



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EFFECTO DE LA OSTEOPOROSIS EN LA EXPRESIÓN DE
OSTEOCALCINA EN RATAS WISTAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

DAVID GLEESON LARA

TUTOR:

Dra. FABIOLA SALGADO CHAVARRÍA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Quiero agradecer infinitamente a mi tutora la Dra. Fabiola Salgado por la oportunidad que me brindó, por la inspiración y la motivación de crear este proyecto; siempre dándome todas las herramientas, facilidades, conocimiento, orientación y sabiduría para seguir adelante. Dra: Jamás podré terminar este agradecimiento, por que usted es un pilar enorme en mi formación académica, personal, y profesional. ¡De todo corazón gracias!

También quiero agradecer a mi amada Universidad Nacional Autónoma de México, que desde pequeño siempre quise formar parte de su historia y su grandeza; el lograr formar parte de ella, ha sido de las mejores cosas que me ha pasado, poder defender sus colores, llenarme de conocimiento, conocer amistades y vivir infinidad de experiencias, formarme como persona y profesional, simplemente no alcanzarían las palabras para expresar mi amor y agradecimiento por la UNAM.

A mis Pumas, sin duda alguna quiero agradecer a la motivación principal por la cual estoy en la UNAM, tengo la fortuna de haber defendido los colores de la Universidad, de haber formado parte de la tradición mas grande y añeja en el Fútbol Americano de México, de haberme forjado como persona y estudiante atleta, haber vivido momentos de gloria con mis hermanos Pumas, mi familia y con el cobijo de la mejor y mas grande afición que existe.

“Icemos siempre airosos el pendón victorioso de la Universidad, por su azul y oro luchemos sin cesar, cubriendo así de gloria su nombre inmortal
¡¡México, Pumas, Universidad!!”

Dedicatoria

Esta obra va dedicada con todo mi amor, cariño y esfuerzo a mi familia, ya que, en todo momento, me han apoyado, aconsejado, animado y confiado en mi, pero lo mas importante es que en todo momento han estado ahí para mi.

Quiero agradecer principalmente a mis padres, Coco y Patrick, que, no importando los tiempos difíciles en casa, dan un buen consejo, se sacrifican y hacen siempre lo necesario para tenernos con las mejores cosas posibles; también quiero agradecerles por que siempre nos dieron la mejor educación posible, nos llevaron por el camino del bien y del deporte, forjándonos como las personas que somos hoy en día. Los amo

A mis hermanos que en todo momento me apoyaron y varias veces sacrificaron su tiempo o sus cosas para poder ayudarme con trabajos de la escuela o siendo mis pacientes

A Pau, que desde el día que nos conocimos siempre me ha apoyado, escuchado y me ha aconsejado. Jamás me ha soltado de la mano y sin importar la situación ella esta a mi lado. Te amo

En el tiempo de mi carrera conocí demasiadas personas, pero entre esas personas llegué a conocer a mis amigos, que desde que los conocí siempre nos hemos apoyado, no importando la situación, Zack, Victor y Malakike ustedes fueron los primeros amigos que tuve en la carrera después al crew se nos fueron uniendo Chino, Erick y Coronel que llegaron a dar mas rizas y buenos momentos.

Otras personas increíbles que conocí son Mich y Caty que tienen un gran corazón, me brindaron su amistad, confianza y cariño, son niñas increíbles. La banda Fit!

Quiero agradecer también al Dr Jacobo Rivera que aparte de ser un excelente maestro y mentor de vida, es un gran amigo y compañero de equipo. Go Tigers!

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	7
Resumen	8
Abstract.....	10
Introducción.....	12
Antecedentes	15
<i>Composición del hueso</i>	<i>17</i>
<i>Células óseas.....</i>	<i>18</i>
<i>Osteoblasto.....</i>	<i>20</i>
<i>Osteocito</i>	<i>20</i>
<i>Osteoclasto</i>	<i>21</i>
<i>Matriz orgánica</i>	<i>22</i>
<i>Colágena.....</i>	<i>23</i>
<i>Osteocalcina</i>	<i>25</i>
<i>Funciones del hueso</i>	<i>26</i>
<i>Osteoporosis.....</i>	<i>28</i>
<i>Cambios en el metabolismo del calcio y la vitamina d relacionados con la edad.....</i>	<i>35</i>
<i>Cambios que sufre la dmo con la edad</i>	<i>36</i>
<i>Epidemiología.....</i>	<i>36</i>
<i>Tratamiento de la osteoporosis.....</i>	<i>38</i>
<i>Recomendaciones:</i>	<i>39</i>
<i>Bifosfonatos</i>	<i>41</i>
<i>Ralenato de estroncio.....</i>	<i>42</i>
<i>Calcitonina.....</i>	<i>43</i>

<i>Fármacos moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (serm)</i>	44
<i>Terapia hormonal de reemplazo</i>	44
<i>Hormona teriparatida</i>	45
<i>Inhibidor de rank/rankl denosumab</i>	46
Modelo animal	47
<i>Modelo murino</i>	48
<i>Osteoporosis postmenopáusica en murinos</i>	49
<i>Planteamiento del problema</i>	53
<i>Justificación</i>	53
<i>Hipótesis</i>	54
<i>Objetivo general</i>	54
<i>Objetivo específico</i>	54
Metodología	56
<i>Diseño</i>	56
<i>Universo de estudio/ tamaño de muestra</i>	56
<i>Constitución de grupos</i>	56
<i>Grupos de estudio:</i>	57
<i>Plan de trabajo</i>	57
<i>Criterios de selección</i>	57
<i>Métodos estadísticos</i>	58
<i>Consideraciones éticas</i>	58
<i>Descripción de procedimientos</i>	58
<i>Muestras serológicas</i>	59
<i>Procedimiento terapéutico</i>	59
<i>Eutanasia</i>	60
<i>Elisa (enzyme-linked immunosorbent assay; ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)</i>	60
Resultados	63

Discusión	69
Conclusión	72
Bibliografía.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

- ALP** - Fosfatasa alcalina (*Alkaline phosphatase*)
- BALP**- Fosfatasa alcalina específica de hueso (*Bone-specific alkaline phosphatase*)
- BMD**- Densidad mineral ósea (*BMD, Bone mineral density*)
- BTMs**- Biomarcadores de recambio óseo (*BMTs Bone turnover markers*)
- DE**- Desviación estándar
- DMO**- Densidad mineral ósea (*BMD, Bone mineral density*)
- DXA**- Absorciometría dual de rayos X
- ELISA**- Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- FDA**- Federación Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*)
- IGF**- Factor de crecimiento similar a la insulina
- IL**- Interleucina
- N-CAM**- Molécula de adhesión celular neural (*neutral cell adhesion molecule*)
- OCN**- Osteocalcina sérica
- OI**- Osteogénesis Imperfecta
- OS**- Osteoporosis
- OPM**- Osteoporosis postmenopáusica
- OMS**- Organización Mundial de la Salud
- OVX**- Ovariectomía, Ovariectomizada
- PGE₂**- Prostaglandina E2
- PTH**- Hormona paratiroidea

RESUMEN

Efecto de la osteoporosis en la expresión de osteocalcina en ratas Wistar.

Introducción: La osteoporosis (OS) es una enfermedad sistémica grave caracterizada por la baja densidad ósea, y el deterioro microarquitectural del tejido óseo, aumentando la fragilidad del hueso y el aumento de fracturas.

Existen varias vías para el diagnóstico de esta enfermedad, sin embargo, es necesario contar con otras alternativas de diagnóstico. Con base en los mecanismos metabólicos que involucran la osteoporosis y la osteocalcina, es posible abrir nuevas líneas de investigación para diagnóstico de la enfermedad.

Objetivo: Determinar si hay diferencia entre los niveles de biomarcadores serológicos de osteocalcina (OCN) a los 90 días en ratas Wistar ovariectomizadas (OVX), en comparación con el modelo de rata sana.

Metodología: Estudio experimental, se conformaron 3 grupos de estudio: Grupo I: seis ratas sin OVX (sanas/control); Grupo II: seis ratas con OVX a los 45 días y Grupo III: seis ratas con OVX a los 90 días. De los cuales se obtuvieron muestras sanguíneas y se evaluaron por medio de la prueba ELISA.

Resultados: Los resultados obtenidos demuestran que existe un efecto sobre los niveles séricos de osteocalcina (OCN), los cuales aumentaron significativamente a 90 días.

Conclusiones: Con la evidencia científica mostrada en el presente estudio, los efectos que tiene la osteoporosis en la expresión de osteocalcina, en un modelo de rata ovariectomizada, observamos que, la osteoporosis aumenta los niveles séricos de osteocalcina, por el proceso de formación, recambio y la pérdida significativa de hueso por la enfermedad. Esto hace a la osteocalcina un potencial biomarcador para la creación de nuevos métodos de diagnóstico para la osteoporosis, abriendo

nuevas líneas de investigación, pudiendo ampliar así, la gama de métodos de diagnóstico existentes.

ABSTRACT

Effect of osteoporosis on the expression of osteocalcin in Wistar rats.

Introduction: Osteoporosis (OS) is a serious systemic disease characterized by low bone density, and microarchitectural deterioration of bone tissue, with increased bone fragility and increased fractures.

In recent years, important advances have been made in its pathophysiology, epidemiology, and treatment. There are several ways to diagnose this disease and also several medications that, although they have good results in treatment, also have some side effects, however, it is necessary to have other diagnostic alternatives and other medications that minimize adverse effects. Based on the metabolic mechanisms that involve osteoporosis and osteocalcin, it is possible to open new lines of research for the diagnosis and treatment of the disease.

Objective: To determine if there is a difference between the levels of osteocalcin serological biomarkers (OCN) at 90 days in ovariectomized Wistar rats (OVX), in comparison with the healthy rat model.

Methodology: Experimental study, 3 study groups were formed: Group I: 6 rats without OVX (healthy / control); Group II: six rats with OVX at 45 days and Group III: six rats with OVX at 90 days. From which blood samples were obtained and evaluated by means of the ELISA test.

Results: The results obtained show that there is an effect on the serum levels of osteocalcin (OCN), which increased significantly at 90 days.

Conclusions: With the scientific evidence shown in the present study, the effects that osteoporosis has on the expression of osteocalcin, in an ovariectomized rat model, we observed that osteoporosis increases the serum levels of osteocalcin, due to the process of formation, turnover and the significant bone loss from the disease. This

makes osteocalcin a potential biomarker for the creation of new diagnostic methods for osteoporosis, opening new lines of research, thus expanding the range of existing diagnostic methods.

INTRODUCCIÓN

La Osteoporosis (OS) se define como una enfermedad sistémica del esqueleto que consiste en el desacoplamiento del proceso del remodelado óseo, ya que, se tiene una mayor resorción ósea que formación y esto provoca un deterioro de la microarquitectura ósea, incrementando la fragilidad y aumentando la susceptibilidad a fracturas espontaneas o de bajo impacto(1,2). La osteoporosis es considerada un grave problema de salud publica por ser una de las enfermedades mas frecuentes en los humanos. Se estima que la población mayor de 50 años, 50% mujeres y 20% hombres, tendrán una fractura debido a la fragilidad ósea o por bajo impacto(3). En México se espera que para el año 2050 la población aumente su esperanza de vida hasta los 82 años, y con esto conlleva a que el número de pacientes con osteoporosis y fracturas relacionadas a ello aumenten drásticamente y existan problemas socioeconómicos y epidemiológicos(4).

Las alternativas terapéuticas actuales, cuentan con una variedad extensa de métodos de diagnóstico y tratamiento, que disminuyen el riesgo de fracturas osteoporóticas, reduciendo la resorción ósea y preservando su arquitectura, sin embargo, no estimulan la formación ósea y la mayoría de los tratamientos son costosos o presentan efectos secundarios adversos(5), como riesgo a desarrollar cáncer de mama, trombo embolias, infartos, enfermedad de arterias coronarias, hipercalcemia, mareos, osteosarcomas, osteonecrosis maxilar y mandibular. Así bien, siendo mas que aceptables las terapias que ya existen, es necesario encontrar métodos de diagnóstico y fármacos que sean menos costosos, mas rápidos y con menos efectos secundarios para que puedan tener mejores resultados para tratar esta enfermedad(2).

En los últimos años se han presentado notables progresos en la biología molecular y genética, que conducen a un mejor entendimiento de los complejos procesos de señalización que regulan el metabolismo óseo, esto ha permitido abrir camino en la investigación de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento para la osteoporosis.

La osteocalcina está implicada en la regulación de la mineralización; modula el crecimiento, tamaño y forma de los cristales de hidroxapatita, se incorpora en gran medida a la matriz ósea extracelular, sin embargo, se libera una pequeña fracción a la circulación, proporcionando un biomarcador de formación ósea. La osteocalcina es un biomarcador tardío de la actividad osteoblástica, los niveles séricos se correlacionan bien con la tasa de formación ósea, también algunos fragmentos se liberan durante la resorción.

En el presente estudio se muestra evidencia científica de los efectos que tiene la osteoporosis en la expresión de osteocalcina en un modelo de rata ovariectomizada. Ya que la osteoporosis aumenta los niveles séricos de osteocalcina, por el proceso de formación, recambio y la pérdida significativa de hueso por la enfermedad. Esto nos puede abrir nuevas líneas de investigación, pudiendo ser la osteocalcina un potencial biomarcador para la creación de nuevos métodos de diagnóstico.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

El sistema esquelético se comienza a formar, del final de la tercera semana de vida intrauterina a la octava, a ésta etapa se le conoce como organogénesis.

