



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

Facultad de Odontología

División de Estudios de Posgrado e Investigación

Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados

Campo de conocimiento: Área Clínica

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

TESIS

que para optar por el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

Presenta:

Fabiola Salgado Chavarría

Tutor:

Dr. Higinio Arzate
Facultad de Odontología

Miembros del Comité Tutor:

Dra. Aída Borges Yáñez

Facultad de Odontología

Dra. Patricia Clark Peralta

Hospital Infantil Federico Gómez

México CDMX a 1 de septiembre de 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Mi más sensible y humilde agradecimiento para mi tutor, el Dr. Higinio Arzate, director de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas de la Dra. Aída Borges Yáñez, con la que me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza depositada en mí.

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a la Dra. Janet Serrano Bello y al Dr. Luis Alberto Medina, del Instituto Nacional de Cancerología, Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular micro PET, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, UNAM.

Agradezco también la ayuda recibida del Dr. Carlos Álvarez Gayoso del Laboratorio de Materiales Dentales de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, UNAM.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros del Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados: Rita, Paola, Rodrigo, Mikado y Kevin. Gracias a Lía, Gonzalo y Enrique que desinteresadamente se ofrecieron a ayudarme; sin ellos, esta investigación no hubiera sido la misma.

También quiero dar las gracias al Sr. Juan Manuel Trejo, por ser un gran colaborador y brindarme todo el apoyo para el bienestar de los animales.

Un especial agradecimiento al Consejo de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

Dedicatoria

Un agradecimiento muy especial a toda mi familia y amigos por la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos.

A todos ellos, gracias infinitas.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo ilimitado que me otorgaron, el cariño y el amor que me inspiraron: Yolanda, Rosendo, Isys, Raziel y Pepito, que de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos; que a pesar de la distancia, mi ansiedad, desesperación y casi mi claudicación, siempre estuvieron a mi lado para saber cómo iba mi proceso y darme todo el apoyo y el impulso necesarios para seguir adelante. Las palabras nunca serán suficientes para testimoniar mi aprecio y mi agradecimiento. **Chasales: ¡los amo infinitamente!**

Gracias a los amigos que me han acompañado por mucho tiempo, a los que son familia por elección, a los que he robado horas de compañía. Disculpenme por mi acelere y por lo ausente que he estado debido a las largas horas de trabajo en mi proyecto.

Gracias Feri por amarme como lo haces: por darme soluciones y no problemas, seguridad y no temor, confianza y no más dudas. Gracias por tu generosidad, complacencia y responsabilidad. Te amo Gompi.



Y por último y con todo mi amor, gracias a los míos: Yolanda Ramírez y Mónica Chavarría por permanecer a mi lado y sin condiciones durante todos estos años de arduo trabajo.

Gracias a los que vienen y a los que ya no están.

"La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad"

Julio Verne

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	5
Resumen/ Abstract	6
Introducción	8
Antecedentes	12
• Osteoporosis	
• Modelo animal experimental	
• Proteínas cemento-específicas	
• Péptidos derivados de las proteínas	
Definición del problema	39
Justificación	39
Hipótesis	40
Objetivos	40
Métodología	41
Resultados	50
Discusión	80
Conclusiones	88
Referencias bibliográficas	89
Anexos	97

