



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS
Y DE LA SALUD

PÉPTIDO DERIVADO DE CAP PARA EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS EN UN MODELO ANIMAL

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA
SINAÍ HERNÁNDEZ CORTÉS

TUTOR
DR. HIGINIO ARZATE

Ciudad de México

Agosto, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

“La búsqueda del éxito y de la felicidad es como escalar una montaña, se requiere de esfuerzos agotadores, pero en la cima está la recompensa”. A pesar de los intentos, si algo no saliera bien, es porque en la vida se vive para APRENDER. No es una casualidad que haya llegado hasta aquí, siempre tuve un guía, por lo que agradezco a Dios quien me dirigió a emprender este largo (pero corto) camino con una serie de bendiciones que vi desde el inicio de esta nueva etapa de mi vida.

Agradezco a mi tutor académico, **Dr. Higinio Arzate**, por darme la oportunidad pertenecer al Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados; por facilitar los medios para realizar este trabajo de investigación y quien sin duda alguna, me ayudó a crecer como persona a través de ciertas situaciones y a nunca darme por vencida.

Agradezco el apoyo técnico brindado por la **Dra. Janeth Serrano Bello**, gracias por la disponibilidad y colaboración para realizar las microtomografías de este proyecto además de brindarme su amistad y siempre resolver cualquier duda que surgiera.

Agradezco a mis amigos y compañeros de maestría **Rodrigo Correa, y Laura Hdez. Tapia** por su apoyo incondicional, e ir estudiando hombro a hombro, sin lugar a dudas, guardaré un lindo recuerdo de su compañía.

Agradezco grandemente a mis compañeros y amigos de laboratorio **Dr. Enrique, Dra Lia, Dr. Gonzalo, Sonia y María de Jesús** quienes siempre estuvieron compartiendo sus conocimientos, su amistad y apoyo incondicional. (Quique, ¡gracias por tu paciencia en cada consulta!! Li, tú fuiste la culpable de quedarme en el laboratorio, ¡Gracias!).

Y por último, y no por ser menos importante, agradezco infinitamente a **mi familia**, a quienes amo y que siempre, a pesar de la distancia han estado conmigo en pensamiento y en oración:

A mis **padres, Heriberto y Sandra**, por quienes siempre me he sentido respaldada, gracias a ustedes que me han enseñados a ser una persona de éxito con honradez y dignidad, y en cada situación difícil lo toman como suyo y sus consejos siempre son la mejor opción.

A mis **hermanos, Cynthia, Crispín, Miguel Angel y Hery David** quienes se enorgullecen de cada logro y su amistad es única e inigualable, sé que siempre puedo contar con ustedes, ¡los volvería a elegir como mis hermanos!

A mis **tías Silvia y Martina**, por sus constantes oraciones, y porque siempre estuvieron al pendiente de mí, ustedes saben que son como unas segundas madres para mí.

To **Francis Manno**, my loved partner, who arrived at the end of this stage, but now, is who tells me to follow forward. I trust a good thing will be here. Thank you, Sweetie!

Sinceramente, Sina!

ÍNDICE

Resumen	5
Abstract	6
Introducción	7
Marco teórico	9
1. Tejido óseo	9
2. Biomineralización	11
3. Osteoporosis	13
3.1 Historia y definición	13
3.2 Epidemiología	14
3.3 Diagnóstico	16
3.3.1 Pruebas bioquímicas	18
3.3.2 Mediciones del contenido mineral óseo	18
3.4 Factores de riesgo	20
3.5 Fracturas	23
3.5.1 Fracturas vertebrales	23
3.5.2 Fracturas femorales	24
3.6 Mecanismos de Patogénesis en la Osteoporosis	25
3.6.1 Fosfatasa alcalina	27
3.6.2 Osteocalcina	27
3.6.3 RANKL	28
3.6.4 Osteoprotegerina	29
3.6.5 Estrógenos	29
3.6.6 Importancia de estrógenos en el metabolismo óseo	30
3.7 Tratamiento	31

3.7.1 Anticatalíticos/antirresortivos	32
3.7.2 Agentes anabólicos	34
3.7.3 Nuevos agentes	35
3.8 Modelos de estudio para osteoporosis	35
4. Proteína de Adhesión del Cemento Radicular (CAP)	36
4.1 Péptido de CAP	37
5. Planteamiento del problema	41
6. Justificación	42
7. Hipótesis	43
8. Objetivo general	43
8.1 Objetivos específicos	43
9. Material y métodos	44
10. Resultados	53
Microtomografía Computarizada (μ CT)	53
Pruebas Biomecánicas	57
Pruebas Histológicas	58
* Tinción con Tricrómica de Masson	58
* Tinción con Hematoxilina y Eosina	63
Biomarcadores de Mineralización en Suero	65
11. Discusión	69
12. Conclusiones	79
13. Referencias bibliográficas	80

RESUMEN

La osteoporosis es una enfermedad sistémica caracterizada por la pérdida de densidad mineral ósea, que incrementa la susceptibilidad de fractura. En este trabajo se utilizó un péptido sintético derivado de la Proteína de Adhesión del Cemento (pCAP), el cual es de fácil síntesis y ha demostrado *in vitro* tener capacidad de formar cristales de hidroxiapatita, promoviendo procesos de biomineralización. Se eligió un modelo de ovariectomía bilateral (OVX) para inducir osteoporosis en ratas Wistar y como tratamiento se administraron dos concentraciones del pCAP por vía intraperitoneal diariamente durante 12 semanas. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del pCAP como tratamiento de la osteoporosis en ratas ovariectomizadas. Se seleccionaron 24 ratas: 18 de éstas fueron sometidas a OVX cumplidas 10 semanas de edad. Se formaron 4 grupos con n=6. Grupos 1 (control con OVX sin tratamiento) y Grupo 2 fueron controles sanos sin OVX. Se administró el pCAP (40µg grupo 3; y 80µg grupo 4) diariamente por vía intraperitoneal durante 12 semanas. Para determinar el efecto del pCAP se realizaron Microtomografías computarizadas (µCT), pruebas biomecánicas, pruebas histológicas y análisis de marcadores bioquímicos en suero. Las imágenes de µCT mostraron que los grupos tratados con pCAP incrementaron la Densidad Mineral Ósea del fémur y vértebras lumbares con diferencia significativa. En la compresión de la 5° vértebra lumbar, el grupo tratado con pCAP40 µg/día presentó resistencia a la compresión similar al grupo sano y el grupo 80 µg/día incrementó con diferencia significativa. Los análisis histológicos en grupos experimentales mostraron reconstitución trabecular y depósito de tejido mineral. Los niveles de la actividad específica de Fosfatasa Alcalina en grupos tratados disminuyeron al final del tratamiento. Los resultados de ELISA mostraron que los niveles de Osteocalcina disminuyeron en el grupo pCAP 40 µg/día con diferencia significativa. Los niveles de RANKL y Osteoprotegerina aumentaron en ambos grupos tratados. Tomando en cuenta los resultados podemos concluir que el pCAP ejerce un efecto antiosteoporótico recuperando las características funcionales del hueso sano, siendo alternativa para el tratamiento de la osteoporosis.

ABSTRACT

Osteoporosis is a systemic disease characterized by the loss of mineral bone density, resulting in an increasing susceptibility to fractures. A synthetic peptide derived from Cementum Attachment Protein (pCAP) was used, for its ability to form hydroxyapatite crystals *in vitro*, thus promoting the process of biomineralization. An osteoporotic model by bilateral ovariectomy (OVX) in Wistar rats was chosen and two concentrations of pCAP were inoculated intraperitoneally daily during 12 weeks. The Objective was determine the effectiveness of the use of the synthetic peptide for treating osteoporosis in preclinical studies in Wistar rats ovariectomized. Four groups of six rats each were examined. Groups 1st and 2nd were controls, but 2nd group was **OVX without treatment, The pCAP was administered in concentrations of 40µg to group 3, and 80µg to group 4** -intraperitoneally daily for 12 weeks. Computarized Microtomography (µCT), biomechanical testing, histology tests and analysis of biochemical markers in serum were analyzed. Images by µCT demonstrated a significant difference between groups indicating the groups with the pCAP treatment had an increased in bone mineral density of the femur and lumbar vertebrae. In biomechanical probes of the 5° lumbar vertebrae, the 40µg/day pCAP group showed resistance to compression, similar to the healthy control group and the 80µg/day pCAP group showed significant increased resistance to compression compared with normal controls. Histological analysis in treated groups showed trabecular recovery and new tissue mineral deposit. The serum levels of –specific alkaline phosphatase activity indicated that the 40µg/day pCAP and 80µg/day pCAP groups had decreased at the termination of our examination period. Using an ELISA we observed a significant decrease in the levels of Osteocalcin in the 40µg/day pCAP group. Additionally, we found RANKL and Osteoprotegerin levels were significantly increased in both groups. Taking into account the results we conclude that pCAP exerts an anti-osteoporotic effect, recovering the functional characteristics of a healthy bone, revealing a mechanism for the ability of future treatment of osteoporosis.

INTRODUCCIÓN

El tejido óseo posee la capacidad de estar en constante regeneración y remodelación en su curso normal de la vida, y más frecuentemente ante algún daño como lo son las fracturas causadas por traumatismos. Sin embargo, además de las adversidades traumáticas, la remodelación del hueso se ve disminuida conforme el individuo se acerca a la edad adulta perdiendo las características propias de la arquitectura del hueso consecuente a la disminución de la producción de las moléculas implicadas en la remodelación ósea. La estructura y estabilidad del hueso están influenciados por fuerzas mecánicas, células óseas (osteocitos, osteoblastos y osteoclastos) y por diversas moléculas que intervienen en el metabolismo óseo. La disfunción o ausencia de una o más moléculas involucradas en la remodelación ósea conduce a susceptibilidad de fracturas o enfermedades sistémicas del hueso, como es la enfermedad de la osteoporosis^[1].

La ingeniería de tejidos centra su estudio en recuperar las características anatómicas y funcionales perdidas en el hueso, ya sea por traumatismos o enfermedades congénitas, valiéndose de la manipulación de compuestos sintéticos en combinación con células vivas, compuestos bioactivos o la utilización conjunta de éstos dos últimos^[2,3].

La osteoporosis es una enfermedad sistémica del esqueleto caracterizada por disminución de la masa y resistencia del tejido óseo y deterioro de la microarquitectura del mismo, lo que conduce a una alta propensión a la fragilidad ósea y susceptibilidad a fracturas^[4-7]. La etiología de esta enfermedad se considera como multifactorial^[8,9] y representa un problema de salud importante, ya que se estima que alrededor de 200 millones de personas en el mundo son afectadas por esta enfermedad, en el cual las mujeres son el principal grupo de riesgo^[10,11] con la llegada

de la menopausia, debido a la disminución de la producción de los estrógenos, hormonas que participan en la homeostasis ósea^[12].

Para el tratamiento de la osteoporosis existen diversas alternativas que incluyen fármacos antirresortivos con el fin de prevenir fracturas óseas a causa de la osteoporosis, y las terapias anabólicas cuyo objetivo se enfoca a incrementar la densidad mineral ósea perdida a causa del estado osteoporótico. Sin embargo, los estudios epidemiológicos apuntan hacia factores de riesgo que implican la afección de otros tejidos debido a los efectos secundarios de los tratamientos para la osteoporosis que van desde hemorragias nasales por el tipo de administración, úlceras gástricas, Osteonecrosis mandibular, hasta asociaciones a cáncer endometrial y de mama^[13].

La búsqueda de nuevas alternativas no sólo para prevenir sino para corregir la pérdida ósea es de gran importancia para el tratamiento de la osteoporosis abriendo un nuevo campo de investigación en la medicina ortopédica.

MARCO TEÓRICO

1. Tejido Óseo

El hueso es uno de los tejidos más duros en el organismo, es una forma de tejido conectivo^[14] y representa 20% de la masa de los organismos adultos^[15]. El hueso posee funciones importantes, tales como proporcionar soporte, locomoción, protección y brindar aporte hematopoyético^[16]. El hueso no es estático, se caracteriza por una reestructuración interna continua para adaptarse a los distintos cambios en la vida del organismo. El tejido preexistente es gradualmente reemplazado por nuevo tejido, con una velocidad que disminuye con la edad, se reestablecen las micro-fisuras, la resistencia del esqueleto y se regula la homeostasis mineral^[17]. El tejido óseo está sometido a modificaciones/cambios y responde a estímulos internos y externos por medio del recambio y en su estructura otros tejidos conectivos toman parte, tales como el hematopoyético, adiposo, vasos sanguíneos y nervios^[18]. Por medio de la remodelación ósea, los huesos son capaces de auto-repararse y de adaptar su estructura en respuesta a cambios mecánicos, biológicos y bioquímicos.

La fuerza del esqueleto depende de su matriz mineralizada y de su densidad mineral ósea; este último es un indicador de diagnóstico para alteraciones y enfermedades sistémicas del esqueleto, tales como osteopenia y osteoporosis. El hueso posee propiedades mecánicas con alta resistencia y capacidad de reparar lesiones que conducen a fracturas, por lo que estudios de ingeniería de tejidos han buscado imitar en las últimas décadas debido a la arquitectura única de este compuesto orgánico-inorgánico^[19]. El hueso se compone en gran parte, de depósito mineral reforzado con colágenas fibrilares (~ 5%). Sin embargo, en contraste con el cartílago, el hueso contiene sólo 10% de agua y un bajo contenido de proteoglicanos. La matriz ósea orgánica consiste típicamente de 95% de heterofibrillas de colágena tipo I y de tipo V (5%)^[20]. En el hueso, estas colágenas se ensamblan para formar fibrillas con un diámetro entre 50 y 100 nm, y se ha encontrado que es más grande que el diámetro de las heterofibrillas (de 15-45 nm) del cartílago no mineralizado^[21]. Ambos factores intrínsecos y extrínsecos afectan el diámetro de las fibrillas de la colágena: la relación

de colágenas heterotípicas (por ejemplo, colágenas de tipo I y tipo-V en hueso) y las interacciones de las fibrillas de colágena a proteoglicanos y otros componentes de la matriz extracelular (MEC)^[22-24]. El hueso está compuesto por el hueso maduro, en el que la matriz extracelular está formada predominantemente por colágena tipo I. La expresión de la colágena indica que se requieren factores adicionales para iniciar y controlar la formación de cristales de hidroxapatita y el mayor depósito de éste entre las fibrillas de colágena^[25].

La formación del tejido óseo nuevo en el embrión de los vertebrados se produce por dos procesos distintos de condensación: intramembranoso, que forma y permanece en la bóveda craneal y en maxilares; y endocondral, que forma los huesos largos. En la formación intramembranosa de hueso, el tejido o hueso primario se produce rápidamente sin un precursor cartilaginoso, es decir, el depósito de hueso se da directamente en el tejido conjuntivo primitivo (mesénquima), mientras que en la osificación endocondral se utiliza una plantilla vascularizada previamente formada de cartilago hialino, la cual sirve de estructura central en el hueso futuro^[26]. El desarrollo y mantenimiento del hueso está controlado por el balance dinámico entre la formación (vía osteoblastos) y la resorción ósea (vía osteoclastos). Las actividades de estas células son reguladas por varios factores genéticos y extrínsecos, y el desbalance entre estos factores es responsable de la pérdida ósea^[27-31].

2. Biomineralización

La biomineralización en humanos es un proceso fisiológico regulado por las interacciones moleculares extracelulares orgánicas y elementos minerales inorgánicos^[22]. Esta ocurre en dos fases: la primera inicia con la formación de cristales de hidroxiapatita (HA) dentro de las vesículas de matriz, seguido por la segunda fase en donde ocurre la propagación de la HA a través de la membrana de la vesícula dentro de la matriz extracelular^[32,33].

El proceso extracelular en el que las células osteoblásticas y osteocíticas están embebidas dentro de una matriz, se lleva a cabo por medio de diversas proteínas que ellas mismas secretan. Los cristales de hidroxiapatita constituyen la fase mineral que se deposita en la matriz orgánica y es la mayor forma cristalina de fosfato de calcio en el hueso y cartílago^[25].

El proceso de biomineralización debe reunir características específicas para permitir la nucleación y permanencia de los cristales minerales en la matriz, y para ello, es necesario que existan fuentes suficientes de iones de calcio y fosfato en el organismo. En el plasma y fluidos extracelulares del ser humano existen concentraciones de 5mg/dL de calcio y 3.5 mg/dL de fosfato; estas concentraciones son muy altas y, aunque es una característica importante para impedir la solubilidad del mineral de los tejidos, no es suficiente para que la nucleación de los primeros cristales minerales se dé de manera espontánea. Por esta razón, se necesita la participación de biomoléculas que conduzcan a la biomineralización y mantengan la homeostasis del tejido óseo^[34,35].

En sitios en los cuales no existe previamente mineral (como en las fases embrionarias), la mineralización que se inicia en hueso, cartílago, dentina y cemento tienen lugar dentro de vesículas de matriz en osteoblastos, condroblastos, odontoblastos y cementoblastos respectivamente, liberan estas vesículas de matriz, que son fragmentos rodeados por membrana plasmática con dimensiones nanométricas (50-200nm). Las vesículas mantienen la actividad de la enzima fosfatasa alcalina tejido-no-específico (TNAP), presente en la membrana de las células que

dieron su origen, así estos iones se acumulan activamente dentro de estas vesículas. Las proteínas Transmembranales (anexinas) forman los canales de calcio quienes permiten la entrada de los iones al interior. Como el volumen circunscrito dentro de las vesículas es muy pequeño, los iones de calcio y fosfato llegan rápidamente a concentraciones elevadas, nucleando los primeros cristales de hidroxapatita. Después, las células forman un estrato único y continuo, formando entre ellas uniones intercelulares que restringen el paso de iones y macromoléculas entre las células. De esa manera, las células rodean la matriz en formación separándola de los alrededores^[32,33,25].

Con el establecimiento de iones intercelulares, concluye la diferenciación de las células y entonces ellas son capaces de secretar proteínas no-colágenas con propiedades ácidas y, por lo tanto, con afinidad por el calcio. La matriz que estaba constituida principalmente por colágena tipo I y proteoglicanos sulfatados, contiene a partir de esa fase, aproximadamente de 90% de colágena y 10% de proteínas no colágenas, las cuales se asocian a las fibrillas colágenas, otorgándoles la capacidad para recibir cristales de mineral en su interior y sus alrededores^[22,32,25,33].

3. Osteoporosis

3.1. Historia y definición

Probablemente la osteoporosis haya existido siempre en la historia de la humanidad, sin embargo, con el incremento de la esperanza de vida, este problema ha ido en aumento en las últimas décadas. La osteoporosis se caracteriza por la pérdida de masa y resistencia ósea, que conduce a predisposición de fracturas, y representa un mayor problema clínico. El término de osteoporosis fue definido por Johann Lobstein, sin embargo la patología que había definido describía a la osteogénesis imperfecta^[36].

El término "osteoporosis" se introdujo por primera vez en la terminología en Francia y Alemania en el siglo XIX, como un término descriptivo haciendo hincapié en la porosidad de las apariencias histológicas del hueso humano en la edad adulta. Antes de esto, sin embargo, el trabajo publicado por Sir Astley Cooper sugiere que ciertos tipos de fracturas pueden ocurrir debido a la reducción relacionada con la edad o la calidad de la masa ósea^[37,38].

En 1940, Fuller Albright, endocrinólogo americano, describió la osteoporosis postmenopáusicas proponiendo que la consecuencia del defecto de la formación ósea se debía a la deficiencia de estrógenos, con ello, se propuso entonces que existían dos formas de osteoporosis: una debido a falta de estrógenos en la menopausia, y la segunda debido a la falta de calcio. Este fue reemplazado por el concepto actual, que la osteoporosis se debe a múltiples mecanismos patogénicos y es la causa de la pérdida de la masa ósea y deterioro de la microarquitectura del esqueleto, definido en 1993^[36,39-42], con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y la susceptibilidad a la fractura. Sin embargo, la definición de la osteoporosis ha evolucionado a lo largo del tiempo, que va desde el reconocimiento de la baja densidad mineral ósea, hacia las cualidades óseas que son responsables de fracturas por insuficiencia de la DMO, las cuales están relacionadas con: tamaño, morfología, propiedades del tejido y la matriz, y la remodelación del hueso^[43-45].

La Organización Mundial de la Salud se centró en proporcionar una definición que abarcara la densidad mineral ósea (DMO) y las fracturas previas. Esta definición engloba el deterioro de la mineralización de los huesos y no incluye ninguno de los

cambios de la microarquitectura que pueden debilitar el hueso de forma independiente de cualquier efecto sobre la DMO_[41]. Actualmente la OMS define la osteoporosis como una densidad ósea de la cadera o espina dorsal de 2.5 desviaciones estándar (DE) debajo de la cifra normal determinada en personas jóvenes, usualmente expresada como marcador T de -2.5 o menor a este marcador diseñado para mujeres posmenopáusicas y hombres menores de 50 años de edad_[46,47].

La osteoporosis también está definida como un desorden sistémico del esqueleto que está caracterizado en general por una pérdida trabecular y cortical y un cambio en la microarquitectura que conduce al riesgo de fractura. Sin embargo, existen muchos mecanismos fundamentales para la regulación del remodelado óseo, y esto no sólo involucra los linajes celulares osteoblásticos y osteoclastos, también otras líneas celulares de médula, además a la interacción de hormonas sistémicas, citocinas locales, factores de crecimiento y factores de transcripción_[48,36].

3.2 Epidemiología

El constante aumento de la carga social y económica a causa de la osteoporosis está asociado fuertemente al envejecimiento de la población mundial_[49, 50]. A nivel mundial, se estima que más de 200 millones de mujeres en el mundo están afectadas por la osteoporosis; una décima parte de éstas son mayores de 60 años, una quinta parte son mayores de 70, dos quintas partes tienen 80 y dos tercios son de 90 años de edad; y a causa de ello cada año ocurren más de 8.9 millones de fracturas, lo que resulta en una fractura osteoporótica cada 3 segundos _[51,52]. De esta manera, 1 de cada 4 mujeres mayores de 50 años sufrirá de fracturas osteoporóticas, y en el caso de los hombres 1 de cada 5 mayores 50 años_[53-55].

En algunos países de Europa, Estados Unidos y Japón, la osteoporosis afecta aproximadamente 75 millones de personas_[56]. En América Latina, de acuerdo a estudios desde 1990 se estima que en una proyección para el año 2050, el número de

fracturas de caderas para mujeres y hombres entre 50-64 años de edad se incrementará hasta un 400% y en grupos de edad mayores de 65 años el incremento sería hasta un 700%^[57]. En los estudios realizados hace un par de décadas, se reportó que en México 1 de cada 4 personas tiene osteopenia u osteoporosis ^[58] y la probabilidad de vida de tener una fractura de cadera a los 50 años de edad en las mujeres es del 8,5% y aproximadamente el 4% de los hombres ^[59]. Para el 2006, el costo estimado de la asistencia sanitaria de fractura de cadera fue de \$97 millones (de dólares)^[60].

Las fracturas de cadera son las fracturas osteoporóticas más comunes y para cualquier persona que sufre de esta condición adquiere un alto impacto económico, una alta morbilidad que puede llegar hasta la mortalidad. Esta se asocia con el dolor crónico, movilidad reducida, discapacidad y un creciente grado de dependencia^[61-63]. Entre los años 1990 y 2000 hubo un aumento de casi 25% de las fracturas de cadera en todo el mundo. El número máximo de fracturas de cadera se produjo de 75-79 años de edad para ambos sexos; para las demás fracturas, el número pico se produjo de 50-59 años y disminuyó con la edad; sin embargo el 75% de las fracturas de cadera corresponde al grupo femenino ^[64,65]. A los 50 años de edad, una mujer tiene un riesgo de 2.8% de muerte relacionada con la fractura de cadera, lo que equivale a su riesgo de muerte por cáncer de mama y 4 veces más que el riesgo de padecer cáncer de endometrio^[66]. Los índices de mortalidad por fracturas de cadera reportan que el 20% de los pacientes afectados mueren en el primer año después de la fractura y menos de la mitad de los que sobreviven no pueden recuperar su nivel de funcionamiento en su totalidad^[67].

La prevalencia e incidencia de fracturas vertebrales varía geográficamente, aunque según los reportes, parecen ser más bajas con respecto a las fracturas de cadera. Sólo una cuarta parte de las fracturas vertebrales ocurre como resultado de caídas, y la mayoría ocurre por actividades de rutina, tales como agacharse o levantar objetos ligeros. La prevalencia de fracturas vertebrales es alta tanto en hombres como en mujeres, sin embargo, en los hombres puede deberse a factores de ocupación

asociados a traumas^[4, 68]. En el caso del grupo femenino, una mujer a los 65 años de edad con una fractura vertebral tiene una probabilidad entre 1 y 4 de padecer otra fractura en los próximos 5 años, que podría reducirse por algún tratamiento^[69]. Se ha estimado que sólo un tercio de las fracturas vertebrales acuden a la atención clínica ^[68] y la falta de diagnóstico de fractura vertebral es un problema en todo el mundo. La proporción de fracturas vertebrales en América Latina es de 46%, en América del Norte es de 45% y el 29% en Europa/Sudáfrica/Australia^[70]. La prevalencia de fracturas vertebrales es del 42% en mujeres de avanzada edad y o quienes tienen una disminución de la masa ósea^[71,72]. En las mujeres, un rápido aumento de fracturas vertebrales, que se asocia inicialmente con el inicio de la menopausia, es seguido por un aumento en la frecuencia de fracturas de muñeca y cadera debido a la pérdida de masa ósea relacionada con la edad^[73].