Cuando ocurre la gastrulación se forma el mesodermo, inicialmente está conformado por celulas mesenquimatosas, las cuales se desplazan de forma cefálica, lateral o caudal entre el ectodermo y el endodermo. Una vez que alcanzan su posición, estas células comienzan a agruparse y a formar cuatro porciones de mesodermo, mesodesmo axial, mesodermo paraaxial, mesodermo intermedio y el mesodermo lateral(6).

MESODERMO	MESODERMO DE LA CABEZA	• Cráneo
		• Tejido conjuntivo de la cabeza
		• Cemento
	MESODERMO PARAAXIAL	• Músculo esquelético de la cabeza, tronco y extremidades
		• Esqueleto excepto el del cráneo
		• Dermis y Tejido Conjuntivo
	MESODERMO INTERMEDIO	• Sistema urogenital
	MESODERMO LATERAL	• Tejido conjuntivo y músculo de las víceras
		• Membranas serosas: pleura, pericardio y peritoneo
		• Corazón
		• Células del tejido linfohematopoyético
		• Bazo
	• Corteza suprarrenal	

TABLA 1.- Derivados del mesodermo de la capa germinativa mesodermo se diferenciaron distintos linajes celulares que darán lugar a estructuras y órganos del embrión.(7)

El sistema esquelético se origina del mesodermo paraaxial, de la hoja somática lateral y del mesenquima de las crestas neurales.(6)

El mesodermo paraaxial forma unas series segmentadas de bloques tisulares en cada lado del tubo neural que en la region de la cabeza se le conoce como somitómeros y, de la región occipital a la caudal, como somitas. Las somitas quedarán divididas en un principio en dos regiones, una ventromedial denominada esclerotomo y una dorsolateral llamada dermomiotomo.(8) Las células mesenquimatosas realizarán diversas migraciones desde su sitio de origen hasta las regiones en las que estarán destinadas a formar sus estructuras finales. La diferenciación de las células osteogénicas estará dada por la expresión de moléculas como la cadherina-N y la N-CAM (*neutral cell adhesion molecule*), y por la expresión de factores de transcripción como RUNX-2 y SOX-9.(6,7,9)

Existen dos tipos de osificación, la endocondral y la intramembranosa, cuya diferencia radica en que la endocondral la formación del hueso va precedida por la formación de un cartilago y en la intramembranosa la constitución de tejido óseo se hace directamente a partir del tejido mesenquimatoso. La osificación endocondral tiene una serie de etapas sucesivas que iniciará con la condensación del mesénquima, continuará con la formación de un molde cartilaginoso (condrogénesis) constituido por condrocitos, su hipertrofia y apoptosis, la formación de vasos sanguíneos y el reclutamiento de osteoblastos para la mineralización de matriz circundante, para conformar el centro de osificación primario en la diáfisis.(8) El desarrollo de los huesos continuará gracias a la proliferación de los condrocitos que darán lugar a la placa o disco de crecimiento. Cuando los vasos sanguíneos invadan las epífisis, se establecerán otros centros de osificación o centros de osificación secundaria. Finalmente, los cartílagos de crecimiento terminarán por osificarse y con ello también detendrán el crecimiento del hueso.(7,8)

La osificación intramembranosa también conlleva una serie de etapas, inicialmente las células mesenquimatosas se condensarán y diferenciarán en osteoblastos, los cuales establecerán el centro de osificación primario u osteoide. La formación del osteoide vendrá seguida de su mineralización, incluyendo a los osteoblastos, que terminarán por convertirse en osteocitos. En los huesos del cráneo, éstos quedarán conformados por dos tablas compactas de tejido óseo, las tablas interna y externa, y entre ellas habrá hueso esponjoso o díploe.(6,10)

COMPOSICIÓN DEL HUESO

El hueso es un tejido conectivo que consiste esencialmente en una matriz extracelular mineralizada y células especializadas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. El principal componente orgánico de la matriz es la colágena tipo I, que supone alrededor del 90%, y el 10% restante lo componen una serie de proteínas no estructurales de menor tamaño, entre las que se encuentran la osteocalcina, la osteonectina, algunas fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas. La fase inorgánica está compuesta por minúsculos cristales de un mineral de carácter alcalino, la hidroxapatita $[Ca^{10}(PO_4)^6(OH)_2]$. Estos cristales se incrustan entre las fibras de colágena para formar un material que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia.(2,11)

Desde un punto de vista histológico, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. La disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso. Ambos están compuestos por osteonas. El hueso cortical o compacto se estructura en conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos.

El hueso esponjoso o trabecular lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades areolares en cuyo interior se encuentra médula ósea. Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen células especializadas, matriz orgánica y fase mineral.(12,13)El hueso es el único tejido del organismo capaz de

regenerarse, permitiendo la regeneración tras el trauma, es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción. Este fenómeno equilibrado, denominado proceso de remodelado, permite una renovación de un 5-15% del hueso total al año en condiciones normales.(12,13)

En el hueso coexisten varios tipos de células que se especificarán a continuación.

CÉLULAS ÓSEAS

Las células óseas se encuentran dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas (Tabla 1). Las células troncales pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, en respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes.(14,15)

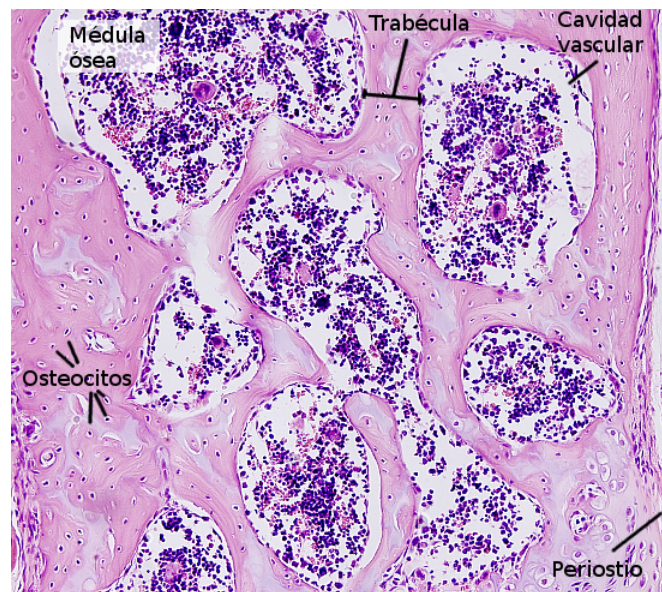


IMAGEN 1. Corte histológico de hueso trabecular, hioides de rata. (16)

ESTROMA MEDULAR	TEJIDO ÓSEO
Células madre (<i>stem cells</i>) hematopoyéticas	Osteoblastos
Células madre (<i>stem cells</i>) mesenquimales	Pre-osteoblastos
Adipocitos	Osteocitos
Macrófagos	Osteoclastos
Mastocitos	Pre-osteoclastos
Células endoteliales	Células linfoides

TABLA 2. Células troncales presentes en el estroma medular y las células que se originan a partir de cada una.

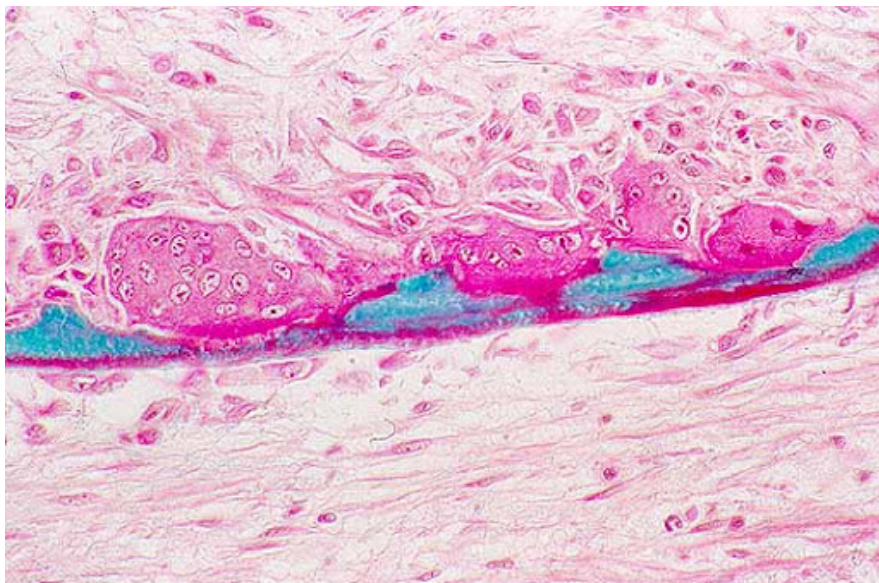


IMAGEN 2- Grupo de osteoclastos reabsorbiendo hueso. (16)

OSTEOBLASTO

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica con citoplasma basófilo, con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos vasculares.(17) Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con los osteoblastos vecinos.(18) Son metabólicamente muy activos, y sintetizan las proteínas de la matriz ósea colagenosas y no colagenosas, que son excretadas y luego depositadas entre los osteoblastos y la superficie ósea. Esta matriz recién construida, aún no está calcificada y se le denomina matriz osteoide. La fase de latencia entre el depósito del osteoide y su mineralización es de aproximadamente 10 días. La diferenciación osteoblástica depende de la expresión de dos factores de transcripción, RUNX2 y su objetivo OSTERIX1, que dan lugar a la diferenciación de estas células en osteoblastos en respuesta a estímulos externos, tales como, La prostaglandina E2 (PGE₂), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) 1, la hormona paratiroidea (PTH), las proteínas morfogénicas óseas (BMP), y las proteínas Wntless (Wnt) e Int-1, son estímulos clave para la diferenciación de los osteoblastos(15,19–21).

OSTEOCITO

Los osteocitos son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Un milímetro cúbico de hueso contiene hasta 25000 osteocitos, derivan de los osteoblastos que posteriormente quedan atrapados en la matriz ósea (22). Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas y los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí, a través, de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo. Los osteocitos participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones

mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción(18). Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse. Poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero tienen como marcador específico el CD44, receptor de membrana que se expresa fuertemente en osteocitos, es negativo en osteoblastos y células limitantes(12). Son sensibles a las cargas mecánicas, respondiendo a los cambios de estrés mecánico, transmitiendo señales a la superficie ósea para inducir osteoformación o resorción ósea. Tienen también una función importante en la homeostasis de los fosfatos y en el remodelado óseo, participan en la nutrición y expulsión de detritus a través de los vasos sanguíneos. Proviene de los osteoblastos, como se ha dicho anteriormente, que también producen células de revestimiento, y otros sufren apoptosis.(20,23)

OSTEOCLASTO

Las células encargadas de la reabsorción son los osteoclastos. Se trata de células grandes (100 μm), multinucleadas (hasta 20 Núcleos), ricas en mitocondrias y vacuolas. Están unidas directamente a la superficie del hueso y construyen las lagunas de resorción (lagunas de Howship).

Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto *in vivo* como *in vitro* y tienen receptores por calcitonina. Los osteoclastos proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos(21). Los osteoclastos tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde se lleva a cabo la reabsorción, y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz, diseñada para secretar y reabsorber proteínas y iones en el espacio entre la superficie de los osteoclastos y el hueso.

MATRIZ ORGÁNICA

La matriz orgánica representa un tercio del peso óseo. Está formada fundamentalmente por proteínas (cuadro1), entre las que destaca la colágena (90%)

Colágena	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo I, III, V, XV
Proteoglicanos	<ul style="list-style-type: none"> • Condroitin sulfato • Decorina • Biglicano • Hialuronato
Proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico	<ul style="list-style-type: none"> • Osteocalcina • Proteína de la matriz con ácido γ-carboxi-glutámico
Glicoproteínas	<ul style="list-style-type: none"> • Osteonectina • Fosfatasa alcalina • Proteínas con RGD: <ul style="list-style-type: none"> ○ Fibronectina ○ Trombospodina ○ Osteopontina ○ Vitronectina ○ Sialoproteínas óseas
Proteínas del plasma	<ul style="list-style-type: none"> • Albúmina • α2-SH-glicoproteína
Factores de crecimiento	<ul style="list-style-type: none"> • IGF-I y II (<i>insulin growth factor</i> I y II) • TGF-β (<i>transforming growth factor-beta</i>) • PDGF(<i>platelet derived growth factor</i>)

CUADRO1. Resumen y descripción de las principales familias de proteínas presentes en la matriz orgánica(12).

La matriz orgánica, tiene un papel importante en el conjunto del sistema óseo, siendo este hecho evidente cuando aparecen enfermedades de la colágena como la osteogénesis imperfecta. Actualmente se debe considerar a la matriz mineralizada extracelular como algo más que un reservorio de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular, en la integridad y función del tejido óseo(24).

COLÁGENA

La matriz extra celular está compuesta por un 90% de colágena sobre todo de tipo I (>95%) y tipo V (>5%). También se han comprobado pequeñas partículas de colágena tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y tipo XII, formado bajo estrés mecánico. En la molécula de la colágena se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas(25). Las fibras de colágena se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina entre las hidroxilisinas y lisinas. Sin embargo, la colágena no tiene gran afinidad por el calcio por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.

PROTEÍNAS NO COLÁGENAS

- **Proteoglicanos:** Constituyen el 10% de las proteínas no colágenas. Son moléculas de gran tamaño. Hay cuatro tipos de proteoglicanos en la matriz osteoide: hialuronano y condroitin-sulfato: De molécula grande, que intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea Biglicano y Decorina: De molécula más pequeña, aparecen en las fases siguientes de la formación ósea. (26)
- **Proteínas con ácido γ -carboxiglutámico:** Son la osteocalcina y la proteína de la matriz con ácido γ -carboxiglutámico. Este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis. (26)

- **Glicoproteínas:** Son la osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripéptido RGD (Arg, Gly-Asp).

