

Estrés oxidativo y osteonecrosis de la cabeza femoral.

F. DASÍ^{1,2}, S. PASCUAL¹, A. SILVESTRE^{1,3,4}, J. CARRASCO⁴, F. GOMAR^{1,3,4}.

FUNDACIÓN INVESTIGACIÓN HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA/INCLIVA¹. UNIVERSITAT DE VALÈNCIA. FACULTAD DE MEDICINA. DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA². HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA. SERVICIO DE CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y TRAUMATOLOGÍA³. UNIVERSITAT DE VALÈNCIA. FACULTAD DE MEDICINA. DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA⁴.

Resumen. La osteonecrosis no traumática de la cabeza femoral representa un problema clínico importante, ya que hasta un 80% de los casos terminan en un colapso osteocondral con gran destrucción ósea y daño articular, con dolor y pérdida de la función de la cadera, necesitando finalmente una intervención de prótesis de sustitución a una edad temprana. La patogénesis de esta enfermedad es multifactorial y se conocen diversidad de factores etiológicos asociados a ella: consumo de alcohol y tabaco, uso de corticosteroides, alteraciones hemostáticas, alteraciones en el metabolismo lipídico y presencia de ciertos polimorfismos genéticos. Sin embargo, un gran número están descritas como idiopáticas y no presentan factores de riesgo. Recientes estudios en modelos animales de ONF inducida por esteroides sugieren que el estrés oxidativo podría estar involucrado en el desarrollo de la enfermedad. Estos estudios muestran que la administración de sustancias oxidantes aumenta el riesgo de padecer la enfermedad y que la administración de antioxidantes podría prevenir el desarrollo de la misma.

Oxidative stress and osteonecrosis of the femoral head

Summary. Non-traumatic osteonecrosis of the femoral head represents a significant clinical problem. Chondral collapse occurs in up to 80% of the untreated cases resulting in bone destruction, pain and loss of joint function and prosthetic hip replacement at an early age is needed. The pathogenesis of the disease is likely multifactorial and several etiologic factors are known to be associated with it: alcohol intake, smoking, corticosteroid use, impaired hemostasis and lipid metabolism, and the presence of certain polymorphisms. However, a significant number are described, as idiopathic and do not present any risk factor. Recent studies in steroid-induced ONF animal models suggest that oxidative stress could be involved in the development of the disease. These studies show that the administration of pro-oxidant substances increase the risk of disease and antioxidants administration might prevent the development thereof.

Correspondencia:

Dr. Francisco Gomar Sancho
Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología
Hospital Clínico Universitario de Valencia.
Avda. Blasco Ibáñez, 15-17.
46010 Valencia.

Introducción

La necrosis de la cabeza femoral puede ocurrir por lesión vascular tras un traumatismo (fractura de cuello femoral, luxación coxofemoral, etc.), pero la forma más frecuente en la clínica es la necrosis espontánea, en un alto porcentaje de los casos relacionada con corticoterapia, alcoholismo, dislipemias u otras patologías que afec-

tan a la microcirculación. En muchos casos no hay ninguna patología asociada, por lo que se conocen como formas idiopáticas (Fig. 1).

Esta patología afecta principalmente a adultos jóvenes, normalmente entre la tercera y la quinta década, causando severas limitaciones funcionales en la cadera de los pacientes, afectando a su trabajo y vida social en una edad completamente productiva. Se ha demostrado que el daño tisular en la cabeza del fémur está causada por los siguientes mecanismos: oclusión vascular, metabolismo lipídico alterado, coagulación intravascular, procesos de curación, muerte celular primaria y estrés mecánico¹. En lugar de una patología isquémica, la ONF podría ser descrita como un problema de muerte celular

