en Diabetes Mellitus.**
Mechanisms involved in the bone fragility in diabetes Mellitus.
Luis Agustín Ramírez Stieben, María Lorena Brance 205

REPORTE DE CASOS / *Case Report*

- Síndrome de Klippel-Feil: a propósito de un caso en Ecuador.**
Klippel-Feil syndrome: about a case in Ecuador.
Cristian Carlos Ramírez Portilla, Roberto Michael Ramírez Guamán, Rosa Andrea Espinoza Ramírez, Luis Damián Ponce López, Katherine Michelle Samaniego Vásquez 219

NOVEDADES 223

ÍNDICE ACUMULADO / *Cumulative Index* 224

INSTRUCCIONES PARA AUTORES / *Authors guidelines* 229

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

El envío de un artículo a **Actualizaciones en Osteología** es considerado como una declaración tácita de que no ha sido enviado a evaluar al mismo tiempo o aceptado para su publicación en otro medio. En las directrices para la preparación de manuscritos, **Actualizaciones en Osteología** sigue los requisitos del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE) en la versión más reciente disponible en <http://www.icmje.org>.

Los manuscritos deben ser preparados usando Word, hoja A4 con márgenes de al menos 20 mm, espacio simple, en tipografía Arial 10 u otra de tamaño similar. El manuscrito **-en español o en inglés-** debe enviarse por correo electrónico a actualizaciones@osteologia.org.ar. Las páginas deben estar numeradas consecutivamente empezando por la que incluye el título. Abreviaturas y símbolos: sólo se deberán utilizar abreviaturas estándares, evitando su uso en el título y en el resumen.

*Los manuscritos que no se ajusten a los requisitos de **Actualizaciones en Osteología**, incluidos su organización, estructura y figuras serán devueltos a los autores sin revisión.*

La **primer página** debe contener: (a) Título del trabajo en español e inglés, (b) título abreviado para el encabezado de página, (c) nombre completo de los autores **-subrayado el apellido-**, (d) nombre de las instituciones en la cual se desempeña cada autor, (e) dirección de correo electrónico de un autor, (f) sección de la revista a la que corresponde el artículo y (g) conflicto de intereses.

Las secciones de la revista son: **Artículos Originales, Actualizaciones, Comunicaciones Breves, Casuísticas, Editoriales, Cartas al Editor.**

Los **Artículos Originales** deben ser divididos en Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión. Los títulos deben estar escritos en letra negrita. La extensión máxima del texto recomendado es de 5.000 palabras y hasta 5 figuras y 5 tablas. Se sugiere no incluir más de 50 referencias. Las **Actualizaciones** tienen una extensión máxima recomendada de 6.000 palabras y hasta 5 figuras y 5 tablas. Se sugiere no incluir más de 60 referencias. Para las **Comunicaciones Breves** y **Casuísticas** se sugiere un máximo de 3.000 palabras de extensión y hasta 4 figuras y 4 tablas. Se sugiere no incluir más de 30 referencias. La **Casuística** deben contener las siguientes secciones: Introducción, Caso Clínico y Discusión.

Para cualquier tipo de artículo mencionado anteriormente, se debe incluir un **resumen en español y en inglés** sin incluir tablas o figuras, cada uno con una extensión máxima de 250 palabras. Además, se requieren de 3 a 6 palabras clave en inglés y español.

AUTHOR GUIDELINES

Submission of a manuscript to "**Actualizaciones en Osteología**" is regarded as a tacit declaration that has not been submitted at the same time or accepted for publication elsewhere. In the guidelines for the preparation of manuscripts, "**Actualizaciones en Osteología**" follows the requirements of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) in the most recent version available in <http://www.icmje.org>.

Manuscripts should be prepared using Word on A4 paper with margins of at least 20 mm, simple spacing, in letter font type Arial 10, or other of a similar size. The manuscript **-in Spanish or in English-** should be submitted by email to actualizaciones@osteologia.org.ar. Pages must be consecutively numbered starting with the title page. Units of measurement: metric units should be used, with decimal points. Abbreviations and Symbols: only standard abbreviations should be used, avoiding them in the title and abstract.

*Manuscripts that do not conform to "**Actualizaciones en Osteología**" requirements, including requirements for manuscript organization, format, and figure will be returned to the authors without review.*

The **first page** must contain: (a) title of the work in Spanish and English, (b) abbreviated title for running head, (c) complete name of the authors **-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.