La osteonectina es una glicoproteína con gran afinidad por la colágena tipo I, por el calcio y por la hidroxapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. (26)

La fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización. Existen varias isoenzimas, entre ellas la ósea, que se ha considerado un buen marcador de la actividad osteoblástica. (26)

- **Proteínas procedentes del plasma:** Se encuentran en la matriz orgánica ósea en mayor proporción que en el plasma. Son la albúmina y la α_2 -SH-glicoproteína, que probablemente se relaciona con la incorporación del calcio a la matriz osteoide. (26)
- **Factores de crecimiento:** Son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otros lugares (hígado, plaquetas, etc.), que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de manera autócrina o parácrina. (26)

OSTEOCALCINA

Así mismo la osteocalcina es una proteína sintetizada por los osteoblastos maduros, odontoblastos y condrocitos. Se caracteriza por contener tres residuos del aminoácido ligador de calcio: ácido gammacarboxiglutámico y se determina por inmunoensayo. Se considera un marcador sensible y específico de la actividad osteoblástica, si bien en parte puede derivar de la resorción ósea. Sus niveles siguen un ritmo circadiano, con los valores más elevados por la mañana y no se influye por la dieta. (27)

La osteocalcina o BGP (por sus siglas en inglés *Bone Gla Protein*), es la proteína no colágena más abundante en el periodonto y constituye hasta el 3% de la proteína ósea total. Tiene 49 aminoácidos con tres residuos de ácido gamacarboxiglutámico, los que se asocian con sus propiedades de unión a calcio. La producen los osteoblastos, cementoblastos y subpoblaciones de fibroblastos del ligamento periodontal completamente diferenciados, con una masa de aproximadamente de 6 kDa y es secretada en el frente de mineralización (28–30).

También se le conoce como proteína Gla de hueso (primera proteína derivada de hueso que fue caracterizada). Es la proteína no colágena más abundante encontrada en el hueso, forma aproximadamente el 1% de la matriz orgánica de hueso, en el que existe una estrecha asociación con la superficie de los cristales minerales (tiene una gran afinidad por la hidroxiapatita); es un péptido de 49 aminoácidos que contiene de dos hasta tres residuos de ácido gamma-carboxiglutamico (Gla) de la vitamina K, los cuales son responsables de las propiedades de unión al calcio de la molécula. Es sintetizada por las células mineralizantes (osteoblastos y osteoclastos) y es secretada a la matriz en el frente de mineralización. Su distribución está limitada a tejidos mineralizados como el hueso, dentina y cemento. Durante la síntesis osteoide, la osteocalcina es liberada por los osteoblastos, bajo el control de 1,25-dihidroxitamina D₃ cuando están activos depositando hueso. Está asociada con la calcificación de tejidos duros. Como se menciona, tiene una alta afinidad por el calcio y la hidroxiapatita a través

de las interacciones con el residuo Gla. El papel fundamental de la osteocalcina es la regulación de la mineralización. (2,31–34)

La osteocalcina es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y contiene tres restos de ácido γ -carboxiglutámico. Sus niveles plasmáticos se han considerado cómo uno de los marcadores bioquímicos de la osteogenesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos. (2,31–34)

Modula el crecimiento y forma de los cristales de hidroxapatita, también participa en el reclutamiento de osteoclastos y en la remodelación ósea.

Se han reportado que bajas concentraciones de osteocalcina retrasan el crecimiento de cristales de hidroxapatita *in vitro*, por lo que se especula, que la osteocalcina también puede actuar cómo regulador negativo más que promotor de la mineralización de la matriz(2,31–34).

FUNCIONES DEL HUESO

El tejido óseo tiene muchas funciones importantes para el organismo, ya que protege órganos vitales, hace posible la locomoción, es reservorio de calcio, fósforo, factores de crecimiento y citoquinas, participa en la hematopoyesis, forma parte del equilibrio ácido-base y es el principal regulador del metabolismo fosfo-cálcico:

- Protección, especialmente, en aquellas zonas del organismo donde un traumatismo puede acarrear graves consecuencias, como ocurre en la cabeza, tórax o pelvis, ya que están todos los órganos vitales, y, aunque la estructura de los huesos que cubren estas zonas es igual que la del resto del organismo, está organizado para absorber el máximo de energía posible.(14,23,35)

- Función mecánica, que consiste en dar soporte y permitir los movimientos mediante la acción de los músculos estriados, ya que ninguna contracción muscular sería efectiva sin realizar un efecto de palanca en el hueso.(14,23,35)
- Hematopoyesis, al producirse las células sanguíneas en la médula ósea. Regulación del metabolismo fosfocálcico, al ser el reservorio más importante de ambos elementos que pasan al torrente circulatorio mediante el remodelado óseo.(14,23,35)

Recientemente, se le atribuyen otras funciones endocrinas, ya que también participa en el metabolismo energético mediante la secreción de la osteocalcina y del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23); este último es segregado por el osteoblasto, aumentando la reabsorción de fosfatos y disminuyendo las concentraciones de 1-25 OH vitamina D. La osteocalcina influye en la secreción de insulina y actúa sobre los adipocitos que producen adiponectina, que reduce la resistencia a la insulina. También el hueso, mediante la lectina, influye el hipotálamo. Así, no solamente actúa en el metabolismo mineral, sino también en el metabolismo de la glucosa y deposición grasa. (14,23,35)

OSTEOPOROSIS

Existen enfermedades que afectan los huesos, algunas de estas son:

- **Enfermedad de Paget:** También conocida como osteítis deformante, es un trastorno progresivo caracterizado por una pérdida de masa ósea que el organismo intenta compensar mediante la regeneración acelerada de nuevo tejido óseo. Como resultado, se producen alteraciones estructurales que conducen a deformidades, dolor y fracturas. (36)
- **Osteogénesis imperfecta (OI):** Existen varios tipos de OI, causadas por diferentes mutaciones genéticas que interfieren con la producción de colágeno. La enfermedad causa una extrema fragilidad a los huesos, haciendo que ocurran fracturas frecuentemente. (36)
- **Osteomalacia:** Afecta la mineralización de los huesos, aumentando el riesgo de fracturas, en especial en la pelvis, caderas y piernas. Una de las causas fundamentales es el déficit de vitamina D. Es más común en países con pocas horas de luz solar al año, debido a que la vitamina D se forma gracias a la luz del sol. (36)
- **Osteodistrofia renal:** Enfermedades de los huesos que aparecen como consecuencia de la insuficiencia renal crónica. Cursa con mayor metabolismo óseo y con el enlentecimiento de la mineralización del hueso. (36)
- **Osteomielítis:** Inflamación del tejido óseo causada por una infección bacteriana que puede ser aguda o crónica. La mayoría de los casos son provocados por la bacteria *Staphylococcus aureus*. (36)

- **Acromegalia:** Es característico de esta enfermedad el crecimiento anormal de la cara, manos y pies. Ocurre cómo consecuencia de la producción excesiva de la hormona del crecimiento. La causa más común de acromegalia es un tumor benigno de la glándula pituitaria. (36)
- **Enfermedad de Perthes:** Una enfermedad que afecta a menores entre 3 y 12 años. Cursa con la destrucción de parte del hueso del fémur debido a falta de flujo sanguíneo. Algunas personas se recuperan gracias a que el hueso se regenera, mientras otras viven con secuelas durante toda su vida. (36)

De igual manera la osteoporosis es una enfermedad esquelética caracterizada por un descenso en la masa ósea y deterioro de la microarquitectura, con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y por lo tanto, suceptibilidad a fracturas. Alrededor del 50% de las mujeres y el 20% de los hombres mayores de 50 años tendrán alguna fractura por fragilidad ósea (36)

La Osteoporosis (OS) es la enfermedad ósea más común en los seres humanos (37), es descrita por la Organización mundial de la salud como “enfermedad sistémica esquelética progresiva caracterizada por baja masa ósea y deterioro microarquitectural del tejido óseo, con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y la susceptibilidad a fracturas”(38).

La palabra osteoporosis literalmente significa hueso poroso, indicando que la densidad del hueso es menor y los huesos son delgados. Sin embargo actualmente se sabe que los huesos no se fracturan solo por estar delgados, por lo que se propuso una nueva definición de acuerdo con la clasificación diagnóstica de la Organización Mundial de la Salud (OMS): “La osteoporosis está presente cuando la densidad mineral ósea -DMO- (*BMD, bone mineral density*) está más de 2.5 desviaciones estándar (DE) por debajo de las mujeres adultas premenopáusicas sanas. (36)

La osteopenia o disminución de la masa ósea es definida como una densidad mineral ósea entre 1 y 2.5 desviaciones estándar debajo de la media de los individuos normales”(36).

La osteoporosis podría ser el resultado de varios factores: Un pico de masa ósea no óptimo, un exceso de resorción ósea que cause pérdida de la masa ósea y daño estructural, o una formación inadecuada de hueso como respuesta a la resorción ósea.

En la actualidad se siguen utilizando los criterios de la clasificación de la OMS de 1994. La misma se basa en comparar los valores de DMO del paciente adulto con los valores de la medida del adulto joven del mismo sexo y raza. En la clasificación se considera el T-score, que es el número de desvíos estándar por arriba o por debajo de la medida de DMO normal de la población adulta joven del mismo sexo, estudiada por DXA (*absorciometría dual de rayos X*) (36).

Un individuo es clasificado con osteoporosis severa, cuando una fractura se presenta debido a una densidad ósea insuficiente. La osteoporosis es un factor de riesgo para que se fracture el hueso. El riesgo de fractura es mayor en aquellos con la DMO más baja; sin embargo, la mayoría de las fracturas se producen en pacientes con baja masa ósea en lugar de osteoporosis, debido al gran número de individuos con la masa ósea en este rango(39).

Procedimientos para el diagnóstico de la osteoporosis:

De rutina
• Historia clínica y examen físico.
• Recuento de células sanguíneas, velocidad de sedimentación o proteína C reactiva. Suero de calcio, albúmina, creatinina, fosfato, fosfatasa alcalina y transaminasas hepáticas.
• Pruebas de función tiroidea
• Densitometría ósea (DXA)
Otros procedimientos, si están indicados.
• Radiografías laterales de la columna lumbar y torácica o imágenes vertebrales laterales basadas en DXA
• Inmunolectroforesis de proteínas séricas y proteínas de Bence Jones urinarias.
• Suero 25-hidroxivitamina D.
• Hormona paratiroidea plasmática.
• Testosterona sérica, globulina fijadora de hormonas sexuales, hormona folículo estimulante, hormona luteinizante (en hombres).
• Prolactina sérica.
• Prueba de supresión de dexametasona durante la noche libre de cortisol / orina de 24 h.
• Anticuerpos endomisiales y / o transglutaminasa de tejidos.
• Gammagrafía ósea isotópica.
• Marcadores del recambio óseo.
• Excreción urinaria de calcio.

CUADRO 2- Procedimientos para el diagnóstico de la osteoporosis (OS).(38)

La osteoporosis primaria fue clasificada en 1983 por Riggs y colaboradores en tipo I (postmenopáusicas) y tipo II (senil). La osteoporosis tipo I ocurre en mujeres postmenopáusicas, en la fase rápida de pérdida de hueso en los primeros 5 a 10 años después de la menopausia, o en mujeres con oligomenorrea o amenorrea prematura (por anorexia nerviosa o a un programa excesivo de ejercicios, como se llega a ver en las atletas). La pérdida estrogénica incrementa el nivel sérico de citoquinas que aumentan el reclutamiento y la respuesta de los precursores de osteoclastos en el hueso trabecular, implicando una mayor resorción ósea.

En hombres después de una castración o cuando existe una deficiencia de testosterona, se causa una pérdida ósea relacionada al déficit de la función gonadal, en estos pacientes se presentan mayor número de fracturas donde el esqueleto tiene mayor predominio de hueso trabecular, como el antebrazo distal y el cuerpo vertebral (40)

La osteoporosis de tipo II, se asocia con el envejecimiento y es predominante en la edad de 60 a 70 años. Con el aumento de la edad, se genera una declinación de los osteoblastos que disminuyen su actividad, esto sin aumentar la actividad de los osteoclastos. Las fracturas son frecuentes donde predomina el hueso cortical.

La osteoporosis secundaria es debida a otros trastornos o exacerbada por ellos, o también puede ser causada por medicamento. Es más común en la premenopausia y en hombres. Las enfermedades asociadas a osteoporosis incluyen desórdenes endocrinos, enfermedades inflamatorias sistémicas, trastornos genéticos, enfermedades gastrointestinales, deficiencias nutricionales, medicamentos tales como anticonvulsivantes, anticoagulantes (heparina y warfarina), ciclosporina y tacrolimus, dosis excesiva de hormona tiroidea entre otras (tabla 3), sin embargo la causa más frecuente de osteoporosis secundaria se debe al uso de glucocorticoides. (40)

Causas de osteoporosis secundaria	
Enfermedades endocrinas/metabólicas	Hipogonadismo, desorden pituitario, diabetes mellitus, tirotoxicosis, embarazo, hiperadrenocortisolismo, hiperprolactinemia, porfiria, hipofosfatasa, talasemia.
Enfermedades autoinmunes y crónicas	Enfermedades reumatológicas, enfermedad renal crónica, enfermedad pulmonar crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedades gastrointestinales, transplante, enfermedades granulomatosas, mastocitosis sistémica.
Enfermedades malignas y de médula ósea	Mieloma múltiple, linfomas y leucemias, enfermedad metastásica ósea, anemia, enfermedad de Gaucher.
Medicamentos	Glucocorticoides, anticonvulsivantes, agentes antituberculosos, colestiramina, tratamiento prolongado con heparina, ciclosporina, metotrexate.
Deficiencias nutricionales	Vitamina D, Vitamia K, Vitamina C, enfermedad celíaca, desnutrición
Desórdenes genéticos	Osteogénesis imperfecta, homocistinuria, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan.
Otras Causas	Inmovilización, distrofia simpática refleja, tabaquismo, alcoholismo.