Las mejoras en la evaluación de las fracturas se centran en la identificación de factores para una mejor comprensión sobre la etiología de fractura osteoporótica y proporcionar nuevos avances para la prevención^[74].

3.3 Diagnóstico

El diagnóstico para la osteoporosis se centra en la evaluación de la densidad mineral ósea y éste es el elemento principal que surge para la definición internacional de la osteoporosis: una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por una baja masa ósea y deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y la susceptibilidad a la fractura. Así, el diagnóstico de la osteoporosis dependerá de la medición de la masa y calidad ósea debido a que no existen medidas clínicas satisfactorias para medirla. La forma más fácil de diagnosticar la osteoporosis por mediciones de la densidad ósea es definir un umbral, definir un punto de corte para la DMO, que abarque en la mayoría de los pacientes con fracturas por osteoporosis. También se utiliza la medición de la DMO para evaluar el riesgo futuro de fractura, por lo que se necesita más de un punto de corte^[75,47].

Una vez que el crecimiento se ha detenido, la masa y la densidad ósea se mantienen muy constantes hasta cerca de los 50 años^[76]. Debido a la distribución de Gauss, los valores de densidad ósea en las personas pueden expresarse en relación con una población de referencia en unidades de desviación estándar. Esta capacidad reduce las dificultades de las diferencias en la calibración entre los instrumentos. Cuando las desviaciones estándar se utilizan en relación con la población joven saludable, esta medición se conoce como la puntuación T. Para las mujeres, se han propuesto cuatro categorías generales de diagnóstico por la OMS y modificado por la Fundación Internacional de Osteoporosis, para las evaluaciones realizadas con DXA:^[77,78]

- ✓ DMO-normal de la cadera superior a 1 DE por debajo de la media de referencia de mujeres adultas jóvenes (puntuación $T \geq -1$).
- ✓ Una baja masa ósea (osteopenia) de cadera con DMO mayor de 1 DE por debajo de las mujeres para el adulto joven, pero menos de 2.5 DE por debajo de este valor (puntuación $T < -1$ y > -2.5).
- ✓ **La osteoporosis- de cadera con DMO de 2.5 DE o más por debajo de la media de mujeres adultas jóvenes (puntuación $T \leq - 2.5$).**
- ✓ **La osteoporosis grave** (osteoporosis establecida) de cadera con DMO 2.5 DE o más por debajo del promedio para un adulto joven **en presencia de una o más fracturas por fragilidad.**

En las mujeres, la pérdida ósea se produce predominantemente después de la menopausia. En la población joven sana, el 15% de las mujeres tienen una puntuación T de menos de -1 y por lo tanto tienen una baja masa ósea u osteopenia^[79,80]. Debido a la distribución normal para la DMO, aproximadamente 0.5% de las mujeres cae en el rango osteoporótico, con una puntuación T de -2.5 o menos. La proporción de mujeres afectadas por la osteoporosis en cualquier sitio anatómico aumenta en gran medida con la edad de la misma forma a medida que aumenta el riesgo de fractura con la edad^[79]. Por dicha razón, el aumento de la prevalencia es aproximadamente exponencial y se ajusta al patrón de la frecuencia conocida de muchas fracturas

osteoporóticas en mujeres mayores. Cuando las mediciones se realizan en un sitio, por ejemplo en la cadera, a continuación, la prevalencia de la osteoporosis de cadera en mujeres de raza blanca de 50 años o más es de aproximadamente uno de cada seis, y ello significa que está cerca el riesgo de por vida de fractura de cadera^[81].

3.3.1 Pruebas bioquímicas

De acuerdo al historial clínico del paciente, se debe tomar en cuenta las pruebas de laboratorio en el que se incluye un panel bioquímico: el conteo sanguíneo completo, función de la glándula tiroides, nivel de la vitamina D, electroforesis de proteínas séricas o urinarias, nivel de la hormona paratiroidea y niveles de calcio en orina de las últimas 24 horas^[82,83]. Los marcadores del metabolismo óseo incluyen marcadores de la formación y resorción ósea, los cuales son útiles en algunas instancias para monitorear el curso de la terapia, pero no para ser usado en el diagnóstico de la osteoporosis^[84].

3.3.2 Mediciones del contenido mineral óseo

- **Absorciometría simple y dual de rayos X**

Actualmente la absorciometría dual de rayos X (DXA) se considera el estándar de oro para la medición de la densidad ósea y clasificación de la osteoporosis^[85]. La DXA es utilizada para medir el contenido mineral del esqueleto y de sitios específicos incluyendo aquellos más vulnerables a fracturas^[86]. El contenido mineral del hueso es la cantidad de minerales en el sitio específico escaneado y, cuando dividido por el área medida, se puede utilizar para derivar un valor para la densidad mineral ósea. Ambas técnicas proporcionan una imagen del área de dos dimensiones, en lugar de una verdadera densidad volumétrica. Por lo tanto, el tamaño del hueso afecta a la densidad aparente, ya que la relación entre el área y el volumen no es lineal. Este error puede mejorar el valor de la DMO como predictor del riesgo de fractura, ya que el tamaño del hueso también es un factor determinante de la fuerza del esqueleto. La densidad aparente se define como el producto de la densidad del material que

constituye a las trabéculas individuales y el volumen de fracción del hueso presente en la muestra. La precisión de DXA en la cadera excede 90%; aunque surgen ciertos errores residuales de diagnóstico por diversos motivos relacionados con la técnica en sí y la manera en que se aplica como en el caso de osteomalacia y osteoartritis_[47, 77,87,88].

- **Tomografía computarizada**

La tomografía computarizada (CT) cuantitativa se ha aplicado tanto al esqueleto apendicular como a la columna vertebral_[89-91] de todo el cuerpo. La CT cuantitativa es más útil en la evaluación de la densidad ósea trabecular, ya que proporciona una medida de la densidad volumétrica verdadera, en lugar de un resultado de zona ajustada (como en el caso con DXA). El hueso esponjoso es más sensible que el hueso cortical para muchas intervenciones. La CT puede, por lo tanto, ser utilizado para monitorear el efecto del tratamiento_[89]. Además, esta técnica evita el efecto de la enfermedad degenerativa, un inconveniente en particular para DXA en la columna vertebral. Las principales desventajas de la tomografía computarizada son una alta exposición a la radiación, las dificultades con el control de calidad y alto costo en comparación con los de DXA_[47].

- **Radiografía**

Este método es utilizado para el diagnóstico de la osteoporosis, sin embargo, posee baja sensibilidad. Existen varias características de la osteoporosis que se pueden identificar con esta técnica y que pueden ser útiles también en el diagnóstico diferencial. La fractura vertebral subclínica es un fuerte factor de riesgo para siguientes fracturas en nuevos sitios vertebrales y en otros sitios susceptibles a osteoporosis. Por lo tanto, hay gran interés en la identificación de las deformidades vertebrales debido a la osteoporosis que podrían no haber llegado a la atención clínica. Sin embargo, de las técnicas que se han desarrollado para evaluar la masa ósea o la estructura del esqueleto, la técnica que se ha pagado la mayor cantidad de

atenciones en términos de desarrollo técnico y validación biológica es DXA, que es considerado como el estándar de oro para el diagnóstico de la osteoporosis^[81].

3.4 Factores de riesgo

Se han identificado muchos factores de riesgo para la osteoporosis, y ciertos factores varían en importancia de acuerdo a la edad. Por ejemplo, los factores de riesgo de caída, deficiencia visual, movilidad reducida, y el tratamiento con sedantes y corticoides, son los más fuertes predictores de fracturas en los ancianos que en los individuos más jóvenes^[80,54].

- **Sexo, edad y etnia**

Las mujeres tienen una mayor incidencia de fracturas por osteoporosis que los hombres, más del 25% de las cuales son fracturas vertebrales ^[55]. La incidencia de fracturas osteoporóticas es mayor en las mujeres posmenopáusicas de origen caucásico (o consideradas de raza blanca), sin embargo mujeres y hombres de otras razas también presentan riesgos para padecerla. En comparación con los hombres, las mujeres presentan menor tamaño esquelético, menor cantidad de tejido mineral y menor masa muscular, por lo que el riesgo es más alto que en los hombres, además que a partir del periodo de la menopausia, la desregulación de la homeostasis que regulan ciertas hormonas en el metabolismo óseo disminuyen, por lo que su sistema esquelético es más susceptible a padecer la osteoporosis que en el hombre^[49].

- **Factores metabólicos**

El hipogonadismo es un importante factor de riesgo para ambos sexos. En mujeres jóvenes, el hipogonadismo puede ser primario o secundario en condiciones como anorexia nerviosa, amenorrea inducido por el ejercicio, hiperprolactinemia y desórdenes ginecológicos. La menopausia prematura, ya sea espontánea o inducida por cirugía, quimioterapia o radioterapia se consideran los riesgos más fuertes asociado a la osteoporosis. En hombres, el hipogonadismo puede estar causado por

varios desórdenes, incluyendo el síndrome de Klinefelter, hipopituitarismo, hiperprolactinemia y castración (por ejemplo, después de la cirugía prostática)^[47].

- **Consumo de corticoides**

La osteoporosis posmenopáusica es la causa más común para las fracturas vertebrales, mientras que la osteoporosis inducida por glucocorticoides es la segunda causa y más común para la osteoporosis secundaria. Los glucocorticoides son una importante causa de osteoporosis. La pérdida ósea se cree que es más rápida en los primeros meses de tratamiento y sus efectos en el esqueleto axial y apendicular, pero es más pronunciado en la espina, donde predomina el hueso esponjoso. La pérdida ósea puede ser evitada por la terapia de inhalación de glucocorticoides^[92,93]. Los glucocorticoides reducen la formación ósea osteoblástica, esto ocurre a través de una reducción en el número de osteoblastos. La osteoporosis inducida por glucocorticoides se produce en dos fases: una fase rápida y temprano en el que se reduce la densidad mineral ósea, presumiblemente debido a la resorción ósea excesiva; y una fase más lenta y progresiva en el que la DMO disminuye debido a la formación de hueso deteriorado^[94,95]. El riesgo relativo (RR) para fractura vertebral es de 5.2 con dosis >7.5 mg de prednisona por día o equivalente, mientras que con dosis menores a ese valor umbral el RR es <5. Sin embargo, dosis tan bajas como 2.5 mg de prednisona aumentan el RR cuando los sujetos tratados se comparan con una población que no recibe corticoides. El aumento del RR es dependiente de la dosis y del tiempo de administración, y disminuye progresivamente cuanto más tiempo pasa desde la interrupción del corticoide. Se considera que cuando el índice de masa corporal (IMC: kg/m²) es inferior o igual a 20, el sujeto es delgado y tiene un factor de riesgo para desarrollar osteoporosis; en mujeres puede tomarse simplemente el bajo peso (<55 kg) como indicador de riesgo para la osteoporosis^[10].

- **Sedentarismo**

La inmovilización de pacientes o cada astronauta que experimenta la ingravidez producen alteraciones en la homeostasis del calcio y la pérdida de tejido mineral; por

lo tanto conducen a la osteoporosis. El ejercicio influye en forma positiva durante la etapa de crecimiento para aumentar la masa ósea; en la vida adulta favorece su mantenimiento. Es importante para conservar un tono muscular adecuado y mejorar los reflejos, factores que disminuyen la incidencia de caídas que predisponen a fracturas^[96].

- **Otros factores de riesgo**

Los niveles elevados de marcadores del recambio óseo constituyen un indicador de riesgo aumentado de fracturas, independientemente del valor de la densitometría mineral ósea (DMO)^[97,98]

El riesgo de osteoporosis está aumentado en los fumadores y personas alcohólicas. Esta población suele ser más delgada y tener menor actividad física, motivos que influyen negativamente sobre la masa ósea además, el tabaco actúa negativamente por múltiples mecanismos patogénicos^[99,100]. También es importante señalar la deficiente nutrición y la disminución de la ingesta del calcio en la dieta^[101]. En los estudios de casos y control de las fracturas de cadera en hombres y mujeres fue incrementado el riesgo con desórdenes asociados con osteoporosis secundaria con previo hipertiroidismo, cirugía gástrica e hipogonadismo^[65,80].

- **Fracturas previas**

Las personas con antecedente de fracturas por traumas leves tienen un riesgo mayor de sufrir nuevas fracturas osteoporóticas en el futuro. La presencia de dos o más fracturas vertebrales se asocia con 12 veces más aumento de riesgo de fractura por cualquier DMO específica^[10,102,47].

3.5 Fracturas

La osteoporosis es el mayor problema de salud y la posibilidad de predecir el riesgo de fractura es esencial para las personas quienes cursan esta enfermedad. Las fracturas osteoporóticas son el resultado de una combinación de la fuerza reducida y el aumento acelerado a la disminución del hueso. Aunque la densidad mineral ósea sigue siendo la mejor evaluación disponible no invasiva de la resistencia ósea en la práctica clínica rutinaria, muchas otras características del esqueleto también contribuyen a la resistencia ósea. Estos incluyen la microarquitectura ósea (forma y geometría), la microarquitectura ósea (tanto trabecular y cortical), la matriz y la composición mineral, así como el grado de mineralización, la acumulación de micro-lesiones, y el recambio óseo, que puede afectar a las propiedades estructurales del hueso^[103,104].

Las fracturas osteoporóticas son de importancia socioeconómica y de salud global. Los sitios más comunes de fracturas osteoporóticas incluyen la vértebra, cuello femoral y el radio distal, donde la información de la microestructura es una clave para el total entendimiento de la patogénesis y la mejor predicción del riesgo de fractura^[105].

3.5.1 Fracturas vertebrales

La resistencia vertebral está preservada por el hueso trabecular, el cual no es microestructuralmente homogéneo, con bajo volumen óseo en las regiones superior anterior y central (figura 1)^[105]. Los cuerpos vertebrales aportan una interesante área de investigación biomecánica después de algún tratamiento antiosteoporótico que promueven el crecimiento trabecular así como del hueso cortical^[106,107]. Las fracturas vertebrales son un indicador clínico de la progresión de la osteoporosis y proporcionan información del riesgo de fractura en curso y de futuras fracturas osteoporóticas independientemente de la densidad mineral ósea, por ello se han utilizado nuevas técnicas de compresión mecánica para evaluar los efectos de grado de mineralización^[108].

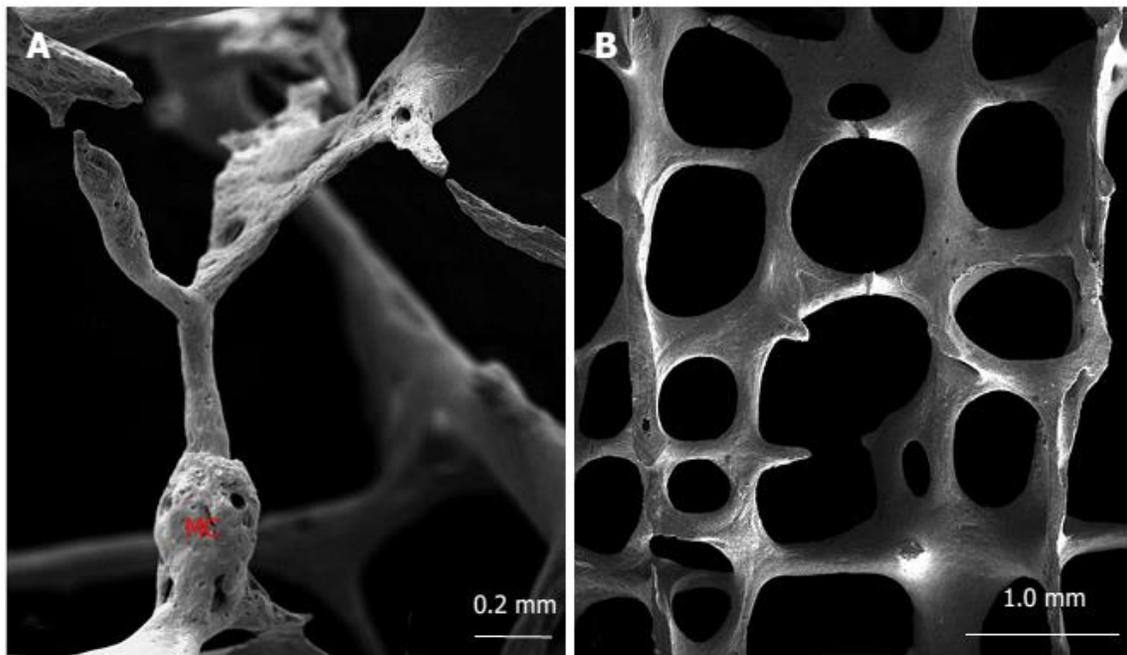


Figura 1. Imagen de microscopio electrónico de Barrido de hueso trabecular vertebral^[109]. A, el micro-callo (MC) es vista en la trabécula vertical. B, las trabéculas verticales son relativamente más gruesas que las horizontales.

3.5.2 Fracturas femorales

Las fracturas del cuello femoral relacionadas con la osteoporosis son una causa importante de mortalidad y morbilidad en personas de edad avanzada en todo el mundo^[110,5]. El cuello del fémur tiene que soportar altas compresiones y fuerzas de corte continuamente. Estas fuerzas son aproximadamente de 1 x peso corporal (BW) al estar de pie, pero son mucho más altas durante las actividades físicas^[105,111]. Estas fracturas se consideran ser la causa para la pérdida del hueso esponjoso y el adelgazamiento del hueso compacto^[112]. La fractura del cuello femoral generalmente está inducida por alguna caída, pero puede estar ocasionada por un impacto de cadera. Cuando el hueso comienza a debilitarse por la osteoporosis, solo con una ligera fuerza externa es suficiente para hacer más susceptible el cuello femoral a la fractura.

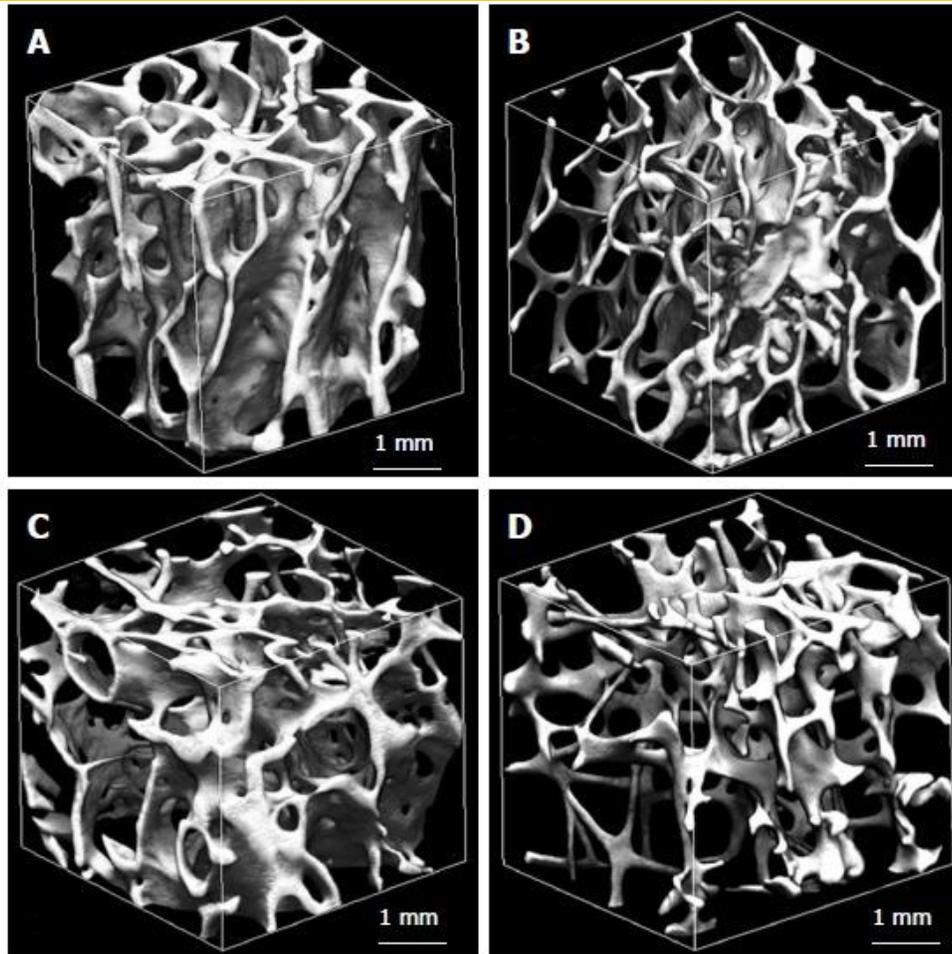


Figura 2. Microestructura trabecular del cuello femoral de un hombre de 62 años (A); hombre de 92 años (B); mujer de 62 años (C); mujer de 92 años (D)^[112]. El hueso trabecular es mayor en un hombre de mediana edad de 62 años y es más bajo en una mujer de 92 años de edad.

3.6 Mecanismos de patogénesis en la osteoporosis

Son tres los componentes principales que forman parte de la estructura ósea: El componente mineral, matriz orgánica y componente celular. El componente principal del hueso son los cristales de calcio y fosfato depositado en una matriz compuesta por fibras proteicas, fundamentalmente colágena tipo I en el 90% y proporcionan al tejido óseo flexibilidad y elasticidad relativa. El componente mineral es el responsable de la

rigidez ósea, y su exceso o disminución tienen efectos adversos en la estabilidad ósea^[36,113].

El tejido óseo se encuentra susceptible a fragilidad y ello se puede deber a diversas causas: a) falla en la producción de una masa esquelética óptima y de la resistencia durante el proceso de crecimiento, b) excesiva resorción ósea que causa una disminución y deterioro de la microarquitectura del esqueleto, c) formación ósea inadecuada, como respuesta al incremento de la resorción durante la remodelación ósea^[114,36].

Para entender la fisiopatología de fragilidad esquelética, debido a una excesiva resorción ósea y a una formación ósea inadecuada, es necesario entender el proceso de remodelación óseo, en el que la principal actividad es de las células óseas en el esqueleto adulto. El proceso de remodelado óseo incluye un proceso de resorción mantenido por la actividad osteoclástica y un efecto de formación ósea mantenido por la actividad osteoblástica^[115,36,116]. La regeneración ósea es un proceso que puede ocurrir tanto en la superficie trabecular como en el hueso cortical. El proceso inicia con la activación de precursores hematopoyéticos de los osteoclastos, los cuales normalmente requieren de la interacción de la línea osteoblástica^[117,36]. La fase de resorción de la remodelación ósea es corta, y el periodo de reemplazo osteoblástico es largo. Hay múltiples causas por las cuales se incrementa la resorción osteoclástica que provoca la fragilidad esquelética^[118-120] y conducen a la pérdida ósea como sucede en la osteoporosis.

La formación de cristales mineralizados se presenta inicialmente en los espacios de las fibras de colágena. Las fibras de colágena proporcionan una estructura que funciona como andamio sobre el que se relacionan otras proteínas, las cuales cumplen funciones diversas^[121,122]. Las proteínas no colágenas secretadas en el hueso participan activamente en el proceso de mineralización y en última instancia controlan el sitio y la cantidad de cristal mineral que se deposita, así como la determinación de la calidad y propiedades biomecánicas comprendidas en su fase orgánica y mineral^[25].

3.6.1 Fosfatasa Alcalina

Existen dos tipos de isoenzimas de fosfatasa alcalina contenidas en el suero: fosfatasa alcalina de tejido específico que participa en células germinales, placenta e intestino, y la fosfatasa alcalina tejido-no-específica con presencia en hígado, hueso y riñón. Ambas están codificadas por diferentes genes en los cromosomas 2 y 1 respectivamente^[121-123]. La TNAP es una proteína glicosilada que se encuentra en la porción externa de la membrana citoplasmática^[124] y también se encuentra en las vesículas de matriz con una participación importante para promover la mineralización al regular las concentraciones extracelulares de fosfatos debido a que cataliza la hidrólisis del pirofosfato inorgánico (PPI) y por lo tanto disminuye las concentraciones de este inhibidor de la mineralización, mientras que incrementa los niveles de fosfato inorgánico (Pi). La fosfatasa alcalina es el marcador bioquímico más ampliamente conocido para la actividad osteoblástica^[125,126]. Su actividad se incrementa cuando inicia el proceso de mineralización de la matriz extracelular, por lo que es un marcador temprano de la biomineralización^[33,127]. Se ha identificado en placas de crecimiento de cartílago, células endosteales, células de médula ósea, osteoblastos y cementoblastos^[124]. La fosfatasa alcalina específica de hueso ha demostrado ser un marcador para el metabolismo óseo más confiable que la fosfatasa alcalina total proporcionando información acerca del recambio óseo en pacientes con enfermedades óseas metabólicas^[128] como en la osteoporosis.

3.6.2 Osteocalcina

La osteocalcina es la proteína no colágena más abundante de la matriz extracelular **también conocida como proteína ácida de hueso γ -carboxiglutámico (Gla)** o BGP, los que se asocian con sus propiedades de unión a calcio y cristales de hidroxapatita^[129]. Posee una secuencia de 46 a 50 aminoácidos, con un peso de 5,6 kDa de proteína secretada y es producida exclusivamente por osteoblastos^[130]. Es específica del hueso y dentina, se encuentra elevada en situaciones de recambio óseo acelerado. Su función exacta en el remodelado óseo no está bien establecida pero se

ha analizado el papel que podría desempeñar en su forma intracarboxilada en la predicción de masa ósea y en el riesgo de fractura^[131,132].

