

COMUNICACIONES ORALES:

SESIÓN 2

7. Caracterización de una nueva mutación en el exón 6 del gen SQSTM1 en pacientes con enfermedad ósea de Paget

Usategui Martín R^{1,3}, Calero Paniagua I^{2,3}, Carranco Medina T^{2,3}, Quesada Moreno A^{2,3}, Pino Montes J del P^{1,3}, González Sarmiento R^{1,3}

1 Unidad de Medicina Molecular, Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca; 2 Servicio de Reumatología, Hospital Clínico Universitario de Salamanca; 3 Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL)

Introducción: El gen del sequestosoma1 (SQSTM1) se traduce en una proteína de 62kDa a la cual se la denomina proteína p62. La proteína p62 induce la proliferación celular a través de la activación de la ruta NF-κB, proceso fundamental en la maduración de los osteoclastos y, por tanto, en la resorción y remodelado óseos. La enfermedad ósea de Paget (EOP) es un trastorno focal del hueso que afecta de forma segmentaria al esqueleto. La alteración principal reside en los osteoclastos que aumenta en número, tamaño y actividad. Como resultado, se produce un hueso de estructura abigarrada y anárquica que altera las propiedades mecánicas.

Se ha descrito una fuerte tendencia a la agregación familiar (15-40%). Su herencia tiene un patrón autosómico dominante con alta penetrancia y un mecanismo multifactorial que no puede justificarse por una sola mutación genética. El gen candidato más plausible es el gen SQSTM1.

Objetivo: Estudio molecular del gen Sqstm1 en pacientes con enfermedad ósea de paget familiar.

Material y métodos: Extracción de DNA de sangre periférica. Análisis molecular del gen sqstm1 mediante PCR de exones 6, 7 y 8. Secuenciación automática en ABI 3000. Análisis *In silico* mediante los programas bioinformáticos sift, polyphen y pmut. Estudio poblacional mediante dHPLC (Denaturing High Pressure Liquid Chromatography).

Resultados y discusión: Se estudiaron 21 familias, todas ellas con pacientes con diagnóstico probado de EOP. Se realizó el estudio de los exones 6, 7 y 8 del gen SQSTM1 en el DNA genómico del paciente mediante PCR y posterior secuenciación automática con Big Dye Terminators en el analizador genético ABI 3000. Nuestros resultados muestran que 8 de las 21 familias estudiadas (38.09%) eran portadoras de una mutación en el gen SQSTM1. En tres de las ocho familias aparece la mutación p.E273D, no descrita en la bibliografía hasta el momento. La mutación p.E273D está localizada en el exón 6 del gen SQSTM1 y en el primer dominio PEST de la proteína p62.

Como los estudios “*in silico*” la clasifican como mutación patogénica, realizamos un estudio poblacional en 100 alelos de individuos sanos mediante dHPLC (Denaturing High Pressure Liquid Chromatography). En ninguno de los controles se encontró dicha mutación.

Conclusiones: En el gen SQSTM1 se han descrito 20 mutaciones exónicas localizadas en los exones 6, 7 y 8 relacionadas con la aparición de EOP en los pacientes portadores. Nosotros aportamos una nueva mutación no descrita hasta ahora, p.E273D.

8. Importancia de FGF23 y PTH en la regulación de la vía de Wnt y sus inhibidores

Carrillo López N, Naves Díaz M, Panizo García S, Rodríguez Rebollar A, Cannata Andía JB

Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto Reina Sofía de Investigación, REDinREN del ISCIII, Universidad de Oviedo (Asturias)

Introducción: En el hiperparatiroidismo secundario (HPTs) hay incremento del remodelado óseo y reducción de formación ósea. En un estudio previo con ratas con HPTs observamos que el incremento de PTH y FGF23 se asoció con aumento significativo de la expresión de genes relacionados con recambio óseo y con inhibición de la vía de Wnt, cambios compatibles con lo observado en pacientes.

Objetivo: El objetivo del presente trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto de PTH y FGF23 sobre la expresión de genes y proteínas relacionados con el recambio óseo y la vía de Wnt.

Material y métodos: Se cultivaron osteoblastos UMR106 con 10-7 M de PTH 1-34 y/o FGF23 (1000 ng/mL) y Klotho (5 ó 50

ng/mL). Tras 48 horas, se extrajo ARN y proteínas para su análisis.