Lista de abreviaturas

aa	Aminoácido
ALP	Fosfatasa alcalina (ALP, <i>Alkaline phosphatase</i>)
BALP	Fosfatasa alcalina específica de hueso (BALP, <i>Bone specific alkaline phosphatase</i>)
BMD	Densidad minera ósea (BMD, <i>bone mineral density</i>)
BSP	Sialoproteína ósea (BSP, <i>bone sialoprotein</i>)
CAP	Proteína de adhesión del cemento radicular (CAP, <i>cementum attachment protein</i>)
CBFA1	Subunidad alfa-1 del factor de unión al núcleo [<i>core-binding factor subunit alpha-1</i> (CBF-alpha-1), también conocido como RUNX2 (<i>Runt-related transcription factor 2</i>)]
CEMP1	Proteína del cemento 1 (CEMP1, <i>cementum protein-1</i>)
Col 1	Colágena 1
DE	Desviación estándar
DMO	Densidad minera ósea (BMD, <i>bone mineral density</i>)
DXA	Absorciometría dual de rayos X
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, <i>Food and Drug Administration</i>)
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
LP	Ligamento periodontal
NOF	Fundación Nacional de Osteoporosis (NOF, <i>National Osteoporosis Foundation</i>)
OB	Osteoblastos
OC	Osteoclastos
OCN	Osteocalcina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONM	Osteonecrosis de la mandíbula (ONM, <i>osteonecrosis of the jaw</i>)
OPG	Osteoprotegerina (OPG, <i>osteoprotegerin</i>)
OS	Osteoporosis
OVX	Ovariectomizada, ovariectomía
pCEMP1	Péptido derivado de la proteína del cemento 1
pHACD1/CAP	Péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular
pI	Punto isoeléctrico
RANK	Receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK, <i>receptor activator of nuclear factor kappa B</i>)
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL, <i>receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i>)
SD	Desviación estándar (SD, <i>standard deviation</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido
BMU	Unidad básica multicelulares (BMU, <i>basic multicellular units</i>)
VOI	Volumen de interés
μTC	Microtomógrafo

RESUMEN

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

Introducción: la osteoporosis es una enfermedad sistémica del esqueleto, caracterizada por baja densidad ósea y deterioro de la microarquitectura ósea, que incrementa la susceptibilidad a fracturas. Existen múltiples tratamientos que incrementan la densidad mineral ósea, sin embargo presentan efectos colaterales. Recientemente se ha demostrado que las proteínas del cemento HACD1/CAP (proteína de adhesión del cemento radicular) y CEMP1 (proteína del cemento 1) poseen alta afinidad por la hidroxiapatita y promueven el proceso de mineralización *in vitro* e *in vivo*, es posible que péptidos derivados de estas podrían utilizarse para el tratamiento de osteoporosis.

Objetivo: Determinar si los péptidos sintéticos pCAP y pCEMP1 actúan en la corrección del estado osteoporótico (aumento de la densidad mineral ósea, recuperación de la microarquitectura ósea) en un modelo murino.

Metodología: estudio experimental. Se conformaron 5 grupos, cada uno constituido por 5 animales: Grupo 1. pCAP 20 µg/día, Grupo 2. pCEMP1 40 µg/día, Grupo 3. pCEMP1 80 µg/día, Grupo 4. Osteoporosis sin tratamiento, Grupo 5. Ratas no osteoporóticas.

Resultados: Los resultados indican que la resistencia mecánica a las fuerzas de compresión de la 5^{ta} vértebra lumbar, reflejaron que la carga máxima antes del punto de fractura es similar en las ratas tratadas con los péptidos en comparación con los animales sanos. En relación a la densidad mineral ósea (DMO), el espesor, número y grosor trabecular de la vértebra lumbar y del fémur aumentó en los grupos experimentales. Los ensayos de proliferación celular y citotoxicidad demostraron que los péptidos no son citotóxicos y promueven la proliferación celular. Los marcadores biológicos (ALP, OC, RANK1 y OPG) muestran valores similares a los animales no osteoporóticos. Los análisis histológicos muestran que en los grupos tratados con los péptidos hay neoformación de trabéculas óseas y tejidos sin calcificaciones ectópicos.

Conclusiones: Los péptidos muestran efectividad terapéutica para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo experimental.

Apoyado por DGAPA-UNAM IT200414, CONACyT 224081.

Abstract

Development of the preclinical phase of peptidic drugs derived from cementum protein 1 (CEMP1) and cementum attachment protein (HACD1/CAP) and its potential effectiveness for the treatment of osteoporosis.