The journal sections include: **Original Articles, Reviews, Brief Communications, Case Reports, Editorials, Letters to the Editor.**

Original Articles should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. Titles must be written in bold type. The recommended maximum text extension is 5,000 words and up to 5 figures and 5 tables will be accepted. It is suggested not to include more than 50 references. **Reviews** have a recommended maximum text extension of 6,000 words and up to 5 figures and 5 tables will be accepted. It is suggested not to include more than 60 references. **Brief Communications** and **Case Reports** should 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. **Case Reports** should be divided into Introduction, Clinical Case and Discussion.

For all type of article described previously, a **250-word Abstract in Spanish and in English**, not including tables or figures, must also be included. Also, 3 to 6 key words in English and Spanish are required. Authors who are not fluent in Spanish and,



En los **Artículos Originales** y **Casuísticas** detallar la solicitud de consentimiento informado. Además se solicita se indiquen las normas y directrices éticas y los métodos estadísticos utilizados (Originales).

Para las **Cartas al editor** y **Editoriales** se sugiere un máximo de 1.000 palabras y se admitirán para las Cartas al Editor hasta 2 figuras o tablas. Se sugiere no incluir más de 10 referencias. **Agradecimientos:** la ayuda técnica, el apoyo financiero y las contribuciones que no justifican la autoría se pueden enumerar en este ítem. **Conflicto de intereses:** los autores deben revelar cualquier relación financiera que podría conducir a un conflicto de intereses en relación con el artículo publicado.

Las **referencias** deben ser numeradas consecutivamente. Usar números en superíndices para indicar las referencias en el texto. Para las referencias seguir los siguientes ejemplos:

1. Revistas: Todos los autores serán incluidos si son seis o menos; si hay más de seis, el tercero será seguido de "et al". Los títulos de las revistas deben abreviarse de acuerdo con el estilo usado en el Index Medicus (disponible en <http://www.nlm.nih.gov>). Los nombres de las revistas deben ir en itálica. Ejemplo: T Diab, Wang J, S Reinwald, Guldborg RE, Burr DB. Efectos de la combinación de tratamiento de raloxifeno y alendronato en las propiedades biomecánicas de hueso vertebral. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 270-6.
2. Capítulo de libro: Rigalli A. Eutanasia. En: Rigalli A, Di Loreto VE (eds). *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2009, p. 31-2.
3. Sitios Web: Organización Mundial de la Salud (OMS). The Stop TB Web Alert. (2000, Dec 6) <http://www.stoptb.org/updates/index.html>

Las **Tablas** con sus respectivos títulos explicativos se presentarán al final del manuscrito numeradas en números arábigos. Deben ser indispensables y comprensibles por sí mismas. No se utilizarán líneas verticales entre las columnas y sólo se emplearán líneas horizontales en los siguientes casos: parte superior de la tabla, parte inferior del encabezado de la tabla y final de la tabla. En el texto manuscrito se indicará la ubicación aproximada con la leyenda "Insertar Tabla aquí".

Las **Figuras** deben ser presentadas separadamente del texto. El manuscrito sólo incluirá una leyenda explicativa. El formato requerido de imágenes es ".jpg o .tif" en calidad no menor de 300 dpi de resolución. No se aceptarán imágenes en archivos de *Word* ni *Power Point*. En las micrografías se debe indicar la escala o el aumento que se usó. Tener en cuenta que en la versión *on line* la imagen se mostrará a color, mientras que en la versión impresa se observará en escala de grises. En el manuscrito se indicará la ubicación aproximada con la leyenda "Insertar Figura aquí".

therefore, are not able to include the abstract and keywords in this language, can submit the manuscript without them.

In **Original papers** and **Case Reports** record informed consent by patients. Ethical standards and guidelines followed will be indicated and statistical methods will be described (in Originals).

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

Acknowledgments: technical assistance, financial support, and contributions that do not justify authorship may be listed. **Conflict of interest:** authors must disclose any financial relationship that could lead to a conflict of interest in relation to the published article.

