

COMUNICACIONES ORALES:

SESIÓN 2

1. Precision assessment of cortical thickness and volumetric bone mineral density measured by 3D-DXA

Humbert L, Hinojosa A, Cortés E, Potau JM, Del Río L, Winzenrieth R¹
¹ Galgo Medical. Barcelona; ² Unidad de Anatomía y Embriología Humana. Universidad de Barcelona; ³ Cetir Centre Mèdic. Barcelona

Objective: The aim of this study is to evaluate the precision at the femur of the mean cortical thickness (Cth) and the volumetric BMD in the trabecular, cortical and integral compartments (vBMDtrab, vBMDint and vBMDcort) derived from hip DXA scan using ex- and in-vivo settings.

Methods: DXA scans were done at CETIR Centre Mèdic (Barcelona, Spain) using a GE-Lunar iDXA. 10 dried human femurs were obtained from the anatomical laboratory of the Hospital Clinic (Barcelona, Spain). The femurs were scanned using a thickness of 19 cm of water, 4 times a row without repositioning. In addition, 30 patients (90% women, mean age 65±12 years) were acquired two times a row with complete repositioning on the same DXA device. Finally, 55 post-menopausal women (66±5.7 years) were recruited to evaluate the monitoring time intervals. DXA scans were obtained at baseline and at 12 months. 3D models were derived from the hip DXA scans using the 3D-DXA software (v2.3, Galgo Medical SL, Spain). The root-mean-square standard deviation (RMS-SD) as well as the LSC at 95% were computed for areal BMD at total femur (aBMDtot) and femoral neck (aBMDfn) and for the 3D measurements (Cth, vBMDtrab, vBMDcort, vBMDint). Monitoring time intervals were computed by dividing LSC by the median change per annum.

Results: Ex- and in-vivo RMS-SD values are presented table. As expected, in-vivo RMS-SD were higher than those obtained ex-vivo. Interestingly, RMS-SD for Cth and vBMDcort are similar ex- and in-vivo. Monitoring time intervals were similar for DXA-derived [4.8–5.5 yrs] and 3D-DXA-derived measurements [3.6–7.0 yrs].

Conclusions: Consistent results were obtained using ex- and in-vivo settings. Low differences were observed between the two settings, suggesting that patient positioning and soft tissues heterogeneity have few effects on 3D-DXA measurements. Finally, similar monitoring time intervals were obtained between areal and 3D measurements. These results suggest that 3D-DXA measurements could be used to monitor bone status in postmenopausal women.

Table. RMS-SD and LSC 95% obtains for the studied parameters and settings

RMS-SD (LSC 95%)	aBMDtot (mg/cm ²)	aBMDfn (mg/cm ²)	Cth (mm)	vBMDcort (mg/cm ³)	vBMDint (mg/cm ³)	vBMDtrab (mg/cm ³)
ex-vivo	5.6 (15.52)	8.9 (24.67)	0.02 (0.06)	4.82 (13.36)	2.64 (7.32)	2.8 (7.7.9)
in-vivo	8.73 (24.2)	9.13 (25.31)	0.02 (25.31)	4.78 (13.25)	3.43 (9.51)	3.2 (8.87)
in-vivo time to monitor (yrs)	4.8	5.5	5.4	7.0	3.6	5.2

2. El cáncer de próstata induce cambios en el nicho pre-metastásico óseo mediante la secreción de espondina-2

Ardura JA, Gutiérrez Rojas I, Álvarez Carrión L, Alonso V
 IMMA-USP CEU. Madrid

Introducción: Estudios recientes sugieren cambios pro-metastáticos en órganos en los que posteriormente se desarrolla la metástasis en el cáncer. La formación de nichos pre-metastásicos óseos por comunicación cruzada entre el órgano diana y el tumor favorecen la colonización de células tumorales circulantes. La espondina-2, una proteína recientemente caracterizada como marcador de cáncer de próstata, aparece elevada en el suero de pacientes con tumores de próstata.

Objetivo: Analizar los efectos de la sobreexpresión de espondina-2 por los tumores de próstata sobre el entorno óseo antes del establecimiento de la metástasis (nicho pre-metastásico).

Material y métodos: Se desarrolló un modelo *in vivo* de cáncer de próstata pre-metastásico basado en la implantación de células de adenocarcinoma TRAMP-C1 con silenciamiento o no del gen de espondina-2, en ratones macho C57BL/6. Un mes tras la implantación de células TRAMP-C1- periodo suficiente para el desarrollo del tumor primario sin formación de metástasis óseas se analizaron parámetros histomorfométricos y marcadores óseos

por PCR cuantitativa en fémures en los grupos control (sin tumor), espondina (+) (tumor con espondina-2) y espondina (-) (tumor sin espondina-2). Además, estudiamos los efectos en expresión génica y proliferación de la estimulación con espondina-2 exógena de pre-osteoblastos MC3T3-E1, osteocitos MLO-Y4 y macrófagos RAW 264.7.