Introduction: Osteoporosis is a systemic skeletal disease characterized by low bone density and deterioration of bone microarchitecture, which increases susceptibility to fractures. There are multiple treatments that increase bone mineral density, however, have side effects. Recently it has been shown that cement proteins HACD1/CAP (cementum attachment protein) and CEMP1 (cementum protein 1) have high affinity for hydroxyapatite and promote mineralization *in vitro* and *in vivo* therefore cementum proteins-derived peptides could be used to treat osteoporosis.

Objective: To determine whether the synthetic peptides pCAP and pCEMP1 can correct the osteoporotic state (by increasing bone mineral density and recovery of bone microarchitecture) in an osteoporosis murine model.

Methodology: experimental study. 5 groups were created, 5 animals each: Group 1. pCAP 20 µg/day, Group 2. pCEMP1 40 µg/day, Group 3. pCEMP1 80 µg/day, Group 4. Osteoporotic untreated rats, Group 5. not osteoporotic rats.

Results: The results indicate that mechanical compression forces of the 5th lumbar vertebra, have similar values in those treated with the peptides and compared with non-osteoporotic animals. Regarding bone mineral density (BMD), the trabecular number and thickness of the lumbar vertebrae and femur increased in the experimental groups. Cell proliferation assays and cytotoxicity demonstrated that peptides are not cytotoxic and promote cell proliferation. Biological markers (ALP, OCN, RANK1 and OPG) show similar values to the non-osteoporotic animals. Histological analyzes show that in the groups treated with the peptides there is bone neoformation in trabeculae and there is no ectopic bone formation.

Conclusions: Peptides from cementum proteins show high potential therapeutic effectiveness for the treatment osteoporosis in an experimental model.

Supported by DGAPA-UNAM IT200414, CONACyT 224081.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es un problema grave de salud pública debido a que sus resultados son potencialmente devastadores. En los últimos diez años se tienen registrados enormes avances en su epidemiología, fisiopatología y tratamiento. 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 tanto, susceptibilidad a fracturas. Alrededor del 50% de las mujeres y el 20% de los hombres mayores de 50 años tendrán alguna fractura por fragilidad ósea (2). Condiciones fisiológicas como la menopausia o patológicas como las metástasis óseas o la artritis reumatoide, conducen a que la cantidad de hueso eliminado por los osteoclastos, supere al remplazado durante el proceso de formación ósea por los osteoblastos: esta situación conduce a la pérdida neta de la masa ósea e incremento de la fragilidad (1-3).

Algunas alternativas terapéuticas actuales para el tratamiento de la osteoporosis (las cuales sólo tienen como objetivo mejorar la calidad mineral ósea), disminuyen el riesgo de fracturas osteoporóticas, reduciendo la resorción ósea y preservando su arquitectura, pero no estimulan la formación ósea; aún así, éstas presentan múltiples consecuencias deletéreas para la salud: los estrógenos más progesterona reducen significativamente las fracturas vertebrales, de cadera, antebrazo y muñeca (3), sin embargo, los efectos colaterales incluyen el riesgo de desarrollar cáncer de mama, tromboembolia venosa, enfermedad de arterias coronarias e infarto; el raloxifene, sus efectos colaterales incluyen el riesgo de tromboembolismo venoso y bochornos; la calcitonina: irritación nasal ocasional y sangrado; los biofosfonatos: irritación gastrointestinal, dolor músculo-esquelético y osteonecrosis del maxilar y mandíbula; teriparatida: hipercalcemia, calambres en las piernas, mareo y asociación con osteosarcomas; denosumab: osteonecrosis de la mandíbula; proteínas morfogénicas (BMPs): las dos principales vías de administración, la ingestión oral y la aplicación tópica, no logran que las proteínas lleguen al hueso, las BMPs tienden a romperse antes de llegar al tejido óseo, además de que se ha visto que al ser solubles en agua, difunden muy rápido en todos los fluidos del cuerpo; proteínas morfogénicas recombinantes humanas (rhBMPs): su uso en la práctica clínica no solamente es costoso, sino que también se asocia a efectos adversos tales como el sobrecrecimiento óseo y las reacciones inmunológicas del huésped. Luego entonces, elucidar los mecanismos que regulan la formación ósea, pueden conducir al desarrollo de terapéuticas capaces de reconstituir la masa ósea y su arquitectura, empero por ahora, se ve la necesidad de contar con más opciones terapéuticas con las cuales se puedan tener mejores resultados para tratar esta enfermedad (4).