References should be numbered consecutively. Use superscript numerals for references in the text. References should be mention according to the following examples:

1. Journals: All authors will be included if they are six or less; if more than six, the third one will be followed by "et al". The titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus (also available in <http://www.nlm.nih.gov>). The names of journals should be in italics. Example: Diab T, Wang J, Reinwald S, Guldborg RE, Burr DB. Effects of the combination treatment of raloxifene and alendronate on the biomechanical properties of vertebral bone. *J Bone Miner Res* 2011; 26:270-6.
2. Books chapter: Rigalli A. Euthanasia. In: Rigalli A, Di Loreto VE (eds). *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Boca Raton, Florida: CRC press, 2009, p. 31-2.
3. Web sites: World Health Organization (WHO). The Stop TB Web Alert. (2000, Dec 6) <http://www.stoptb.org/updates/index.html>

Tables and its legends will be presented at the end of the manuscript numbered in Arabic numerals. They should be indispensable and comprehensible by themselves. 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 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 here".

Todos los artículos publicados en **Actualizaciones en Osteología** están sujetos a revisión por pares. La revisión se hace por un editor y al menos dos revisores con amplia experiencia en el tema. La identidad de los autores y revisores se mantiene 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 de **Actualizaciones en Osteología**. El tiempo de evaluación dura entre 30 y 60 días. El autor será notificado por correo electrónico de la aceptación (con o sin correcciones) o rechazo del manuscrito. La decisión es definitiva sin posibilidad de apelar. El Comité Editorial se reserva el derecho de introducir, con conocimiento de los autores, todos los cambios de redacción necesarios de acuerdo a reglas gramaticales y de diseño. Los trabajos aceptados serán devueltos a los autores con las modificaciones solicitadas y se les concederá un período no mayor de 30 días para el envío de la versión corregida. Después de la aceptación y el diseño del artículo, los autores dispondrán de 72 horas para revisar la prueba de galera.

POLÍTICAS EDITORIALES

Actualizaciones en Osteología es una revista de Acceso Abierto.

Costo de publicación: La publicación de artículos no tiene costo con excepción de las imágenes a color en caso de que esto sea requerido por los autores.

Derechos de autor. Actualizaciones en Osteología es la publicación oficial de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM) que posee los derechos de autor de todo el material publicado en dicha revista.

Responsabilidades éticas. Cuando se describan experiencias en seres humanos, los autores deberán indicar si los procedimientos realizados siguieron las normas éticas de un comité institucional o regional en la experimentación con seres humanos, y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki. Los autores también enviarán el modelo de consentimiento informado utilizado para el estudio. Cuando se describen experimentos con animales, se debe indicar si se siguieron los lineamientos de un Comité o Consejo sobre el cuidado y uso de animales de experimentación.

Duplicación/publicación redundante. Los autores son responsables de asegurar que el manuscrito -incluyendo todos los datos, figuras y tablas- no ha sido publicado anteriormente. Además, es responsabilidad de los autores asegurar que el manuscrito no ha sido, ni será, sometido a evaluación por otra revista mientras está bajo revisión por Actualizaciones en Osteología. Los artículos originales que proporcionan nuevos datos de los estudios que han sido objeto de publicaciones anteriores deben evitar la superposición de los mismos y los autores deberán enviar información sobre todas las publicaciones previas al Editor responsable.

All articles published in **Actualizaciones en Osteología** are subject to peer review. The review is made by an Editor and at least two reviewers with extensive experience in the particular 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.

EDITORIAL POLICIES

Actualizaciones en Osteología is an Open Access Journal.

Page Fees: No charge for publication is required except for color figures if requested by authors.

Copyright. Actualizaciones en Osteología is the official journal of the Argentinean Association of Osteology and Mineral Metabolism (AAOMM), which holds copyright to all material published in the Journal.

Ethical responsibilities. When experiments performed in humans are described, authors must 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. Authors must also send the informed consent model used for the study. When animal experiments are described, it should be indicated whether guidelines of an institution or research council on care and use of laboratory animals were followed.

Duplicate/Redundant Publication. The corresponding author is responsible for ensuring that the manuscript -including all data, figures, tables, and supplementary materials- has not been previously reported or published. Further, it is the responsibility of the corresponding author to ensure that the manuscript has not been, and will not be, submitted to another journal while under review by Actualizaciones en Osteología. Original Articles providing new data from studies that have been the subject of previous publications must avoid data overlap and authors must provide information on all previous publications to the Editor-in-Chief.