Resultados: Los tumores primarios espondina (+) mostraron sobreexpresión de espondina-2, Runx2, osterix, osteocalcina y RANK-L respecto a próstatas control o tumores espondina (-). Los fémures de animales con tumores espondina (+) presentaron disminución del volumen de hueso y del grosor y número de trabéculas y aumento de la separación trabecular y del número de osteoclastos y osteoblastos, asociado a una mayor expresión génica de Runx2, TRAP y cambios en OPG/RANK-L respecto a fémures control o tumores espondina (-). Espondina-2 indujo sobreexpresión de Runx2, osterix y osteocalcina y elevada mineralización/diferenciación en pre-osteoblastos MC3T3-E1, aumento de OPG/RANK-L y de la proliferación en MC3T3-E1 y osteocitos MLO-Y4 y sobreexpresión de RANK en macrófagos RAW 264.7.

Conclusiones: La espondina-2 secretada por células tumorógenicas prostáticas induce cambios en el entorno óseo previos al desarrollo de la metástasis.

3. Dipyridamole, un inhibidor del transporte de adenosina, es capaz de revertir la acción osteoclastogénica de tenofovir

Conesa FM, Llamas P, Wilder T, Atencio P, Pérez Tanoira R, Cabello A, Prieto L, Górgolas M, Cronstein B, Largo R, Herrero Beaumont G, Mediero A^{1,2}
¹ Bone and Joint Research Unit. IIS-Fundación Jiménez Díaz UAM. Madrid; ² Division of Translational Medicine. Department of Medicine. NYU School of Medicine. New York (Estados Unidos); ³ Infectious Diseases Division. IIS-Fundación Jiménez Díaz UAM. Madrid

Introducción: Dipyridamole bloquea el transporte de adenosina incrementando los niveles extracelulares de la misma, y activa de forma indirecta el receptor A2A, incrementando la formación de hueso de forma similar a rhBMP-2. Estudios clínicos en pacientes con VIH evidencian una pérdida en densidad ósea, principalmente en aquellos individuos tratados con tenofovir, un anti-retroviral nucleosídico mimético de AMP, lo que sugiere que aun siendo efectivo para reparar el sistema inmune, podría tener un efecto directo deletéreo en hueso.

Objetivo: Estudiar si tenofovir tiene un efecto directo en el

hueso y si el tratamiento con dipyridamole es capaz de revertir este efecto en un modelo animal.

Material y métodos: Ratones macho C57BL/6 se dividieron en cuatro grupos: control (salino 0,9%), tenofovir 75 mg/Kg/día, dipyridamole 25 mg/Kg/día, combinación tenofovir/dipyridamole durante 4 semanas (n=10 cada grupo). Se realizó un doble marcaje con calceína (15 mg/Kg) y rojo de alizarina (30 mg/Kg) y los huesos largos se analizaron por microCT e histología.

Resultados: Se ha observado un descenso en el peso de los animales tratados con tenofovir cercano al 10% (p<0,001), efecto normalizado cuando los animales fueron tratados con Dipyridamole. tenofovir reduce la formación de hueso (19±1,4 µm vs. 35±4 µm control, p<0,0001), efecto revertido por Dipyridamole (30±2,5 µm, p).

Conclusiones: Tenofovir actúa de forma directa incrementando osteoclastogénesis y produciendo un fenotipo osteoporótico. El tratamiento con agentes capaces de incrementar los niveles de adenosina, como dipyridamole, podría ser empleado como diana terapéutica para contrarrestar los efectos de tenofovir.

4. Comparativa entre los pacientes con hipoparatiroidismo postquirúrgico y los no-quirúrgicos: análisis "post-boc" del estudio REPLACE (recombinant human parathyroid hormone (rhPTH[1-84], parathyroid hormone rDNA))

García Ortí L¹, Mannstadt M², Brandi ML³, Bilezikian JP⁴, Clarke BL⁵, Fraser WD⁶, Krasner A⁷, Lagast H⁸, Lee HM⁹, Rejnmark L¹⁰, Shoback DM¹¹, Vokes TJ¹¹
¹ Shire Medical Affairs. Madrid; ² Endocrine Unit. Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School. Boston (Estados Unidos); ³ Endocrinology and Metabolic Diseases. University of Florence (Italia); ⁴ Division of Endocrinology. College of Physicians and Surgeons. Columbia University, New York (Estados Unidos); ⁵ Mayo Clinic Division of Endocrinology, Diabetes, Metabolism, and Nutrition, Rochester (Estados Unidos); ⁶ Department of Medicine, Norwich Medical School. University of East Anglia. Norwich (Reino Unido); ⁷ Shire Human Genetic Therapies, Inc., Lexington, MA (Estados Unidos); ⁸ Formerly NPS Pharmaceuticals, Inc., Lexington (Estados Unidos); ⁹ Endocrinology and Internal Medicine. Aarhus University Hospital. Aarhus (Dinamarca); ¹⁰ Endocrine Research Unit. SF Department of Veterans Affairs Medical Center. University of California. San Francisco (Estados Unidos); ¹¹ Section of Endocrinology. University of Chicago Medicine. Chicago (Estados Unidos)