La osteocalcina ha sido utilizada como un marcador sérico rutinariamente de la formación ósea osteoblástica y se cree que actúa en la matriz para regular la mineralización, pero nuevas evidencias genéticas y farmacológicas apuntan a esta proteína con un papel hormonal^[133, 131]. La osteocalcina carboxilada madura se empaqueta en vesículas intracelulares para la secreción en la matriz ósea y se secreta en el microambiente óseo para luego sufrir un cambio conformacional que se alinea sus residuos Gla de unión a calcio con los iones de calcio en hidroxapatita. Esta propiedad fue propuesta inicialmente como un mecanismo para permitir a la osteocalcina iniciar la formación de estos cristales^[134]. Algunos estudios han hipotetizado que la osteocalcina ejerce una función mecánica dentro de la matriz ósea como resultado de la capacidad de unirse herméticamente a la hidroxapatita y formar un complejo con la colágena a través de otra proteína de matriz como la osteopontina^[135,136].

3.6.3 Sistema RANKL - RANK

RANKL es el Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear κ B. Es una citosina involucrada en la diferenciación de células precursoras de osteoclastos y promueve el aumento de la actividad y supervivencia de osteoclastos^[137]. RANKL es expresado por muchos tipos celulares incluyendo osteoblastos, células endoteliales y linfocitos T activados^[138,139]. El único receptor para RANKL, es RANK y esta unión es capaz de inducir una señal de transducción crucial para conducir al desarrollo del osteoclasto desde células progenitoras hematopoyéticas así como en osteoclastos maduros (figura 3)^[140]. La unión de RANK con RANKL puede promover la formación, activación y supervivencia de los osteoclastos durante el remodelado óseo así como una gran variedad de condiciones patológicas. Los genes que codifican para estos productos son bien aceptados como genes que pueden influenciar al desarrollo de la osteoporosis^[141,142]. RANK es esencial para la osteoclastogénesis, ya que se ha reportado que los ratones deficientes de RANK exhiben osteopetrosis severa^[143].

3.6.4 Osteoprotegerina

La osteoprotegerina (OPG) es un miembro de la superfamilia de proteínas receptoras de factor de necrosis tumoral y está expresada por osteoblastos así como por otros tipos celulares incluyendo a linfocitos de sangre periférica_[144-147]. Esta proteína soluble es un señuelo que es liberado por los osteoblastos y se une a RANKL, por medio de una inhibición competitiva para la unión a RANK (expresado en la superficie de osteoclastos) para bloquear la formación osteoclástica e inhibir la resorción_[148,149]. Estudios acerca de esta vía han explicado cómo diversas señales fisiológicas y patofisiológicas extraen sus efectos en la formación osteoclástica, función y supervivencia y recientemente sobre el control del remodelado esquelético y la masa ósea_[150]. Estudios muestran que la deficiencia de OPG exhiben osteoporosis grave causada por el aumento de la resorción osteoclástica_[151]. OPG y RANKL son moléculas que juegan un importante papel en la formación del osteoclasto y potencialmente regulan la resorción del tejido duro_[141].

3.6.5 Estrógenos

Son hormonas esteroideas producidas primariamente en los ovarios, cuerpo lúteo y placenta, aunque una pequeña pero significativa cantidad de estrógenos también pueden ser producidos por órganos no gonadales (como hígado, corazón, piel y cerebro)_[152]. En hombres, la enzima aromatasa puede convertir la testosterona en estradiol, y se ha observado que tiene influencia en la composición del cuerpo, fuerza y función sexual_[153]. Existen tres tipos de estrógenos: Estrona (E1), Estradiol (E2 ó **17 β** -estradiol) y Estriol (E3); y cada forma de estrógeno presenta diferentes productos liberados a partir del colesterol por diferentes reacciones a través de la biosíntesis de estrógenos. E2, es el estrógeno más abundante de toda la biosíntesis de estrógenos, y es el estrógeno más potente durante el periodo pre-menopáusico en la vida de la mujer, mientras que E1 juega un papel después de la menopausia, cuando estos son sintetizados en tejido adiposo a partir de la dehidro-epiandrosterona-adrenal. E3 es el estrógeno menos potente y está formado a partir de E1 por hidroxilación, y juega un papel importante durante el embarazo, produciéndose

grandes cantidades en la placenta. La desactivación estrogénica, como los niveles de E2, pueden ser regulados por metabolismos específicos, incluyendo la conversión desde E2 a una forma menos activa como E1 o E3_[152,154].

3.6.6 Importancia de Estrógenos en el metabolismo óseo

Es bien conocido que los estrógenos tienen un papel multifuncional e influyen en el crecimiento, diferenciación y función en muchos tejidos. Son esenciales para el crecimiento y desarrollo óseo, así como para el mantenimiento de la salud ósea en la edad adulta. La deficiencia de estrógenos en el inicio del periodo de la menopausia se asocia a la pérdida ósea_[155,12]. La función del estradiol, consiste en estimular la expresión de OPG y disminuye así la expresión de RANKL en osteoblastos. El estrógeno desencadena una serie de respuestas celulares en osteoblastos y osteoclastos a partir de dos receptores de estrógenos de alta afinidad (**ER α** y **ER β**). Los osteoblastos sintetizan RANKL, necesario para la función y formación de osteoclastos, y la osteoprotegerina (OPG), su receptor señuelo_[155].

La deficiencia de estrógenos es el factor más influyente para padecer osteoporosis en la mujer_[156]. Previos estudios_[157,158] sugieren que el estrógeno ovárico preserva la masa ósea por restricción local de citosinas que promueven la resorción ósea; por lo tanto la producción deficiente de estrógenos en el periodo de la menopausia promueve la resorción ósea_[157]. En mujeres posmenopáusicas que carecen de estrógenos, están afectados por la osteoporosis_[159]. Diversos estudios han demostrado que la terapia de estrógeno juega un papel osteo-protector tanto en humanos como en roedores con osteoporosis_[160].

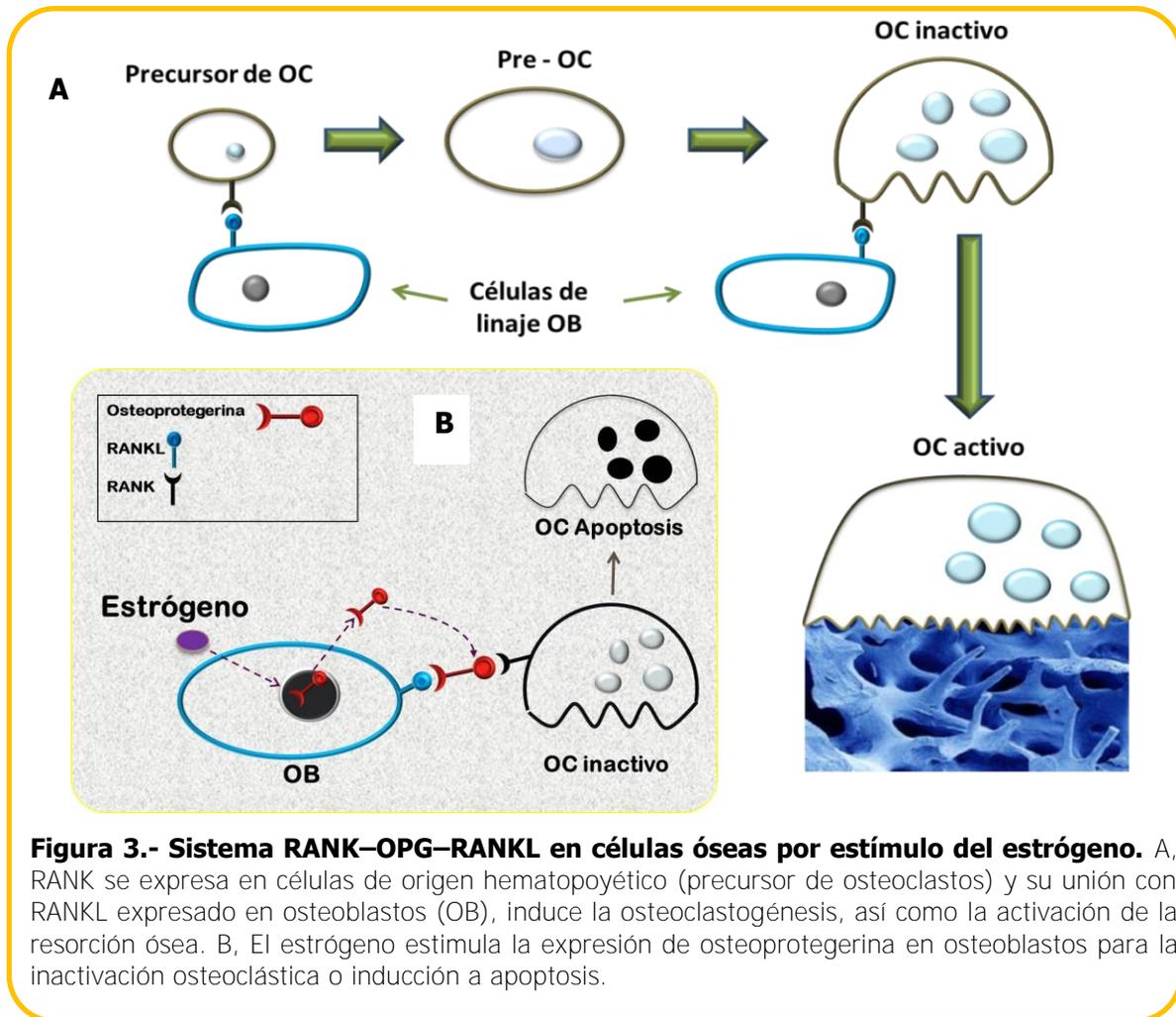


Figura 3.- Sistema RANK–OPG–RANKL en células óseas por estímulo del estrógeno. A, RANK se expresa en células de origen hematopoyético (precursor de osteoclastos) y su unión con RANKL expresado en osteoblastos (OB), induce la osteoclastogénesis, así como la activación de la resorción ósea. B, El estrógeno estimula la expresión de osteoprotegerina en osteoblastos para la inactivación osteoclástica o inducción a apoptosis.

3.7 Tratamiento

La mayoría de las fracturas ocurren como el resultado de caídas, y por ello es importante la disminución de este riesgo. El objetivo de las terapias farmacológicas para la osteoporosis es la de prevenir las fracturas a través de la inhibición de la resorción ósea así como también la estimulación de formación ósea^[161]. Existen dos clasificaciones de fármacos para el tratamiento de la osteoporosis: los **anticatabólicos o agentes antirresortivos**, cuyo objetivo es detener el proceso de la resorción ósea; la segunda clasificación incluye a los agentes anabólicos, cuyo objetivo es no sólo detener la resorción sino incrementar la DMO perdida a causa de la osteoporosis. Entre los tratamientos antirresortivos se encuentra la administración de

vitamina D, el Calcio, la terapia hormonal (derivados de estrógenos), bisfosfonatos, los moduladores selectivos del receptor de estrógeno, y la calcitonina^[4,162]; y actualmente sólo se ha aprobado a la Teriparátida como terapia anabólica ^[163-165].

3.7.1 Anticatabólicos/Antirresortivos

El calcio y la vitamina D tienen distintas funciones en la fisiología del hueso, sin embargo muchos ensayos han examinado diferentes combinaciones de estos dos tratamientos. La suplementación de sólo calcio ofrece pequeños efectos beneficiosos sobre la DMO durante toda la vida después de la menopausia y podría reducir ligeramente la tasa de fracturas. El bajo nivel de vitamina D se ha asociado con una reducción de la DMO, un alto recambio óseo, y un mayor riesgo de caídas y de fracturas de cadera en los ancianos, pero existen dificultades para establecer las concentraciones adecuadas de vitamina D^[10]. Diversos estudios^[166-170] sugieren que el calcio solo o en combinación con la vitamina D tiene sólo un efecto modesto sobre el riesgo de fractura y que es más probable que la vitamina D sea eficaz en individuos con deficiencia de ésta.

Las terapias de reemplazo hormonal incluyen la combinación de estrógenos y progesterona. Se ha visto que la combinación de éstas reducen significativamente las fracturas vertebrales, de cadera, antebrazo y muñeca. Además, este tipo de tratamiento está indicado para aliviar los síntomas de la menopausia tales como la sequedad vaginal, bochornos y reduce el riesgo de cáncer de colón; sin embargo posee efectos colaterales que incluyen el riesgo de desarrollar cáncer de mama, tromboembolia venosa, enfermedad de arterias coronarias e infarto. También existe preocupación acerca del cáncer endometrial en el útero cuando la terapia de estrógenos no es prescrita junto con la terapia de progesterona. Empero, esta terapia estrógeno/hormona ha sido aprobada por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, por su acrónimo en inglés *Food and Drug Administration*) para la prevención de la osteoporosis, alivio de los bochornos y atrofia vulvovaginal^[171-174].

El Raloxifene es una droga de receptor agonista de estrógeno/antagonista aprobada por la FDA para la prevención de la osteoporosis como droga anti-catabólica. Su administración incrementa la DMO en la espina lumbar, cadera y en el cuello del fémur. Reduce el riesgo de fracturas vertebrales y recientemente recibió una aprobación adicional por la FDA como droga que permite la disminución del riesgo de cáncer de mama no invasivo. Sus efectos colaterales incluyen el riesgo de tromboembolismo venoso y bochornos^[175,176].

La calcitonina es un agente biológico de la clase anti-catabólica y es una droga aprobada por la FDA y ha probado tener efectos positivos para el tratamiento de la osteoporosis. Sus efectos reflejan que es útil para incrementar la DMO ligeramente de la espina dorsal y cadera, y se determinó que su administración reduce las fracturas vertebrales, pero no se comprobó algún beneficio para reducir las fracturas de cadera o las fracturas no vertebrales^[177]. Debido que es prescrito como atomizador nasal, sus efectos colaterales incluyen irritación y sangrado nasal ocasional. Asimismo tiene un posible efecto analgésico en pacientes con fracturas de compresión vertebral^[178].

Los Bifosfonatos son un grupo de agentes antirresortivos que disminuyen la resorción ósea por medio del mecanismo de inhibición de la función osteoclástica y ello representa un gran avance en el tratamiento de la osteoporosis. Éstos son análogos químicamente estables del pirofosfato inorgánico y se utilizan principalmente en pacientes con metástasis ósea y osteoporosis como prevención y tratamiento. Los diferentes tipos de Bifosfonatos incluyen el alendronato, residronato, ibandronato y ácido zoledrónico. Éstas exhiben diferentes grados de potencia según el tipo de osteoporosis que presenten^[179] y han probado ser efectivas para mantener la DMO en sitios susceptibles a fracturas por la disminución de la masa ósea ^[179-181]. Entre los efectos secundarios que se han asociado a este tipo de fármacos se encuentra la irritación gastrointestinal, dolor muscular, y osteonecrosis mandibular^[182,183].

Los inhibidores de RANKL como el Denosumab, son anticuerpos monoclonales producido contra el receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$ -ligando (RANKL). Cuando

el Denosumab se une a RANKL, inhibe la formación osteoclástica, su función y sobrevivencia y por ello, la DMO se incrementa y la resorción ósea se detiene. Se ha determinado que el Denosumab reduce las fracturas vertebrales, no vertebrales y fracturas de cadera en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis^[184].

3.7.2 Agentes anabólicos

A diferencia de las terapias anteriormente mencionadas que actúan principalmente para reducir la resorción ósea, la primera terapia claramente anabólica que estimula la formación de hueso es la hormona paratiroidea^[185]. En mamíferos, la hormona paratiroidea (PTH) regula la homeostasis del calcio. La PTH posee en la forma larga que consiste de 84 aminoácidos, sin embargo los fragmentos de la N-terminal son responsables de sus efectos metabólicos. Se ha demostrado que la intermitente inyección de PTH proporciona un efecto osteo-anabólico, mientras que la continua administración de PTH por infusión produce efectos catabólicos en el hueso cortical^[186]. La combinación de PTH con estrógenos ha demostrado un efecto osteoanabólico^[187]. También hay evidencia de que la respuesta a la PTH puede ser modificado por el tratamiento previo con antirresortivos. Por ejemplo, el tratamiento previo con alendronato resultó en una respuesta de DMO atenuada con teriparatida, mientras que en los tratados anteriormente con raloxifeno, la respuesta de la densidad mineral ósea no fue diferente que en los pacientes sin tratamiento previo^[188]. Sin embargo, no se ha probado su eficacia para el tratamiento de fracturas de cadera. En estudios en ratas la administración de esta droga está asociada a la presencia de osteosarcomas. Sus efectos colaterales mayores incluyen: hipercalcemia, calambres en las piernas y mareo. Debido a su asociación con el desarrollo de los osteosarcomas, la FDA ha limitado su administración a los 24 meses^[189].

3.7.3 Nuevos agentes

Actualmente han surgido nuevos agentes para el tratamiento de la osteoporosis con el fin de contar con otras alternativas que cumplan con los requerimientos de prevenir las fracturas a causa de esta enfermedad. Entre ellos, se encuentra el Ranelato de estroncio que ha sido aprobado en la Unión Europea para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica debido a que incrementa la formación ósea y reduce la resorción; sin embargo, este mecanismo de acción aún no es muy claro. El ranelato de estroncio posee eficacia contra fracturas vertebrales y no vertebrales y podría ser alternativa a los bisfosfonatos en el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica^[190]; sin embargo, entre los efectos secundarios, destaca por su gravedad en la trombosis venosa, el tromboembolismo pulmonar, y los efectos secundarios dermatológicos, entre los que se incluyen el síndrome de Stevens Johnson, la necrolisis epidérmica tóxica y una reacción de hipersensibilidad grave conocida como DRESS (acrónimo formado por las iniciales en inglés de Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms)^[191].

3.8 Modelos de estudio para osteoporosis

La Ovariectomía es actualmente el modelo ampliamente más estudiado para mimetizar el proceso de Osteoporosis posmenopáusica, debido a que la abstinencia de estrógenos causa un rápido incremento de la resorción ósea asociada con una disminución sustancial de la masa ósea^[192]. Los experimentos en modelos animales en los que se han realizado la ovariectomía (también llamada ooforectomía) incluyen mini cerdos, monos, conejos ^[193-196]. Otros modelos osteoporóticos incluyen la inducción de glucocorticoides estudiados en embriones y adultos de pez cebra^[197] al igual que la supresión de expresión génica (knowkout) para la generación del fenotipo osteoporótico^[115].

4. Proteína de Adhesión del Cemento radicular (HACD1/CAP).

De los tejidos mineralizados en el humano, el cemento radicular contiene **moléculas específicas expresadas únicamente por cementocitos, cementoblastos** y sus **células progenitoras presentes en el ligamento periodontal**. Estas moléculas únicas son la **Proteína de Adhesión del Cemento radicular (HACD1/CAP)** y la Proteína del Cemento 1 (CEMP1), y se cree que regulan las actividades biológicas de las células del ligamento periodontal_[198-203].

En estudios previos se clonó e identificó un ARNm a partir de una biblioteca derivada de un línea celular de un fibroma cemento-osificante humano, que codifica para una isoforma truncada de la 3-hidroxiacil-CoA-dehidratasa 1 antiguamente denominada PTPLa y actualmente denominada **HACD1**_[198]. El gen que codifica a **CAP** se localiza en el cromosoma 10, región p13-p14 y posee 6 exones. Este gen codifica para dos productos: uno de 288 (proteína tirosina fosfatasa A) y otra de **140 aminoácidos**, respectivamente. La proteína de 288 aminoácidos es la HACD1 que está expresada en el desarrollo y en etapas posnatales de músculo esquelético e implicada en la elongación de los ácidos grasos de cadena muy larga en la formación de la fibra muscular_[204,205]. El RNAm que codifica a la proteína de 140 aminoácidos corresponde a la proteína de Adhesión del Cemento Radicular, en el que 125 aminoácidos del Amino-terminal son idénticos a HACD1 y su ADNc está conformado por 1435 pares de bases_[206]. El resto del Carboxilo-terminal de CAP constituye el sitio de splicing donador en el exón 2 de HACD1. **HACD1/CAP** posee dos sitios transmembranales y la proteína se trunca después del segundo sitio transmembranal. Esta truncación elimina la secuencia de HACD1 "IVHCLIGIVPT" la cual es el motivo de sitio activo de fosfatasa y es sustituido por la secuencia de **15 aminoácidos VSFPSCCFSIAVIFM** (Val-Ser-Fen-Pro-Ser-Cis-Cis-Fen-Ser-Iso-Ala-Val-Iso-Fen-Met). Por lo tanto, CAP es una isoforma y splicing alternativo de HACD1_[198].

HACD1/CAP fue la primer proteína específica aislada e identificada del **cemento radicular** humano y se ha demostrado que juega un papel importante en el

reclutamiento y diferenciación en la formación del cemento^[200,207,208,201,203]. Además, posee gran afinidad a la fibronectina y a la hidroxiapatita^[207].

Los análisis *in silico* indican que la carga eléctrica de HACD1/CAP es neutra (pI 7.78), así mismo, refieren que es una proteína hidrofóbica y que su localización es citoplasmática en un 94.19% debido a la carencia de péptido señal. También estos análisis sugieren la existencia de modificaciones postraduccionales, particularmente fosforilaciones, y se ha demostrado que incrementa los niveles de fosfatasa alcalina, y está activamente presente en la biomineralización. Estudios que se han realizado con esta proteína en un sistema libre de células han demostrado que CAP tiene el potencial para formar cristales de hidroxiapatita. Las vías de señalización intracelular involucradas que se han identificado y se propone participan en proliferación y diferenciación celular son la vía de Smad-1 (vía canónica de señalización de BMP) y la vía de MAPK^[198-207]. Por ello se deduce que la proteína CAP está involucrada en procesos de biomineralización.

4.1 Péptido de CAP (pCAP)

Como se mencionó anteriormente, HACD1/CAP codifica para un producto de 140 aminoácidos y el splicing alternativo ocurre exactamente en el sitio de actividad de la HACD1. Este splicing alternativo comprende los últimos 15 aminoácidos de la secuencia de la proteína en el Carboxilo terminal: VSFPSCCFSIAVIFM (Val-Ser-Fen-Pro-Ser-Cis-Cis-Fen-Ser-Iso-Ala-Val-Iso-Fen-Met), por lo que se infirió que su función podría ser diferente. Este péptido posee un peso molecular de 1.65 kDa, un punto isoeléctrico de 5.48. Además, esta secuencia es única en las bases de datos y lo más destacable, es que este péptido que ha sido sintetizado, al realizar pruebas en un sistema en contradifusión libre de células *in vitro* ha demostrado poseer propiedades idénticas a la HACD1/CAP debido a la alta afinidad de unirse a la hidroxiapatita, así como promover la formación de cristales de hidroxiapatita mimetizando así las funciones de la proteína completa. En estudios previos, se ha demostrado que el péptido sintético promueve la formación de nuevo tejido óseo *in vivo* en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata^[202] y en tibias de conejo^[209].

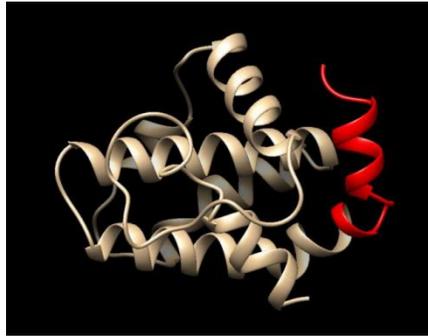


Figura 4. Modelo teórico de la estructura secundaria de la proteína HADC1/CAP conformado por hélices alfa y estructura aleatoria. La región en rojo indica la región de 15 aminoácidos en el Carboxilo-terminal (pCAP).

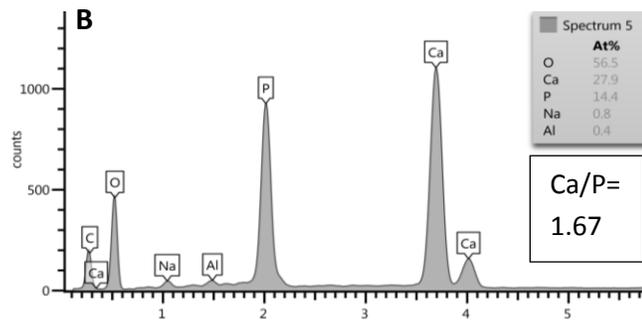
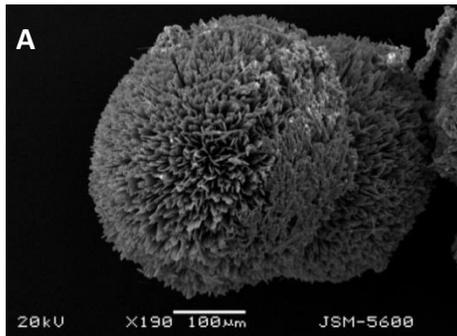


Figura 5. HADC1/CAP. A, Microfotografía obtenida en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) de los cristales de fosfato de calcio formados en el sistema de contradifusión en gel de silicato mediante el uso de la proteína HADC1/CAP. B, Espectroscopía de dispersión de rayos X (EDS), de cristales de hidroxiapatita formados en presencia de la proteína HADC1/CAP. La relación Ca/P = 1.67 corresponde a hidroxiapatita de tipo biológico^[202].