En los últimos años algunos notables progresos en biología molecular y genética han conducido al mejor entendimiento de los complejos procesos que regulan el metabolismo óseo y de las señales e interacciones que se establecen para ello; esto ha permitido abrir un interesante camino en la investigación de nuevos tratamientos contra la osteoporosis (4). Sin embargo, algunas técnicas utilizadas en dichas ramas de la biología, como por ejemplo, las proteínas recombinantes, presentan grandes desventajas como: la complejidad del equipo, así como las técnicas de preparación, ciclos de producción largos, rendimientos bajos y procesos costosos, lo que las hace difícil de producir a gran escala. Las principales diferencias de los biofármacos producidos por métodos de expresión genética recombinante con relación a los producidos mediante síntesis química, consisten en el mayor tamaño molecular y en la complejidad de su estructura molecular; por su naturaleza, presentan una biodisponibilidad oral escasa, no superando el 1% la mayor parte de las veces. Esto es debido principalmente por la gran actividad enzimática que existe en el tubo digestivo, donde se produce un elevado metabolismo de péptidos y proteínas, y por otro lado, por la función-barrera frente a la absorción de estas moléculas en la pared intestinal. Asimismo, la distribución tisular es compleja,

estando expuestas continuamente a la degradación por la acción de las enzimas proteolíticas presentes en la sangre; en general, la vida media suele ser pequeña, motivo por el cual la estructura proteica de algunos biofármacos se une a polímeros (polietilenglicol-PEG) para evitar una rápida excreción renal. En adición a esto, existen problemas de seguridad de los productos como resultado de la ingeniería genética, muchos biofármacos son capaces de provocar la generación de anticuerpos neutralizantes, lo que podría reducir o incluso anular sus efectos sobre sus dianas farmacológicas. La mayoría de los biofármacos han sido calificados como medicamentos hospitalarios, tal condición viene determinada por la necesidad de realizar una estrecha monitorización en los pacientes durante o tras la administración; en otros casos tal justificación resulta cuestionable, habida cuenta de que algunos de estos medicamentos están específicamente acondicionados para la autoadministración por el paciente (5). A la fecha no existen fármacos que llenen los requerimientos de un material sin efectos colaterales y que sean utilizados en el tratamiento de la osteoporosis. Es de suma importancia indicar que existen biomateriales capaces de conducir los fenotipos celulares específicos esenciales para el correcto desarrollo, la homeostasis, la reparación, y el potencial de regeneración de los tejidos, sin embargo, estos presentan un alto grado de complejidad, procesos moleculares coordinados, y de interacciones dinámicas entre células y tejidos.

La osteoporosis es una entidad patológica que no puede ser curada en corto término, ya que requiere la administración de drogas por un periodo largo de tiempo (6). De acuerdo a esto, es necesario un biofármaco distinto que no muestre ninguno de los efectos colaterales anteriormente mencionados y que sea terapéuticamente efectivo para el reemplazo de las drogas convencionales, que sea de fácil síntesis y finalmente que sea económicamente accesible a la población para la atención de este problema de la salud pública mundial.

El periodonto es una unidad biofuncional compleja, conformada por dos tejidos blandos: encía y ligamento periodontal; y dos tejidos duros: hueso y cemento. El cemento radicular es un tejido mineralizado especializado, formado por cementoblastos y se localiza en la superficie radicular de los dientes. Este tejido mineralizado tiene características similares al hueso en cuanto a su composición orgánica e inorgánica, sin embargo, el cemento posee características únicas, ya que no presenta aporte sanguíneo directo, inervación, ni drenaje linfático, y recientemente se han identificado dos proteínas específicas de este tejido, la proteína de adhesión del cemento [CAP] (7-10) y la proteína del cemento 1 [CEMP1] (7, 11).