*Filial de entera propiedad de Shire plc

El hipoparatiroidismo es una enfermedad caracterizada por la ausencia o niveles bajos de la hormona paratiroidea (PTH), normalmente producido como consecuencia de la cirugía de tiroides. Sin embargo, etiologías no-quirúrgicas están presentes en >10% de los pacientes. Los datos de este grupo de pacientes son limitados. En este análisis *post-boc* del estudio REPLACE (NCT00732615, EudraCT2008-005063-34), se evaluaron las características basales y de respuesta al tratamiento con 50–100µg/día de rhPTH(1-84) de pacientes con

hipoparatiroidismo postquirúrgico o no-quirúrgico. Las características basales y demográficas se compararon entre los grupos mediante test de Chi-cuadrado para las variables categóricas y mediante Análisis de Varianza *one-way* para las continuas. Los pacientes respondedores se definieron como aquellos cuyas necesidades de tratamiento con calcio y vitamina D activa se redujeron $\geq 50\%$ manteniendo la concentración de calcio sérico en 2,00–2,25 mmol/L. De los 124 pacientes aleatorizados, 89 (72%) tenían hipoparatiroidismo postquirúrgico y 35 (28%), hipoparatiroidismo noquirúrgico.

De forma llamativa, según criterios de las guías ESE 2015, $\geq 80\%$ de los pacientes dentro de cada grupo eran pacientes no-controlados previamente con el tratamiento con rhPTH(1-84), incluso después de la optimización con tratamiento convencional. En general, hubo más similitudes que diferencias entre los dos grupos de pacientes. Las únicas diferencias significativas fueron el género masculino (9/89 [10%] *vs.* 17/35 [49%]; $p < 0,0001$), la edad al comienzo del estudio (49,1 *vs.* 42,9 años, $P = 0,014$), y el tiempo desde el diagnóstico (12,1 *vs.* 17,5 años, $p = 0,008$). Basalmente, la media (DT) de la concentración sérica de PTH intacta fue 0,8 (0,9) y 0,4 (0,5) pmol/L en el grupo postquirúrgico y no-quirúrgico, respectivamente; el rango normal en adultos es 1,5–7,6 pmol/L. En el grupo postquirúrgico, el 58% de tasa de respuesta con rhPTH(1-84), (35/60), fue significativamente mayor que la tasa del 3% observada con placebo (1/29; $p < 0,001$). En el grupo no-quirúrgico, la tasa de respuesta fue del 46% en el grupo tratado con rhPTH(1-84), (11/24), numéricamente mayor que la tasa del 0% del grupo con placebo (0/11; $p = 0,007$).

Este estudio *post-boc* no sugirió ninguna diferencia en respuesta a PTH(1-84) basada en la etiología del hipoparatiroidismo.

5. Incidencia de mutaciones en los genes TNSALP, GGPS1 y CYP1A1 en pacientes con fractura atípica de fémur

Peris P¹, González E¹, Rodríguez S¹, Monegal A¹, Guañabens N¹

¹ Servicio de Reumatología; ² Servicio de Inmunología. Hospital Clínic. Universidad de Barcelona

La fractura atípica de fémur (FAF) se ha relacionado con relativa frecuencia al tratamiento prolongado con bisfosfonatos (BP) y de forma aislada a la presencia de mutaciones en el gen de la fosfatasa alcalina (FA) no específica de tejido (TNSALP). Recientemente, también se han descrito casos aislados de FAF relacionados con mutaciones de la geranyl pirofosfato sintetasa (GGPS1), una enzima que puede inhibirse por los BP, y de la familia de la citocromo P450 (CYP1A1), ésta última relacionada con el metabolismo de muchos fármacos.

Nuestro objetivo fue analizar las características clínicas y la incidencia de mutaciones en los genes TNSALP, GGPS1 y CYP1A1 en pacientes con FAF.

Metodología: Se incluyeron 17 mujeres con FAF (edad 68 ± 10 años). Se realizó la secuenciación de los genes TNSALP, GGPS1 y CYP1A1 mediante la tecnología de Sanger en todas las pacientes. Se analizaron los sustratos de la FA (vitamina B6 y PEA), mar-

cadore de recambio óseo, densidad mineral ósea (DMO), tratamientos realizados y las características clínicas de las pacientes y de las fracturas.