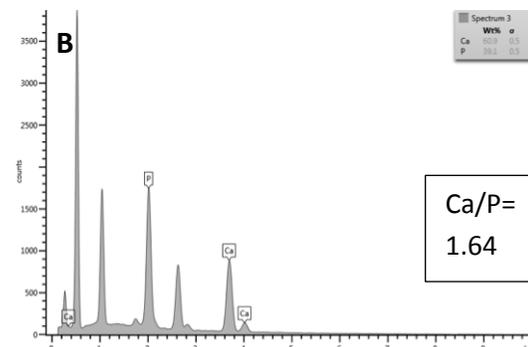
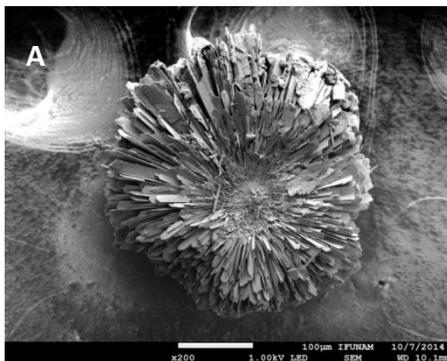


Figura 6. Péptido de CAP. A, Microfotografía obtenida por MEB de los cristales de fosfato de calcio formados en el sistema de contradifusión en gel de silicato mediante el uso del péptido pCAP. B, Espectroscopía de dispersión de rayos X (EDS), de cristales de hidroxiapatita formados en presencia del péptido de HADC1/CAP. La relación Ca/P = 1.64 corresponde a hidroxiapatita de tipo biológico.

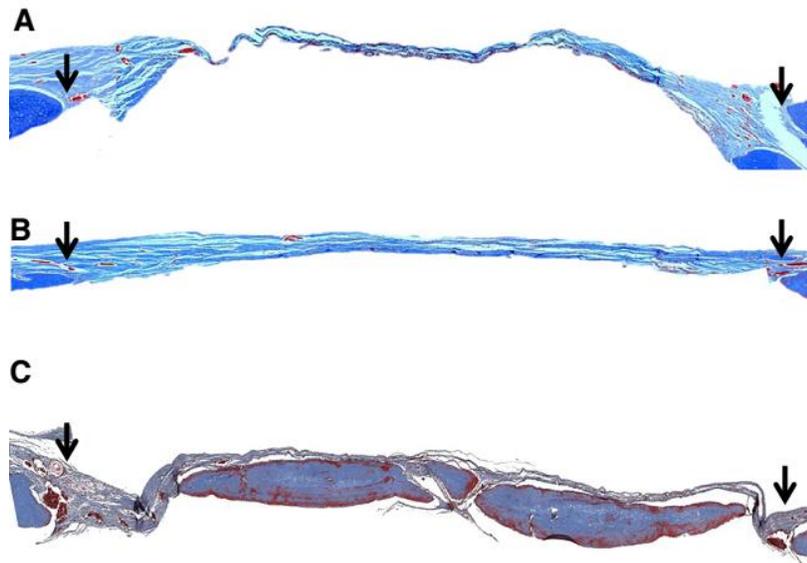


Figura 7. Secciones histológicas teñidas con Hematoxilina y Eosina después de 4 semanas de tratamiento con hrHACD1/CAP en un defecto de calvaria de tamaño crítico^[202]. **A**, Defecto en control vacío. Márgenes del defecto muestran la conexión con un tejido conectivo fibro-denso. **B**, control con matriz de gelatina muestra el defecto ocupado por tejido conectivo fibro-denso. **C**, matriz de gelatina embebida con hrHACD1/CAP muestra la formación de tejido óseo en el defecto. Las flechas muestran el borde del defecto de calvaria.

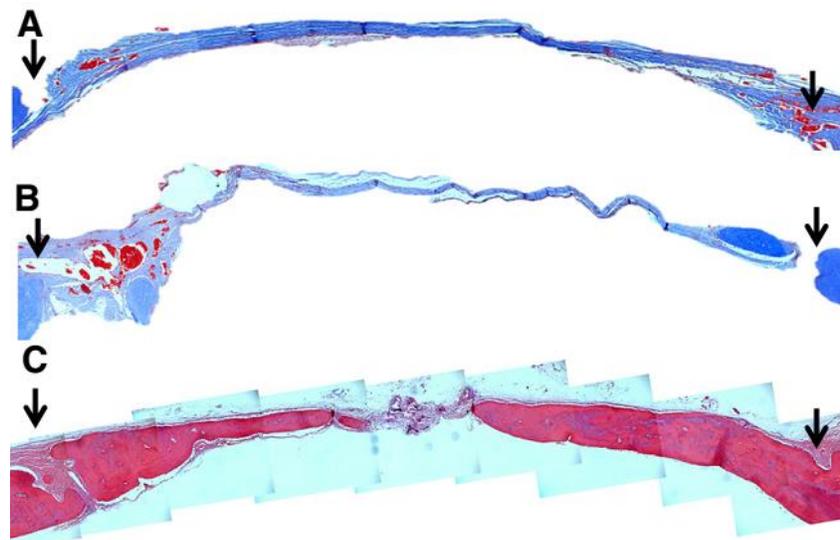


Figura 8. Secciones histológicas teñidas con Hematoxilina y Eosina de 8 semanas de tratamiento con hrHACD1/CAP en un defecto de tamaño crítico bóveda craneal de rata^[202]. **A**, Defecto vacío y **B** defecto tratado con matriz de gelatina muestran la conexión de los bordes del defecto por un tejido conectivo fibro-denso. **C**, defecto experimental tratado con matriz de gelatina embebida con hrHACD1/CAP muestra la formación ósea y un espacio ocupado por tejido fibroso conectivo denso y tejido osteoide. Las puntas de flecha indican los bordes del defecto de la bóveda craneal.

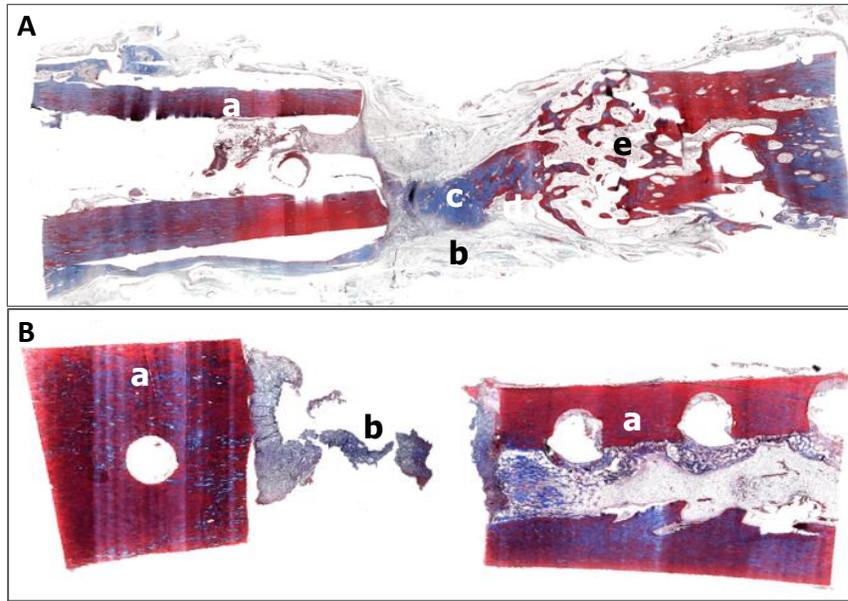


Figura 9. Cortes histológicos teñidos con Tricrómica de Masson, de tibias de conejo con membrana tratada con péptido de CAP durante 20 semanas (A) y sin el péptido de CAP (B)^[209].

A. Se observa un fragmento de hueso vital, el cual presenta diversas áreas de calcificación, el hueso cortical y trabecular es vital (a), presenta hacia el centro del corte una extensa zona de fibras de colágena dispuestas en forma condensada (b), se observa también una zona de cartilago vital el cual está activo y está generando calcificación ósea de tipo endocondral (c). Estas áreas se encuentran entremezcladas con áreas de tejido hematopoyético correspondiente a médula amarilla y en menor grado roja (d); dispuesto todo sobre una matriz de tejido conjuntivo fibroso denso y laxo bien vascularizado (e). **B.** Se observan dos fragmentos de tejido óseo compuesto por hueso cortical y trabecular vital entremezclados con áreas de médula amarilla (a). En el centro se observa un área de hemorragia mezclada con plasma.

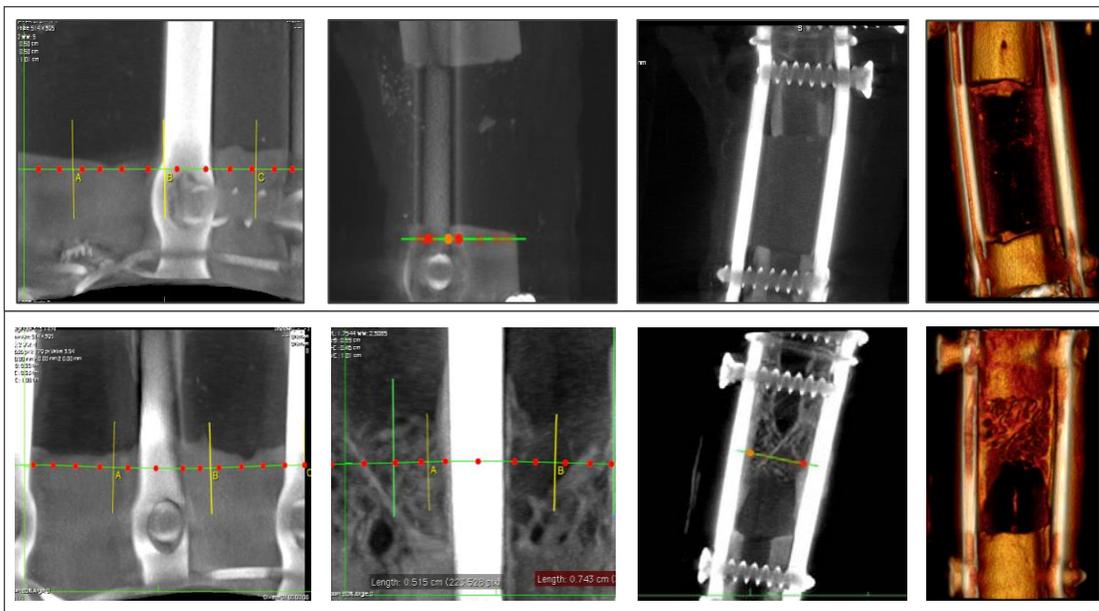


Figura 10. Imágenes de Tomografía Computarizada en tibias de conejo sin péptido (imagen superior) y con la utilización del péptido de CAP (imagen inferior)^[209].

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La osteoporosis es la enfermedad ósea más común en humanos y afecta ambos sexos generalmente en la edad adulta y/o en la tercera edad. Esta enfermedad progresiva conduce a la fragilidad ósea aumentando el riesgo de presentar fracturas que pone en riesgo la salud del individuo. Las fracturas de cadera son las fracturas más comunes que se asocian a altos índices de morbilidad y mortalidad y los costos de vida ascienden a más de 20 mil millones de dólares en los Estados Unidos de América (costo estimado en 1997) y más de 2 mil millones de Euros en el Reino Unido (en 2012)^[180,181].

Las mujeres constituyen el grupo principal de riesgo a padecer osteoporosis debido a que al cursar por el periodo de la menopausia a partir de los 50 años de edad aproximadamente, constituyen el principal grupo de riesgo debido a la disminución de los estrógenos, los principales reguladores de la homeostasis ósea, durante y más aún después de la menopausia. Tan sólo en México, el 22% de la población padece esta enfermedad, lo que significa que 1 de cada 4 mexicanos tendrá posibilidad de tener fracturas a causa de esta enfermedad ^[60,63,65].

Actualmente existe una gran variedad de alternativas farmacéuticas para prevenir fracturas, y muy pocas para incrementar la DMO en pacientes con osteoporosis, sin embargo, éstos poseen efectos colaterales asociado a afecciones en distintos tejidos, tales efectos secundarios son epistaxis e irritación (ocasionalmente acompañado de sangrado) nasal, irritación del tracto gastrointestinal, dolor músculo-esquelético, calambres en piernas, hipercalcemia, mareos, osteonecrosis maxilar y mandibular, hasta el desarrollo de cáncer endometrial, cáncer de mama y osteosarcomas^[50-55,63,68].

6. JUSTIFICACIÓN

Actualmente sólo un fármaco ha sido aprobado por la FDA como agente anabólico para incrementar la DMO perdida a causa de la osteoporosis^[55,66,68]; por ello, es importante y necesario buscar y proponer nuevos agentes no sólo prevengan fracturas, sino que incrementen la masa ósea para recuperar las funciones propias del tejido óseo. Por esta razón, en este proyecto se propone la utilización de un péptido sintético derivado de la Proteína de Adhesión del Cemento radicular en un modelo osteoporótico para comprobar las propiedades biológicas demostradas en sistemas *in vitro* e *in vivo* para la regeneración de tejidos mineralizados.

La utilización de péptidos tiene propiedades ventajosas: es de fácil síntesis y por ende, una obtención más factible comparado con la proteína recombinante que implica bajos costos, y, debido al bajo peso molecular, no desencadena respuesta inmunológica.

Estos datos sugieren la importancia y la utilidad del pCAP para la terapéutica en la regeneración de los tejidos mineralizados que se han perdido debido a defectos congénitos, cáncer y enfermedades que afectan las estructuras óseas, particularmente la osteoporosis.

7. HIPÓTESIS

El péptido de CAP induce la regeneración ósea en un modelo osteoporótico animal, aumenta la densidad mineral ósea y recupera las funciones del hueso sano.

8. OBJETIVO GENERAL

Comprobar el potencial de regeneración inducido por el péptido sintético derivado de la Proteína de Adhesión del Cemento radicular (CAP) para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo animal utilizando ratas Wistar ovariectomizadas.

8.1 Objetivos específicos:

- ✓ Determinar el incremento de la Densidad Mineral Ósea en los grupos de ratas Wistar ovariectomizadas tratados con el péptido sintético pCAP
- ✓ Determinar si la administración del péptido sintético pCAP recupera las características biomecánicas como resistencia ósea en los grupos tratados.
- ✓ Determinar las características histológicas y sus diferencias entre las ratas que cursan con osteoporosis y las tratadas con pCAP.
- ✓ Determinar si el péptido sintético pCAP es un agente con efecto regenerador en las ratas Wistar ovariectomizadas.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción del método: Diseño experimental y comparativo.

Formación y distribución de grupos de estudio

Animales

Se incluyeron veinticuatro ratas sanas de la cepa Wistar con un peso de 250 g +/- 50 g y de una edad de 16 semanas. Los animales se mantuvieron a temperatura controlada a 25 °C ± 2 °C con 12 horas de luz / oscuridad-ciclo. Se alimentaron con la dieta estándar de laboratorio y agua *ad libitum*. Antes de llevar a cabo el experimento, se obtuvo la aprobación ética de acuerdo al Comité Institucional de Ética Animal de la Facultad de Odontología. Los 24 animales se distribuyeron en cuatro diferentes grupos con una $n=6$ de la siguiente manera:

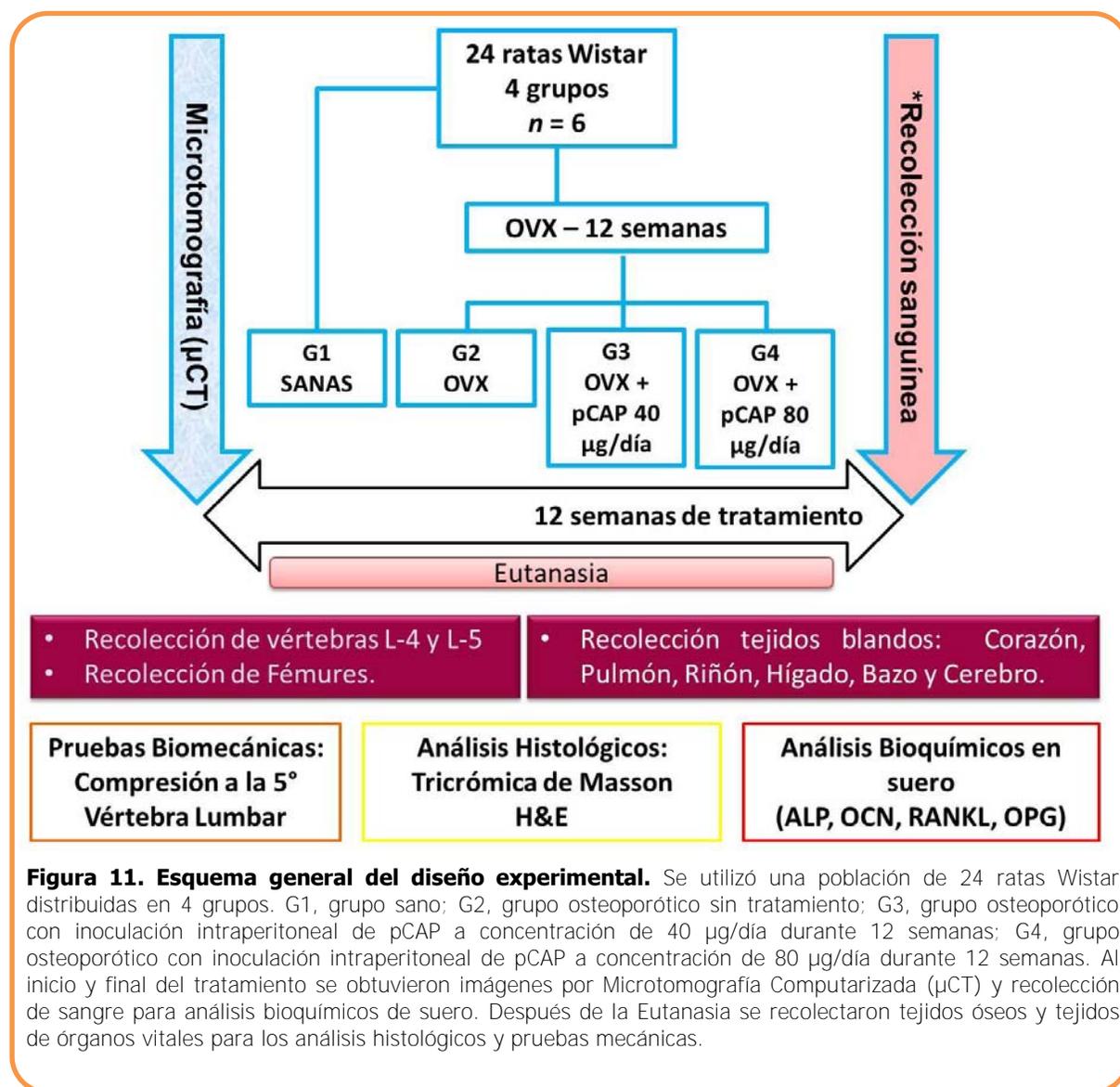
Grupo 1.- Seis ratas de la cepa Wistar que fueron sometidas a ovariectomía (OVX) bilateral y 12 semanas postquirúrgico se inicia la inoculación de pCAP a una concentración de 40µg/día durante 12 semanas por vía intraperitoneal.

Grupo 2.- Seis ratas de la cepa Wistar que fueron sometidas a OVX bilateral y 12 semanas postquirúrgico se inicia la inoculación de pCAP a una concentración de 80µg/día durante 12 semanas por vía intraperitoneal.

Grupo 3.- Seis ratas de la cepa Wistar que fueron sometidas a OVX bilateral y 12 semanas postquirúrgico son tratadas con vehículo (solución amortiguadora de fosfatos; PBS) inoculado intraperitonealmente actuando como control positivo.

Grupo 4.- Seis ratas de la cepa Wistar a las que NO se les realiza ningún procedimiento quirúrgico y al mismo tiempo de inicio de inoculación del tratamiento de los grupos anteriores, son tratadas con vehículo (solución amortiguadora de fosfatos, PBS) inoculado intraperitonealmente actuando como control negativo.

Cumplidas las 12 semanas de tratamiento, se realiza la eutanasia de los animales con monóxido de carbono. El diseño experimental se observa en la figura 11.



Generación del modelo osteoporótico

Con el fin de promover el desarrollo de osteoporosis en los grupos de estudio y en el grupo control positivo (grupo 2, 3 y 4 respectivamente) se realizó Ovariectomía bilateral (OVX) a 18 ratas.

Anestesia: Los animales se tranquilizaron con maleato de acepromicina (Relax 0.5g/100ml) a una dosis de 0.05 ml/kg.

Ovariectomía:

- Una vez sedada y tranquilizada la rata, se coloca en posición decúbito lateral, se procede a afeitar la zona de incisión a partir de la última costilla formando un rectángulo de 4 x 3 cm aproximadamente.
- Se realiza la asepsia de la zona con solución electrolizada con pH neutro.
- Con un bisturí, se realiza una incisión lineal de aproximadamente 2 cm.
- Se identifica el músculo y se expone la cavidad abdominal.
- Cuidadosamente se localiza e identifica el cuello uterino, el cual se liga justo en la zona media con sutura de ácido poliglicólico 6/0 con seis nudos.
- Se escinde el ovario.
- Se sutura por planos (la musculatura abdominal y la piel) con ácido poliglicólico de 4/0.
- Limpieza de la zona quirúrgica con agua oxigenada.
- Las ratas se mantienen en condiciones de bioterio durante 12 semanas expuestas a 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a una temperatura media de 22 °C con alimentación *ad libitum*.

Esta técnica se realiza bilateralmente para el desarrollo de osteoporosis.

Determinación de la Densidad Mineral Ósea (DMO) por Microtomografía Computarizada (μ CT)

Para poder evaluar la densidad mineral ósea (DMO), se obtuvieron imágenes por medio de un microtomógrafo (μ CT) en zonas corticales de cuarta vértebra lumbar y fémur de todos los animales al inicio (día 0) y final (12 semanas) de tratamiento con pCAP40 μ g/día y pCAP 80 μ g/día. La μ CT de alta resolución se realizó en un equipo Albira ARS (Oncovisión, España) en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Las características de adquisición fueron: una fuente de rayos X de 35 micras (tamaño nominal de punto), CT-High-Res HDHV (alta dosis –bajo voltaje) de 0.4 mA con 35 kV. El número de proyecciones fue de 400 y el tiempo de proyección de 1 segundo. La reconstrucción de las imágenes 3D se realizó a máxima intensidad de proyecciones con el propio software del equipo Albira utilizando el método de Retroproyección Filtrada (FBP).

El análisis se basó en la evaluación de la DMO de fémur y cuarta vértebra lumbar a partir de la determinación del coeficiente de atenuación de rayos X, expresado en unidades Hounsfield (HU), para describir los diferentes niveles de radio-densidad, que se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$HU = \frac{\mu_x - \mu_{agua}}{\mu_{agua}} \times 1000$$

En donde, μ_x = coeficiente de atenuación lineal del tejido o material de interés.

μ_{agua} = coeficiente lineal del agua.

El ajuste para la DMO según los parámetros de la CT HighRes HDHV son:

$$DMO = 1.55 + 0.135HU + 0.00186HU^2 - 1.02 \times 10^{-6}HU^3.$$

Los valores del contenido de hidroxapatita (HA) están dados en un *Phantom* estándar con diferentes niveles de concentración de HA que se compararon con los valores obtenidos de las muestras.

Se identificó una región de interés (ROI) de un milímetro cúbico (1mm³) entre la diáfisis y metáfisis de las áreas corticales del fémur y en la región central del hueso cortical del cuerpo de la vértebra.

Los resultados de la DMO se muestran en valores porcentuales tomando como referencia al grupo control sano (100%). Por medio de una regla de tres se obtuvieron los porcentajes de cada grupo con y sin tratamiento:

$$\frac{\text{DMO OVX} * 100}{\text{DMO SANO}}$$

Resistencia a la compresión de la 5ta vértebra lumbar

La resistencia a la compresión ósea de la quinta vértebra lumbar (L5) se realizó mediante la Máquina de Pruebas Universal Instron[®] (mod. 5567) equipada con una celda de carga de 1,000 Newton (N). Se recolectaron las vértebras L5 de todos los animales aislándolas de la columna vertebral. Se limpió de tejidos circundantes y se eliminaron las apófisis espinosas de las vértebras alineándolas en sus extremos axiales. Se procedió a medir el diámetro y la longitud del cuerpo vertebral. Cada muestra se colocó en posición vertical alineada al centro de referencia del marco de la base de la Máquina de Pruebas Universal (figura 12). Una vez depositada la muestra en la Máquina de Pruebas, el puente superior desciende a una velocidad de 1mm/min hasta lograr la fractura de la muestra. La fuerza ejercida es expresada en N. Con los valores de la fuerza (F) se calculó la resistencia a la compresión (R) usando la expresión matemática siguiente:

$$R = F/A$$

Donde A es el área transversal de cada 5ta vértebra lumbar calculada con:

$$A = \pi / (4D^2)$$

Donde D es el diámetro de cada vértebra.

Los valores de R fueron proporcionados por el Software Merlin, (integrado a la máquina de prueba). Los resultados se promediaron y reportaron como resistencia a la compresión en N/mm².

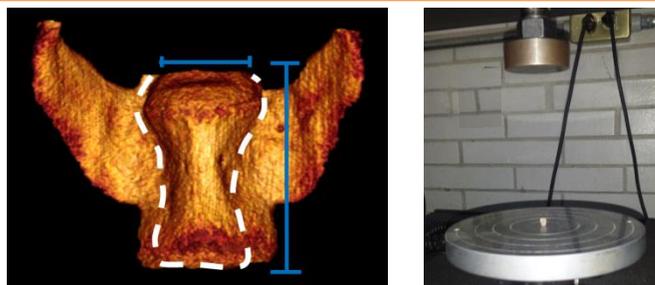


Figura 12. Preparación y colocación de la muestra para pruebas biomecánicas. Las líneas blancas demarcan la eliminación de las apófisis espinosas y las líneas azules señalan la medición del diámetro y longitud del cuerpo vertebral, datos ingresados al software (imagen izquierda). Cuerpo vertebral L5 colocado en el marco de prueba del equipo Instron (imagen derecha).