TABLA 3- Causas de osteoporosis secundaria

FISIOPATOLOGÍA DE LA PÉRDIDA ÓSEA

La deficiencia de estrógenos que existe en la menopausia deteriora el ciclo normal del remodelado óseo al aumentar la actividad de resorción osteoclástica sin aumento correspondiente en la actividad osteoblástica y, por lo tanto, la cantidad de hueso que se reabsorbe es mayor a la cantidad de hueso que se regenera, lo que conduce a una pérdida de hueso neta. A este proceso se le describió originalmente como “desacoplamiento”(41).

Hay una mayor producción del factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$) y las células del linaje estromal osteoblástico se vuelven más sensibles a la IL-1, IL-6 y TNF estimulan a las células estromales de preosteoblastos, para liberar citocinas: IL-6, factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) y factor de crecimiento transformante (TGF). La citocina final en la cascada de osteoclastogénesis es el ligando RANK (ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B) que se produce a partir de los osteoblastos y se une a su receptor (RANK) en los osteoclastos(42). RANK tiene un antagonista, la osteoprotegerina (OPG) que es un receptor soluble que es secretado por el linaje celular del estroma osteoblástico. OPG es estimulada por el estrógeno(43). Es posible observar que el factor de desacoplamiento secretado por los osteoblastos es RANKL. Estos factores aumentan la resorción ósea; la acción importante del estrógeno es aumentar la secreción de OPG y disminuir M-CSF y RANK(44).

CAMBIOS EN EL METABOLISMO DEL CALCIO Y LA VITAMINA D RELACIONADOS CON LA EDAD

En la menopausia, durante la primera fase de pérdida ósea, las mujeres tienen un marcado balance negativo de calcio. Se puede estimar que la pérdida promedio de calcio diario en los primeros 3 a 4 años es de 200mg diarios, esta pérdida va disminuyendo gradualmente a -45 mg diarios durante los 5 a 10 años después de la menopausia. Después de los 60 años, hay una disminución relacionada con la edad en la absorción de calcio, que contribuye a un mayor equilibrio negativo de calcio(45,46). La mala absorción de calcio causa hiperparatiroidismo secundario, y este aumenta la resorción ósea. En adultos mayores la respuesta de absorción de calcio en relación con la 1,25- dihidroxivitamina D sérica es menor que en los jóvenes, lo que sugiere que parte del problema del envejecimiento es la resistencia intestinal a la 1,25- dihidroxivitamina D en el riñón envejecido; la producción de 1,25- dihidroxivitamina D puede disminuir hasta un 50%. La deficiencia de vitamina D agravará la situación al causar hiperparatiroidismo secundario, aumentando con este la resorción ósea. Los niveles de estrógeno también tienen lugar en el envejecimiento, estos datos se ven reflejados en la densidad ósea, puesto que, la densidad de masa ósea será mayor si el estradiol sérico es superior a 15 pg/ml y menor si el estradiol sérico es menor a 5pg/ml(47) esto quiere decir que las fracturas aumentarían cuando el nivel de estradiol sérico esté por debajo de los 5pg/ml(47).

CAMBIOS QUE SUFRE LA DMO CON LA EDAD

Entre los 20 y principios de los 30 años de edad, la masa ósea alcanza su pico en columna y cadera. Hay otros huesos que alcanzan su pico de DMO a los 40 como el radio. La disminución promedio de la DMO durante la transición menopáusica es de aproximadamente 10%, esto nos dice que la mitad de las mujeres están perdiendo de 10 a 20% en esos 5- 6 años alrededor de la menopausia. La edad promedio de la menopausia es de 51 años, una menopausia temprana es a los 41 años en donde el hueso se deteriora 10 años antes de lo normal, a menos que reciba tratamiento médico. Esto explica por qué entre el 15 y el 20 por ciento de las mujeres a principios de los años sesenta tienen fracturas vertebrales y el efecto de la menopausia precoz en los huesos(3). Un año previo que comience la menopausia, la pérdida ósea empieza a acelerar, continúa así durante 3 años y comienza a disminuir esa aceleración, aún así la pérdida ósea en los siguientes 4- 8 años posteriores a la menopausia se mantiene elevada.

EPIDEMIOLOGÍA

La osteoporosis es considerada un serio problema de salud pública, por ser una de las enfermedades más frecuentes en los humanos, ya que se estima que un 50% de mujeres y un 20% de hombres, mayores de 50 años la poseen y tendrán alguna fractura debido a la fragilidad ósea por la BMO, y esto representa una amenaza grave para la economía(36).

La fundación Nacional de Osteoporosis en los Estados Unidos de Norteamérica, estima 9.9 millones de estadounidenses que padecen osteoporosis. Una de cada dos mujeres caucásicas, así como 1 de cada 5 hombres sufren fracturas a causa de la osteoporosis en algún momento de su vida(37). Datos mundiales señalan que hay 200 millones de personas con osteoporosis, en su mayoría mujeres(48).

Se cree que en los siguientes 50 años la población de América Latina tendrá un aumento en la población adulta que sobrepase los 65 años, y que emulara las cifras actuales de Estados Unidos y Europa. Se espera que la cantidad de fracturas en los siguientes 50 años (6.3 millones anuales), ocurran la mitad de ellas entre América Latina y Asia(4).

En México la población mayor de 60 años ha aumentado considerablemente, ya que en las últimas 7 décadas la expectativa de vida ha aumentado de 36.2 años a 75 años y se espera que esa población aumente a 36.4 millones para el año 2050. La osteoporosis tiene estrecha relación con la edad, y es de esperarse que los casos aumenten.

Estudios en nuestro país también mencionan la situación de osteoporosis que tenemos. Se comparó la BMO en la zona femoral y de columna lumbar en 4460 mujeres con edades entre los 29 y 70 años, en tres regiones diferentes del país, y se encontró una variación significativa, siendo la BMO en las mujeres de la zona norte en comparación con las mujeres del centro y sur del país(49).

En otro estudio se recolectaron datos de fracturas ocurridas en el año 2000, por parte del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y la Secretaría de Salud (SS), señalando que 168 mujeres y 98 hombres de cada 100,000 individuos padecen fracturas anualmente por osteoporosis, siendo porcentualmente el riesgo para fracturas de cadera de 8.5 y 3.8 respectivamente en hombres y mujeres.

Registros nos indican que el tiempo de hospitalización por fractura de cadera son variables dependiendo del sistema de salud tratante, el Instituto Mexicano del Seguro Social cuenta con el mayor promedio de días con 10.7, la Secretaría de Salud 9.3 y las instituciones privadas 5.2 días(50,51).

FACTORES DE RIESGO DE FRACTURA SECUNDARIO A OSTEOPOROSIS.	
<i>Riesgo elevado</i>	
Edad > 65 años	
Historia de fracturas previas por fragilidad	
Antecedentes de fractura de cadera en familiares de 1 ^{er} grado	
Tratamiento con corticoides (más de 5 mg/día de cortisona, periodo superior a 3 meses)	
Bajo peso corporal (iMC < 20 kg/m ²)	Caídas (más de 2 caídas en el último año)
Riesgo	moderado
Exceso en la ingesta de alcohol y tabaco Menopausia precoz (45 años)	
Artritis reumatoide, artropatías inflamatorias	
Osteoporosis secundaria: hipogonadismo, amenorrea primaria y secundaria, síndrome de malabsorción, hepatopatías, enfermedad inflamatoria intestinal, celiaquía	

TABLA 4. Factores de riesgo de fractura secundario a osteoporosis. (1,52).

TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene como herramienta y promueve el uso de “Fracture Risk Assessment Tool” (FRAX), que estima el riesgo de sufrir una fractura causada por osteoporosis pudiendo ser de cadera, hombro muñeca o alguna vertebra, en una población de 40 a 84 años de edad, para mujeres y hombres que no han recibido tratamiento previo. El FRAX ha sido validado en 40 cohortes sobre un millón de pacientes, su uso ha demostrado que permite una mejor racionalización en la evaluación de la densidad mineral ósea y orientación del tratamiento (1,53).

Según el resultado del estudio, el riesgo de fractura se estima en: Bajo, si el riesgo absoluto de fractura osteoporótica es inferior al 10 %, moderado entre 10-20 % y alto riesgo si es superior al 20 %. Para cada una de estas clasificaciones se tienen y se recomiendan intervenciones farmacológicas y no farmacológicas. Así mismo se tienen recomendaciones generales que se basan en una correcta nutrición, ejercicio y prevención de caídas. Para la nutrición se recomienda una ingesta adecuada de calorías, calcio de 1.000- 1.200mg/día y de 700- 1000UI/día de Vitamina D(54), respecto a la prevención de caídas los estudios en la población de adultos mayores demuestran su disminución mediante estrategias multifactoriales como el ejercicio físico, evaluación de los factores de riesgo y la utilización de sistemas protectores de cadera, aunque existen dudas sobre su eficacia(1,55–57).

RECOMENDACIONES:

Bajo Riesgo: Para estos pacientes son suficientes los consejos sobre el estilo de vida tales como, las medidas de higiene, prevención de caídas, ingesta adecuada de calcio y vitamina D.

Riesgo Moderado: Por lo general no es necesario enviar alguna medicación, pero se pueden considerar, además de los consejos de estilo de vida, alimentación y prevención de caídas; individualizar la necesidad de tratamiento farmacológico según los factores de riesgo del FRAX.

Riesgo Alto: Se considera el tratamiento farmacológico, ingesta diaria de vitamina D y calcio. Además de los consejos de estilo de vida, higiene, alimentación y riesgos de caídas. Los objetivos principales de los tratamientos para la osteoporosis son la prevención de las fracturas, el mantenimiento o el aumento de la DMO y la mejora de la función física(41).

La FDA tiene aprobadas opciones farmacológicas para el tratamiento y la prevención de la osteoporosis posmenopáusica, estos fármacos cuentan con diferentes mecanismos de acción y su eficacia en la prevención de los diferentes tipos de fracturas se presentan en la siguiente tabla:

Eficacia del tratamiento farmacológico en la prevención de fracturas en población de mujeres posmenopáusicas					
Fracturas			<i>Fractura vertebral</i>	<i>Fractura de cadera</i>	<i>Fractura no vertebral</i>
Bifosfonatos	Alendronato	Prevención primaria*	+	+	+
		Prevención secundaria**	+	+	+
	Risedronato	P. Primaria	+	+	+
		P. Secundaria	+	+	+
	Etidronato	P. Primaria	+	+	No efecto
		P. Secundaria	+	+	No efecto
	Zoledronato	P. Primaria	+	+	+
		P. Secundaria			
Ralenato de estroncio	P. Primaria	+	Dudoso	+	
	P. Secundaria	+	+	+	
Raloxifeno	P. Primaria	+	No efecto	No efecto	
	P. Secundaria	+	No efecto	No efecto	
Teriparatida		+	No efecto	+	
Denosumab			+	+	+

*Prevención primaria: sin antecedentes de fractura por fragilidad. **Prevención secundaria: con antecedentes de fractura por fragilidad.

TABLA 5. Eficacia del tratamiento farmacológico en la prevención de fracturas en población de mujeres posmenopáusicas (1,58)

Los beneficios antifractura de los medicamentos que ha aprobado la FDA, se han estudiado en su mayoría en mujeres con osteoporosis postmenopáusica, y sus tratamientos han demostrado que disminuyen el riesgo de fracturas en pacientes que han tenido osteoporosis

Los tratamientos mas comunes para la osteoporosis, incrementan la densidad mineral ósea, sin embargo poseen efectos colaterales importantes.

BIFOSFONATOS

Alendronato Fosamax® 10 mg/día (70 mg semanales) Está aprobado por la FDA para aumentar la masa ósea y el tratamiento de pacientes que toman glucocorticoides. El Alendronato reduce la incidencia de fracturas de cadera y vertebras en un 50% a los 3 años en pacientes con fractura previa de vertebra o en pacientes con osteoporosis en el sitio de la cadera, no se encontraron resultados estadísticamente significativos para la prevención primaria, con la excepción de las fracturas vertebrales, las cuales la reducción es clinicamente importante(1,59,60).

Risedronato Acrel®, Actonel® 5 mg/día (35 mg semanales) Aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica, por un efecto positivo en la DMO y reducir el riesgo de fracturas vertebrales, no vertebrales y de cadera en mujeres con osteoporosis. Reduce la incidencia de fracturas vertebrales en un 41% a 49% y las fracturas no vertebrales en un 36% a los 3 años.(61).

Etiendronato Osteum® Primer bifosfonato utilizado en la clínica, es eficaz en la reducción de las fracturas vertebrales a 2 años pero no sobre el resto de fracturas, no se recomienda como tratamiento de primera línea(62).

Ibandronato Boniva® 150mg (mensual) y 3 mg cada 3 meses por inyección intravenosa. Reduce la incidencia e fracturas vertebrales alrededor del 50% a los 3 años la reducción en el riesgo de fracturas no vertebrales no se ha documentado(63).