CEMP1 es una proteína de 247 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 25.9 kDa, la cual fue aislada inicialmente a partir de una biblioteca derivada de cementoblastos putativos (células derivadas del cultivo de un cementoblastoma humano) cultivados *in vitro* (11). Su expresión tanto a nivel de ARNm como de proteína, se limita a cementoblastos, cementocitos a subpoblaciones de células derivadas del ligamento periodontal con una localización paravasculares y en los espacios endosteales del hueso alveolar cercanos al ligamento periodontal (12). A la fecha, los análisis *in silico* no han demostrado que esta proteína tenga homología significativa en su secuencia de aminoácidos con ninguna otra proteína en las bases de datos. También se demostró que la transfección con el gen de CEMP1 y la sobreexpresión de ésta proteína en células con un fenotipo no mineralizante (fibroblastos gingivales humanos adultos) dio como resultado la diferenciación de dichas células hacia un fenotipo mineralizante (12). Por otra parte, CEMP1 estimula la proliferación de células del ligamento periodontal en cultivos tridimensionales e induce la formación de estructuras semejantes a tejidos mineralizados como hueso y/o cemento radicular y tejido similar a cartílago (13). Finalmente el uso terapéutico de CEMP1 ha sido probado en la regeneración de defectos de tamaño crítico en ratas Wistar, teniendo un 97% de regeneración del defecto óseo (11, 14).

CAP fue la primera proteína aislada del cemento radicular, se ha determinado que participa en el reclutamiento y la diferenciación celular durante la formación del cemento (15-17). Se expresa en células del folículo dental, promoviendo su adhesión y diferenciación (9, 15, 18). Además, las células periodontales crecidas en presencia de CAP son capaces de formar un tejido mineralizado, *in vitro* (15,

19). Recientemente se informó de la identificación de un ARNm obtenido de lisados de células del ligamento periodontal y células derivadas del cemento utilizando un anticuerpo específico para CAP (9, 15, 18). Este ARNm codifica un polipéptido de 140 aminoácidos. El análisis BLAST de la base de datos de proteínas NCBI reveló que la N-terminal de 125 aminoácidos de este ARNm es idéntica a una isoforma truncada de 3-hidroxiacil-CoA deshidratasa 1/proteína tirosina-fosfatasa; siendo los últimos 15 aminoácidos la diferencia entre ambas isoformas (19). Esta nueva molécula fue nombrada HACD1/CAP, la cual se expresa en cementoblastos y algunas poblaciones de células del ligamento periodontal (precursores probablemente de cementoblastos) pero no se detecta en otros tejidos como la encía o el hueso (9, 19). En un estudio experimental, en un defecto segmental en la tibia de tamaño crítico en conejos Nueva Zelanda, HACD1/CAP mostró su potencial en la regeneración ósea (20), probablemente por la inducción de la neovascularización y el posterior reclutamiento de células troncales mesenquimales, ya que se ha demostrado que la proteína se expresa por células troncales paravasculares en el ligamento periodontal, las cuales son progenitoras de los osteoblastos y cementoblastos (9, 18, 19).