Análisis histológicos

Se recolectaron tejidos óseos de todos los animales: Vértebras lumbares cuartas y quintas (L4 y L5 respectivamente) y fémures derecho e izquierdo fijadas en paraformaldehído al 10% y procesadas para análisis histológico. También se recolectaron los tejidos blandos de órganos vitales como: Corazón, pulmones, hígado, riñones, cerebro y bazo.

Procesamiento de muestras de tejidos óseos:

Una vez fijadas en paraformaldehído al 10%, las muestras se lavaron con agua corriente durante 2 horas y se colocaron en una solución de EDTA al 10% durante 4 semanas para su descalcificación. Al finalizar el tiempo de deshidratación, se clarificaron con xileno y se embebieron en parafina para la realización de cortes de 5µm de grosor, las cuales fueron teñidos con Tricrómica de Masson para el análisis histológico mediante microscopía óptica utilizando el microscopio AxioSkop 2 Carl Zeiss, Alemania. Se tomaron fotomicrografías del cuello y cóndilo del fémur con el fin de analizar la composición del hueso trabecular, patrones de remineralización ósea y/o aumento del grosor trabecular, presencia de osteocitos, osteonas, osteoblastos, vascularización y matriz osteoide.

Procesamiento de muestras de tejidos blandos:

Una vez fijadas en paraformaldehído al 10%, las muestras se lavaron con agua corriente durante 2 horas. Los tejidos fueron deshidratados durante 12 horas con diferentes porcentajes de etanol. Las muestras se clarificaron con xileno y se embebieron en parafina para la realización de cortes de 5µm de grosor, los cuales fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina con el fin de observar las diferentes estructuras de los tejidos, reacción inflamatoria y/o reacción a cuerpos extraños.

Análisis de marcadores bioquímicos en suero

Se recolectó una muestra de sangre de todos los animales al inicio (día 0), mitad (6 semanas) y final (12 semanas) del tratamiento. Se centrifugó a 4000 revoluciones por minuto durante 15 minutos para separar el contenido sérico. La sangre y el suero se conservaron a -80°C hasta el análisis. Para el descongelamiento del suero la temperatura se ascendió desde -80°C a -20°C y 4°C hasta temperatura ambiente hasta su uso para medir la actividad de Fosfatasa Alcalina (TNP), y para los ensayos ELISA para Osteocalcina (OCN), Osteoprotegerina (OPG) y el Ligando del Receptor Activador de RANK (RANKL).

Actividad de Fosfatasa Alcalina:

La actividad de la fosfatasa alcalina (TNP) se determinó por medio de la técnica de Lowry *et al* (1954). El suero fue extraído de los 4 grupos de estudio y fueron separados por medio de centrifugación a 4,000 revoluciones por minuto durante 15 minutos. La actividad enzimática se analizó utilizando p-nitrofenil-disodio-fosfato (PNP) 8 mM como sustrato y MgCl₂ 2 mM en amortiguador de Tris-HCl 0.1 M, a pH 9.8 e incubadas a 37° C por 30 minutos. La reacción se detuvo por adición de 50 mL de NaOH 0.05 N y la absorbancia se determinó a 405 nm. Las muestras se analizaron en condiciones que aseguraron linealidad con respecto al tiempo y a la concentración de la proteína. La concentración de la proteína se determinó de acuerdo a método de Bradford (1976) usando albúmina (BSA) como estándar. Los ensayos se hicieron por triplicado y se repitieron tres veces.

Identificación de biomarcadores por medio de ELISA:

Por medio del ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por el acrónimo en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) se realizaron las pruebas para la identificación de los biomarcadores: Osteoprotegerina (**OPG**), Osteocalcina (**OCN**) y

el Ligando del Receptor Activador de RANK (**RANKL**) utilizando el kit Rat Osteocalcin ELISA, ALPCO[®] por el método directo.

Se colocaron 3 μ L de muestra por cada pozo y se agregó el buffer con PBS al 1X dejándose incubar toda la noche. Al día siguiente se realizaron lavados y se colocó albúmina bovina (BSA) para bloquear sitios inespecíficos. Posteriormente se hicieron lavados y la colocación del primer anticuerpo (**correspondiente a cada biomarcador**) incubándolo por 1 hora; después, nuevamente se realizaron los lavados y se colocó el segundo anticuerpo; después de 1 hora de incubación, se lavó y se colocó el sustrato de reacción (ABTS) durante 30 minutos. Se tomaron lecturas a 405 nm cada 15 minutos y se detuvo la reacción a los 50 minutos. Los ensayos se hicieron por triplicado y se repitieron tres veces.

Métodos estadísticos

Para los análisis estadísticos se utilizó el análisis de varianza de una vía con un 95% de confianza, con un valor de $P = < 0.05$ para examinar las diferencias entre cada grupo experimental contra los grupos controles positivo y negativo. Cada gráfico fue registrado con el error y desviación estándar donde un asterisco (*) muestra la diferencia estadística sobre el grupo analizado.

10. RESULTADOS

Microtomografía Computarizada (μ CT)

Con el fin de determinar la DMO en los grupos de estudio, se obtuvieron imágenes de μ CT al inicio (día cero) y al final de tratamiento (día 85) en los tejidos óseos de fémur y en cuartas vértebras lumbares (*figura 13*).

Las tablas 1 y 2 resumen las cantidades obtenidas de la Densidad Mineral Ósea, de la cantidad de HAmg/cc de la ROI del hueso cortical de fémur y vértebra L4; y sobre los porcentajes obtenidos partiendo de los valores del grupo sano como total (100%).

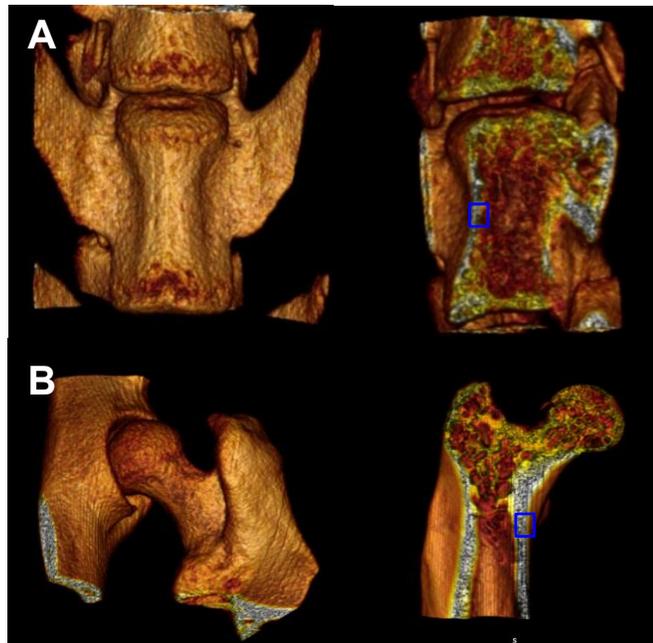


Figura 13. Imágenes de la Microtomografía Computarizada para determinar la Densidad Mineral Ósea. A, vértebra L4 con imagen primaria (izquierda) y corte longitudinal (derecha) mostrando las estructuras internas como el hueso cortical. B, Fémur con imagen primaria (izquierda) y corte longitudinal (derecha). La ROI del hueso cortical se muestra en cuadros azules de la vértebra L4 y fémur.

μ CT de Fémur:

La ROI seleccionada fue de 1mm^3 en la región cortical en la intersección entre la metáfisis y la diáfisis del fémur (*figura 13, D*).

Al día 0 del tratamiento, los tres grupos que fueron sometidos a OVX mostraron disminución de DMO con porcentajes 86 y 88% de HA mg/cc comparado con el grupo sano con diferencia significativa (valor de $p < 0.05$). (*figura 14, A*).

Al final del tratamiento (día 85), los grupos tratados pCAP40 y pCAP80 $\mu\text{g}/\text{día}$ mostraron incremento de la DMO con porcentajes de 91 y 92% respectivamente considerando al grupo sano como el 100%. El análisis estadístico de varianza mostró diferencia significativa comparado con el grupo OVX (valor de $p < 0.05$) (*figura 14, B*).

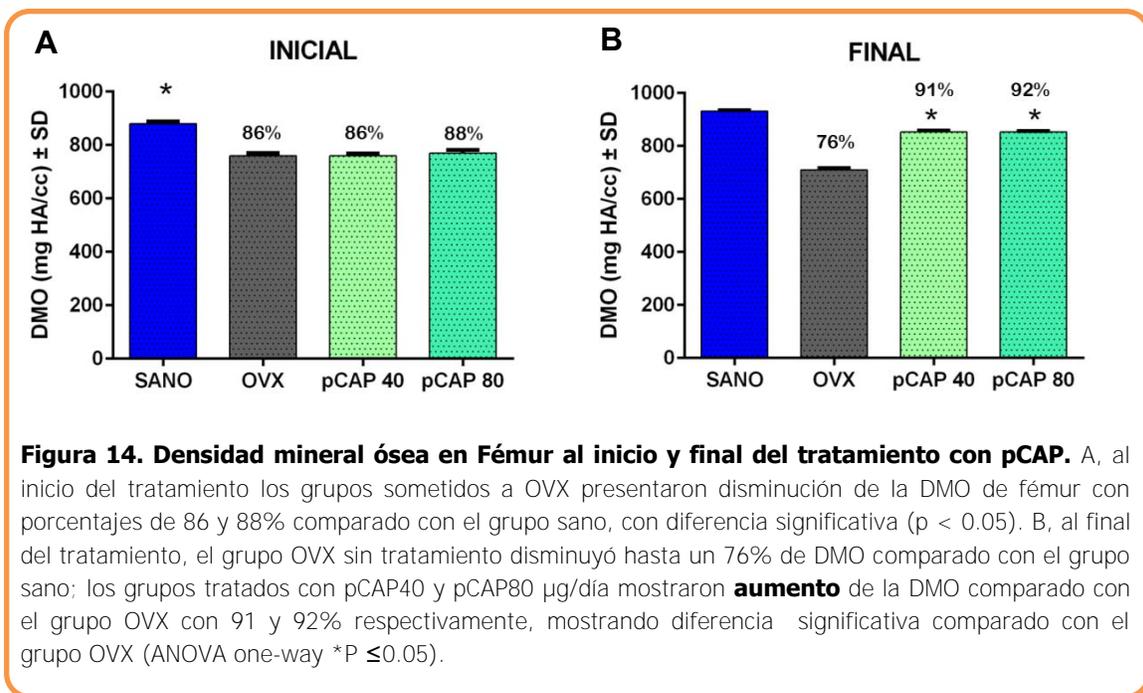


Tabla 1. Densidad Mineral Ósea de Fémur				
GRUPO	INICIO		FINAL	
	HA mg/cc	%	HA mg/cc	%
SANO	880	100	932	100
OVX	759	86	710	76
pCAP 40	759	86	853	91
pCAP 80	770	88	854	92

Tabla 1. Densidad Mineral Ósea de Fémur. El contenido absoluto de HA mg/cc expresado a valores porcentuales. El grupo control (sano) se consideró como el 100%, y los grupos con OVX sin y con tratamiento fueron comparados con éste. Al final del tratamiento se aumentó la DMO de los grupos tratados con pCAP 40 Y 80 µg/día en el fémur.

µCT de Vértebra L4

Se seleccionó una ROI de 1mm³ en la porción central superior del hueso cortical de la vértebra L4 (*figura 13, C*).

Los resultados de la DMO de la 4ta vértebra lumbar en el día 0 de tratamiento se observó que los grupos que fueron sometidos a ovariectomía bilateral mostraron disminución de la cantidad de HA mg/cc con porcentajes 86 y 88% con diferencia significativa comparado con el grupo sano (*figura 15, A*).

Al final del tratamiento, el grupo OVX sin tratamiento disminuyó el porcentaje de la DMO hasta un 74%. Los grupos tratados con pCAP40 y pCAP80 mostraron un incremento con diferencias significativas con porcentajes de 95.4 y 95% de HA comparado con el grupo sano (*figura 15, B*).

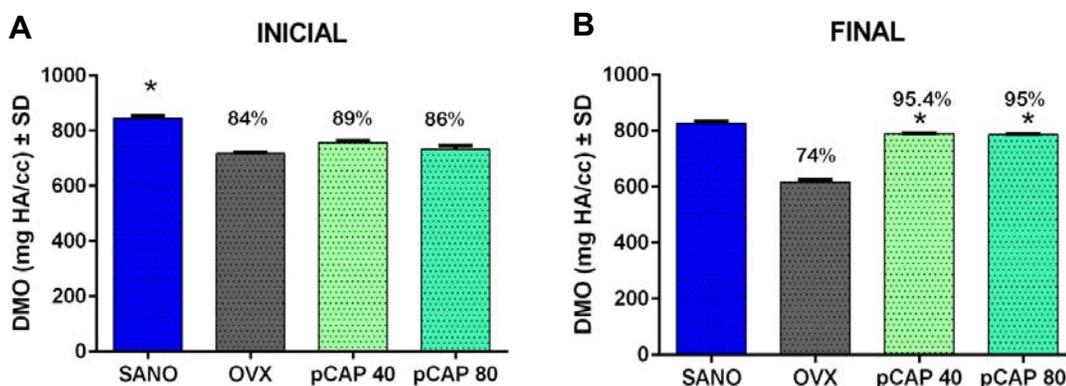


Figura 15. Densidad mineral ósea en Vértebra L4 al inicio y final del tratamiento con pCAP. A, al inicio del tratamiento los grupos sometidos a OVX presentaron disminución de la DMO de la vértebra con porcentajes de 84, 89 y 86% comparado con el grupo sano, mostrando diferencia significativa. B, Al final de tratamiento, el grupo OVX disminuyó hasta un 74%, mientras que los grupos tratados con pCAP40 y pCAP80 $\mu\text{g}/\text{día}$ mostraron **aumento** de la DMO hasta 95.4 y 95% respectivamente, con diferencia significativa (ANOVA one-way * $P < 0.05$).

Tabla 2. Densidad Mineral Ósea de vértebra L4

GRUPO	INICIO		FINAL	
	HA mg/cc	%	HA mg/cc	%
SANO	845	100	827	100
OVX	718	84	617	74
pCAP 40	757	89	789	95.4
pCAP 80	733	86	786	95

Tabla 1. Densidad Mineral Ósea de vértebra L4. El contenido absoluto de HA mg/cc expresado a valores porcentuales. El grupo control (sano) se consideró como el 100%, y los grupos con OVX sin y con tratamiento fueron comparados con éste. Al final del tratamiento se aumentó la DMO de los grupos tratados con pCAP 40 Y 80 $\mu\text{g}/\text{día}$ en la vértebra L4.

PRUEBAS BIOMECÁNICAS:

Resistencia a la compresión de quinta vértebra lumbar

Para determinar si el tratamiento con pCAP a diferentes concentraciones (40 y 80 $\mu\text{g}/\text{día}$) proporcionaba soporte a cargas mecánicas, se realizó la prueba de resistencia a la compresión ósea de la quinta vértebra lumbar (L5).

El grupo que recibió tratamiento con pCAP a una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{día}$ presentó mayor resistencia ósea a la compresión comparado con el grupo OVX; aunque no se observaron diferencias significativas, los valores de resistencia fueron similares al grupo sano.

La concentración de 80 $\mu\text{g}/\text{día}$ del péptido incrementó la resistencia ósea por arriba del grupo control sano; y cuando se realizó el análisis estadístico de ANOVA, se encontró diferencia significativa comparado con el control osteoporótico (*figura 16*).

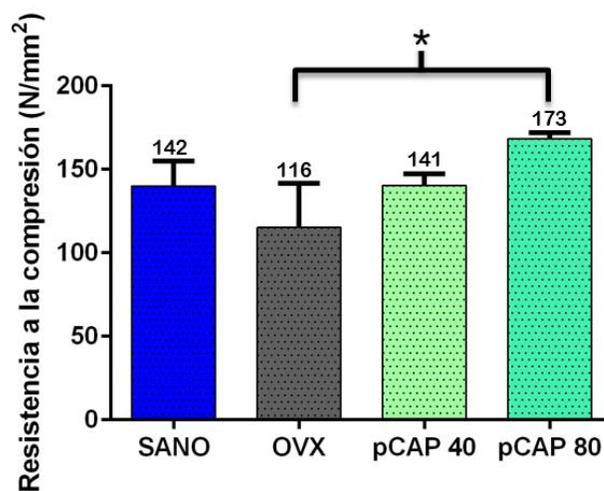


Figura 16. Resistencia a la compresión de la vértebra L5. El grupo osteoporótico presentó menor resistencia a la compresión ósea comparado con el grupo sano. El grupo tratado con pCAP40 $\mu\text{g}/\text{día}$ fue similar al grupo sano y no presentó diferencia significativa. El grupo tratado con pCAP80 $\mu\text{g}/\text{día}$ presentó mayor resistencia con diferencia significativa en el análisis de varianza (ANOVA one-way *P < 0.05).

PRUEBAS HISTOLÓGICAS:

Tinción Tricrómica de Masson

Se realizaron cortes histológicos y se tiñeron con Tricrómica de Masson, con la finalidad de identificar las características histomorfológicas y diferencias fenotípicas del tejido óseo de fémures y vértebras L4 entre los grupos de estudio (*figura 17*).

- **Cuellos Femorales**

Debido a que una de las zonas con mayor incidencia de fractura a causa de la osteoporosis, es el cuello femoral, se observó esta porción como blanco de estudio bajo el Microscopio invertido a un aumento de 10X.

Los fémures de los grupos controles sanos fueron examinados y se observó el tamaño trabecular, línea epifisaria y cuerpo femoral normal. Se aprecia coloración roja alternada con predominante color azul como característica propia del cartílago de crecimiento que se encuentra en la porción de la articulación coxofemoral, (*línea verde de la figura 17 A*). Ligeramente predomina la coloración roja en la fracción del cuerpo femoral (*figura 17 A, en corchetes*). Se observa médula ósea roja (*figura 17, A, flechas amarillas*) y muy escasa presencia de médula ósea amarilla (*señaladas con flechas negras en la figura 17, A*).

En los cortes histológicos del fémur del grupo osteoporótico se observa pérdida de la continuidad trabecular (*figura 17, B flechas negras*) e incremento en la presencia de la **médula ósea amarilla** (*figura 17, B flechas verdes*).

Los cortes histológicos del grupo tratado con pCAP 40µg/día presentan mayor grosor trabecular, la pérdida de la continuidad trabecular es mucho menor comparado con el control osteoporótico, el color azul es levemente menor que el color rojo, y en el

proceso cartilaginoso se observa color azul claro, y se observó la presencia de médula ósea amarilla (*figura 17, C*).

En el grupo tratado con pCAP 80µg, se aprecia mayor grosor trabecular, la pérdida de la continuidad trabecular es mucho menor comparado con el control osteoporótico, sin embargo, el color azul es mayor que el color rojo, y en el proceso cartilaginoso se observa color rojo con azul intenso, y se observó la presencia de médula roja (*figura 17, D*).

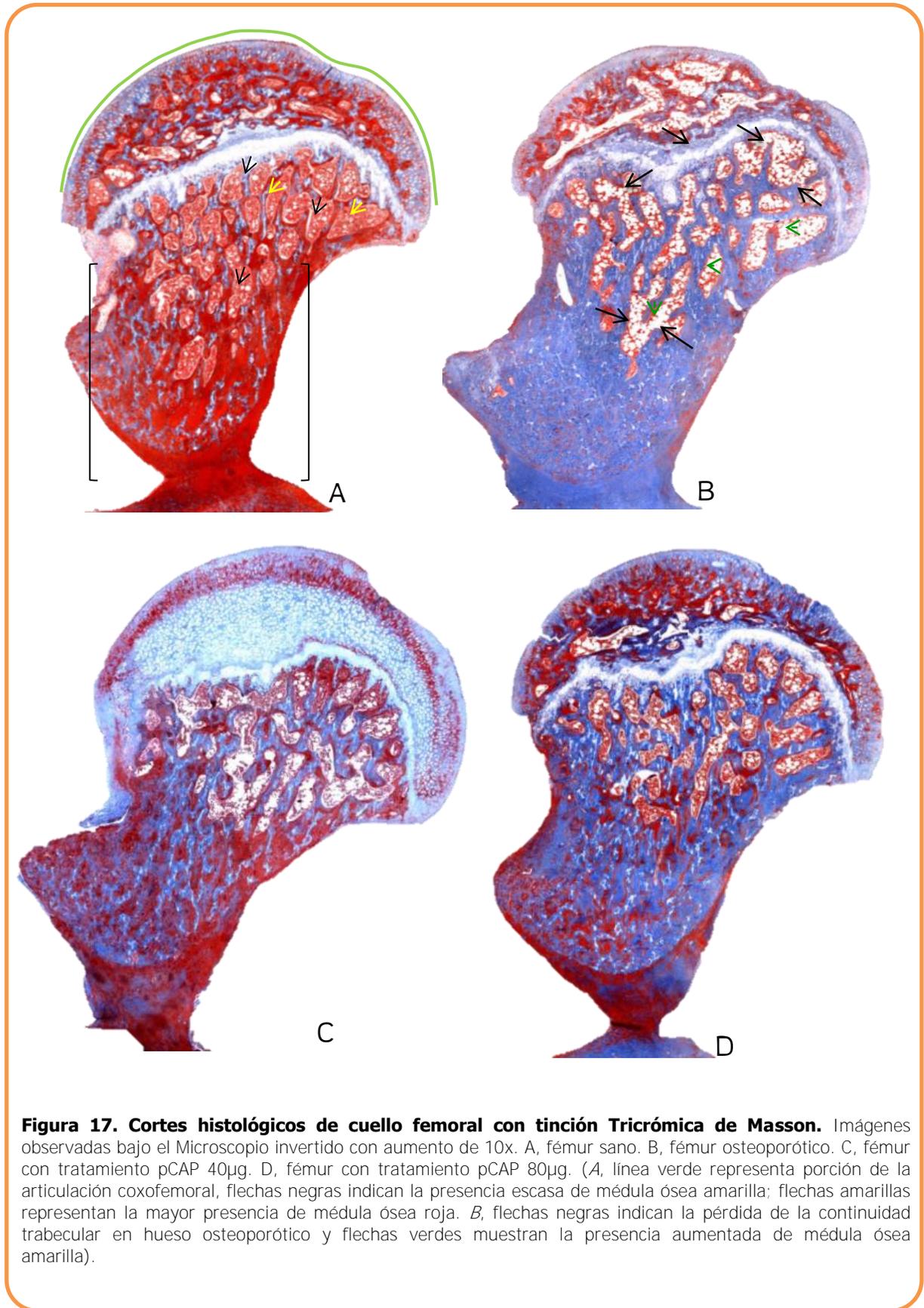


Figura 17. Cortes histológicos de cuello femoral con tinción Tricrómica de Masson. Imágenes observadas bajo el Microscopio invertido con aumento de 10x. A, fémur sano. B, fémur osteoporótico. C, fémur con tratamiento pCAP 40µg. D, fémur con tratamiento pCAP 80µg. (A, línea verde representa porción de la articulación coxofemoral, flechas negras indican la presencia escasa de médula ósea amarilla; flechas amarillas representan la mayor presencia de médula ósea roja. B, flechas negras indican la pérdida de la continuidad trabecular en hueso osteoporótico y flechas verdes muestran la presencia aumentada de médula ósea amarilla).

- **Vértebras L4**

Las vértebras L4 se observaron bajo el Microscopio invertido y se obtuvieron imágenes a un aumento 10X.

En el grupo sano se observó coloración rojiza que corresponde al depósito del tejido biomineral sobre la matriz extracelular normal del hueso. El número, tamaño y espacio trabecular son normales sin pérdida de la continuidad de la composición ósea. Se observa espacio medular en condiciones normales (*figura 18, A y B*).

En el grupo osteoporótico se observa pérdida de la continuidad trabecular con apariencia lagunar, trabéculas más delgadas y aumento del espacio medular. Así mismo se observó una coloración azul que corresponde a la pérdida de tejido mineral, ya que la tinción es específica para colágena mostrando la pérdida del tejido mineral (*figura 18, D*).

En los grupos experimentales, la L4 tratada con 40µg/día de pCAP (*figura 18 E, F*) presentó la coloración roja similar al que se observó en el grupo control sano y recuperación del grosor trabecular, se conservó el espacio medular.

El grupo tratado a una concentración del péptido de 80µg/día (*figura 18 G y H*) se observa con un aumento en el número trabecular con disminución y/o ausencia del espacio medular y una coloración predominantemente roja y leve coloración azul (*figura 18 G*).