Ácido Zoledrónico Reclast®, Zometa®, Aclasta® 5 mg endovenosos anuales durante 3 años disminuyen el riesgo de fractura vertebral en un 70 % y el riesgo de fractura de cadera en un 41 %. Las fracturas no vertebrales se redujeron en un 25 %(58).Aprovado para prevención de nuevas fracturas en pacientes que ya hayan tenido fractura de cadera, para la mejorar el aumento de la masa ósea en hombres con osteoporosis, prevención y tratamiendo para pacientes que en tratamiento con glucocorticoides (64).

Efectos adversos de los bifosfonatos

Los efectos adversos que generan son: Problemas gastrointestinales, inflamacion del esofago y estomago, afectar la función renal, inflamación ocular, fracturas atípicas de fémur dolor en inge y músclo, osteonecrosis mandibular(65).

RALENATO DE ESTRONCIO

Ralenato de estroncio Osseor®, Protelos® 2gr/día por las noches. Reduce la incidencia de fracturas vertebrales y las no vertebrales en un 16% hasta los 10 años, incrementa la fromacion de hueso y reduce su reabsorción. El ralenatode estroncio se presenta como una opción en prevención secundaria en caso de intolerancia o contraindicación de los bifosfoatos en mujeres con un DMO *T-score* <-4/-“,5 mayores de 55 años o mayoresde 50 años con DMO *T-score* < -3,5 y 1 o más factores de riesgo para fracturas(66).

Efectos adversos de ralenato de estroncio

Contraindicada en pacientes con insuficiencia renal grave, puede causar Cefalea, trastornos de consciencia, pérdida de memoria; infarto de miocardio, tromboembolia venosa; náuseas, diarrea, heces blandas; dermatitis, eccema; aumento de CPK(66).

CALCITONINA

Calcitonina Miacalcin® Fortical® 200 UI en una sola atomización intra nasal diaria. La calcitonina de salmón fue aprobada para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres con 5 años después de la menopausia y cuando los tratamientos alternativos no son adecuados, es 40-50 veces mas potente que la humana. Sus efectos incrementan la DMO ligeramente en espina dorsal y cadera, se determinó que la administración de este medicamento reduce la fracturas vertebrales en un 30% y en aquellos con fracturas vertebrales previas no se ha demostrado a reduccion de fracturas no vertebrales(67,68).

Efectos adversos de la Calcitonina

La calcitonina puede causar nauseas, vomitos, riesgo de cáncer, como es intra nasal puede causar rinitis, edema y congestión nasal, epistaxis y reacción alergica por alergia a los salmones(69).

FÁRMACOS MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS (SERM)

Fármacos moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (*SERM*)

Raloxifeno: Evista® y Optruma®. Bazedoxifeno: Conbriza®. Fármacos que actúan como agonistas estrogénicos sobre el hueso. Incrementa la DMO en la espina lumbar, en la cadera y en el cuello del fémur. Reduce el riesgo de fracturas vertebrales, es una opción en prevención secundaria en caso de intolerancia o contraindicación de los bifosfonatos en mujeres posmenopáusicas. En un estudio (MORE) se observó una reducción de fracturas vertebrales osteoporóticas del 50 % a los 3 años (70). En mujeres posmenopáusicas disminuye el riesgo de cáncer de mama invasivo (71).

Efectos adversos de los fármacos moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERM)

Contraindicado en pacientes con insuficiencia renal grave, aumenta el riesgo de trombosis venosa profunda, enfermedad hepática, colostasis, sangrado uterino o cáncer de endometrio.

TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO

Terapia hormonal de reemplazo Activella®, Climara®, Estrace®, Estraderm®, Ogen®, Premarin®, Vivelle®. Aprobada por la FDA para la prevención de la osteoporosis, el alivio de síntomas vasomotores y atrofia vulvovaginal. Los estrógenos más progesterona reducen significativamente las fracturas vertebrales, de cadera, antebrazo, y muñeca. Es eficaz en la prevención de la pérdida ósea. La dosis de la terapia hormonal de reemplazo incluye regímenes cíclicos secuenciales y continuos, si no se sigue correctamente el tratamiento, este puede causar pérdida ósea más rápida.

Efectos adversos de la terapia hormonal de reemplazo

Los riesgos asociados con la terapia hormonal de reemplazo son relevantes, ya que, se asocia a un aumento del riesgo de enfermedad coronaria, cáncer de mama, embolia pulmonar, trombosis venosa profunda y accidentes cerebrovasculares.

HORMONA TERIPARATIDA

La teriparatida Forsteo® 20µg diarios durante 18 a 24 meses (subcutánea). Es una recombinante de la hormona paratiroidea humana endógena (PTH) formada por el fragmento amino-terminal de la molécula (1-34PTH). Aprobada por la FDA para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y hombres con alto riesgo de fractura. Reduce el riesgo de fracturas vertebrales en un 65% y no vertebrales en un 53% en pacientes con osteoporosis después de una media de 18 meses. El tratamiento con teriparatida ayuda al aumento de DMO, en la espina dorsal y la cadera, disminuye las fracturas vertebrales y no vertebrales.

Efectos adversos de la teriparatida

En los efectos adversos de la teriparatida se encuentran náuseas, mareos, astenia y calambres. Estudios indicaron que hubo aparición de osteosarcoma y otras neoplasias óseas en estudios de *Fischer* en ratas, se debe puntualizar que los estudios fueron realizados con dosis y duraciones dependientes entre 3 a 58 veces lo permitido en humanos, pero se tiene que evitar la administración en pacientes con historia de osteosarcoma o cualquier otro cáncer óseo incluyendo metástasis, riesgo a desarrollar osteosarcoma (enfermedad de Paget, o radiación esquelética previa) y niños o adultos con la epífisis todavía abiertas(1,72,73).

INHIBIDOR DE RANK/RANKL DENOSUMAB

Denosumab Prolia® 60mg cada 6 meses (subcutanea). Aprobado por la FDA para el tratamiento para las mujeres posmenopáusicas con alto riesgo de fractura y también aumenta la DMO en hombres con alto riesgo de fracturas y para el tratamiento de la pérdida ósea en los hombres que han recidivado con tratamiento de reducción de gonadotropina para el cancer de próstata. Es un anticuerpo monoclonal producido contraligando del receptor activador de factor nuclear kappa B (RANKL). Inhibe la formación osteoclástica, su función y sobrevivencia; y debido a esto la DMO incrementa. Reduce la incidencia de fracturas vertebrales en un 68%, fracturas de cadera en 40% y las fracturas no vertebrales en un 20% en 3 años. A diferencia de los bifosfonatos el Denosumab no se acumula en el hueso(74,75).

Efectos adversos del inhibidor de RANK/RANKL Denosumab

Al ser un fármaco de reciente liberación, el perfil de seguridad aún no está definido, puede causar aumento en el riesgo de infecciones graves de la piel. Los principales efectos potenciales son hipocalcemia y osteonecrosis mandibular e infecciones. Se han notificado riesgos de fracturas atípicas de fémur⁽⁷³⁾.

MODELO ANIMAL

Muchos de los adelantos terapéuticos en el manejo de la osteoporosis se estudiaron primero en diversos modelos animales y luego entraron en la práctica clínica. Todos estos modelos cumplieron con criterios básicos similares: deben satisfacer las normas éticas, legislativas locales y nacionales, ser accesibles a los centros experimentales, ser fáciles y seguros de manejar, tener un bajo costo de adquisición, requerir poco mantenimiento, reproducir fiablemente la enfermedad y el material biológico al ser examinado debe estar fácilmente disponible. Las ratas de laboratorio (cepa Wistar) cumplen la mayoría de estos criterios. Además de la disponibilidad de un conocimiento detallado del esqueleto de la rata y los protocolos para la inducción rápida de la osteopenia, han aumentado la popularidad de este modelo(2,76).

Existen muchas similitudes entre la pérdida de hueso en ratas después de la ovariectomía y la pérdida de hueso en mujeres menopáusicas, tales como el incremento de resorción ósea en comparación a la formación ósea, incremento de la pérdida ósea seguida por una formación muy lenta de hueso, mayor pérdida de hueso esponjoso que cortical y poca absorción de calcio en el intestino(2,77). Los mayores factores secundarios a la diferencia hormonal, ya sea inducida o quirúrgica son la disminución de la densidad ósea y el incremento de la fragilidad debido a la disminución del volumen de hueso esponjoso, caracterizado por el incremento de la separación trabecular, la disminución del grosor, conectividad y número trabecular (2,77).

MODELO MURINO

Los roedores son los animales que se utilizan con mayor frecuencia para estudios experimentales.

Las investigaciones relacionadas a la osteoporosis no son la excepción, los primeros estudios datan de 1985, y en 1991 se reportó por primera vez la ovariectomía (OVX) como modelo para el estudio postmenopáusico de pérdida ósea. En 1994, la administración de alimentos y medicamentos (FDA, *Food And Drug Administration*) estableció el uso de modelo en ratas ovariectomizadas como estrategia para pruebas, tratamiento y prevención de la osteoporosis. La rata ovariectomizada es un excelente modelo animal preclínico que emula de manera correcta la clínica del esqueleto humano mermado de estrógenos y la respuesta de los agentes terapéuticos sobre éste(2,78). El desarrollo de la osteopenia-osteoporosis es una de las respuestas biológicas más reproducibles en la investigación ósea(2,79). Todos los protocolos experimentales de osteoporosis pueden ser implementados en ratas esqueléticamente inmaduras o maduras(2,76). Aunque las ratas alcanzan la madurez sexual a los 2,5 meses, su esqueleto se considera maduro después de los 10 meses(2,79).

OSTEOPOROSIS POSTMENOPÁUSICA EN MURINOS

Después de la ovariectomía, la reabsorción ósea supera inicialmente la formación ósea causando pérdida ósea. Poco después, la remodelación ósea alcanza un estado estacionario, donde la resorción y la formación se equilibran. La pérdida ósea estadísticamente significativa se observa en la metáfisis proximal de la tibia después de 14 días(2,80) en el cuerpo vertebral lumbar después de 60 días(2,81), y en el cuello femoral después de 30 días(2,82). La ovariectomía no induce la pérdida de masa ósea en la epífisis de los huesos largos, la metáfisis tibial distal, ni en las vértebras caudales (2,83,84); estos tres sitios son abundantemente ricos en hueso trabecular. En el hueso cortical el aumento de la cavidad medular es una medida indirecta de la pérdida ósea. Este agrandamiento en la diáfisis de los huesos largos se debe al aumento de la resorción ósea endosteal(85) y la aposición ósea perióstica (86). La reabsorción endosteal y la formación ósea periosteal simultánea, dan lugar a una tasa de pérdida ósea cortical muy lenta (87). Los cambios tempranos en la anchura del hueso cortical y en la cavidad de la médula del eje femoral y tibial se observan entre los 90 y 120 días después de la ovariectomía (88–90); el hueso cortical requiere 180 días o más después de la cirugía para lograr el estado estacionario. Las disminuciones relacionadas con la edad en la DMO cortical en ratas hembra (sin operar) comienzan en las vértebras lumbares en la edad de 15 meses y en la metáfisis proximal de la tibia a la edad de 12 meses(91).

Al tener un déficit de hormonas se promueve las células progenitoras derivadas de la médula que se diferenciarán principalmente en osteoclastos por influencia del estroma medular del hueso, por lo tanto, se necesitarán muchas proteínas solubles como las citocinas y factores de crecimiento para que se desarrollen los osteoclastos. Los siguientes 7 días después de la ovariectomía, se incrementan las colonias de macrófagos granulocitos, forman una unidad y células de tipo osteoclastos. La proximidad de las células de la médula ósea, explica el efecto del estrógeno para regular la expresión de citosinas de las células(92). Los receptores de estrógeno están presentes en los osteoblastos y osteoclastos. Las propiedades

moduladoras del estrógeno en las células de la médula ósea muestran que los receptores de estrógeno (Ers, *estrogen receptors*) α y β , se afectan en ratas ovariectomizadas.

El estrógeno actúa a través de la activación del ER α de la célula madre mesenquimal (93). Los estrógenos también pueden promover el desarrollo de los osteoblastos, aumentando su proliferación e incrementando un número importante de proteínas como el factor de crecimiento tipo insulínico 1 (*FGI, Insuline like growth factor-1*), factor de crecimiento transformante- β (*FGT- β , Transforming growth factor- β*) y proteína morfogénica ósea-6 (*BMP, Bone morphogenic protein-6*).

Después de la ovariectomía hay un incremento en la producción de citocinas pro inflamatorias, específicamente la interleucina 1 (*IL-1, Interleukin1*) y el factor de necrosis tumoral alfa (*TNF- α , Tumor necrosis factor-alpha*) en ratones(94,95). La IL-6 regula el desarrollo de los osteoclastos en ratas OVX. Los estrógenos suprimen la expresión de IL-6. La neutralización de IL-11 disminuye la pérdida de hueso trabecular en ratas OVX por la disminución de la formación de osteoclastos. Aparte de las citocinas pro-inflamatorias, la molécula de adhesión intracelular 1 (*ICAM 1, intracelular adhesion molecule 1*) se expresa en ratas OVX, lo que es importante para la osteoclastogénesis (96). Las ratas que tienen déficit del factor inhibidor de la migración de los macrófagos, están protegidas contra la pérdida ósea inducida por la ovariectomía (97). Las prostaglandinas aumentan el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) en células de la médula ósea de los animales OVX(98).