Las proteínas y péptidos juegan un papel crítico en los procesos biológicos y fisiológicos en todos los organismos vivos. Los péptidos son pequeñas secuencias de aminoácidos que pueden cumplir funciones como estimular, regular o inhibir numerosas funciones biológicas (19). En la naturaleza no existen muchas proteínas que promuevan la nucleación de cristales de hidroxiapatita y mucho menos existen péptidos. Lo cual es de suma importancia y por esto inferimos que pueden tener un importante papel terapéutico en el tratamiento de diversas afecciones de los tejidos mineralizados. Nosotros seleccionamos estos péptidos porque imitan las funciones de las proteínas nativas y su uso terapéutico (intervención de actividades celulares específicas) nos permiten tener rutas alternativas para el control de enfermedades óseas. En lo correspondiente a nuestra línea de investigación, en estudios previos se ha demostrado que los péptidos en cuestión [péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (pHACD1/CAP) y el péptido derivado de la proteína del cemento 1 (pCEMP1)] inducen la neoformación ósea, lo cual mejora el índice clínico de efectividad, así como el impacto positivo en el costo de los tratamientos, poseen una actividad biológica inductora de la diferenciación osteoblástica y de biomineralización, por lo tanto se trata de péptidos útiles para el tratamiento de la osteoporosis. Sin embargo, la evolución de los péptidos en biomateriales no puede simplemente basarse en los avances en la química de péptidos y de su diseño, sino que también deberán ser utilizados clínicamente (experimentalmente) para su mejor comprensión (21).

De acuerdo a la FDA, la ovariectomía bilateral es un modelo animal preclínico excelente que imita las características clínicas de la depleción del estrógeno en los humanos y la respuesta a agentes terapéuticos (22); también imita las condiciones de la menopausia: pérdida de hueso esponjoso y endocortical aumentando la tasa global de remodelación ósea y alterando el equilibrio entre la formación ósea y la resorción ósea.

El modelo murino presenta su madurez sexual a los 2.5 meses, y uno de sus indicadores de pérdida ósea es el agrandamiento de la cavidad medular (resorción endosteal). La pérdida ósea postovariectomía en las vértebras lumbares comienza a los 60 días y en la cabeza femoral a los 30 días, motivo por el cual, nosotros iniciamos los tratamientos al cuarto mes postquirúrgico.

El esqueleto de una rata madura, tiene muchas similitudes con el esqueleto humano: los huesos de ambas especies se elongan por crecimiento epifisial (osificación endocondral) y el área se incrementa por crecimiento periosteal (osificación intramembranosa secundaria). El crecimiento radial crece a tasas muy lentas como en los humanos; también, el remodelado de las trabéculas es similar al observado en los humanos (23).

Una de las grandes diferencias esqueléticas entre estas especies, es que la rata tiene falta de remodelación de Havers [debido a que tiene poca cantidad de Sistema de Havers (intracortical)]. En el humano, el aumento de la remodelación de Havers es la principal causa de la porosidad ósea. En la rata, la ganancia ósea cortical se produce en el periostio y el hueso cortical se pierde en el endostio. También cabe destacar que el espesor trabecular y la separación en los murinos, son aproximadamente tres veces menores que en los seres humanos (23).

Existen otros modelos más apropiados para el estudio del modelado de Havers: perros (inapropiado para el estudio y tratamiento de la OS, alto costo de mantenimiento, dilemas éticos) y primates (alto costo de adquisición y mantenimiento, menor disponibilidad en centros experimentales y dilemas éticos), sin embargo las pérdidas de hueso endocortical y esponjoso son las causas primarias de la OS, mientras que la pérdida ósea inducida por el remodelado intracortical en el sistema de Havers desempeña un papel menor. Luego entonces, una de las grandes ventajas que ofrece el modelo de ovariectomía en ratas, es que debido a la disminución de la masa ósea que ocurre en la osteoporosis postmenopáusica, proporciona una información confiable para predecir la eficacia de los agentes antiosteoporóticos (24). También existen otros modelos animales como: primates (macacos), ovejas, perros y conejos, no obstante, presentan más complejidad en su estudio (25).

Los sitios más comunes de las fracturas por OS incluyen la vértebra y cadera (cuello femoral), donde la información microestructural es una clave para el entendimiento de la patogénesis y la predilección de la mejoría del riesgo de fractura (24). La arquitectura trabecular da información adicional a la DMO, los efectos de agentes terapéuticos son más grandes en la arquitectura trabecular en comparación a los resultados de la DMO.