Resultados: 2/17 pacientes (12%) presentaron mutaciones heterocigotas en los genes TNSALP (p.G288A) y CYP1A1 (p.R136H), respectivamente. La paciente con la mutación del gen TNSALP presentó un aumento de los valores de vitamina B6 y una disminución de la FA sérica. La paciente con la mutación del gen CYP1A1 tenía una osteoporosis asociada a tratamiento por glucocorticoides tratada con BP durante sólo 3 años. Todas las pacientes habían seguido tratamiento previamente con BP (94% con alendronato) durante un tiempo medio de 74 ± 45 meses, y alrededor del 50% también había seguido tratamiento con glucocorticoides. La FAF fue bilateral en el 35% de los casos y el 76% de las pacientes tenía fracturas por fragilidad previas.

Conclusiones: La presencia de mutaciones en los genes CYP1A1 y TNSALP puede estar relacionada con el desarrollo de FAF en algunos pacientes tratados con BP. La valoración de los sustratos de la FA en pacientes con valores bajos de FA permite identificar los pacientes con mutaciones en el gen TNSALP. Son precisos estudios que analicen el papel de las mutaciones en el CYP1A1 en el desarrollo de la AFF.

6. Functional effects of the p.Asp188Tyr mutation in the geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) suggested to be responsible for atypical femoral fractures

Roca Ayats N¹, Dunford JE², PeiYing NG³, García Giralte N⁴, Cozar M¹, Quesada Gómez JM¹, Nogués X¹, Prieto Alhambra D⁵, Russell RG⁶, Grinberg D⁷, Díez Pérez A⁸, Baron R⁹, Balcells S¹

¹ Dept. de Genètica, Microbiologia i Estadística. Universitat de Barcelona. IBUB. CIBERER. ISCIII. IRSJD. Barcelona; ² NIHR Musculoskeletal BRU & Botnar Research Centre. Nuffield Department of Orthopaedics, Rheumatology and Musculoskeletal Sciences. University of Oxford (Reino Unido); ³ Division of Bone and Mineral Research. Dept. of Oral Medicine. Harvard School of Dental Medicine (Estados Unidos); ⁴ Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques. CIBERFES. Barcelona; ⁵ Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba. Hospital Universitario Reina Sofía. CIBERFES. Córdoba; ⁶ GREMPAL. CIBERFES. Barcelona

Introduction: A novel mutation in the GGPS1 gene was found in 3 sisters with atypical femoral fracture (AFF) after long-term bisphosphonates (N-BPs). This gene encodes the GGPPS protein, a key component of the mevalonate pathway.

Aim: We have now performed functional studies to assess the impact of the mutation in the enzyme.

Materials and methods: The cDNA for both wild type and Asp188Tyr GGPPS were cloned into a bacterial expression vector and the resulting his-tagged proteins were purified using Ni sepharose followed by gel filtration. Analysis of the oligomerisation of the GGPPS monomers was undertaken using a Sephadex S300 gel filtration column. Enzyme activity was assayed using both substrates, farnesyl pyrophosphate and C14- isopentenyl

pyrophosphate (400 KBq/µMol) at 20 µM in buffer containing 100 mM HEPES pH7.5, 2 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20. Reactions were stopped after 10 mins at 37 °C by adding acidified methanol. Products were extracted directly into water immiscible scintillation fluid and quantified by scintillation counting. The effect of shRNA-mediated GGPS1 depletion was also assessed in cells.

Results: Asp188 is an active site residue of GGPP synthase, involved in the binding of the substrate via a magnesium salt bridge. As predicted, disruption of this residue led to greatly reduced enzyme activity. In the recombinant enzyme the mutant had 5.7% of wildtype activity (0.72±0.09 cpm/ng/min for the wildtype, 0.04±0.013 cpm/ng/min for the mutant (n=3)). Gel filtration experiments showed the wildtype enzyme to have a MW in excess of 200KDa suggesting that it is present as a hexamer in line with previous findings. The mutant enzyme consistently showed two peaks corresponding to the hexamer and the monomer (a peak around 38 kDa), suggesting the mutant destabilises the oligomerisation of the enzyme.

Furthermore, shRNA-mediated GGPS1 depletion (>80%) in RAW 264.7 macrophages yielded significantly higher osteoclast numbers after mCSF-RANKL stimulation when compared to the corresponding non-target shRNA control. However, despite having higher osteoclast formation rates, osteoclasts with reduced GGPS1 expression had lower resorption activity when cultured on the bone-mimicking substrate Osteo Assay surface plates.

Conclusions: GGPS1 gene mutation greatly impairs the enzyme activity inducing biological effects that may contribute, likely with other factors notably BP exposure, to AFFs observed in patients carrying the mutation.