Resultados: El cultivo conjunto con PTH y FGF23 aumentó significativamente la expresión de genes relacionados con el recambio óseo (Osteocalcina, Runx2 y Catepsina K) así como de los inhibidores de la vía de Wnt (Sfrp1, Sfrp4 y Dkk1). Ese aumento se observó también a nivel de proteína con un incremento de la relación pβ-catenina/β-catenina. El cultivo independiente con varias concentraciones de FGF23 y de Klotho mostró resultados similares. Por el contrario, el cultivo con PTH mostró resultados similares en relación con el recambio óseo (aumentó la expresión génica de Osteocalcina, Runx2 y Catepsina K), pero opuestos en relación a los inhibidores de la vía de Wnt, observando una reducción significativa de ARN y proteína que guardó relación con el descenso significativo de pβ-catenina/β-catenina.

Conclusiones: Nuestros resultados indican que la inactivación de la vía de Wnt y la sobreexpresión de Sfrp1 y Dkk1 observada en el sHPT, se debería al incremento de FGF23 y no de PTH. Estos resultados sugieren otro nuevo papel del FGF23 involucrándolo en procesos de regulación de la vía Wnt.

9. La chaperona de histonas, HIRA, regula la masa ósea

Román-García P, Sharan K, Raphel L, Mouse Genetics Project, Yadav VK
Systems Biology of Bone, Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge (United Kingdom)

Introducción: Las delecciones en heterocigosis de la región cromosómica 22q11.2 (comúnmente conocidas como síndrome de DiGeorge) afectan a aproximadamente uno de cada 3.000 nacimientos. Se pierde una región de al menos 20 genes y se han asociado muchas características clínicas con esta delección; sin embargo, el gen o genes responsables de los efectos sobre el metabolismo óseo son aún desconocidos.

Objetivo: El objetivo de este estudio es identificar el gen o genes responsables de las perturbaciones en el metabolismo óseo en el síndrome de DiGeorge.

Material y métodos: Métodos: Se utilizó siRNA para causar el silenciamiento de los genes implicados en la delección 22q11 y se midió el efecto de dicho silenciamiento en la proliferación y diferenciación en células osteoblásticas OB6. La expresión génica se midió mediante RT-qPCR. La proliferación se midió como la síntesis de ADN (incorporación de BrdU) y la diferenciación como actividad de la fosfatasa alcalina. Los niveles de Osteocalcina y CTx séricos se midieron mediante ELISA en suero de ratón. El desarrollo óseo en etapas embrionarias se evaluó usando preparaciones esqueléticas “*whole mount*” a los 18,5 días de desarrollo embrionario. La histología del hueso se realizó en

ratones de 8 semanas de edad, utilizando secciones descalcificadas e inclusión en metil-metacrilato. El sistema de análisis de Osteomeasure se utilizó para histomorfometría dinámica.

Resultados: Los 20 genes implicados en la delección 22q11 fueron silenciados con éxito en células osteoblásticas OB6. De esos 20 genes silenciados, sólo se encontró que el silenciamiento de Hira, un gen que codifica para una chaperona de histonas con el mismo nombre, mostró un efecto negativo tanto en la proliferación de osteoblastos (-25,5%) como en la diferenciación (-30,2%) en comparación con células control. Se encontró que los ratones homocigotos para HIRA eran letales durante el desarrollo embrionario, pero no se detectó ningún defecto en la formación de hueso durante dicho desarrollo. Ratones heterocigotos de 8 semanas mostraron una masa ósea significativamente baja comparados con sus controles *wildtype* de la misma camada: 34% menos de volumen de hueso/volumen total, con menor número de osteoblastos. La osteocalcina sérica era significativamente inferior, pero sin cambios en CTx en suero, lo que confirma una formación ósea defectuosa. Los osteoblastos primarios de calvaria proveniente de ratones heterocigotos mostraron una disminución significativa en la proliferación, diferenciación y mineralización en comparación con los osteoblastos de WT, lo que sugiere un efecto específico de HIRA en los osteoblastos.

Conclusiones: Es este estudio sugiere que HIRA, una chaperona de histonas, tiene un papel importante en las alteraciones del metabolismo óseo en el contexto del síndrome de DiGeorge de una manera específica en el tipo celular osteoblastico.