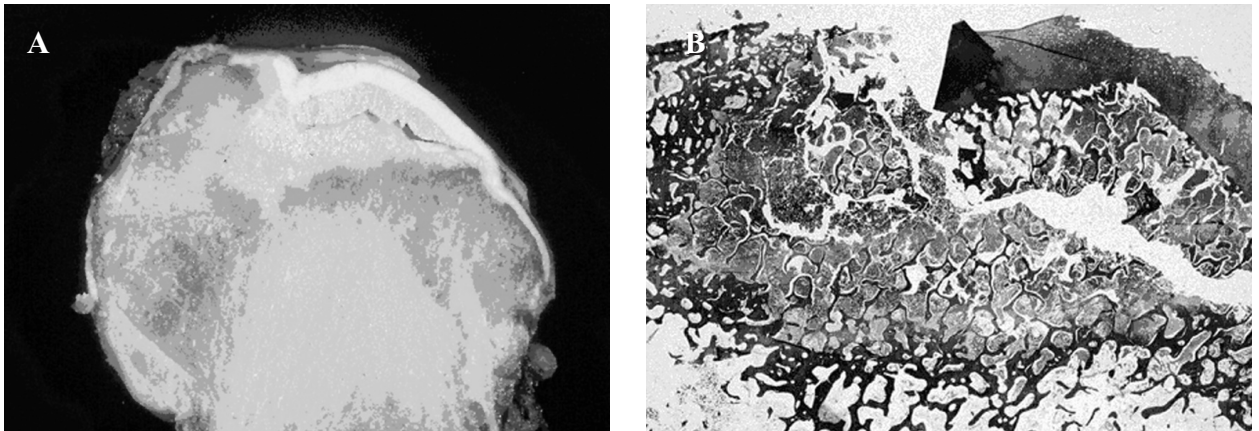


Figura 1. Cabeza femoral con necrosis idiopática en fase de fragmentación, aún con cartilago articular íntegro. A: Imagen macroscópica donde se ve bien delimitada la zona de necrosis, el hueso reactivo y la fragmentación del hueso necrosado. B: Misma lesión vista a microscopia óptica a pequeño aumento, teñida con tricrómico de Masson.

producida por acción vascular, química y factores mecánicos, la cual lleva a la teoría del estrés celular acumulativo propuesta por Kenzora². El colapso osteocondral ocurre 5 años después del diagnóstico inicial en un 75-80% de los casos no tratados, provocando la destrucción del hueso, dolor y pérdida de función de la articulación¹.

Aunque a lo largo de la historia se han propuesto muchas teorías etiopatogénicas y causas de ONF, se desconoce aún la fisiopatología de la enfermedad. Esto limita las posibilidades terapéuticas y el cirujano, en las fases precoces, solo es capaz de realizar intervenciones que mejoran la sintomatología clínica y ocasionalmente retardar el progreso de destrucción articular, hasta que la sustitución de la articulación "solucione" el problema. Desafortunadamente, a pesar de la mejora técnica del procedimiento de artroplastia de la cadera, los resultados del reemplazo de la cadera no son enteramente satisfactorios, con una tasa de fracaso de aproximadamente un 10% de los casos a los 5 años de la cirugía inicial. Debido a la juventud de estos pacientes, es de esperar que la artroplastia de la cadera no dure toda la vida del paciente, por eso, el diagnóstico y tratamiento precoz son importantes para ralentizar el proceso de la enfermedad y retrasar el reemplazo de la cadera¹.

Se conocen diversidad de factores etiológicos asociados a esta enfermedad: consumo de alcohol y tabaco, uso de corticosteroides, alteraciones hemostáticas, alteraciones en el metabolismo lipídico y presencia de ciertos polimorfismos genéticos^{3,4}. Asimismo, enfermedades sistémicas como el lupus eritematoso, desórdenes gastrointestinales y trasplante de órganos, también están asociadas con un incremento del riesgo de desarrollar ONF⁵. Los pacientes con ONF presentan más de uno de

los factores de riesgo, esto indica que la patogénesis de la enfermedad es multifactorial. Sin embargo, un gran número están descritas como idiopáticas y no presentan factores de riesgo. El mecanismo exacto por el que se desarrolla la ONF idiopática no se conoce, lo que imposibilita el uso de medidas profilácticas¹.