La medición de la DMO es por DEXA (*gold standard*), pero la μ TC puede usarse para monitorizar o medir la microarquitectura y la DMO en los animales de pequeñas especies (26). El método estándar para describir cuantitativamente la arquitectura del hueso es el cálculo de los índices morfométricos (morfometría cuantitativa); antes por métodos estereológicos. Actualmente, el cálculo de los índices morfométricos: grosor (Tb.Th), separación (Tb.Sp) y número trabecular (Tb.N) se correlacionan por medio de algoritmos 3D, independientes del modelo para calcular la microarquitectura. Estos índices se derivan de conteo preciso de voxeles (voxel: unidad del volumen del escáner, el cual es el resultado de la reconstrucción tomográfica; es un volumen 3D que representa a las 2D de la imagen). La μ CT no sólo se usa principalmente para generar información sobre la estructura ósea, sino también se usa para estimar la DMO. La cual se calcula a partir del coeficiente de atenuación del tejido óseo (mgHA/cm^3); tanto la cantidad de tejido mineralizado como el grado de mineralización varían entre los huesos, el genotipo o los tiempos de crecimiento y envejecimiento, y lo visto en nuestros resultados, la μ CT proporciona un medio para incorporar una medida de mineralización en un diseño de estudio rápido y no destructivo en comparación con los métodos tradicionales de evaluación (27-29), por lo tanto, la μ TC puede mejorar el diagnóstico de OS y ya se puede considerar el *gold standard* entre otras técnicas imagenológicas, debido a que ya se ha reportado en estudios longitudinales *in vivo* que reducen el número de animales requeridos e incrementa el poder estadístico para detectar cambios en la arquitectura ósea (30).

Considerando lo anterior, el presente estudio muestra evidencia científica sobre el efecto de la utilización del péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (pHACD1/CAP) y del péptido derivado de la proteína del cemento 1 (pCEMP1), ya que promueven el incremento en la densidad mineral ósea, la restauración de la microarquitectura ósea, así como el restablecimiento de las propiedades físico-mecánicas y biológicas del hueso en ratas Wistar ovariectomizadas que cursaron con osteoporosis y que fueron tratadas con ambos péptidos. Finalmente, el uso terapéutico de ambos péptidos ha probado que participa en la regeneración ósea local y sistémica, lo cual abre una posibilidad de que el pCAP y PCEMP1 tengan un potencial de ser utilizados como biofármacos para el tratamiento de la osteoporosis.

ANTECEDENTES

OSTEOPOROSIS

La osteoporosis (OS) es la enfermedad ósea más común en los seres humanos, la cual representa una amenaza médica y socioeconómica emergente, lo que simboliza un importante problema de salud pública (31). Se caracteriza por una disminución sistémica de la masa ósea, deterioro del tejido óseo, alteración de la microarquitectura del hueso y resistencia ósea comprometida, lo que aumenta la propensión de las fracturas por fragilidad (6).

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 sólo 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 la de las mujeres adultas premenopáusicas sanas, el T-score. 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" (5). 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 media 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 media de DMO normal de la población adulta joven del mismo sexo, estudiada por DXA (absorciometría dual de rayos X) (5).

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 la fractura al igual que la hipertensión es para el accidente cerebrovascular. El riesgo de fracturas 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 (6).

La osteoporosis ha sido clasificada tradicionalmente como primaria o secundaria. La OS **primaria** ocurre como resultado de las causas y consecuencias de la condición fisiológica: envejecimiento (senescencia) y la osteoporosis **secundaria** se desarrolla como consecuencia de los principales efectos fisiopatológicos sobre los huesos del esqueleto de numerosos trastornos y enfermedades de otros órganos y tejidos del cuerpo.