10. Asociación de WNT16 y BCL9 con el fenotipo de la coxartrosis

García-Ibarbia C¹, Neila S¹, Arozamena J², Alonso MA³, Pérez-Núñez MI³, Zarrabeitia MT⁴, Riancho JA¹

1 Departamento Medicina Interna, Hospital Marqués de Valdecilla, Santander (Cantabria); 2 IFIMAV, Santander (Cantabria); 3 Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Hospital Marqués de Valdecilla, Santander (Cantabria); 4 Universidad de Cantabria

Introducción: En las articulaciones artrósicas existe una destrucción del cartílago articular y una respuesta del hueso subcondral a esta lesión. En función de esta respuesta ósea, se ha clasificado la artrosis en hipertrófica o atrófica, según existan o no grandes osteofitos. Los mecanismos patogénicos que determinan la evolución hacia cada uno de estos tipos de artrosis son desconocidos.

Objetivo: Dado el papel de la vía Wnt en la homeostasis ósea, nos planteamos analizar si los polimorfismos de esta vía Wnt están asociados con el patrón radiológico de la coxartrosis.

Material y métodos: Se estudiaron 236 pacientes con coxartrosis grave que iban a ser sometidos a artroplastia. Se clasificaron las lesiones como atróficas o hipertróficas siguiendo los criterios de Kellgren Lawrence. Se aisló ADN de sangre periférica y se analizaron 72 SNPs de los genes WNT1, WNT10A, WNT16, FZD5, DVL2, TCF7L1, BCL9, SFRP1 y SFRP4.

Resultados: Al comparar los casos con artrosis atrófica e hiper-

trófica, encontramos diferencias significativas en las frecuencias genotípicas de los SNPs de WNT16 rs2908004 ($P=0,0412$) y rs2707466 ($p=0,0163$). En este último caso existía una interacción significativa con el sexo ($p=0,02$) y en el análisis estratificado la relación se mantenía sólo en hombres (OR 3,5; $P=0,0004$). En BCL9 fueron los SNPs rs10900382 ($p=0,0079$), rs2353525 ($p=0,0075$) y rs3737843 ($p=0,0062$) los que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas formas de artrosis. Este último SNP mostraba una interacción significativa con el sexo ($p=0,0004$) y al estratificar la asociación únicamente se mantenía en las mujeres (OR 4,2; $p=0,0001$).

Conclusiones: Algunos polimorfismos de los genes WNT16 y BCL9 pueden contribuir a determinar la respuesta ósea periarticular y por tanto, la evolución hacia formas atróficas o hipertróficas de la artrosis de cadera.

Discusión: Últimamente varios estudios han encontrado asociación entre diferentes alelos del gen WNT16 y la densidad mineral ósea en muñeca, cadera y columna lumbar. Recientemente, nuestro grupo ha encontrado asociación entre los SNPs rs2908004 y rs270746 de WNT16 y la masa ósea y su distribución espacial en la cadera. Cabe pensar que ello pudiera contribuir a la diferente respuesta del hueso a la lesión del cartílago en la coxartrosis. En estudios previos, hemos observado que algunos polimorfismos del gen BCL9 se relacionan con el riesgo de artrosis. Los resultados actuales apoyan esa relación.

11. Denosumab: un tratamiento innovador y eficaz para el granuloma reparativo mandibular de células gigantes

Quesada Gómez JM, Dean Ferrer A, Alamillo F, Ruiz Masera JJ, Navarro Valverde C, Bravo E, Seoane C

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía, RETICEF, Córdoba

Introducción: El granuloma reparativo de células gigantes (GRCG) es una lesión expansiva y destructiva de la mandíbula, positivo para los marcadores de osteoclastos, que afecta a niños y adultos jóvenes, con predilección femenina lesiones de rápido crecimiento, a pesar de su apariencia histológica inocente, tiene un comportamiento agresivo, dramático, imitando una lesión maligna. El tratamiento convencional consiste en la enucleación quirúrgica y curetaje, con una tasa de recurrencia del 15-20%. El tratamiento quirúrgico es agresivo, precisando incluso resección mandibular "en bloque". El tratamiento médico (inyecciones intralesionales de esteroides, subcutánea (sc) de calcitonina, o interferón alfa) tiene una eficacia limitada. Contrarrestar la activación de los osteoclastos en GRCG para inhibir el posible papel fisiopatológico de RANKL podría ser una herramienta terapéutica. El denosumab es un anticuerpo monoclonal totalmente humano que se une e inhibe RANKL, evitando la activación de la vía RANK, que

ha demostrado su potencial terapéutico y seguridad además de en osteoporosis en el tratamiento del tumor de células gigantes del hueso.