Estrés oxidativo

Los radicales libres son moléculas que poseen un electrón desapareado en su orbital más externo, lo que les confiere una gran reactividad con otras moléculas, con el fin de obtener el electrón que les hace falta y alcanzar su estabilidad electroquímica. De esta forma, el radical libre es capaz de reaccionar con ADN, lípidos y proteínas lo que conduce a su oxidación y generalmente a la pérdida de actividad de estas biomoléculas⁶.

Como producto del metabolismo aerobio celular se generan en las células dos tipos fundamentales de radicales libres. Por un lado, las especies reactivas del oxígeno (ROS) entre las que se encuentran los radicales hidroxilo (.OH), el anión superóxido (O_2^-), el ión hipoclorito (OCl^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Por otro lado, las especies reactivas de nitrógeno (RNS), entre las que se encuentran el óxido nítrico, y el radical peroxinitrito⁷. Las principales fuentes intracelulares de generación de ROS y/o RNS son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como las membranas nuclear, citoplasmática y del retículo endoplásmico⁸. Los radicales libres también son generados por factores externos tales como la exposición a radiaciones ionizantes, la contaminación ambiental, el tabaco, algunos medicamentos como los corticoides, y xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas⁹.

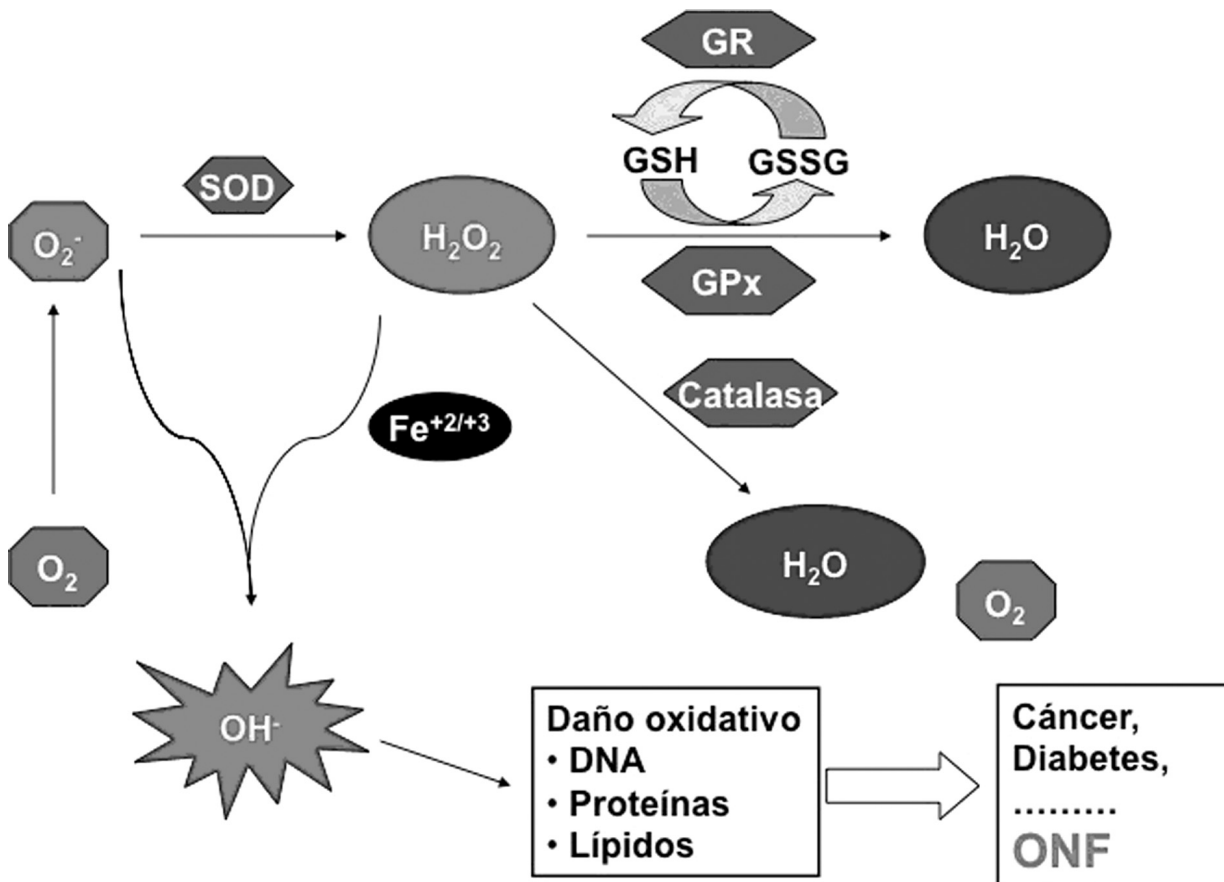


Figura 2. Teoría del estrés oxidativo y la enfermedad. Como consecuencia del metabolismo aerobio celular se generan en los organismos diversas especies reactivas del oxígeno (O_2^- , H_2O_2 , OH^-) que son capaces de interactuar y oxidar a las llamadas bio-moléculas (DNA, proteínas y lípidos). Esta oxidación conduce generalmente a la pérdida de la función de la bio-molécula. Según la teoría del estrés oxidativo y la enfermedad, la acumulación de productos de oxidación sería la responsable del desarrollo de múltiples patologías. Con el fin de protegerse del daño oxidativo causado por los radicales libres del oxígeno, la célula ha desarrollado varios mecanismos enzimáticos (SOD, Catalasa, Glutación Peroxidasa, Glutación Reductasa) y no enzimáticos (Glutación), que actuarían evitando la acumulación de especies reactivas del oxígeno, y por tanto, el estrés oxidativo. Abreviaturas: SOD: Superóxido Dismutasa; GPx: Glutación Peroxidasa; GR: Glutación Reductasa; GSH: Glutación Reducido; GSSG: Glutación Oxidado.