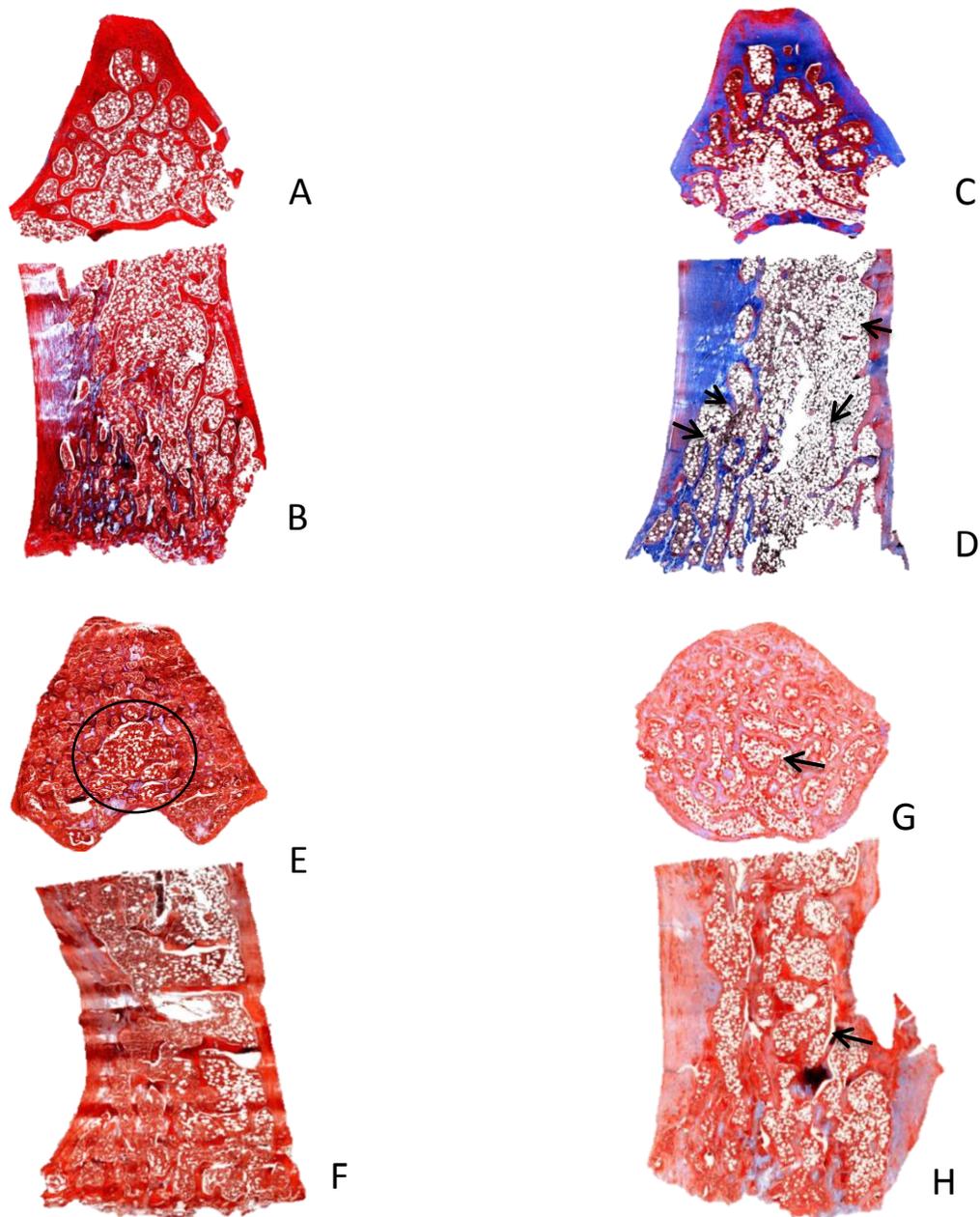


Figura 18. Cortes histológicos de vértebras L4 con tinción Tricrómica de Masson. Imágenes observadas bajo el Microscopio invertido con aumento de 10x. *A* y *B*, L4 sana (*A*, vista axial y *B*, vista longitudinal); se observa tejido mineralizado (coloración rojo intenso) como proceso normal de biomineralización ósea, número y espacio trabecular normal. *C* y *D*, L4 osteoporótica (*C*, vista axial y *D*, longitudinal); identificación de colágena tipo I (coloración azul), se observa pérdida de la continuidad trabecular (flechas negras), lagunas y aumento del espacio medular. *E* y *F*, tratamiento con pCAP 40µg/día (*E*, vista axial y *F*, vista longitudinal) se observa continuidad trabecular, coloración roja, similar a L4 sana y conservación del espacio medular (*E*, círculo). *G* y *H*, tratamiento con pCAP 80µg/día (*G* vista axial y *H* vista longitudinal); aumento del número trabecular, disminución del espacio medular (flechas negras).

Tinción con Hematoxilina y Eosina

Con el fin de determinar si la administración del péptido desencadenaba alguna respuesta inflamatoria y observar acumulación de cuerpo extraño o calcificaciones debido a su biodistribución, se recolectaron órganos vitales de todos los grupos de estudio, se realizaron cortes histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E), observados bajo el Microscopio invertido con aumentos de 5X, 10X, 20X y 40X.

Se examinó la porción del ventrículo del **corazón** hacia la zona externa del pericardio en el cual se observó al músculo cardiaco sin alteraciones.

Del **pulmón** se examinaron tanto alveolos pulmonares como bronquios observándose la arquitectura normal de éste con infiltrado inflamatorio crónico leve, característica del estado normal de esta región.

Se examinaron los tejidos del **riñón** y sus estructuras funcionales como túbulos renales y glomérulos los cuales no presentaban ninguna alteración.

En el **hígado** se identificó las triadas hepáticas (compuesta por vena, arteria y conducto biliar) para delimitar los lóbulos hepáticos y el estado las células de Kuffer; no se observó ninguna alteración en los 4 grupos de estudio.

Se examinó el plexo coroideo correspondiente al **cerebro**. Se analizó cerebelo y sus componentes como la capa molecular, la capa de la célula de Purkinge, la capa granular y la sustancia blanca. Se examinó estado neuronal y no se observaron alteraciones en ninguna de las estructuras en los grupos de estudio.

También se examinó el **bazo** y las estructuras que lo componen como la pulpa blanca que corresponde a nódulos esplénicos con linfocitos T y B; y la pulpa roja que corresponde a sinusoides esplénicos llenos de sangre y con láminas de tejido linfoide y no se observó anomalía ni alteración.

En la figura 19 se muestran las imágenes de los cortes de cada uno de los órganos descritos.

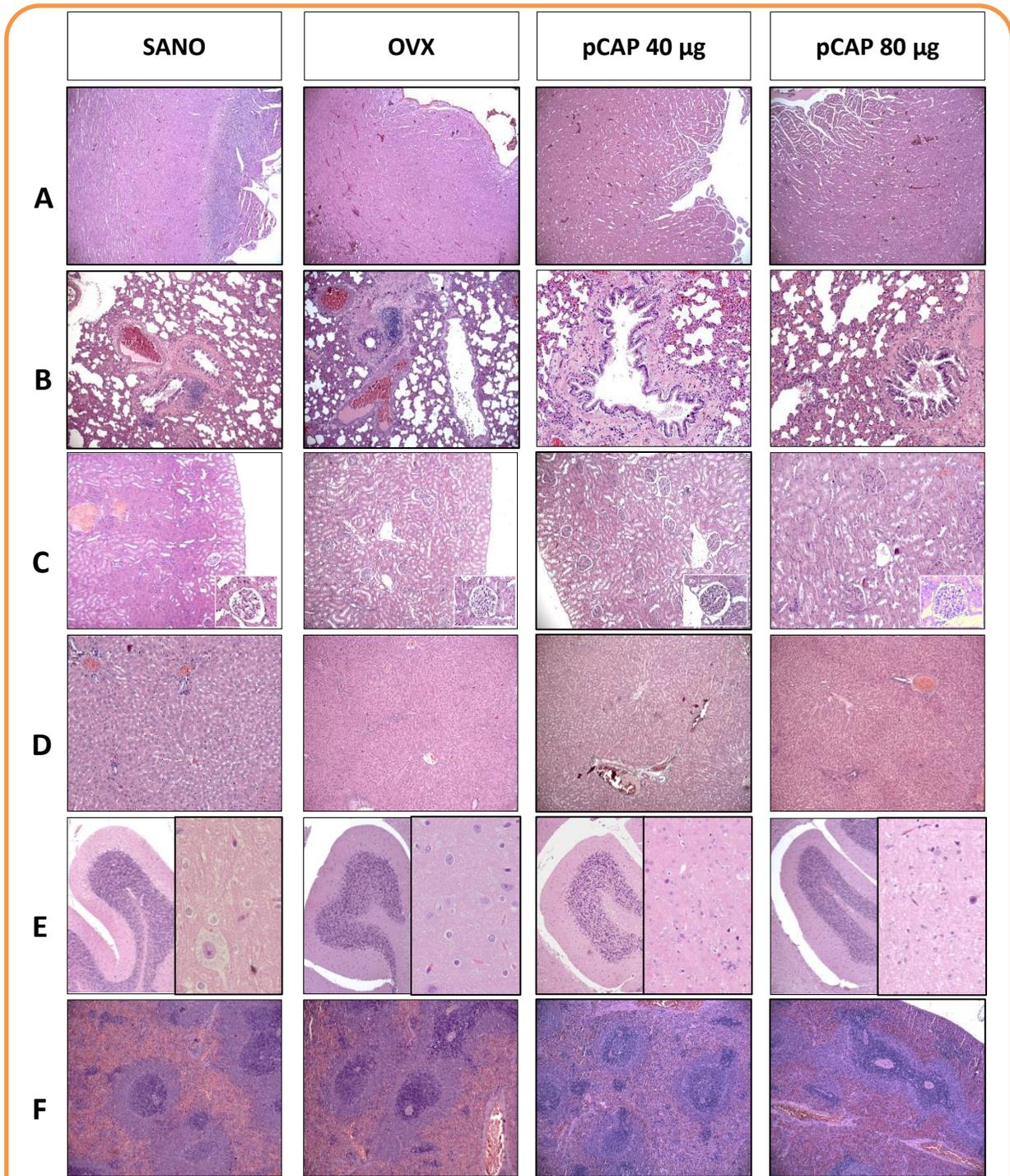


Figura 19. Micrografías Histológicas. Órganos vitales teñidos con H&E observados bajo el Microscopio Invertido con aumentos 5x. **A**, Corazón (se observa cavidad del endocardio). **B**, Pulmón (se observa los alveolos pulmonares). **C**, Riñón (recuadros muestra al glomérulo, unidad funcional del riñón a un aumento de 20X). **D**, Hígado (se observa la triada funcional compuesta por vena, arteria y conductor biliar). **E**, Cerebro (imagen izquierda porción del plexo coroideo de cerebelo, derecha células neurales a un aumento 40X). **F**, Bazo (se observa médula roja, médula blanca que rodea al centro germinal).

BIOMARCADORES MINERALIZACIÓN EN SUERO

Actividad Específica de Fosfatasa Alcalina tejido no-específica

Con el fin de evaluar los niveles de expresión proteica a nivel sérico de biomarcadores asociados al proceso de biomineralización, se realizó el ensayo de la actividad de la fosfatasa alcalina (TNP) debido a que es un biomarcador temprano de biomineralización.

El ensayo de actividad de TNP mostró niveles aumentados en el grupo OVX sobre el grupo sano con una diferencia de hasta el 31%. En los grupos tratados con el pCAP de las dos concentraciones se observó que los niveles de actividad de TNP fueron disminuidos, comparado con el grupo sano el grupo tratado con pCAP40 $\mu\text{g}/\text{día}$ obtuvo un porcentaje de 11.2% de diferencia y el grupo tratado con pCAP 80 $\mu\text{g}/\text{día}$ con una diferencia del 22.3. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la prueba de ANOVA one-way ($P < 0.05$), el patrón de disminución fue similar al grupo sano.

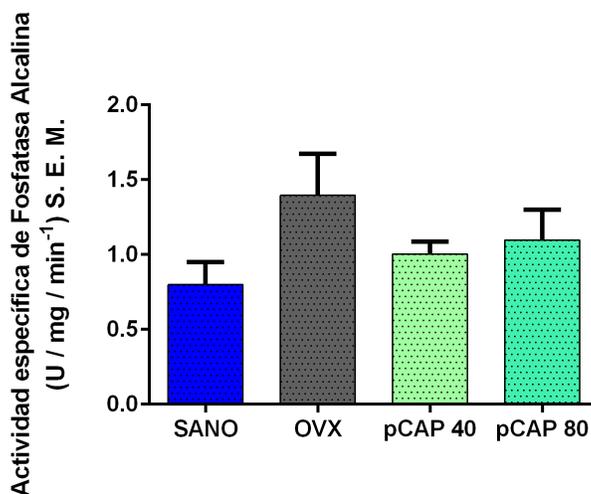


Figura 20. Actividad específica de Fosfatasa Alcalina en suero. El grupo OVX presentó un aumento de la concentración de TNP, y los grupos tratados con pCAP mostraron disminución comparado con el grupo OVX. Los tres grupos comparado con el grupo sano presentaron a diferencias porcentuales de 31% OVX, 11.2% pCAP 40 $\mu\text{g}/\text{día}$ y el grupo pCAP 80 $\mu\text{g}/\text{día}$ un 22.3%. No hay diferencia significativa en el análisis de varianza (ANOVA one-way $P < 0.05$).

ENSAYO DE INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

Se realizaron ensayos ELISA para determinar los niveles de expresión sérica en los otros biomarcadores de biomineralización, tales como osteocalcina (OCN), osteoprotegerina (OPG), y el Ligando del Receptor Activador de RANK (RANKL).

Osteocalcina (OCN)

Los niveles de concentración de OCN sérica en el grupo sano fue de 11.79 ng/ml, el grupo OVX presentó 12.62 ng/ml, y los grupos tratados con pCAP a 40 y 80 µg/día presentaron niveles de 9.79 y 11.89 ng/ml respetivamente con diferencia significativa entre el grupo pCAP40 comparado con el grupo OVX en el análisis de varianza (ANOVA one-way $P < 0.05$).

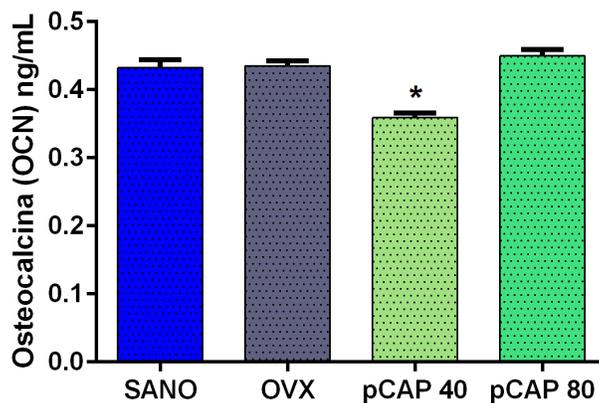


Figura 21. Expresión sérica de Osteocalcina. El grupo OVX presentó niveles ligeramente aumentados comparado con el grupo sano con una diferencia del 7.03%, el grupo tratado con pCAP80 µg/día presentó aumento de concentración sérica con una diferencia del 0.84% por arriba del grupo sano mientras que la concentración sérica en el grupo tratado con pCAP40 µg/día disminuyó hasta un 22.42% de diferencia comparado con el grupo OVX, con diferencia significativa en el análisis de varianza (ANOVA one-way * $P < 0.05$).

Osteoprotegerina (OPG)

Los niveles de OPG en los grupos tratados con pCAP incrementaron sus niveles comparado con el grupo osteoporótico, quien presentó disminución de expresión sérica de OPG. Las concentraciones de OPG fueron del grupo sano 16.85 ng/ml, grupo OVX de 14.27 ng/ml, pCAP40 de 15.64 ng/ml y pCAP80 de 15.78 ng/ml. En tanto que los niveles de OPG en los grupos tratados con pCAP en las dos diferentes concentraciones no mostraron diferencia significativa en el análisis de varianza ($p = < 0.05$), los niveles expresados mostraron un patrón similar al grupo sano.

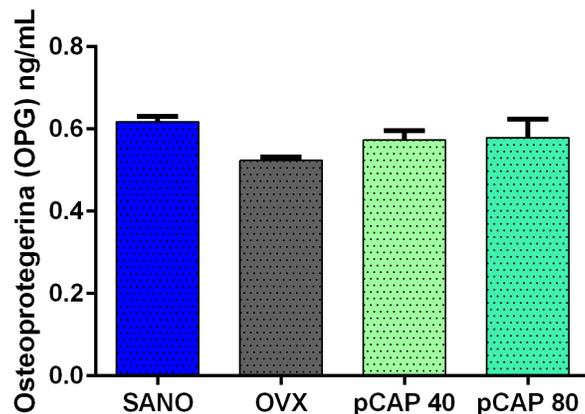


Figura 22. Expresión sérica de Osteoprotegerina. El grupo OVX presentó disminución de expresión sérica de OPG, y los grupos tratados con pCAP en las dos diferentes concentraciones mostraron incremento comparado con el grupo OVX. Las diferencias de los grupos comparado con el grupo sano (como el 100%) fueron de OVX 15.4%, pCAP40 7.2% y pCAP80 6.4%. No hay diferencia significativa en el análisis de varianza (ANOVA one-way * $P < 0.05$).

Ligando del Receptor Activador RANK (RANKL)

Los niveles de RANKL mostraron un aumento en el grupo osteoporótico y en los grupos tratados con pCAP 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{día}$ los niveles se aumentaron. La concentración sérica de RANKL en el grupo sano fue de 15.209 ng/ml, grupo OVX de 20.74 ng/ml, pCAP40 31.74 y pCAP80 de 39.81 ng/ml. El grupo tratado con pCAP 80 $\mu\text{g}/\text{día}$ presentó un incremento con diferencia significativa en el análisis de varianza comparado con el grupo OVX ($p = < 0.05$).

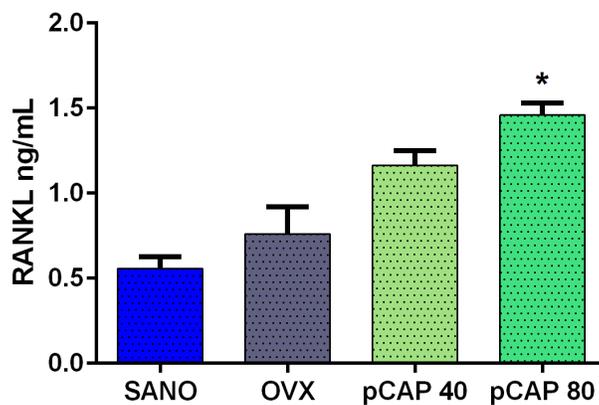


Figura 23. Expresión sérica de RANKL. Las concentración sérica aumentó entre el grupo y en los grupos tratados con pCAP40 y pCAP80 mostraron incrementos con diferencia significativa en el análisis de varianza (ANOVA one-way * $P < 0.05$) entre el grupo tratado con pCAP80 comparado con el grupo osteoporótico.

11. DISCUSIÓN

El presente estudio muestra evidencia sobre el efecto de la utilización de un péptido sintético derivado de la Proteína de Adhesión del Cemento radicular en un modelo de ratas deficientes de estrógenos que desarrollaron osteoporosis. Estudios previos han demostrado que la secuencia de 15 aminoácidos ubicados en el carboxilo-terminal de CAP tiene el potencial de actuar como nucleador de cristales de hidroxapatita en un sistema libre de células asociándose a los procesos de biomineralización; y en estudios recientes, se ha demostrado que el péptido sintético promueve la formación de nuevo tejido óseo *in vivo* en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata^[202] y en tibias de conejo^[209]. Estos descubrimientos condujeron a preguntar si el péptido sería capaz de ejercer un efecto regenerativo a nivel sistémico en una enfermedad metabólica como la osteoporosis.

La ovariectomía bilateral es un pequeño pero importante modelo animal para el estudio de los efectos de la deficiencia de estrógenos que conducen al balance negativo de la arquitectura del hueso trabecular. La ventaja que ofrece el modelo de ovariectomía en roedores es que su esqueleto es más sensible a la pérdida de hormonas ováricas además de mimetizar a la osteoporosis postmenopáusica^[210-213] y debido a la disminución de la masa ósea que ocurre por la osteoporosis, proporciona una información confiable para predecir la eficacia de los agentes antiosteoporóticos^[214].

Los sitios más comunes de las fracturas por osteoporosis incluyen la vértebra y el cuello femoral, donde la información microestructural es una clave para el completo entendimiento de la patogénesis y la predicción de la mejoría del riesgo de fractura^[215, 105]. Las imágenes por microtomografía computarizada revelaron que el fémur y las vértebras lumbares de las 18 ratas que se sometieron a OVX después de 12 semanas la DMO disminuyó significativamente hasta un 86 y 84% respectivamente comparado con el grupo sano, así se aseguró que los animales en estudio cursaban

por el proceso osteoporótico. Al final de las 12 semanas de tratamiento se observó que no sólo hubo una detención de la pérdida ósea, sino una ganancia de ésta en los grupos tratados con pCAP 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{día}$ hasta del 91 y 92% en el hueso cortical del fémur y hasta un 95% en la vértebra L4. Muchos estudios se han enfocado en el análisis de los cambios histomorfométricos y las tasas del recambio óseo en modelos de rata OVX_[211,212,216], pero hay poca mención sobre las diferencias entre la espina vertebral y los huesos largos en ratas OVX; Yong-Hwan y colaboradores_[217] estudiaron las diferencias entre la L4 y el fémur en ratas ovariectomizadas durante 4 y 8 semanas por medio de μCT , y encontraron que la pérdida ósea en la 4ta vértebra lumbar fue principalmente causada por el adelgazamiento trabecular, en tanto que la pérdida ósea en el fémur fue a causa de la eliminación trabecular; Chen *et al*_[218,105] también hacen mención que el hueso esponjoso de la vértebra es metabólicamente más activo que el hueso cortical y la DMO trabecular puede actuar como un inicial predictor de las fracturas osteoporóticas. Tomados en conjunto estos hallazgos muestran la importancia de la utilización del pCAP como tratamiento en las ratas con OVX al incrementar el hueso vertebral con un porcentaje incluso mayor que el que se presentó en el hueso femoral y con ello un efecto protector al riesgo de fracturas.

Los estudios histomorfométricos y estereológicos para determinar la DMO han cuantificado la arquitectura del hueso trabecular en términos de parámetros específicos tales como el grosor trabecular, el porcentaje de anisotropía y la fracción de volumen, pero los estudios biomecánicos teóricos y experimentales han abordado la relación entre la densidad aparente, el módulo y fuerza para resistir los esfuerzos mecánicos. La resistencia a la fractura de hueso depende de su estructura y propiedades mecánicas, que se mantienen por la remodelación ósea permanente_[219]. Las pruebas biomecánicas corroboraron que el tratamiento con pCAP confería otra característica primordial para la recuperación de la función ósea: soporte, fuerza y resistencia a cargas mecánicas incrementando la resistencia a la compresión del cuerpo vertebral en vértebras L5, ya que diversos estudios_[106-108] han reportado que el cuerpo vertebral es un importante e interesante área para investigar los cambios

biomecánicos después de un tratamiento con un fármaco antiosteoporótico que promueva el crecimiento del hueso trabecular así como en el hueso cortical. En nuestro estudio, el tratamiento con pCAP 40 µg/día mostró un patrón de resistencia a la compresión muy similar al grupo sano, sin embargo, en el grupo tratado con pCAP 80 µg/día se incrementó la carga máxima de compresión y rigidez del tejido óseo en ratas osteoporóticas. Takao-Kawabata_[219] realizó pruebas de fuerza biomecánica en cuerpos vertebrales L4 en ratas con OVX tratadas con teriparatide (PTH₁₋₃₄) tres veces por semana en dosis de 5.6 y 28.2 µg/kg y sus resultados muestran que incrementó significativamente la carga máxima, la rigidez y la energía de rompimiento comparado con el grupo OVX y por arriba de los valores del grupo sano. Estos resultados son equiparables a la administración de pCAP80 µg/día que incrementó significativamente estas características sobre el grupo sano y más pronunciado sobre el grupo OVX. Por otro lado, de acuerdo a los hallazgos de Sehmisch_[108], los resultados en la prueba de compresión de L4 en ratas con OVX tratadas con PTH demuestran que las características de resistencia resultaron en mejoría de las estructuras corticales así como en las trabeculares. Las sustancias con potencial osteoprotectivo se reflejan en la composición trabecular así como en el hueso cortical_[220]. La ley de Wolff señala que la función mecánica del hueso está directamente influenciada a su arquitectura y propiedades mecánicas y que **“cada cambio en la forma y función del hueso o por sí sola es seguido de ciertos cambios definidos en su arquitectura interna y la alteración igualmente es definida en su conformación externa ...”**_[221] de modo que pCAP fue capaz de remodelar las estructuras internas reflejándose tanto en la DMO como en la resistencia a la compresión; además existen diversos estudios descriptivos que establecen la relación entre las propiedades mecánicas del hueso trabecular y la densidad aparente, tal como lo menciona Galante *et al*_[222], quien reportó una relación lineal entre la fuerza y la densidad aparente, donde esta última característica es el más importante hallazgo en las propiedades mecánicas del hueso trabecular reflejándose en el incremento de la resistencia mecánica. Por lo tanto, toda esta evidencia señala que el pCAP mostró el potencial para remineralizar un tejido

deficiente, ~~de tejido mineral~~ recuperando la fuerza y resistencia, las cuales son funciones esenciales en el tejido óseo.