La deficiencia de estrógeno incrementa la producción del factor estimulante de colonias de macrófago (*M-CSF, Macrophage colony stimulating factor*) vía respuesta de crecimiento rápido (*Erg-1, early growth response*) Egr-null, incrementando la resorción de hueso y la disminución de masa ósea (99). A altas concentraciones, los estrógenos incrementan los índices histomorfométricos de formación ósea, posiblemente por el incremento de la síntesis de factores de crecimiento osteoblástico. La actividad celular predominante en la superficie ósea endosteal (hueso esponjoso o trabecular y endocortical) es la

remodelación(100,101). Además la pérdida ósea en el envejecimiento ocurre en las superficies endosteales adyacentes a la médula(101). Incluso el hueso cortical muestra un bajo nivel de remodelado intracortical el cual puede ser inducido por condiciones metabólicas estresantes (102,103). El principal inconveniente del esqueleto de la rata es que algunos huesos conservan el crecimiento de por vida y no fusionan la epífisis(104). La expansión perióstica en la diáfisis de los huesos largos continúa hasta aproximadamente 10 meses, marcando la edad del pico de masa ósea(83,105). Permitiendo un amplio tiempo para los diseños experimentales, para prevenir y restaurar la masa ósea y la fuerza ⁽²²⁾.

Debido a estos hechos el modelo de rata OVX es un modelo ideal para la investigación en osteoporosis (76).

La osteopenia de a rata, debido a su edad, la OVX y la inmovilización tienen una fuerte similitud con la osteopenia humana, en sus características anatómicas como en los estados transicionales y estacionarios de la dinámica ósea. Las principales características de la osteoporosis humana son fracturas espontáneas y de bajo impacto, ninguna de las cuales ha sido reproducida en ningún modelo animal(106).Debido a estos hechos el modelo de rata OVX es un modelo ideal para la investigación en osteoporosis (76).

CAPÍTULO 2

DISEÑO EXPERIMENTAL

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la población mundial de adultos va en aumento y al potencial incremento en el número de pacientes con osteoporosis, es necesario establecer terapéuticas para el diagnóstico, prevención y el tratamiento de este problema. En la actualidad los métodos de diagnóstico basados en la densidad mineral ósea (DMO), son muy confiables, sin embargo, buscamos métodos más eficaces que logren ayudar a diagnosticar la enfermedad, que sean más rápidos y se utilicen de manera rutinaria, ya que la osteoporosis es considerada un problema grave de salud mundial, por las tasas de morbilidad, mortalidad y el impacto económico que genera. Teniendo todo esto a considerar, nos planteamos lo siguiente:

¿Se puede usar la osteocalcina como método de diagnóstico para la osteoporosis?

Para poder realizar esto, se utilizará los biomarcadores serológicos de osteocalcina (OC), que nos indicara si hay algún efecto de la osteoporosis en su expresión, y si el efecto es afirmativo, poder abrir más líneas de investigación con este biomarcador y poder utilizar en el futuro su uso clínico.

JUSTIFICACIÓN

Con el sustento científico y apoyados en los estudios de ratas ovariectomizadas como modelo experimental adecuado de osteoporosis humana postmenopáusica, y de igual forma, con los reportes de estudios histológicos en ratas ovariectomizadas que demuestran las disminuciones marcadas del volumen óseo, se procede a elegir el modelo osteoporótico en ratas Wistar, para evaluar el efecto que tiene la osteoporosis en los niveles serológicos de la osteocalcina. Y habiendo diferencias en los biomarcadores, nos dará la posibilidad de encontrar métodos y fármacos más específicos para el diagnóstico y posteriormente el tratamiento de la enfermedad, a nivel de los sistemas de formación ósea.

HIPÓTESIS

Los niveles de osteocalcina (OCN) en ratas Wistar ovariectomizadas (OVX) a los 45 y 90 días mostrarán diferencia significativa con los niveles de ratas sanas (sin OVX).

OBJETIVO GENERAL

Determinar si hay diferencia entre los niveles de biomarcadores serológicos de osteocalcina (OCN) en ratas Wistar ovariectomizadas (OVX), en comparación con el modelo de rata sana.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar si hay diferencia entre los niveles de biomarcadores serológicos de osteocalcina (OCN) en ratas Wistar ovariectomizadas (OVX) a 45 y 90 días, en comparación con el modelo de rata sana.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

METODOLOGÍA

DISEÑO

Estudio experimental, conocimiento que tienen los investigadores de los factores del estudio: abierto; participación del investigador: experimental; tiempo en que suceden los eventos: prospectivo; relación que guardan entre sí los datos: longitudinal.

UNIVERSO DE ESTUDIO/ TAMAÑO DE MUESTRA

Para poder desarrollar el modelo experimental, se seleccionaron 18 ratas hembras de la cepa Wistar, de 4 meses de edad ($250 \pm 20\text{g}$) que fueron obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por método aleatorio; todos los animales fueron obtenidos en un solo evento. Los animales fueron aclimatados y estuvieron en resguardo durante siete días en el bioterio de la Facultad de Odontología de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Universidad Nacional Autónoma de México, a una temperatura ambiente de 22°C , con un fotoperiodo de 12 horas y humedad relativa a 50%, la alimentación (Rodent Diet 5001®) y el agua fueron *ad libitum*(107).

CONSTITUCIÓN DE GRUPOS

Se formaron 3 grupos de estudio: Grupo 1 conformado por las 6 ratas sanas, los grupos 2 y 3 que también están conformados por 6 ratas cada uno, son resultado de la evolución postovariectomía a los 45 y 90 días respectivamente

GRUPOS DE ESTUDIO:

Grupo I: Seis ratas sin OVX (sanas/control)

Grupo II: Seis ratas con OVX a los 45 días

Grupo III: Seis ratas con OVX a los 90 días

PLAN DE TRABAJO

Se obtuvieron 18 animales del bioterio de la Facultad de Medicina, se aclimataron durante 7 días en el bioterio de la Facultad de Odontología. Se tomaron muestras serológicas de las 18 ratas y se realizaron las ovariectomías a los grupos II y III. A los 45 días se tomaron muestras serológicas del grupo I (control) y del grupo II y a los 90 días se tomaron muestras del grupo I (control) y grupo III.

Se realizó la eutanasia a los grupos II y III después de realizar la toma de muestras; es decir, a los 45 y 90 respectivamente, y para el grupo I (control) la eutanasia se realizó a los 90 días junto con el grupo III, después de los tres tiempos de toma de muestras.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión: ratas hembra, cepa Wistar, ovariectomizadas, osteoporóticas, obtenidas y mantenidas en bioterio. Criterios de exclusión: ratas con enfermedades sistémicas, osteopenia, obesas, anémicas. Criterios de eliminación: ratas que desarrollen enfermedades óseas, fracturas traumáticas y/o patológicas, necrosis avascular, infección tisular y muerte por causas no consecuentes al estudio, como enfermedades infectocontagiosas (bacterias, hongos, virus), las cuales, en caso de presentarse serán evaluadas por un Médico Veterinario Zootecnista con el fin de descartar que la enfermedad no haya sido consecuencia derivada del estudio.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los resultados fueron evaluados con una prueba de ANOVA de una vía para determinar la variabilidad y llevar a cabo la prueba de Turkey para determinar la significancia estadística a nivel de confianza de $P < 0.05$. Los datos para el análisis serológico fueron analizados estadísticamente por medio de la prueba exacta Fisher (2x2) para comparar los grupos. Se utilizó el programa Sigma Stata (V 9.0 / Jandel Scientific).

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos fueron de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud. Título séptimo. De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. Capítulo único. Artículos 121 – 126. El trabajo fue realizado mediante el aval del Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Con el número de aprobación CIE/06/19/03/2014.

DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS

Generación del modelo osteoporótico en ratas Wistar/Procedimiento terapéutico

Las ratas fueron sedadas y tranquilizadas con Zolazepam (20.40 mg/kg) y Maleato de acepromicina (0.5.-1 mg/kg), ambas por vía intramuscular. Se realizó la tricotomía de la zona quirúrgica (dorsal lumbar) y se realizó la antisepsia de rutina con yodopovidona jabón. Se aplicó anestésico local en la zona quirúrgica (mepivacaína al 3%), y a continuación se realizó una incisión lineal de 1 cm a lo largo de la línea media dorsal (caudal a la última costilla), se realiza una segunda incisión para atravesar la musculatura abdominal. Se pinza suavemente la grasa que rodea los ovarios; una vez expuestos, se ligan con seda 3/0 (Atramat®) y se

remueven. Se sutura por planos, con puntos simples; el plano profundo con ácido poliglicólico 4/0 y piel con ácido poliglicólico 3/0 (Atramat®). Finalmente, se irriga la zona con una solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS) para remover detritos y la yodopovidona. Terminando el acto quirúrgico, se procede a realizar los mismos pasos de lado contralateral. Las ratas fueron medicadas con analgesia y antibioticoterapia postquirúrgica. Los animales fueron asignados a cada una de las condiciones previamente referidas (107).

MUESTRAS SEROLÓGICAS

Todas las muestras sanguíneas se obtuvieron del plexo venoso retroorbital. Con el dedo índice, se empuja el tubo capilar (pipeta) incertándolo en el canto interno del ojo (el ojo se protruye levemente); el dedo pulgar debe presionar detrás de la mandíbula para impedir el retorno venoso de la cabeza y que la sangre llene más el plexo. Una vez recolectada la sangre requerida, el capilar es removido. Se realiza una ligera presión en el globo ocular con el objetivo de reposicionarlo y evitar un hematoma o exoftalmos post orbital. La sangre es recolectada y etiquetada en tubos Eppendorf. Se centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos para posteriormente colectar el suero.

PROCEDIMIENTO TERAPÉUTICO

Con el sustento científico y apoyados en los estudios de ratas ovariectomizadas como modelo experimental adecuado de osteoporosis humana postmenopáusica y con los reportes de estudios histológicos en ratas ovariectomizadas que demuestran las disminuciones marcadas del volumen óseo, se procedió a elegir el modelo osteoporótico en ratas Wistar (77). En principio (día cero) se tomaron muestras sanguíneas a todas las ratas, posteriormente se realizó la ovariectomía bilateral (OVX) bajo sedación a las 18 ratas que conformaron los grupos II y III (6 ratas en cada uno). Se tomaron muestras a los 45 días a los grupos I y II. Y posteriormente

se tomaron muestras a los grupos I y III. Las muestras sanguíneas se centrifugaron para separar el suero/plasma y posteriormente realizar los estudios serológicos correspondientes. Los procedimientos siguieron los fundamentos establecidos por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología, UNAM(76).

La eutanasia se realizó sin dolor y siguiendo lo establecido por el Comité de Investigación y Ética (el sacrificio de los animales se realizó empleando CO₂).

EUTANASIA

Las eutanasias se llevaron a cabo posterior al plan de toma de muestras de cada grupo: 45 días grupo II, 90 días grupos I y III, de acuerdo a lo establecido en el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología de la UNAM; se utilizó monóxido de carbono para evitar dolor y sufrimiento a los animales de experimentación.

ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY; ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS)

Todas las muestras fueron ensayadas bajo condiciones que aseguren la linealidad respecto al tiempo y a la concentración de proteína. La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina como estándar. Por medio del ensayo de inmuoadsorción ligado a enzimas, se realizaron las pruebas para la identificación de los biomarcadores de osteocalcina (OCN), utilizando el kit Rata Osteocalcin ELISA, ALPCO® por método directo. Se tomaron lecturas a 405 nm cada 15 minutos y la reacción se detuvo a los 60 minutos. Los ensayos se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces.

TABLA 4- ELISA

1. Tomar 1 μL de Suero y llevarlo a 300 μL con PBS pH 7.2.
2. Colocar 100 μL por cada pozo e incubar a 4 °C toda la noche. Cubrir la caja con parafilm y la tapa de plastico.
3. Al sig día, lavar con PBS + tween 0.05% 3 veces y despues 2 veces con PBS sin tween (sacudir la caja para eliminar residuos de agua).
4. Bloquear con BSA 1% colocar 200 μL por pozo durante 1 hr en agitación a temperatura ambiente.
5. Lavar con PBS + tween 0.05% 2 veces y despues 2 veces con PBS sin tween.
6. Incubar primer anticuerpo 1:1000 con PBS/BSA durante 1hren agitación a temperatura ambiente. Se colocan 100 μL por pozo. Cubrir con papel de aluminio para evitar la luz.
7. Lavar 3 veces con PBS + tween y 2 veces con PBS sin tween.
8. Incubar segundi anticuerpo 1:1000 con PBS durante 1 hr en agitación a temperatura ambiente. Se colocan 100 μL por pozo. Cubrir con papel aluminio paraevitar la luz.
9. Lavar 5 veces con PBS sin tween.
10. Agregar 100 μL de solución de sustratos ABTS, dejarlo por 30min en agitación a temperatura. Cubrir con papel de aluminio para evitar la luz. Monitorear la coloración.
11. Leer a 405 nm con la corrección a 650nm.
12. Detener la reacción con acido citrico 0.1 M (100 μL por pozo) y tapar con el papel aluminio.

CAPITULO 4

RESULTADOS

RESULTADOS

Análisis serológico

Las muestras serológicas que se obtuvieron fueron analizadas por medio de la prueba ELISA para evaluar los niveles circulantes de Osteocalcina.