Las células eucariotas disponen de diversos mecanismos de defensa antioxidantes para evitar el daño oxidativo causado por las ROS. Los mecanismos de defensa más sencillos implican la actuación de las vitaminas C y E, las cuales sufren ellas mismas un proceso de oxidación, protegiendo de este modo a las biomoléculas. Existen, por otra parte, mecanismos de defensa más complejos que implican sistemas enzimáticos tales como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutación peroxidasa que han evolucionado para reducir los niveles de ROS¹⁰.

En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre la producción y la degradación de ROS. Cuando el balance entre los mecanismos pro-oxidantes y anti-oxidantes se desplaza en favor de los primeros, se produce una condición conocida como estrés oxidativo, que está implicada en numerosas enfermedades y que ha dado

lugar a la teoría de la enfermedad causada por estrés oxidativo. La sobreproducción de ROS inducida por diversos mecanismos exógenos y endógenos agotaría la capacidad antioxidante celular y contribuiría al desarrollo de numerosos procesos patológicos¹¹. Por otra parte, cuando los mecanismos de defensa no pueden prevenir la acumulación de ROS, se produce la activación de determinadas vías de señalización intracelular, alteraciones en la actividad de la ADN polimerasa y cambios en la expresión génica y en la síntesis proteica. Este conjunto de efectos ha llevado a desarrollar la hipótesis de que los radicales libres, y el daño oxidativo, provocarían un aumento en el daño celular que conduciría al desarrollo de diversas condiciones patológicas, tales como la carcinogénesis^{12,13}, inflamación crónica¹⁴, envejecimiento^{15,16}, autoinmunidad^{17,18}, enfermedades cardiovasculares¹⁹ y neurodegenerativas²⁰ (Fig. 2).

Sin embargo, incluso en ausencia de estrés oxidativo, existen en las células niveles basales de ROS. Estas sustancias, anteriormente mencionadas, actúan como moléculas reguladoras y de señalización, y son, en concentraciones adecuadas, imprescindibles para el correcto funcionamiento celular en un sistema conocido como regulación REDOX²¹.