El análisis del hueso osteoporótico tiene una particular importancia para identificar las diferencias con aquellos que han ganado tejido mineral mediante la inducción de algún fármaco. La tinción Tricrómica de Goldner Masson es útil para identificar diferencias del tejido osteoide de la matriz ósea mineralizada. La ventaja que ofrece esta tinción histológica es, debido a su componente Hematoxilina (férica), que otorga una marcada distinción entre la matriz ósea madura (la cual tiñe de verde) y la nueva matriz ósea inmadura (que se tiñe de rojo) y de cartílago calcificado que se tiñe de verde muy pálido^[223]. En los cortes histológicos de las vértebras L4 mostrados en este trabajo se observó mayor tendencia a la coloración roja, que de acuerdo a las características descritas por Gruber *et al*^[223], esto corresponde a un depósito mineral constituyendo una nueva matriz ósea inmadura en la matriz ósea observada en las vértebras tratadas con pCAP. Marcu *et al*^[18] investigaron acerca de los cambios histopatológicos en 47 fragmentos de hueso humano y observó que en los huesos osteoporóticos, una de las consecuencias es la disminución de la conectividad de las trabéculas y su espesor es el incremento de los espacios areolares. Ellos determinaron que había una tendencia de degeneración adiposa en la médula hematogena dentro de los espacios areolares, además de estar agrandados e incompletamente separados debido a la lisis de las paredes; así mismo concluyen que la disminución del hueso esponjoso se asocia con el aumento de la relación médula ósea hematogena adiposa en las areolas. Estas características concuerdan con los cortes histológicos de fémur y vértebra L4 del grupo con OVX, pero los espacios de la médula hematogena disminuyó considerablemente en los grupos tratados con pCAP 40 y 80 µg/día. Además, el estudio reportado por Choi *et al*^[224] en el que realizaron investigaciones sobre el efecto del complejo de B-glucano + calcio lactato-gluconato concluyen que un clásico perfil histológico detectado en sus grupos con OVX incluía una marcada pérdida ósea cortical y trabecular con un incremento en los niveles de tejido conectivo en el periostio del hueso cortical resultando de la resorción del tejido osteoide, y en sus

grupos tratados con el complejo resultó que hubo un incremento en la masa y estructura comparado con el grupo sano. En nuestro estudio, la administración del pCAP mostró un efecto inhibitorio en la resorción ósea incrementando el grosor trabecular marcadamente en las vértebras que en el fémur, y probablemente esto podría explicar el aumento de la DMO y el incremento de la resistencia ósea en los experimentos de las pruebas biomecánicas, debido a la reconstitución trabecular. Por otra parte, Ferreti *et al*_[211] reportan que la pérdida ósea temprana y más extensa es en hueso trabecular más que en el hueso cortical. Sus estudios demostraron que hubo mayor pérdida trabecular en vértebras lumbares que en el hueso proximal de tibia, por lo que ellos concluyen que la vértebra pierde hueso por adelgazamiento trabecular. Nuestros resultados concuerdan con estos hallazgos, debido a que entre en las vértebras L4 histológicamente se observó mayor pérdida y adelgazamiento trabecular que en el cuello y cabeza de fémur en el grupo con OVX; sin embargo, el resultado en los grupos tratados con las dos diferentes concentraciones de pCAP se observó una ganancia trabecular desde el estado osteoporótico, hacia un fenotipo similar al sano, observándose un incremento del número trabecular en el grupo tratado con pCAP 80µg/día. Thompson *et al*_[106], indican que el patrón de pérdida ósea difiere entre la columna vertebral y los huesos largos; la primer pérdida, se identifica por adelgazamiento de las trabéculas, pero en los huesos largos, mediante la eliminación de éstas. Al comparar nuestros resultados con los reportes de Thompson, indican que el pCAP tiene capacidad de remineralizar huesos con más susceptibilidad al adelgazamiento de trabéculas (que conducen a mayor pérdida ósea) que en el cuello femoral, donde el proceso de remineralización se observó con menor capacidad. Sin embargo, los datos estadísticos respaldan que las fracturas causadas por osteoporosis se presentan más frecuentemente en las vértebras lumbares_[108]. Este enfoque señala un futuro prometedor destacando las propiedades de pCAP en el tratamiento de la osteoporosis en la pérdida trabecular vertebral.

En el examen histológico se ilustra que la utilización del péptido de CAP por vía intraperitoneal no indujo cambios patológicos ya que la arquitectura de los tejidos de

los grupos tratados con pCAP es similar a la arquitectura normal del grupo sano. Tampoco hubo presencia de algún efecto adverso o reacción inflamatoria al cuerpo extraño. Ninguno de los órganos vitales presentó alteración en la conformación de sus tejidos comparado con el grupo sano. En un estudio realizado por Fahmy *et al*^[225], realizaron secciones teñidos con Hematoxilina y Eosina del hígado y riñón de ratas con OVX tratadas con extracto de garbanzo por vía oral como efecto antiosteoporótico y reportaron que sus grupos tratados no presentaron cambios patológicos y las características del tejido hepático eran similares a sus grupos sanos. Nuestros resultados sugieren que probablemente por el peso molecular de pCAP de 1.65 kDa (y ya que este péptido deriva de una proteína endógena), el sistema inmunológico no desencadenó reacción inflamatoria y al participar en el proceso de remineralización en huesos osteoporóticos brindó mayor factibilidad para su utilización terapéutica.

La regeneración del hueso comprende una serie de eventos biológicos en el que participan gran número de tipos celulares y los productos que secretan^[226]. Los niveles séricos de marcadores de formación ósea correlacionan positivamente con parámetros de Histomorfometría de formación ósea^[227,128,228]. Aunque hay variabilidad en los métodos para medir el recambio y la formación ósea en los estudios previos, el nivel de osteocalcina es el marcador generalmente aceptado para la renovación ósea debido a que **es un ácido α -carboxiglutámico** dependiente de vitamina K liberado por los osteoblastos, mientras que los niveles de fosfatasa alcalina se considera para demostrar la nueva formación del hueso^[229-232]. De la fosfatasa alcalina, la isoforma ósea posee la ventaja de no presentar variación entre sexos^[233], es una enzima localizada en la superficie de osteoblastos, y probablemente está involucrada en la regulación de la mineralización del tejido osteoide^[128]. Los niveles de TNP y OC incrementan cuando los niveles de estrógeno disminuyen^[234-236], por lo tanto, la actividad osteoblástica se puede aproximar de acuerdo a los niveles séricos de TNP y OC^[156]. En un estudio de ratas OVX, Kim *et al*^[212] encontraron grandes concentraciones en plasma de OCN en sus grupos OVX, y los reportes de Kyung-Hyuk *et al*^[237] mostraron que los niveles de TNP y OCN fueron elevados, indicando un

incremento del recambio óseo acelerado a causa de la osteoporosis. Choi *et al*^[224] probaron el efecto del Polycan (complejo β -glucano) y calcio lactato-gluconato en donde los niveles de TNP y OCN estaban disminuidos comparados con sus grupos OVX concluyendo que el efecto era antiosteoporótico. El tratamiento con pCAP en las dos concentraciones mostraron disminución de los niveles séricos de TNP, sin embargo los valores más cercanos al grupo sano fue la concentración de 40 μ g/día. Este resultado coincide con los niveles de OCN en donde el grupo tratado con pCAP 40 μ g/día presentó disminución con diferencia significativa comparado con el grupo OVX, sin embargo, en el grupo tratado con pCAP 80 μ g/día no disminuyó ya que, aunque presentó una concentración inferior al grupo OVX, mostró un 0.84% arriba del grupo sano. Con esta evidencia, la concentración que mostró mejores resultados en los biomarcadores de formación ósea fue el grupo tratado con pCAP 40 μ g/día. Esto nos conduce a pensar que ejerce un efecto (además de anti-resortivo) regenerativo en el hueso osteoporótico recuperando las características fisiológicas y funcionales del hueso. La doble concentración del péptido (80 μ g/día) aunque en la prueba a la compresión del cuerpo vertebral L5 demostró tener un efecto por arriba de los valores del grupo sano, en las pruebas histológicas de la vértebra L4 se observó una reducción del espacio medular, por lo que sus efectos podrían ser blanco de estudio para identificar los efectos secundarios que conducen a este incremento trabecular.

Actualmente, uno de los mayores estudios que se han realizado para producir un efecto anabólico en la osteoporosis es la administración de un péptido derivado de la hormona teriparátida (PTH₁₋₃₄). Estudios muestran que este fármaco con una aplicación intermitente, produce un efecto anabólico y puede reducir el riesgo de fracturas óseas, sin embargo, una administración continua conduce a efectos catabólicos, induciendo la resorción ósea^[108]. Whitfield, *et al*^[238] mencionan que después de la aplicación intermitente de PTH, se produce en primer lugar una fase de activación de los osteoclastos conduciendo a la resorción. Resultaría interesante pensar que la doble concentración de pCAP tendría un efecto similar al de la PHT debido a que los niveles de RANKL que fueron sobreexpresados en el grupo tratado

con pCAP 80µg/día (como se detallará más adelante); sin embargo no se observó que el péptido a concentración de 80 µg/día resultara con efecto resortivo, en cambio se observó incremento óseo observado en la histología de las vértebras con la disminución del espacio medular. Debido a estos hallazgos se requieren de más estudios para poder concretar y entender el mecanismo de éste.

El descubrimiento de OPG, RANKL y RANK ha arrojado luz sobre la comprensión de la regulación de la modelación y remodelación ósea^[239]. OPG es uno de los miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), y una glicoproteína soluble secretada por diversas células mesenquimales, tales como osteoblastos^[240] y células estromales de la médula ósea^[241]. La OPG actúa como un receptor señuelo soluble para RANKL y, por tanto, disminuye la resorción ósea. RANKL es una citocina expresada por varias células óseas, incluyendo osteoblastos y sus precursores inmaduros^[242], los linfocitos T activados y linfocitos B^[243]. RANKL es esencial para la mediación de la resorción ósea, ya que estimula la actividad de la osteoclastogénesis mediante la unión a su receptor RANK expresado en la superficie de osteoclastos^[243,244]. RANK es también un miembro de la familia TNFR^[245] y es altamente expresado por una amplia variedad de células, tales como los precursores de osteoclastos, los osteoclastos maduros, B y linfocitos T, células dendríticas, fibroblastos y condrocitos articulares, y se considera como un receptor natural de RANKL^[244]. La unión de RANKL a RANK conduce a la activación de vías de señalización, para regular la función de los osteoclastos. OPG protege los huesos de la resorción excesiva por la inhibición de la unión RANKL a RANK^[246]. Por lo tanto, la vía de señalización OPG / RANKL / RANK se considera como un sistema de citocinas claves para el control la remodelación ósea. En nuestros resultados, los niveles de OPG fueron elevados comparado con el grupo OVX aunque sin diferencia significativa en las dos concentraciones de pCAP, y en el grupo OVX fueron disminuidas. Los niveles de OPG incrementan con la edad, y posiblemente la producción de OPG se eleva como una respuesta homeostática a limitar la pérdida ósea que ocurre con un incremento por otros factores de reabsorción ósea^[62,247]. Estudios realizados por

Buccay^[148] demostraron que la sobreexpresión del gen de OPG en ratones resultó una masa ósea elevada y una notable reducción en el número y actividad de osteoclastos; en los ratones knockout además de la DMO disminuida, el número de osteoclastos era elevado y no se observó más tejido óseo. Un estudio realizado por Liu *et al*^[247] investigó los efectos de suplementos de hiervas chinas para el tratamiento de la osteoporosis en ratas OVX y sus resultados mostraron que los niveles de proteína de RNAm de RANKL fueron disminuidos significativamente pero no hubo cambio en los niveles de expresión de OPG observados en osteoblastos y células troncales mesenquimales de las ratas con OVX en tratamiento. Diversos estudios en modelos de OVX establecen que para que se lleve a cabo la osteoclastogénesis, en la relación entre OPG/RANKL en suero debe haber un aumento de RANKL proporcional a la disminución de OPG^[225,248,36,249]. Además, otros estudios han demostrado las correlaciones positivas y negativas entre las concentraciones de las proteínas OPG y RANKL^[250,251] vs DMO, sin embargo, algunos autores cuestionan la aparición de estas relaciones en absoluto^[252-254].

Nuestros resultados mostraron que la expresión sérica de RANKL se incrementó en los grupos con tratamiento, de forma significativa en el grupo tratado con pCAP 80 µg/día en tanto que pCAP 40 µg/día presentó menores niveles que éste, aunque mayor al del grupo OVX. Debido a que los niveles de OPG fueron elevados comparado con el grupo OVX, se esperaba que los niveles de RANKL fueran disminuidos; sin embargo, acorde a los resultados observados en la DMO, resistencia a la compresión y en los cortes histológicos que muestran la regeneración de los huesos osteoporóticos analizados, sugieren que el mecanismo por el cual pCAP induce la remineralización ósea implica otra mecanismo distinto al conocido por la inducción de estrógenos. Sin embargo, el péptido demostró poseer potencial regenerador a pesar de la pérdida estrogénica.

La información contenida en este trabajo no proporciona información sobre los mecanismos de acción que pueda conducir a distinguir las propiedades de las dos diferentes concentraciones de pCAP, por lo que será necesario extender las

investigaciones en comprender cómo es el mecanismo por el cual pCAP ejerce su potencial regenerador.

12. CONCLUSIONES

La utilización del péptido sintético derivado de la Proteína de Adhesión del Cemento radicular para el tratamiento de la osteoporosis demostró jugar un papel importante no sólo para el detenimiento del proceso osteoporótico, sino de incrementar a partir de este estado características similares a un tejido óseo sano, y esto confiere la recuperación de la función propia del hueso, como la ganancia de masa ósea, restitución trabecular, aumento de la capacidad de soporte y resistencia a fuerzas mecánicas.

De las dos concentraciones utilizadas, este trabajo reveló que la concentración de 40 µg/día promovió la regeneración ósea recuperando las características más similares al grupo sano que la concentración de 80µg/día, cumpliendo así con el objetivo planteado. Sin embargo, los resultados demuestran que el pCAP promueve el proceso de remineralización en ratas osteoporóticas proporcionando una alternativa para la futura terapia de esta enfermedad ósea.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Klein-Nulend J, Van Oers R, Bakker AD, Rommel GB. Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis. *Journal of Biomechanics*. 2014; 48:855-865.

2. Kofron MD, Li X. Laurencin CT. Protein and gene-based tissue engineering in bone repair. *Current opinion in biotechnology*. 2004;15(5):399-405.
3. Rameshwar RR, Stegemann JP. Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytotherapy*, 2013; 15:1309-1322.
4. Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet* 2006; 367: 2010-18.
5. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002; 359: 1761-67.
6. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application in screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organization Tech Rep Ser*. 1994; 843:1-129.
7. Sikon A, Thacker H, Carey J, Deal C, Licata A. Secondary osteoporosis: are we recognizing it? *J Womens Health (Larchmt)* 2006; 15: 1174–1183.
8. Moayyeri A, Ahmadi-Abhari S, Hossein-nezhad A, Larijani B, Soltani A. Bone mineral density and estimated height loss based on patients' recalls. *Osteoporos Int* 2006; 17: 834–840.
9. Eggertsen R, Mellström D. Height loss in women caused by vertebral fractures and osteoporosis. *Ups J Med Sci* 2007; 112: 213–219.
10. Schurman L, Bagur A, Claus-Hermberg H, Messina O, Negri AL, et al. Guías 2012 para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la osteoporosis. *Medicina* 2013; 73:55-74.
11. National Osteoporosis Foundation: Fast Facts. Available at: URL <http://www.nof.org/node/40>.
12. Vedi S, Compston JE. The effects of long-term hormone replacement therapy on bone remodelling in postmenopausal women. *Bone* 1996; 19:535–9.
13. Eriksen EF, Díez-Pérez A, Boonen S. Update on long-term treatment with bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: A systematic review. *Bone*, 2014; 58: 126-135.
14. **Diculescu I, Onicescu D. Histologie medicală, vol. I, Ed. Medicală, București, 1987.**
15. Day J. Bone quality: the mechanical effect of microarchitecture and matrix properties. *Optima Grafische Comunicatie*, 2005; 11–18.
16. **Ianculescu A, Mogoș G. Compendiu de anatomie și fiziologie a omului, Ed. Științifică, București, 1972.**
17. **Stoica E, Ignat L. Materiale compozite bioactive pentru reconstrucție osoasă. Materiale compozite sustenabile pentru îmbunătățirea calității vieții, Ed. PIM, Iași, 2006, 52–121.**
18. Marcu FL, Bogdan FL, Mutiu G, Lazar L. The histopathological study of osteoporosis. *Rom J Morphol Embryol*, 2011; 52 (1): 321-25.
19. Olszta MJ et al. Bone structure and regeneration: A new perspective. *Materials Science and Engineering* 2007; 58: 77-116.
20. Schwartz NB, Pirok EW 3rd, Mensch JR Jr, Domowicz MS. Domain organization, genomic structure, evolution, and regulation of expression of the aggrecan gene family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol.* 1999; Biol.62:177–225.
21. Wiesmann HP, Meyer . Aspects of Collagen Mineralization in Hard Tissue Formation. *International Review of Cytology*, 2005; 242: 121- 56.
22. Kawasaki K, Buchanan AV, Weiss KM. Biomineralization in humans: Making the Hard Choices in Life. *Annu. Rev. Genet.* 2009; 43: 119-142.
23. Hulmes DJ. Building Collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J Struct. Biol.* 2002; 137:2-10.
24. Wiesmann HP, Meyer . Aspects of Collagen Mineralization in Hard Tissue Formation. *International Review of Cytology*, 2005. 242: 121- 56.
25. Gorski JP. Biomineralization of bone: a fresh view of the roles of noncollagenous proteins. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2015; 16: 2598-2621.
26. Olsen, Bjorn R. Bone Embryology. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Editado en: Favus, Murry J. American Society for Bone and Mineral Research; Whashington, DC: 2006.
27. Talbott SM, Cifuentes M, Dunn MG, Shapses SA. Energy restriction reduces bone density and biomechanical properties in aged female rats. *J Nutr*, 2001; 131: 2382-7.
28. Westerbeek ZW, Hepple RT, Zernicke RF. Effects of aging and caloric restriction on bone structure and mechanical properties. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008; 63:1131-6.
29. Whitehouse WJ, Dyson ED, Jackson CK. A fine structure in the trabeculation of the human rib. *J Radiol* 1971; 44: 367-372.
30. Whitehouse WJ. Scanning Electron Micrographs of cancellous bone from the human sternum. *J path.*, 1975; 116: 213-223

31. Whitehouse WJ, Dyson ED, Jackson CK. The scanning electron microscope in studies of trabecular bone from a human vertebral body. *J Anat.*, 1971; 108: 481- 496.
32. Anderson, GL, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the **Women's Health Initiative randomized** controlled trial. *JAMA*. 2004. 291:1701-1712.
33. Negri L. Regulation of Bone Mineralization by inorganic and peptide factors. *Rev Arg Endocrinol y Met*, 2011; 48 (4): 216-24.
34. Kirsch T. Determinants of pathological mineralization. *Curr Opin Rheumatol*, 2006; 18: 174-180.
35. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Othop Rel Res.*, 1995; 314: 266-280.
36. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115(12): 3318-24.
37. Consensus Development Conference. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Osteoporosis International* 1991;1:114–117.
38. Cooper AP. A treatise on dislocation and fractures of the joints. London: John Churchill, 1842.
39. Albright F, Bloomberg E, Smith PH. Postmenopausal osteoporosis. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 1940, 55:298-305.
40. Riggs BL. Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. *J. Clin. Invest.* 70:716-23.
41. Holroyd C, Cooper C, Dennison E. Epidemiology of osteoporosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008, 22(5): 671-85.
42. Schapira D, Schapira C. Osteoporosis: the evolution of a scientific term. *Osteoporos. Int.* 1992, 2:164-7.
43. Reddy MS, Morgan SL. Decreased bone mineral density and periodontal management. *Periodontology* 2000, 2013; 61: 195-218.
44. Consensus Development Conference. Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993; 94:646–650.
45. Turner C. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos Int* 2002; 13: 97–104.
46. Eggertsen R, Mellström D. Height loss in women caused by vertebral fractures and osteoporosis. *Ups J Med Sci* 2007; 112: 213–219.
47. Kanis AJ. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *The Lancet*, 2002; 359: 1929-36.
48. Muller R, Kamps M, Khassawna TE, Schlewits G, et al. Change of Mechanical vertebrael properties due to progressive osteoporosis: combined biomechanical and finite-element analysis within a rat model. *Med Biol Eng Comput*, 2014; 52: 405-14.
49. Cummings SR, Melton LJ 3rd. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002; 359: 1761-7.
50. Salica D, Buceta A, Palcios S, Sánchez A, et al. Consenso Iberoamericano de Osteoporosis SIBOMM 2009. Osteoporosis: Prevención, Diagnóstico y Tratamiento. *Rev Arg Osteol* 2010; 9: 4-44.
51. Kanis JA. WHO Technical Report, University of Sheffield, 2007; UK: 66.
52. Johnell O and Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int*, 2006;17:1726.
53. Melton LJ, 3rd, Atkinson EJ, O'Connor MK, et al. (1998) Bone density and fracture risk in men. *J Bone Miner Res* 13:1915.
54. Melton LJ, 3rd, Chrischilles EA, Cooper C, et al. (1992) Perspective. How many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res* 7:1005.
55. Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. (2000) Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmo. *Osteoporos Int* 11:669.
56. EFO and NOF (1997) Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis? *Osteoporos Int* 7:1.
57. Cooper C, Campion G, Melton LJ, 3rd (1992) Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int* 2:285.
58. Gomez Garcia F Morbimortalidad de fracturas de cadera en el Hospital de Traumatología Magdalena de las Salinas. IMSS. *Rev Mex Ortop Traum*, 1998; 2:48.
59. Clark P, Lavielle P, Franco-Marina F, et al. Incidence rates and life-time risk of hip fractures in Mexicans over 50 years of age: a population-based study. *Osteoporos Int*, 2005;16:2025.
60. Clark P, Carlos F, Barrera C, et al. Direct costs of osteoporosis and hip fracture: An analysis for the Mexican healthcare system. *Osteoporos Int*, 2008; 19:269.

61. Hui SL, Gao S, Zhou XH, Johnston CC, Lu Y, Glüer CC, et al. Universal standardization of bone density measurements: a method with optimal properties for calibration among several instruments. *J Bone Miner Res* 1997;12:1463-1470.
62. Cooper C, Campion G, Melton LJ. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int* 1992;2:285.
63. International Committee for Standards in Bone Measurement. Standardization of proximal femur bone mineral density (BMD) measurements by DXA. *Bone* 1997;21:369-370.
64. Johnell O and Kanis JA (2006) An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 17:1726.
65. Jordan KM and Cooper C (2002) Epidemiology of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16:795.
66. Cummings SR, Black DM, Rubin SM (1989) Lifetime risks of hip, Colles', or vertebral fracture and coronary heart disease among white postmenopausal women. *Arch Intern Med* 149:2445.
67. Keene GS, Parker MJ, Pryor GA (1993) Mortality and morbidity after hip fractures. *BMJ* 307:1248.
68. **Cooper C, Atkinson EJ, O' Fallon WM, Melton LJ. Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985-1989. *J Bone Miner Res*, 1992; 7:221-27.**
69. Kaptoge S, Armbrecht G, Felsenberg D, et al. (2004) Cuando el médico debe ordenar una columna de rayos X? La identificación de las fracturas vertebrales para el cuidado de la osteoporosis: resultados del Estudio Prospectivo Europeo de Osteoporosis (EPOS). *J Bone Miner Res* 19: 1982.
70. Delmas PD, Van de Langerijt L, Watts NB, et al. Underdiagnosis of vertebral fractures is a worldwide problem: the IMPACT study. *J Bone Miner Res* 20:557.
71. Melton LJ III, Kan SH, Frye MA, et al. Epidemiology of vertebral fractures in women. *Am J Epidemiol* 1989; 129(1):1000-101.
72. Gallagher JC, Menton LJ, Riggs BL, et al. Epidemiology of fractures of the proximal femur in Rochester, Minnesota. *Clin Orthop*, 1980; 150:163-71.
73. **Mohammad MI. Osteoporosis: Epidemiology , Diagnosis, and Treatment. *South Med J*. 2000;93(1).**
74. Cauley J. Osteoporosis in men: prevalence and investigation. *Clin Cornerstone* 2006; 8(Suppl. 3): S20–S25.
75. Consensus Development Conference. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am F Med* 1993; 94: 646-50.
76. Bonjour JP, Rizzoli R. Bone acquisition in adolescence. In: Marcus R Feldman D, Kelsey J, eds. *Osteoporosis*. San Diego_ Academic Press, 1996: 465-76.
77. WHO. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: technical report series 843. Geneva: WHO, 1994.
78. Kanis JA, Glüer CC, for the Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. *Osteoporos Int* 2000; 11: 192-202.
79. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 1994; 9: 1137-41.
80. Kanis JA, McCloskey EV, de Takats D, Pande K. Clinical assessment of low bone mass, quality and architecture. *Osteoporos Int*, 1999; 9 (1): 24-28.
81. Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmo. *Osteoporos Int*, 2000; 11: 669-74.
82. Allende-Vigo M. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *P R Healt Sci J*, 2007; 26: 91-95
83. Lata P, Elliott M. Patient assessment in the diagnosis, prevention, and treatment of osteoporosis. *Nutr clin Pract*, 2007; 22:2661-75.
84. Holick MF, Siris ES, Binkley N, Beard MK, Khan A, Katzer JT, Petruschke RA, Chen E, de Papp AE. Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal North aAmerican women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90:3215-24.
85. Miller P. Guidelines for the diagnosis of osteoporosis: T-scores vs fractures. *Rev Endocr Metab Disord*, 2006; 7:75-89.
86. Genant HK, Engelke K, Fuerst T, et al. Non invasive assessment of bone mineral and structure: state of the art. *J Bone Miner Res* 1996; 11:707–30.
87. Keaveny MT, Hayes WC. A 20-Year Perspective on the Mechanical Properties of Trabecular Bone. *Journ of Biomechanical Engineering*, 1993; 115: 534-542.