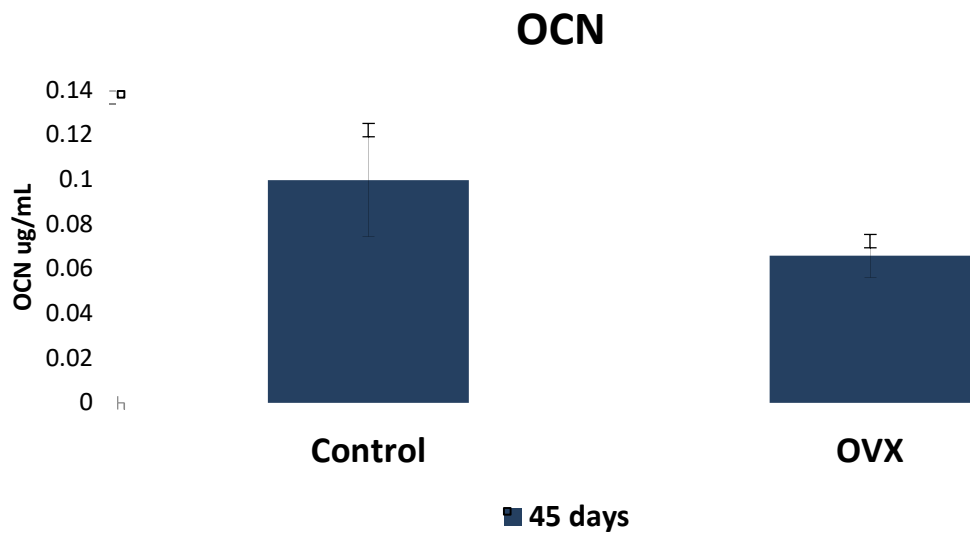
Osteocalcina OCN

Los niveles de osteocalcina (OCN) se determinaron por medio de un ensayo de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), a partir del suero de ratas Wistar sanas y ratas Wistar ovariectomizadas (OVX) a los 45 y 90 días.

Se realizó una comparativa de los valores obtenidos en los distintos tiempos de muestra

Las cifras obtenidas de las ratas Wistar a los 45 días post ovariectomía (OVX) (grupo II) y de las ratas sanas (grupo I/ control) no muestran diferencias significativas al compararse

Tabla 5: Concentraciones de osteocalcina (OCN) 45 días					
Condición	Mean	SD	SE	Lower 95% CI of mean	Upper 95% CI of mean
Sana	0.1001	0.06207	0.02534	0.03492	0.1652
OVX	0.06594	0.02366	0.009661	0.04111	0.09078

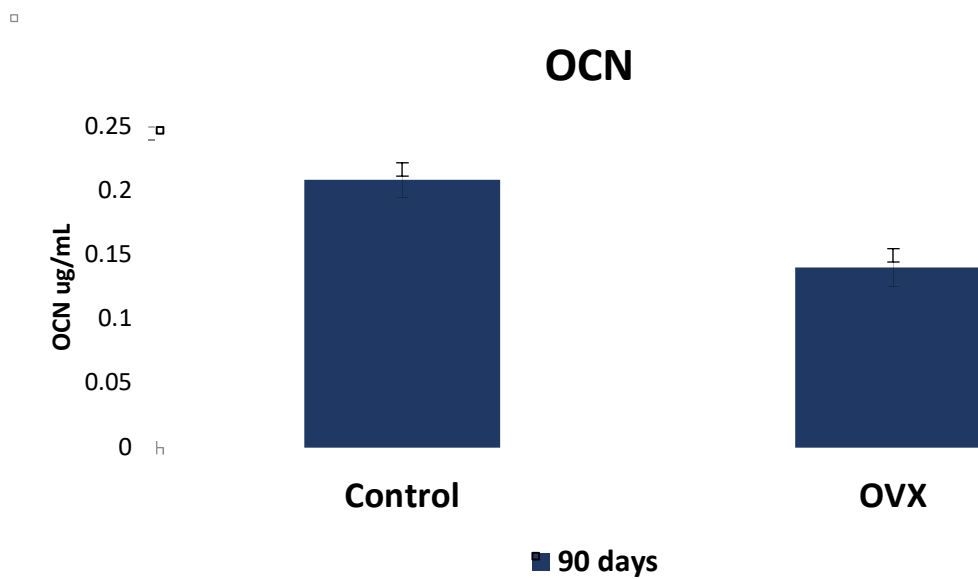


Gráfica 1: Comparativa concentraciones plasmáticas de OCN en ratas sanas y ratas OVX a los 45 días, ($p < 0.05$).

Tabla 6: Comparacion de Sana vs OVX a los 45 días	
P value	0.237
P value summary	Ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
Mean ± SEM of column A	0.1001 ± 0.02534 N=6
Mean ± SEM of column B	0.06594 ± 0.009661 N=6
Difference between means	-0.03411 ± 0.02712
95% confidence interval	-0.09453 to 0.02631
R squared	0.1366

Las cifras obtenidas de las ratas a los 90 días postovariectomía (grupo III) y de las ratas sanas (grupo I / control) Muestran diferencia significativa al compararse.

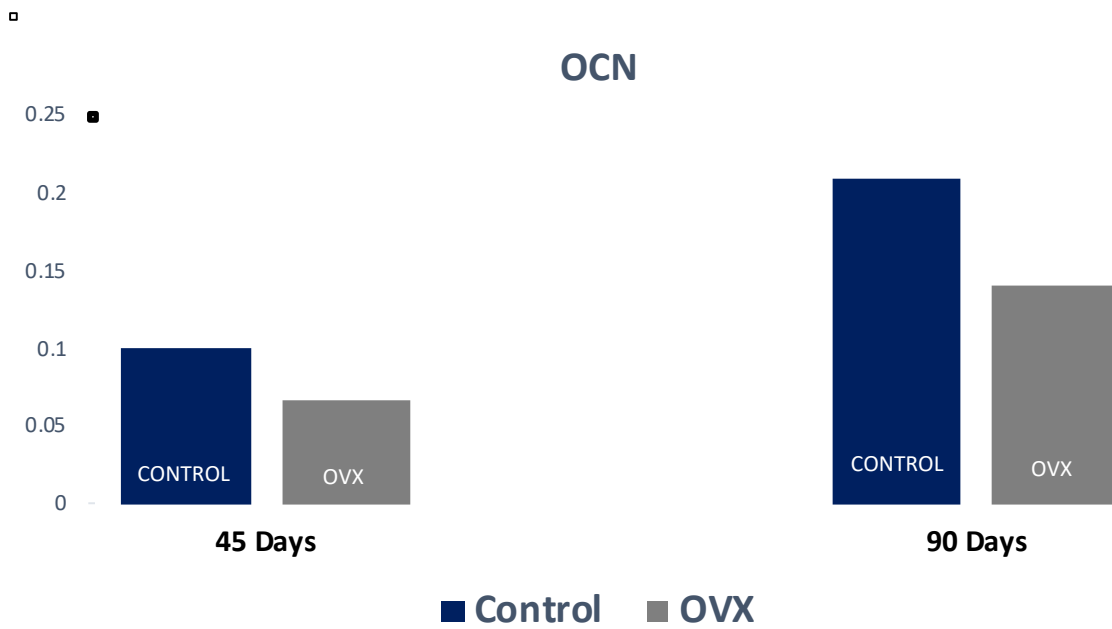
TABLA 7: Concentraciones de osteocalcina a 90 días					
Condición	Mean	SD	SE	Lower 95% CI of mean	Upper 95% CI of mean
Sana	0.2087	0.03282	0.0134	0.1742	0.2431
OVX	0.1404	0.03614	0.01475	0.1025	0.1783



Grafica 2: Comparativa concentraciones plasmáticas de OCN en ratas sanas y ratas OVX a los 90 días, ($p < 0.05$).

TABLA 8: Comparación rata sana vs OVX a los 90 días	
P value	0.0065
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
Mean ± SEM of column A	0.2087 ± 0.01340 N=6
Mean ± SEM of column B	0.1404 ± 0.01475 N=6
Difference between means	-0.06828 ± 0.01993
95% confidence interval	-0.1127 to -0.02387
R squared	0.54

COMPARATIVA DE OC EN 45 Y 90 DÍAS



Grafica 3: Comparativa de concentraciones de OCN serica en grupos I,II ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La Osteoporosis es una enfermedad ósea, caracterizada principalmente por un desacoplamiento en el proceso de recambio óseo, con una mayor elevación en la resorción ósea, que en la formación, lo cual conlleva a la pérdida de la densidad de la masa ósea, ruptura de la microarquitectura y fuerza del hueso(2). Según la OMS la enfermedad ósea más común en los seres humanos es la osteoporosis y se considera un serio problema de salud pública, por ser una de las enfermedades más frecuentes en los humanos, ya que se estima que entre un 20 y un 50% de mujeres y hombres mayores a 50 años tendrán una fractura debido a la fragilidad ósea que les provoca dicha enfermedad(108), aunado a esto, también los gastos que la enfermedad genera; la encuesta III- National Health and nutrition Examination (NHANES III) arrojó datos, con los que la Fundación Nacional de Osteoporosis en los Estados Unidos de Norteamérica (NOF), estima 9.9 millones de estadounidenses, y otras cifras arrojan que más de 200 millones de personas alrededor del mundo se ven afectadas por osteoporosis, siendo en su mayoría mujeres .

En México la tendencia al aumento de esperanza de vida conlleva a una transición socioeconómica y epidemiológica por el número creciente de personas mayores, puesto que, la esperanza de vida ha crecido en las últimas décadas 39 años, de 36.2 años a 75 años y se espera que para el 2050 la población aumente su esperanza de vida a 82 años. Debido a que la osteoporosis es una enfermedad asociada con el envejecimiento, se espera que el número de pacientes con osteoporosis y fracturas asociadas a ello aumenten drásticamente. Es por eso que se tienen que encontrar métodos y fármacos más eficaces, rápidos y económicos para poder diagnosticar y tratar la enfermedad.

Existe una extensa literatura que estudia la rata OVX y se estudian diversos cambios histomorfométricos y los marcadores de recambio óseo ya que los modelos en ratas son fundamentales para tener un nivel alto de eficacia y seguridad. El estudio del

Dr Kyung-Hounk Yoon y Dae-Chul Cho et al(109) demostró que la ovariectomía en ratas aumenta significativamente el recambio óseo y esto se confirma por la elevación de los marcadores de recambio óseo y la pérdida significativa de hueso trabecular. Otros estudios como el de la Dra Jameela Banu et al(110) nos confirma que el modelo de rata ovariectomizada es un modelo reproducible, confiable y económico, para el estudio de la osteoporosis.

En este estudio investigamos los efectos que tiene la osteoporosis en la expresión de la osteocalcina en ratas Wistar, a los 45 y 90 días después de la OVX. El estudio nos arrojó que a los 45 días, los niveles séricos de osteocalcina no tienen un aumento significativo, en comparación con el grupo de control; y a los 90 días se da un aumento significativo en los niveles séricos de osteocalcina. Los niveles séricos de los biomarcadores de formación aumentan debido a que hay un aumento en el recambio óseo por la deficiencia de estrógeno inducida por la menopausia.

Podemos observar que la osteocalcina es un biomarcador que nos puede ayudar con el diagnóstico de la osteoporosis, ya que lo visto en los resultados va conforme a lo reportado en la literatura: Los niveles séricos de osteocalcina se incrementan en condiciones asociadas con el aumento del remodelado óseo.

Sin embargo, con estos hallazgos se sugiere incrementar las líneas de investigación con el objetivo de determinar si la osteocalcina es sensible y específica a la osteoporosis.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

Se confirma el efecto de la osteoporosis posmenopáusica en la expresión de osteocalcina, en un modelo de rata osteoporótica. Los niveles de producción de estrógenos bajan drásticamente y el estudio muestra diferencia significativa en los niveles circulantes de osteocalcina sérica, ésto nos brinda un precedente para continuar con una línea de investigación que continúe descubriendo los mecanismos de acción que tienen lugar en un paciente osteoporótico, para posteriormente crear o mejorar los métodos de diagnóstico existentes, para brindar mejor calidad de vida al paciente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez Álvarez R, Mendoza Garcés F, Torre Mollinedo F, Callejo Orcasitas A, Arizaga Maguregui A. Actualización en el tratamiento de la osteoporosis: manejo desde una unidad del dolor (1.ª parte). Rev la Soc Española del Dolor. 2014;21(6).
2. Salgado F. Desarrollo de la fase preclínica de fármacos peptídicos derivados de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) y su potencial eficacia en el tratamiento de la osteoporosis. UNAM; 2017.
3. Garnero P, Sornay-Rendu E, Duboeuf F, Delmas PD. Markers of bone turnover predict postmenopausal forearm bone loss over 4 years: The OFELY study. J Bone Miner Res. 1999;14(9).
4. G. R-E. Epidemiology of osteoporosis in Latin America. Salud publica Mex. 2009;
5. Keen R. Osteoporosis: strategies for prevention and management. Vol. 21, Best Practice and Research: Clinical Rheumatology. 2007.
6. Sebastian Manuel Arteaga Martinez MIGP. Desarrollo del sistema Esquelético. In: Embriología Humana Y Biología del Desarrollo. 2da ed. Panamericana; 2017. p. 255–7.
7. Fortuny A. Embriología humana y biología del desarrollo. Progresos Obstet y Ginecol. 2009;
8. Fallis A. Langman, Embriología Médica. Guanabara Koogan; 2016.
9. Carlson BM. Human Embryology and Developmental Biology: Fifth Edition. Human Embryology and Developmental Biology: Fifth Edition. 2013.
10. Moore KL, Persaud TV. Embriología Clínica. Elsevier; 2008.
11. Arnett T. Bone Structure and Bone Remodelling. Univ Coll London. 2003;
12. Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil I, Del Canto Pingarrin M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11:47–51.