Los lípidos y las proteínas oxidadas se eliminan por mecanismos de recambio normales. Sin embargo, el DNA dañado no se puede reemplazar en su totalidad y tiene que ser reparado²². En respuesta al daño oxidativo en el ADN la célula reacciona mediante varios mecanismos, tales como la reparación de dichas lesiones, la activación de diversos puntos de control del ciclo celular (lo cual produce la parada del ciclo celular y previene la transmisión de los cromosomas dañados) y la apoptosis²³.

Como resultado de las distintas oxidaciones moleculares y distorsión celular secundaria se producen y liberan al medio extracelular distintos productos cuya determinación es utilizada para el conocimiento del estrés oxidativo de un individuo. Entre sus marcadores más representativos destacan, los isoprostanos y el malondialdehído como índice de peroxidación lipídica, los grupos carbonilo como reflejo de la modificación oxidativa de proteínas y la base modificada y mutagénica 8-oxo-2'-deoxiguanosina como producto de la oxidación del material genético ya sea este nuclear o mitocondrial. Además, existen otros metabolitos que complementan la batería de indicadores de oxidación entre los que destacan la relación GSSG/GSH (glutación oxidado/glutación reducido), la pentosidina y los peroxinitritos, etc. Las concentraciones de estos metabolitos pueden ser cuantificados en sangre, orina, células circulantes o tejidos mediante procedimientos y técnicas analíticas específicas (ELISA, HPLC entre otras)^{24,25}.

Estrés oxidativo en la ONF

Recientes estudios en modelos animales indican que el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de la osteonecrosis, y este ha sido identificado como un mecanismo importante que contribuye a la lesión endotelial durante la ocurrencia de osteonecrosis asociada a esteroides²⁶.

Estudios en modelos animales han puesto de manifiesto la relación existente entre el estrés oxidativo en la ONF inducida por esteroides y la posibilidad de evitar la enfermedad mediante el empleo de sustancias antioxidantes. Los resultados muestran que los esteroides suministrados incrementaban significativamente los niveles de estrés oxidativo (determinado por la disminución de

los niveles de glutación reducido (GSH), y por un incremento en los niveles de peróxidos lipídicos (LPO) y modificaciones oxidativas de la proteínas. Entre 3-5 días tras la administración de esteroides se produce un aumento en los niveles de GSH y una disminución de LPO, además la extensión de la zona osteonecrótica tendía a disminuir con el paso del tiempo. Los productos finales de oxidación proteica no se detectaron ni en los conejos control, ni a los 3 días de la administración, pero sí a los 5 y 14 días después de la administración de corticosteroides, lo que sugiere que estos provocan un aumento del estrés oxidativo en tan solo 3-5 días. Estos datos fueron contrastados con la administración de un antioxidante (GSH) a los conejos, con el fin de comprobar si el estrés oxidativo es la causa de ONF, y estudiar si la administración de antioxidantes puede evitar el desarrollo de la enfermedad. La tasa de desarrollo de la ONF, que fue de un 70% en conejos después de 14 días de la administración de esteroides, disminuyó al 0% con la administración de GSH, lo que sugiere que se puede prevenir la enfermedad con la administración de sustancias antioxidantes²⁷. Otro estudio, también en conejos, sugiere que las hembras podrían ser más vulnerables al desarrollo de ONF inducida por esteroides, ya que se obtuvieron las mismas tasas de osteonecrosis (70%) en conejos macho con una sola administración de metilprednisolona (MP) de 20mg/kg que en conejos hembra con una sola administración de MP de 4 mg/kg²⁸.

En otras especies animales se han observado resultados similares, lo que induce a pensar que se trata de un fenómeno generalizable. Estudios en ratas han demostrado que el estrés oxidativo es por sí solo suficiente para provocar el desarrollo de ONF, incluso en ausencia de anomalías lipídicas, lo que apoya el papel del estrés oxidativo en la ONF^{29,30}.