88. Kanis JA, Delmas P, Buckhardt P, et al. Guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. *Osteoporos Int* 1997; 7: 390-406.
89. Genant HK, Cann CE, Ettinger B, Gordan GS. Qualitative computed tomography of vertebral spongiosa: a sensitive method for detecting early bone loss after oophorectomy. *Ann Intern Med* 1982; 97: 699-705.
90. Lang T, Augat P, Majumdar S, Ouyang X, Genant HK. Non-invasive assessment of bone density and structure using computed tomography and magnetic resonance. *Bone* 1998; 2(suppl): 149-53.
91. Ruegsegger P, Elsasser U, Anliker M, Gnehm H, Kind H, Prader A. Quantification of bone mineralisation using computed tomography. *Radiology*, 1976; 121: 93-97.
92. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hubner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Scholer HR. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009; 136:411-419.
93. Van Staa TP, Leufkens HGM, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res*, 2001; 15: 993-1000.
94. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Investig*, 1998; 102:274-282.
95. Canalis E, Bilezikian JP, Angeli A, Giustina A (2004) Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 34:593-598.
96. Kelley GA, Kelley KS, Tran ZV. Exercise and lumbar spine bone mineral density in postmenopausal women: a metaanalysis of individual patient data. *J Gerontol a biol sci Med sci*, 2002; 47: M599-M604.
97. Reid DM. Can high bone turnover markers identify osteopenic postmenopausal women at risk of future fracture? *Nat Clin pract endocrinol Metab* 2007; 3: 570-1.
98. Garnero P, Delmas PD. Contribution of bone mineral density and bone turnover markers to the estimation of risk of osteoporotic fracture in postmenopausal women. *J Musculoskelet Neuronal interact* 2004; 4: 50-63.
99. Salica D. Osteoporosis inducida por tabaco. *rev arg osteol* 2003; 2: 20-9.
100. Krall EA, Dawson-Hughes B. Smoking increases bone loss and decrease intestinal calcium absorption. *J bone Mineral res*, 1999; 14: 215-20.
101. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, et al. Risk factors for hip fracture in white women. *N engel J Med Res*, 1995; 332: 767-73.
102. Ross PD, Genant HK, Davis JW, Miller PD, Wasnich RD. Predicting vertebral fracture incidence from prevalent fractures and bone density among non black, osteoporotic women. *Osteoporos Int* 1993; 3:120-26.
103. Heaney RP. Remodeling and skeletal fragility. *Osteoporos Int*, 2003; 14 (5): S12-15.
104. Currey JD. Role of collagen and other organics in the mechanical properties of bone. *Osteoporos Int*, 2003; 14 (5): S29-36.
105. Chen Huayue, Kubo Ki-ya. Bone three-dimensional microstructural features of the common osteoporotic fracture sites. *Workl Jn of Orthopedics*, 2014. 5: 486-95.
106. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, et al. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 1995; 17: 125-33.
107. Wronski TJ, Morey ER. Alterations in calcium homeostasis and bone during actual and simulated space flight. *Med Sci. Sports Exccerc.*, 1983; 15: 410-14.
108. Sehmisch S, Erren M, Rack T, Tezval M, et al. Short-Term Effects of Parathyroid Hormone on Rat Lumbar Vertebrae. *SPINE* 2009, 34: 2014-21.
109. Chen H, Shoumura S, Emura S, Bunai Y. Regional variations of vertebral trabecular bone microstructure with age and gender. *Osteoporos Int*, 2008; 19: 1473-83 [PMID: 18330606]
110. Dubey A, Koval KJ, Zuckerman JD. Hip fracture epidemiology: a review. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 1999; 28: 497-506 [PMID: 10497856]
111. Lotz JC, Cheal EJ, Hayes WC. Stress distributions within the proximal femur during gait and falls: implications for osteoporotic fracture. *Osteoporos Int* 1995; 5: 252-261 [DOI: 10.1007/BF01774015]
112. Chen H, Zhou X, Shoumura S, Emua S, Bunai Y. Age-and gender-dependent changes in three-dimensional microstructure of cortical and trabecular bone at the human femoral neck. *Osteoporos Int*, 2010; 21: 627-636 [PMID: 19543764]
113. Alford A, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular Matrix Networks boneremodeling. *Cell Biol Int J Biochem* 2015; 15: 1357-2725.

114. Roux S. New treatment targets in osteoporosis. *Joint Bone Spine* 2010; 77: 222-28.
115. Wang L, Liu S, Zhao Y, Liu Y, et al. Osteoblast-induced osteoclast apoptosis by fas ligand/ FAS pathway is required for maintenance of bone mass. *Nat. Cell Death and Differentiation* 2015; 15:1-11.
116. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *TRENDS in Molecular Medicine* 2006; 12(1):17-25.
117. Bouxsein ML. Mechanism of Osteoporosis Therapy: A Bone Strength Perspective. *Clinical Cornerstone* 2003; 2: 13-21.
118. Martin A, Xiong J, Koromila T, et al. Estrongen antagonize RUNX2-mediated osteoblast-driven osteoclastogenesis through regulating RANKL membrane association. *Bone* 2015; 75: 96-104.
119. Jae-Hwan C, Min-Tae K, Hae-Kag L, et al. Factor Analysis of Biochemical Markers Associated with Bone Mineral Density in Adults. *J Phys. Ther. Sci.* 2014; 26: 1225-29.
120. Wheeler G, et al. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *Journal of Translational Medicine* 2013; 11(201): 1-14.
121. Karimi J, Moshtaghi AA, Haghghi B. High molecular weight Alkaline Phosphatase Changes Following animal Cooper treatment. *Avicenna J Med Biochem*, 2014; 2(1): 1-4.
122. Ho CM, Ho MC, Shau WY et al. Isolated increase in serum alkaline phosphatase after liver transplantation: risk factors and outcomes analysis. *Int Surg.*, 2013; 11(1): 92-5.
123. Yorio Ma, Sembaj A, Sanz E, Carriazo C et al. Alkaline phosphatase isoenzymes for the diagnosis of metastatic tumors and lymphomas of liver and bone. *Medicina (B Aires)*, 2000; 60(3): 311-15.
124. Van de Boss T, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament: age effect relation to cementum growth rate. *J Period Res*, 1999; 34: 1-6.
125. Evans DB, Bunningg RAD, Russell RGG. The effect of recombinant human interleukine-1 β on cellular proliferation and the production of prostaglandin E₂, plasminogen activator, osteocalcin and alkaline phosphatase by osteoblast-like cells derived from human bone. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; 166: 208-216.
126. Nian H, Qin LP, Zhang QY, Zheng Hc, Yu YH, Huang BK. Antiosteoporotic activity of Er-Xian Decoction, a traditional Chinese herbal formula, in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol*, 2006; 108: 96-102.
127. Whyte MP, Peck WA. Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphataemia. *Bone and mineral research*, 1989; 6:175-218.
128. Ureña P, Hruby M, Ferreira A, ang KS, de Vernejoul MC. Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 1996; 7:506- 512.
129. Bartold PM and Narayanan AS. *Biology of the periodontal connective tissues*. Quintessence Publishing Co, Inc. 1998 Carol Stream, Illinois, USA.
130. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*, 1989; 69: 990–1047.
131. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, 2016; 82: 42-49.
132. Booth SL, Broe KE, Peterson JW et al. Associations between vitamin K biomechanical measures and bone mineral density in men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:4904-9.
133. Clemens TL, Karsenty G. The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res*, 2011; 26: 677-80.
134. Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci*, 1976; 73: 447–1451.
135. Ritter NM, Farach-Carson MC, Butler WT. Evidence for the formation of a complex between osteopontin and osteocalcin. *J Bone Miner Res*, 1992; 7: 877–885.
136. Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, Yang DS. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure *Nature*, 2003; 425: 977–980.
137. Kong Wah NG. Potential role of odanacatib in the treatment of osteoporosis. *Clinical Interventions in Aging* 2012; 7: 235–247.
138. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; 139: 1329-37.
139. Wong BR, Josien R, Lee SY et al. The TRAF family of signal transducers mediates NFkappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 1998; 273: 28355-59.

140. Trouvin AP, Goeb V (2010) Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging* 5:345–354.
141. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*, 2008; 473: 139-46.
142. Tu P, Duan P, Zhang RS, X, et al. Polymorphisms in genes in the RANKL/RANK/OPG pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in postmenopausal women. *Osteoporos Int*, 2015 26:179–185.
143. Kim N, Odgren PR, Kim DK, et al. Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97:10905–10910.
144. Stuss M, Sewerinek E, Król, Stepień-Kłos W, Jadrzejczyk S. Assessment of OPG, RANKL, bone turnover markers serum levels and BMD after treatment with strontium ranelate and ibandronate in patients with postmenopausal osteoporosis. DOI: 10.5603/EP.a2016.0014.
145. Chakravarti A, Marceau AA, Flamand L et al. Normal human primary CD4+ T lymphocytes synthesize and release functional osteoprotegerin in vitro. *Lab Invest* 2008; 88: 171-84.
146. Ziolkowska M, Kurowska M, Radzikowska A et al. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1744-53.
147. Vanderborght A, Linsen L, Thewissen M et al. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand mRNA expression in patients with rheumatoid arthritis and healthy controls. *J Rheumatol* 2004; 31: 1483-90.
148. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. los ratones deficientes en osteoprotegerina desarrollan osteoporosis de aparición temprana y la calcificación arterial. *Genes Dev*. 1998; 12 : 1260-68.
149. Huynh N, et al. Characterization of Regulatory Extracellular Vesicles from Osteoclasts. *J Dent Res*, 2016. DOI: 10.1177/0022034516633189
150. Boyle JW, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003; 423: 337-342.
151. Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, 2000; 141 (9): 3478- 84.
152. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends Mol Med*. 2013 19(3): 197–209.
153. Frinkelstein JS, Lee H, Burnett-Bowie SM, Pallais JC, Yu EW, Borges LF, et al. Gonadal steroids and body composition strength, and sexual function in men. *N Engl J Med.*, 2013; 369: 1011-22.
154. Birkhauser M. Treatment of pain in estrogen deficiency. *Arch Gynecol Obstet.*,1996; 259(1): 74–79. [PubMed: 9133284]
155. Bord S, Ireland DC, Beavan S, Compston JE. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone*, 2003; 32: 136-41.
156. Ahn H, Seo DH, Kim HS, Choue R. Calorie restriction aggravated cortical and trabecular bone architecture in ovariectomy-induced estrogen-deficient rats. *Science Direct*, 2014; 34: 707-13.
157. Warburton DE, Nicol CW, Gatto N, Bredin SS. Cardiovascular disease and osteoporosis: balancing risk management. *Vasc Health Risk Manag*, 2007; 3: 673-89.
158. Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*, 2006; 85:584-95.
159. Balash J. Sex steroids and bone: current perspectives. *Hum Reprod Update*, 2003; 9: 207-22.
160. Frenkel B, et al. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *J Cell Physiol*. 2010; 224: 30
161. Akesson K. New approaches to pharmacological treatment of osteoporosis. *Bull World Health Organ*, 2003; 81: 657-64.
162. Parker MJ, Gillespie WJ, Gillespie LD. Hip protectors for preventing hip fractures in older people. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 3 :CD001255.
163. Bonnick S. Osteoporosis in men and women. *Clin Cornerstone* 2006; 8 28-39.
164. Keen R. Osteoporosis: strategies for prevention and management. *Best Pract Res clin Rheumatol*, 2007; 21: 109-22.
165. Shoback D. Update in osteoporosis and metabolic bone disorders. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92: 747-53.
166. Chapuy M, Arlot M, Duboeuf F, et al. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly. *N Engl J Med*1992; 327: 1637–42.

167. Trivedi D, Doll R, Khaw K. Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community: randomised double blind controlled trial. *BMJ* 2003; 326: 469–75.
168. Grant AM, Avenell A, Campbell MK, et al. Randomised placebocontrolled trial of daily oral vitamin D3 and/or calcium for the secondary prevention of low trauma fractures in the elderly. *Lancet* 2005; 365: 1621–28.
169. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Giovannucci E, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA*, 2005; 293: 2257–64.
170. Jackson RD, LaCroix A, Gass M, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *N Engl J Med* 2006; 354: 669–83.
171. Harris RP, Grady WS. Hormone therapy for the prevention of chronic conditions in postmenopausal women: recommendations from the US Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, 2005; 142: 855-60.
172. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA*, 2002; 288: 321–30.
173. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women **with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial.** *JAMA*, 2004; 291: 1701–12.
174. Salpeter SR, Walsh JM, Greyber E, Ormiston TM, Salpeter EE. Mortality associated with hormone replacement therapy in younger and older women: a meta-analysis. *J Gen Intern Med*, 2004; 19: 791–804.
175. Cauley JA, Robbins J, chen Z, Cummings SR, Jackson RD, LaCroix AZ, BeBoff M, Lewis CE, McGowan J, Neuner J, et al. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density_ the Womens Health Initiative randomized trial. *J Am Med Assoc*, 2003; 290: 1729-38.
176. Cummings SR, Black DM, Thompson DE, Applegate WB, Barrett-Connor E, Musliner TA, Palermo L, Prineas R, Rubin SM, Scott JC, Vogt T, Wallace R, Yates AJ, LaCroix AZ, for the Fracture Intervention Trial Research Group. Effect of alendronate on risk of fracture in women with low bone density but without vertebral fractures: results from the Fracture Intervention Trial. *J Am Med Assoc*, 1998; 280: 2077-82.
177. Chesnut CH III, Silverman S, Andriano K, Genant H, Gimona A, Harris S, Kiel D, LeBoff M, Maricic M, Miller P, Moniz C, Peacock M, Richardson P, Watts N, Baylink D, for the PROOF Study Group. A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fracture study. *Am J Med* 2000; 109: 267-76.
178. Chesnut CH III, Azria M, Silverman S, Engelhardt M, Olson M, Mndeholm L. Salmon calcitonin_ a review of current and future therapeutic indications. *Osteoporos Int* 2008; 19: 479-91.
179. Russell RG, Whatts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanism of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008; 19: 733-59.
180. Braithwaite RS, Col NF, Wong JB. Estimating hip fracture morbidity, mortality and costs. *J Am Geriatr Soc* 2003; 51: 364-70.
181. The National Hip Fracture Database. National hip fracture database national report 2012. The National Hip Fracture Database; 2012 [Disponible en: <http://www.hqip.org.uk/assets/NCAPOP-Library/NCAPOP-2012-13/Hip-Fracture-Database-Audit-Reportpub-2012.pdf>. Consultado el 24 de Octubre 2014].
182. Nevit M, Cummings S. Type of fall and risk of hip and wrist fractures: the study of osteoporotic fractures. *J Am Geriatr Soc* 1993; 41: 1226-34.
183. Silverman S, Gold D, Cramer J. Reduced fracture rates observed only in patients with proper persistence and compliance with bisphosphonate therapies. *South Med J* 2007; 100: 1214-18.
184. Prolia (denosumab): 60 mg/mL solution for injection [product monograph] Mississauga (ON): Amgen Canada Inc; Oct 20, 2014
185. Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, et al. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev*, 2005; 26: 688–703.
186. Hodsman AB, Kiesel M, Adachi D, Fraher LJ, Watson PH. Histomorphometric evidence for increased bone turnover without change in cortical thickness or porosity after 2 years of cyclical hPTH (1-34) therapy in women with severe osteoporosis. *Bone*, 2000; 27: 311-18.
187. Shen V, Dempster DW, Brichman R, Xu R, Lindsay R. Loss of cancellous bone mass and connectivity in ovariectomized rats can be restored by combined treatment with parathyroid hormone and estradiol. *J Clin Invest* 91: 2479-87.
188. Ettinger B, San Martin J, Crans G, Pavo I. Differential effects of teriparatide on bone mineral density after treatment with raloxifene or alendronate. *J Bone Miner Res*, 2004; 19: 745–51.

189. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsmann AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001; 344: 1434-41.
190. Meunier PJ, Roux C, Seeman E, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2004; 350: 459-68.
191. Carracedo-Martínez E, Pía-Morandeira A. Impacto de una alerta sanitaria sobre la utilización de ranelato de estroncio. *Gac Sanit*, 2010; 24 (2):151-3.
192. Tommasini MS, Trinward A, et al. Changes in intracortical microporosities induced by pharmaceutical treatment of osteoporosis as detected by high resolution micro-CT. *Bone*. 2012; 50: 596-604.
193. Benhamou LC. Effects of Osteoporosis medications on bone Quality. *Joint Bone Spine*, 2007; 74: 39-47.
194. Kong Wah NG. Potential role of odanacatib in the treatment of osteoporosis. *Clinical Interventions in Aging* 2012; 7: 235-247.
195. Palmer JT, Bryant C, Wang DX, et al. Design and synthesis of tri-ring P3 benzamide-containing aminonitriles as potent, selective, orally effective inhibitors of cathepsin K. *J Med Chem*. 2005; 48(24): 7520-7534.
196. Pennypacker B, Rodan S, Masarachia P, Rodan G, Kimmel DB. Bone effects of a cathepsin K inhibitor in the adult estrogen-deficient rabbit. *J Bone Miner Res*. 2006; 21(Suppl 1):Abstract S383.
197. Pasqualeatti S, Congiu T, Banfi G, Mariotti M. Alendronate rescued osteoporotic phenotype in a model of glucocorticoid-induced osteoporosis in adult zebrafish scale. *Int J Exp Path*, 2015; 96(1): 11-20.
198. Valdés De Hoyos A., Hoz-Rodríguez LH, and Narayanan AS. Isolation of Protein-Tyrosine Phosphatase-like Member-a Variant from Cementum. *J. Dent. Res.*, 2012; 91(2): 1-16.
199. Arzate H, Jimenez-García LF, Alvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res*, 2002; 81(8): 541-6.
200. Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J.*, 1992; 6(11): 2990-5.
201. Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, et al. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 2001; 29(3): 242-8.
202. Montoya G, Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone*, 2014; 1-41.
203. Komaki M, Kang M, Narayanan AS. Role of MAP Kinases p42^{erk-2}/p44^{erk-1} in Cementum-derived Attachment-protein-mediated Cell Attachment. *J Dent Res*, 2000; 79; 4: 1789-93.
204. Blondelle J, Ohno Y, Gache V, et al. *HACD1*, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2015; 7(5): 429-440
205. Uwanogho DA, Hardcastle Z, Balogh P, Mirza G, Thornburg KL, Ragoussis J, et al. Molecular cloning, chromosomal mapping, and developmental expression of a novel protein tyrosine phosphatase-like gene. *Genomics*, 1999; 62 (3): 406-16.
206. Alvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David, Rodríguez-Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23).
207. Pitaru S, Narayanan S, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, Metzger Z. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodont Res*, 1995; 30:360-68.
208. Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res*, 1996; 11: 686-92.
209. Salgado F. Tesis: Inducción de la regeneración ósea en defectos óseos severos por el efecto del péptido novel derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP). UNAM; México, DF, 2014.
210. Palumbo C, Ferreti M, Bertoni L, et al. Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. I: role in preventing osteoporosis. *J Bone Miner Metab*, 2009; 27(5): 538-45.
211. Ferreti M, Bertoni L, Cavani F, Zavatti M, Resca E, et al. Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. II: role in recovering osteoporosis. *J Anat* 2010; 217: 48-56.
212. Kim TH, Jung JW, Ha BG, Hong JM, Park EK, et al. The effects of luteolin on osteoclast differentiation, function in vitro and ovariectomy-induced bone loss. *J Nutr Biochem* 2011; 22: 8-15.
213. Szulc P, Delmas PD: Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2008; 19: 1683-1704.

214. Weinreb M, Patael H, Preiler O et al. Short-term healing kinetics of cortical and cancellous bone osteopenia induced by unloading during the reloading period in Young rats. *Virchows Arch*, 1997; 431: 449-452.
215. Kinney JH, Haupt DL, et al. Three-Dimensional Morphometry of the L6 vertebra in the Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis: Biomechanical Implications. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2000. 15; 10: 1981-91.
216. Lei Z, Xiaoying Z, Xingguo L. Ovariectomy-associated changes in bone mineral density and bone marrow haematopoiesis in rats. *Int J Exp Pathol*, 2009; 512-19.
217. Yong-Hwan S, Dae-Chul C, Song-Hee Y, et al. Histomorphometric Analysis of the Spine and Femur in Ovariectomized Rats Using Micro-Computed Tomographic Scan. *J Korean Neurosurg Soc*, 2012; 52: 1-6.
218. Chen H, Hayashi T, Zhou X, Fujita H et al. Sophisticated imaging technology in the assessment of osteoporosis risk. In: Dionyssiotis Y. *Osteoporosis*. InTech, Rijeka, Croatia 2012; 181-94.
219. Takao-Kawabata R, Isogai Y, Takakura A et al. Three-Times-Weekly Administration of Teriparatide Improves Vertebral and Peripheral Bone Density, Microarchitecture, and Mechanical Properties Without Accelerating Bone Resorption in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int*, 2015. 97; 156-68.
220. Elsasser U, Reeve J. Bone density measurement with computed tomography. *Br Med Bull*, 1980; 36(3): 293-6.
221. **Frost MH, Wolff's Law and bone's structural adaptations** to mechanical usage: an overview for clinicians, 1994; 64 (3): 175-188.
222. Galante J, Rostoker W, Ray RD. Physical Properties of Trabecular Bone. *Calcif. Tissue Res*. 1970. 5: 236-246.
223. **Gruber HE: Adaptations of Goldner's Masson trichrome stain for the study of undecalcified plastic embedded bone.** *Biotech Histochem*, 1992; 67:30-34.
224. Choi JS, Kim J, et al. Antiosteoporotic effects of Polycan in combination with calcium lactate-gluconate in ovariectomized rats. *Experimental and therapeutic medicine*, 2014; 8: 957-967.
225. Fahmy SR, Soliman AM, Sayed AA, Marzouk M. Possible antiosteoporotic mechanism of cicer arietinum extract in ovariectomized rats. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015; 8 (4): 3477- 90.
226. Dimitriou R, et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 2011; 9:66 1-10.
227. Delmas PD, Demiaux B, Malaval L, Chapuy MC et al. Serum bone gamma carboxyglutamic acid containing protein in primary hyperparathyroidism and in malignant hypercalcemia comparison with bone histomorphometry. *J C*
228. Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res*, 1993; 8:127-132.
229. Ke HZ, Foley GL, Simmons HA et al. Long-term treatment of lasofoxifene preserves bone mass and bone strength and does not adversely affect the uterus in ovariectomized rats. *Endocrinology* 2004; 145: 1996-2005.
230. Romero Barco CM, Manrique Arijia S, Rodríguez Pérez M. Marcadores bioquímicos en osteoporosis. Utilidad en la práctica clínica. *Reumatología Clínica*, 2012; 8 (2): 149-52.
231. Ederveen Ag, Kloosterboer HJ. Tibolone, a steroid with a tissue-specific hormonal profile, completely prevents ovariectomy-induced bone loss in sexually mature rats. *J Bone Miner Res*, 1999; 14:1963-1970
232. Szulc P, Delmas PD: Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2008; 19: 1683-1704.
233. Clowes JA, Hannon RA, Yap TS, et al. Effect of feeding on bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements. *Bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements.* *Bone*, 2002; 30: 886-90.
234. Lenora J, Ivaska K, Obran K, Gerðhem P. Prediction of bone loss using biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos*, 2007; 18:1297-305.
235. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev/Aust Assoc Clin Biochem*, 2005; 26:97-122.
236. Vasikan SD. Utility of biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in management of osteoporosis. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2008; 45: 221-58.
237. Kyung-Hyuk Y, Dae-Chul C, et al. The change of Bone Metabolism in ovariectomized Rats: Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. *J Korean Neurosurg Soc*, 2012; 51: 323-327.
238. Whitfield FJ, Morley P. The parathyroid hormones: bone-forming agents for treatment of osteoporosis. *Medscape Womens Health*, 2000; 5:1-3.
239. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. 2008;29:155-192.

240. Woo KM, Choi Y, Ko SH, Ko JS, Oh KO, Kim KK. Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones. *Exp Mol Med*. 2002;34:347–352. doi: 10.1038/emm.2002.49.
241. Kondo T, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. *J Bone Miner Res*. 2004;19:1411–1419. doi: 10.1359/JBMR.040604.
242. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*. 2004;292:490–495.
243. Kwan TS, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:49–60.
244. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142:5050–5055.
245. Hofbauer LC, Heufelder AE. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: new concepts of the pathogenesis and therapy of metabolic bone diseases. *Dtsch Med Wochenschr*. 2001;126:145–150.
246. Gravallese EM, Goldring SR. Cellular mechanisms and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2143–2151.
247. Liu M, Xiao GG, Rong P, Dong J et al. Semen Astragali Complanati- and Rhizoma Cibotii-enhanced bone formation in osteoporosis rats. *BMC Complement Altern Med*, 2013; 13: 1-9.
248. Li CW, Liang B, Shi XL, Wang H. Opg/Rankl mRNA dynamic expression in the bone tissue of ovariectomized rats with osteoporosis. *Genetics nd Mol Res.*, 2015. 14(3): 9215- 24.
249. Ahmed HH, Morcos NYS, Eskander EF et al. Potencial role of leptin against glucocorticoid-induced secondary osteoporosis in adult female rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 2012; 16: 1446-52.
250. Nabipour I, Larijani B, Vahdat et al. Relationships among serum receptor of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, high-sensitivity C-reactive protein, and bone mineral density in postmenopausal women: osteoimmunity versus osteoinflammatory. *Menopause* 2009; 16: 950-5.
251. Uemura H, Yasui T, Miyatani Y et al. Circulating profiles of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in post-menopausal women. *J Endocrinol Invest* 2008; 31: 163-68.
252. Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W et al. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 2003; 32: 681-86.
253. Szulc P, Hofbauer LC, Heufelder AE et al. Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3162-65.
254. Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H, Piswanger-Soelkner C et al. Osteoprotegerin serum levels in women: correlation with age, bone mass, bone turnover and fracture status. *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115: 291-97.