13. Davies JE, Hosseini MH. Histodynamics of Endosseous Wound Healing. Bone Eng. 2000;
14. Burr DB, Akkus O. Bone Morphology and Organization. In: Basic and Applied Bone Biology. 2013.
15. Hartmann C. Transcriptional networks controlling skeletal development. Current Opinion in Genetics and Development. 2009.
16. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Alvarez-Uría M, Fraile B. Citología e Histología vegetal y animal. McGRAW-HILL - Interam ESPAÑA Edif Valrealty C/Basauri, 17 Arav (Madrid). 2017;4.
17. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPAR γ signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. Nature Reviews Rheumatology. 2009.
18. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. Calcif Tissue Int. 1993;
19. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic Control of Bone Formation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2009;
20. Qing H, Bonewald LF. Osteocyte remodeling of the perilacunar and pericanalicular matrix. International journal of oral science. 2009.
21. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. J Bone Miner Res. 1993;
22. Gary S. Firestein, MD, Ralph C. Budd, MD, Sherine E Gabriel, MD, MSc, Iain B McInnes, PhD, FRCP, FRSE, FMedSci and James R O'Dell M. Biología, fisiología y morfología del hueso. In: Tratado de Reumatología. ELSEVIER; 2018. p. 60–5.
23. Enrique Gomez Barrera JCA. Fisiopatología Ósea. In: Traumatología y ortopedia, GENERALIDADES. 1ra ed. España: ELSEVIER; 2020. p. 101–9.
24. Young MF. Bone Matrix Proteins: More Than Markers. Calcif Tissue Int. 2003;
25. Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. J Bone Miner Res. 1993;

26. Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocrine Reviews*. 2003.
27. J. L. Physiology and bone physiopathology. *An Sist Sanit Navar*. 2003;
28. Villarreal Brito M, Álvarez Pérez MA, Marichi Rodríguez FJ. Expresión de la osteocalcina en el ligamento periodontal al inducir fuerzas ortodóncicas. *Rev Odontológica Mex*. 2015;
29. Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. *Principles of Bone Biology*, 3rd ed. *Am J Neuroradiol*. 2009;
30. Hauschka P V., Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*. 2017;
31. Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2000.
32. Brown JP, Albert C, Nassar BA, Adachi JD, Cole D, Davison KS, et al. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clinical Biochemistry*. 2009.
33. E R. Caracterización estructural de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y su relación con la función biológica. 2014;
34. Menanteau J, Neuman WF, Neuman MW. A study of bone proteins which can prevent hydroxyapatite formation. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1982;
35. Taichman RS. Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005.
36. Kanis JA. Osteoporosis III: Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet*. 2002.
37. U.S. Department of Health and Human Services. Bone health and osteoporosis: A report of the Surgeon General. Rockville, MD US Dep Heal Hum Serv Off Surg Gen. 2004;
38. Compston J, Cooper A, Cooper C, Gittoes N, Gregson C, Harvey N, et al. UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. *Arch Osteoporos*. 2017;
39. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, et al.

Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. Osteoporos Int. 2014;

40. Jose F. Molina Restepo LAGN. Osteoporosis: enfoque clínico y de laboratorio. In: Medicina y Laboratorio. 2010. p. 16: 111-140.
41. Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. Vol. 142, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2014.
42. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. A unitary model for involutional osteoporosis: Estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. J Bone Miner Res. 1998;13(5).
43. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. Vol. 15, Journal of Bone and Mineral Research. 2000.
44. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(14).
45. Bullamore JR, Wilkinson R, Gallagher JC, Nordin BEC, Marshall DH. EFFECT OF AGE ON CALCIUM ABSORPTION. Lancet. 1970;296(7672).
46. Albright F, Smith PH, Richardson AM. Postmenopausal osteoporosis: Its clinical features. J Am Med Assoc. 1941;116(22).
47. Cummings SR, Browner WS, Bauer D, Stone K, Ensrud K, Jamal S, et al. Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. N Engl J Med. 1998;339(11).
48. National Osteoporosis F. America's Bone Health: The State of Osteoporosis and Low Bone Mass in Our Nation. National Osteoporosis Foundation. 2002.
49. Delezé M, Cons-Molina F, Villa AR, Morales-Torres J, Gonzalez-Gonzalez

- JG, Calva JJ, et al. Geographic differences in bone mineral density of Mexican women. *Osteoporos Int.* 2000;11(7).
50. Clark P, Carlos F, Barrera C, Guzman J, Maetzel A, Lavielle P, et al. Direct costs of osteoporosis and hip fracture: An analysis for the Mexican healthcare system. *Osteoporos Int.* 2008;19(3).
 51. Zanchetta J. The Latin America regional Audit: epidemiología, costos e impacto de la osteoporosis en 2012. *Int Osteoporos Found.* 2012;
 52. Johansson H, Oden A, Johnell O, Jonsson B, De Laet C, Oglesby A, et al. Optimization of BMD measurements to identify high risk groups for treatment - A test analysis. *J Bone Miner Res.* 2004;19(6).
 53. Crabtree, NJ, Beddington NA CD. Impact of UK national Guidelines base on FRAX® comparison with current clinical practice. *Natl Osteoporos Guidel Group.* 2010;
 54. Tang BM, Eslick GD, Nowson C, Smith C, Bensoussan A. Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *Lancet.* 2007;370(9588).
 55. Howe TE, Shea B, Dawson LJ, Downie F, Murray A, Ross C, et al. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;
 56. Oliver D, Connelly JB, Victor CR, Shaw FE, Whitehead A, Genc Y, et al. Strategies to prevent falls and fractures in hospitals and care homes and effect of cognitive impairment: Systematic review and meta-analyses. Vol. 334, *British Medical Journal.* 2007.
 57. Parker MJ, Gillespie WJ, Gillespie LD. Effectiveness of hip protectors for preventing hip fractures in elderly people: Systematic review. Vol. 332, *British Medical Journal.* 2006.
 58. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-Yearly Zoledronic Acid for Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007;356(18).

59. Cummings SR, Black DM, Thompson DE, Applegate WB, Barrett-Connor E, Musliner TA, et al. 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(24).
60. Wells GA, Cranney A, Peterson J, Boucher M, Shea B, Robinson V, et al. Alendronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2008.
61. Harris ST, Watts NB, Genant HK, McKeever CD, Hangartner T, Keller M, et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: A randomized controlled trial. *J Am Med Assoc.* 1999;282(14).
62. Cranney A, Adachi J, Griffith L, Guyatt G, Krolicki N, Robinson V, et al. Etidronate for treating and preventing postmenopausal osteoporosis. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2001.
63. Chesnut CH, Skag A, Christiansen C, Recker R, Stakkestad JA, Hoiseth A, et al. Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2004;19(8).
64. Lyles KW, Colón-Emeric CS, Magaziner JS, Adachi JD, Pieper CF, Mautalen C, et al. Zoledronic Acid and Clinical Fractures and Mortality after Hip Fracture. *N Engl J Med.* 2007;357(18).
65. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. Vol. 22, *Journal of Bone and Mineral Research.* 2007.
66. Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, et al. The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med.* 2004;350(5).
67. Chesnut CH, Silverman S, Andriano K, Genant H, Gimona A, Harris S, et al. A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal

- women with established osteoporosis: The prevent recurrence of osteoporotic fractures study. *Am J Med.* 2000;109(4).
68. Cranney A, Tugwell P, Zytaruk N, Robinson V, Weaver B, Shea B, et al. VI. Meta-analysis of calcitonin for the treatment of postmenopausal osteoporosis. Vol. 23, *Endocrine Reviews.* 2002.
 69. Overman RA, Borse M, Gourlay ML. Salmon Calcitonin Use and Associated Cancer Risk. Vol. 47, *Annals of Pharmacotherapy.* 2013.
 70. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: Results from a 3-year randomized clinical trial. *J Am Med Assoc.* 1999;282(7).
 71. Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, et al. Effects of Raloxifene on Cardiovascular Events and Breast Cancer in Postmenopausal Women. *N Engl J Med.* 2006;355(2).
 72. Capriani C, Irani D, Bilezikian JP. Safety of osteoanabolic therapy: A decade of experience. Vol. 27, *Journal of Bone and Mineral Research.* 2012.
 73. Vahle JL, Sato M, Long GG, Young JK, Francis PC, Engelhardt JA, et al. Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol Pathol.* 2002;30(3).
 74. Cummings SR, Martin JS, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, et al. Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med.* 2009;361(8).
 75. Xue F, Ma H, Stehman-Breen C, Haller C, Katz L, Wagman RB, et al. Design and methods of a postmarketing pharmacoepidemiology study assessing long-term safety of Prolia® (denosumab) for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2013;22(10).
 76. Lelovas PP, Xanthos TT, Thorma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative Medicine.* 2008.

77. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*. 1991.
78. Marcus R, Feldman D KJ. Animal model for in vivo experimentation in osteoporosis research. *Osteoporosis*. San Diego; 1996.
79. Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001;
80. Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1988;
81. Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*. 1989;
82. Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*. 1997;
83. Li XJ, Jee WSS. Adaptation of diaphyseal structure to aging and decreased mechanical loading in the adult rat: A densitometric and histomorphometric study. *Anat Rec*. 1991;
84. Miyakoshi N, Sato K, Abe T, Tsuchida T, Tamura Y, Kudo T. Histomorphometric evaluation of the effects of ovariectomy on bone turnover in rat caudal vertebrae. *Calcif Tissue Int*. 1999;
85. Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH. The effects of ovariectomy and 17β -estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Miner Res*. 1987;
86. Miller SC, Bowman BM, Miller MA, Bagi CM. Calcium absorption and osseous organ-, tissue-, and envelope-specific changes following ovariectomy in rats. *Bone*. 1991;
87. Kimmel DB, Wronski TJ. Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1990;
88. Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int*. 1993;
89. Ke HZ, Jee WSS, Zeng QQ, Li M, Lin BY. Prostaglandin E2 increased rat

- cortical bone mass when administered immediately following ovariectomy. *Bone Miner.* 1993;
90. Yamamoto N, Jee WSS, Ma YF. Bone histomorphometric changes in the femoral neck of aging and ovariectomized rats. *Anat Rec.* 1995;
 91. FUKUDA S, IIDA H. Age-Related Changes in Bone Mineral Density, Cross-Sectional Area and the Strength of Long Bones in the Hind Limbs and First Lumbar Vertebra in Female Wistar Rats. *J Vet Med Sci.* 2004;
 92. Shevde NK, Pike JW. Estrogen modulates the recruitment of myelopoietic cell progenitors in rat through a stromal cell-independent mechanism involving apoptosis. *Blood.* 1996;
 93. Zhou S, Zilberman Y, Wassermann K, Bain SD, Sadovsky Y, Gazit D. Estrogen modulates estrogen receptor α and β expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J Cell Biochem.* 2001;
 94. Pacifici R, Brown C, Puscheck E, Friedrich E, Slatopolsky E, Maggio D, et al. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;
 95. Kimble RB, Vannice JL, Bloedow DC, Thompson RC, Hopfer W, Kung VT, et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. *J Clin Invest.* 1994;
 96. Gao Y, Morita I, Kubota T, Murota S, Aso T. Expression of adhesion molecules LFA-1 and ICAM-1 on osteoclast precursors during osteoclast differentiation and involvement of estrogen deficiency. *Climacteric.* 2000;
 97. Oshima S, Onodera S, Amizuka N, Li M, Irie K, Watanabe S, et al. Macrophage migration inhibitory factor-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone loss. *FEBS Lett.* 2006;
 98. Kanematsu M, Sato T, Takai H, Watanabe K, Ikeda K YY. Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ligand on pre-B cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J Bone Min Res.* 2000;

99. Cenci S, Weitzmann MN, Gentile MA, Aisa MC, Pacifici R. M-CSF neutralization and Egr-1 deficiency prevent ovariectomy-induced bone loss. *J Clin Invest.* 2000;
100. Yao W, Jee WSS, Zhou H, Lu J, Cui L, Setterberg R, et al. Anabolic effect of prostaglandin E2 on cortical bone of aged male rats comes mainly from modeling-dependent bone gain. *Bone.* 1999;
101. Hagaman JR, Ambrose WW, Hirsch PF KG. Age-related changes in rat trabecula, endosteal and cortical bone demonstrated with scanning electron microscopy. *Cells and Mater.* 1992;
102. Ruth EB. Bone studies. II. An experimental study of the haversian-type vascular channels. *Am J Anat.* 1953;
103. de Winter FR, Steendijk R. The effect of a low-calcium diet in lactating rats; Observations on the rapid development and repair of osteoporosis. *Calcif Tissue Res.* 1975;
104. Dawson AB. The age order of epiphyseal union in the long bones of the albino rat. *Anat Rec.* 1925;
105. Schapira D, Laton-Miller R, Barzilai D SM. The rat as a model for studies of the aging skeleton. *Cells Mater.* 1992;
106. Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner.* 1992;
107. Suckow M, Weisbroth S, Franklin C. *The Laboratory Rat.* 2d Edition. The Laboratory Rat. San Diego California; 2006.
108. Kanis J a. Assessment of osteoporosis at the primary health care level. *World Health.* 2007;
109. Yoon KH, Cho DC, Yu SH, Kim KT, Jeon Y, Sung JK. The change of bone metabolism in ovariectomized rats: Analyses of MicroCT scan and biochemical markers of bone turnover. *J Korean Neurosurg Soc.* 2012;51(6).
110. Banu J. *The Ovariectomized Mice and Rats.* In: *Osteoporosis Research.* Springer London; 2011. p. 101–14.