Varios estudios en modelos animales muestran que las sustancias antioxidantes inhiben significativamente el desarrollo de ONF, apoyando la relación entre el estrés oxidativo y el desarrollo de la enfermedad^{26,31-33}. No existen, sin embargo, estudios de naturaleza similar en seres humanos. Si la relación estrés oxidativo-ONF-antioxidantes se confirmara, se abriría un marco de nuevas estrategias en la profilaxis de la enfermedad con sustancias antioxidantes.

Próximos pasos

A pesar de la teoría unificadora de la base molecular del estrés oxidativo y los datos de apoyo epidemiológicos y de modelos animales, las terapias antioxidantes no han demostrado un claro beneficio en entornos clínicos³⁴.

La visión del estrés oxidativo se complica, ya que las ROS están implicadas en la regulación de las rutas de señalización intracelular. Por lo tanto, la idea general de que los antioxidantes mejoran la salud de los individuos podría no ser cierta y ser contraproducente para la salud del individuo, ya que los antioxidantes podrían alterar rutas metabólicas importantes para la homeostasis celular^{21,35,36}, por lo que los próximos estudios deberían ir dirigidos a clarificar los detalles moleculares de las fuentes de ROS, su naturaleza y regulación en la ONF. Esto permitirá la identificación o síntesis de moléculas provistas de la reactividad y selectividad para inhibir la fuente de ROS en ONF y ayudará a diseñar mejores sustancias antioxidantes que deberán ser probadas en ensayos clínicos.

Visión de futuro

Diversos estudios en modelos animales sugieren que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de ONF. Bajo condiciones de estrés oxidativo, disminuyen los niveles de GSH, aumenta la formación de peróxidos lipídicos e incrementa los niveles de proteínas oxidadas,

lo que conlleva a un daño vascular y del tejido de la cabeza femoral. Por otra parte, el estrés oxidativo inducido por los niveles decrecientes de GSH es causa suficiente para el desarrollo de ONF incluso en ausencia de anomalías lipídicas. La oxidación del tejido se ha observado que también induce la apoptosis que resulta en ONF. Varias estrategias profilácticas antioxidantes han demostrado ser útiles para ONF en modelos animales.

Por lo tanto, la siguiente pregunta a responder es si es posible modular la ONF en los seres humanos mediante un tratamiento con sustancias antioxidantes. Para responder a esta cuestión se debe realizar, un ensayo clínico con un antioxidante o con moléculas que muestren tanto la capacidad antioxidante como antilipídica. Sin embargo, como se ha mencionado, esto no es una tarea fácil, y deben abordarse varias cuestiones antes de poner en marcha un ensayo clínico de estas características. La elección del antioxidante o la combinación de fármacos, la dosis apropiada, la duración del tratamiento y la población seleccionada son factores que deben ser cuidadosamente analizados en el diseño de un ensayo clínico de esta naturaleza.

Bibliografía:

1. Mont MA, Jones LC, Hungerford DS. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later. *J Bone Joint Surg* 2006; 88A:1117-32.
2. Kenzora JE, Glimcher MJ. Accumulative cell stress: the multifactorial etiology of idiopathic osteonecrosis. *Orthop Clin N AM* 1985; 16:669-79.
3. Kim TH, Hong JM, Oh B, Cho YS, Lee JY, Kim HL et al. Genetic association study of polymorphisms in the catalase gene with the risk of osteonecrosis of the femoral head in the Korean population. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16:1060-6.
4. Renovell P, Silvestre A, Escribá I. Etiopatogenia de la osteonecrosis idiopática de la cadera. Situación actual. *Rev Esp Cir Osteoar* 2009; 238:58-64.
5. Jones JP Jr. Concepts of etiology and early pathogenesis of osteonecrosis. *Instr Course Lect.* 1994; 43:499-512.
6. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408:239-47.
7. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82:47-95.
8. Liu Y, Zhao H, Li H, Kalyanaraman B, Nicolosi AC, Gutterman DD. Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ Res* 2003; 93:573-80.
9. Schroder P, Krutmann J. Environmental Oxidative Stress-Environmental Sources of ROS. *The Handbook of Environmental Chemistry. Volume 20*, 2005, pp 19-31.
10. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82:291-5.
11. Matsui A, Ikeda T, Enomoto K et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett* 2000; 151:87-95.
12. Floyd RA. The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1447-50.
13. Kensler TW. Free radicals in tumor promotion. *Adv. Free Radic Biol Med* 1986; 2:347-87.
14. Frenkel K, Karkoszka J, Kim E et al. Recognition of oxidized DNA base by sera of patients with inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med* 1993; 14:483-94.
15. Bunker VW. Free radicals, antioxidants and ageing. *Med Lab Sci* 1992; 299-312.
16. Barnett YA, King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repairs capacity and mutation as a function of age in humans. *Mut Res* 1995; 338:115-28.
17. Lunec J, Herbert K, Blount S et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *FEBS Lett* 1994; 348:131-8.
18. Cooke MS, Mistry N, Word C et al. Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species: implications for anti-DNA antibodies in lupus. *Free Radic. Biol Med.* 1997; 22:151-9.
19. Andreassi MG. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors to oxidative DNA damage. *Mut Res* 2003; 543:67-86.
20. Lovell MA, Gabitta SP, Makesberry WR. Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J Neurochem* 1999; 72:771-6.
21. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:936486.
22. Evans M, Dizdaroğlu M, Cooke MS et al. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mut Res Rev* 2004; 567:1-61.
23. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays* 2004; 26:533-42.
24. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox Reactions, and methods for Their Quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30:620-50.
25. Borrego S, Vazquez A, Dasí F, Cerdá C, Iradi A, Tormos C, Sánchez JM, Bagán L, Boix J, Zaragoza C, Camps J, Sáez G. Oxidative stress and DNA damage in human gastric carcinoma: 8-Oxo-7 β -hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) as a possible tumor marker. *Int J Mol Sci* 2013; 14:3467-86.
26. Zhang G, Ling Q, Sheng H, Wang XL, Wang YX, Yeung DKW et al. A novel semisynthesized small molecule icaritin reduces incidence of steroid-associated osteonecrosis with inhibition of both thrombosis and lipid-deposition in a dose-dependent manner. *Bone* 2009; 44:345-56.
27. Hernández-Saavedra D, McCord J. Evolución y radicales libres. Importancia del estrés oxidativo en la patología humana. *Rev Med Inst Seguro Soc* 2007; 45:477-84.
28. Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M, Kaneuji A, y Katsuda S. Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *J Orthop Sci* 2004; 9:509-15.
29. Ichiseki T, Matsumoto T. Oxidative stress may underlie sex differences seen in steroid-induced osteonecrosis models. *Med Hypotheses* 2006; 66:1256.
30. Ichiseki T, Kaneuji A, Ueda Y, Nakagawa S, Mikami T, Fukui K et al. Osteonecrosis development in a novel rat model characterized by a single application of oxidative stress. *Arthritis Rheum* 2011; 63:2138-41.
31. Ichiseki T, Ueda Y, Katsuda S, Kitamura K. Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. *Rheumatology* 2006; 45:287-90.
32. Miyata N, Kumagai K, Osaki M, Murata M, Tomita M, Hozumi A et al. Pentosan reduces osteonecrosis of femoral head in SHRSP. *Clin Ep Hypertens* 2010; 32:511-6.
33. Lu BB, Li KH. Lipoic acid prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatol Int.* 2011; 32:1679-83.
34. Steinhil SR. Why have antioxidants failed in clinical trials? *Am J Cardiol* 2008; 101:14D-19D.
35. Azzi A. Oxidative stress: A dead end or a laboratory hypothesis? *Biochem Biophys Res Commu* 2007; 362: 230-2.
36. Watson J. 2013 Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biol* 3: 120144. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.120144>.