Objetivo: Describir el uso terapéutico de denosumab (Prolia®) en dos pacientes jóvenes con GRCG recurrente de la mandíbula (20 y 21 años).

Material y métodos: Despues del fracaso de la resección del GRCG e inyecciones de esteroides intra-lesionales. Uso compasivo de denosumab fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Reina Sofía, y administrado en una dosis de 60 mg sc cada tres meses y 1.000 mg de calcio y 1.000 UI de vitamina D todos los días.

Resultados: Poco después de iniciar el tratamiento, ambos pacientes se recuperaron del dolor y la tumefacción mandibular desapareció. Despues de un año de tratamiento sin efectos secundarios, tanto la ortopantomografía y la tomografía computarizada mostraron regresión la regresión completa del tumor, con recalcificación adecuada en ambos pacientes. La perforación de cortical mandibular desapareció y fue totalmente cubierta por hueso nuevo.

Conclusiones: El denosumab podría representar una opción de tratamiento médico para pacientes con GRCG evitando la destrucción y dramática desfiguración de la mandíbula, incluso sin necesidad de cirugía.

12. Efectos de PTH(1-84) frente a ranelato de estroncio en la masa y arquitectura femoral y vertebral en un modelo experimental de osteoporosis masculina

Guedé D¹, Permuy M², Martín-Fernández M³, López-Peña M², Muñoz F², Piedra Gordo C de la⁴, González-Cantalapiedra A², Caeiro JR⁴

1 Trabeculae, S.L., Ourense; 2 Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad de Santiago de Compostela (Lugo); 3 Bioquímica Investigación, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Madrid; 4 Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (A Coruña)

Introducción: Aunque el ranelato de estroncio (SrR) y la PTH(1-84) se han mostrado eficaces en el tratamiento de osteoporosis (OP) del varón, sus efectos sobre la microarquitectura ósea no han sido estudiados en detalle.

Objetivos: Evaluar comparativamente la acción sobre la arquitectura ósea lumbar y femoral de distintas dosis de PTH(1-84) y SrR en un modelo experimental de OP masculina.

Material y métodos: Se dividieron 60 ratas Sprague-Dawley macho de 6 meses en 6 grupos: SHAM (intervención simulada); OQX (orquidectomizadas); PTH50 (OQX tratados con PTH 50 µg/kg/día VO); PTH10 (OQX con PTH 10 µg/kg/día VO); SrR600 (OQX con ranelato 600 mg/kg/día SC); y SrR250 (OQX con ranelato 250 mg/kg/día SC). Los tratamientos comenzaron a los 6 meses de la cirugía y duraron 3 meses. Se extrajeron el fémur derecho y la vértebra L5 para su análisis estructural y de densidad mineral ósea (DMO) con micro-CT.

Resultados: El hueso trabecular muestra un claro deterioro en el

grupo OQX con respecto al SHAM, tanto en fémur como en vértebra, que se frena parcialmente con la dosis baja de PTH(1-84) y de manera mucho más clara con la alta. Esta mejoría proviene principalmente de un engrosamiento de las trabéculas existentes con poca formación de trabéculas nuevas. Por el contrario, ninguna de las dosis empleadas de SrR ha mostrado mejoría con respecto al grupo OQX. Algo similar ocurre con la DMO trabecular. Los grupos tratados con SrR presentan valores cercanos al grupo OQX, mientras que los grupos tratados con PTH(1-84) se muestran cercanos al SHAM. En la estructura cortical, la OQX también provoca una pérdida de grosor y volumen. Ambas dosis de PTH(1-84) mejoran los parámetros estructurales corticales con respecto a OQX, especialmente la dosis alta, pero no ocurre lo mismo con el SrR, que muestra valores similares al grupo OQX. Sin embargo, los tratamientos con SrR muestran un llamativo aumento de la DMO cortical con respecto al grupo OQX e incluso al grupo SHAM.

Conclusiones: La OQX causa un grave empeoramiento de la microestructura y de la DMO. Las dosis utilizadas de SrR han tenido un efecto prácticamente inapreciable sobre la estructura ósea, aunque han producido un gran aumento de la DMO cortical. Por otro lado, las dosis de PTH(1-84), y en especial la de 50 µg, han conseguido mantener parámetros estructurales y DMO muy similares al grupo SHAM. Son necesarios ensayos biomecánicos para estimar los cambios en la resistencia ósea total inducidos por ambos regímenes terapéuticos.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado parcialmente por la Axencia Galega de Innovación, Xunta de Galicia (10CSA004E).