Epidemiología

La osteoporosis afecta a un gran número de personas, de ambos sexos y de todas las razas, y su prevalencia aumentará a medida que la población envejece. Con base en datos de la Encuesta III-*National Health and Nutrition Examination* (NHANES III), la Fundación Nacional de Osteoporosis en los Estados Unidos de Norteamérica (NOF, *National Osteoporosis Foundation*), ha estimado que más de 9.9 millones de estadounidenses padecen osteoporosis y 43.1 millones tienen baja densidad ósea (32).

Aproximadamente una de cada dos mujeres caucásicas experimentarán una fractura relacionada con la osteoporosis en algún momento de su vida, al igual que aproximadamente uno de cada cinco hombres (31). Aunque la osteoporosis es menos frecuente en los afroamericanos, las personas con osteoporosis tienen el mismo riesgo de fractura que los caucásicos.

Más de 200 millones de personas en el mundo se ven afectadas por la osteoporosis, de las cuales la mayoría son mujeres (33). De igual forma la osteoporosis está asociada con una significativa morbilidad,

mortalidad y con una agobiante carga económica para quien cursa con esta enfermedad. La pérdida de hueso es más abrupta durante la primera década después del establecimiento de la menopausia. Las expectativas a este respecto no son promisorias ya que se espera que el 50% de mujeres y el 20% de hombres presenten una fractura en su lapso de vida (34).

Las proyecciones actuales revelan un crecimiento sostenido en la población mundial, la cual se estima que aumentará de 7.5 mil millones a 10.5 mil millones para el año 2050. Lo más importante es que, con la excepción de algunos países, se registra un aumento de la población de personas de edad avanzada en cada región. El mundo nunca antes había tenido una población anciana de esta magnitud. Se estima que el cambio demográfico continuará en el siglo XXI, con implicancias que serán trascendentales para la sociedad y los sistemas de salud en todo el mundo. Para la región de América Latina el acceso al diagnóstico está restringido y el acceso a la atención médica es altamente variable, en especial, en entornos urbanos en comparación con entornos rurales. La falta extrema de datos confiables sobre fracturas epidemiológicas es un obstáculo importante para evaluar la dimensión del problema y, por lo tanto, limita gravemente la capacidad de los expertos nacionales de ejercer presión con el fin de lograr un cambio de política que llevaría a una mejora en los servicios de diagnóstico y atención médica de un paciente con osteoporosis (35).

De acuerdo a la OMS, la población de más de 65 años aumentará significativamente en los próximos 50 años en América Latina y la cantidad de fracturas de cadera será similar a las cifras actuales de EE.UU. y Europa (35). Se ha calculado que en el año 2050 se producirán 6.3 millones de fracturas por año en todo el mundo y más de la mitad ocurrirá en América Latina y Asia (36).

La osteoporosis se desarrolla menos frecuentemente en hombres que en mujeres, debido a que la pérdida ósea comienza más tarde y progresa más lentamente porque no experimentan un periodo de cambios hormonales rápidos ni la subsecuente pérdida ósea acelerada; otro factor que disminuye la incidencia de fracturas en los hombres son la geometría y su remodelado óseo. La edad es un factor de riesgo independiente para las fracturas, por cada década de vida en las mujeres postmenopáusicas se incrementa 2 veces el riesgo de fractura, asimismo, el uso continuo e intermitente de altas dosis de esteroides, también incrementa el riesgo de fractura. La combinación de factores de riesgo y la determinación de la densidad mineral ósea mejora las posibilidades para predecir las fracturas. Los factores de riesgo para mujeres menopáusicas son predictivos de fractura y estos son independientes de la densidad mineral ósea.

México y OS

Al igual que las tendencias en otras regiones del mundo, la dinámica demográfica de México cambió y su población está envejeciendo. Si bien el proceso de envejecimiento ocurrió en un lapso de dos siglos en países industrializados y desarrollados, está sucediendo muy rápido en México. La expectativa de vida al nacimiento aumentó casi 39 años en promedio en las últimas siete décadas (de 36,2 a 75 años). La población del segmento etario de 60 años y más, que actualmente asciende a 10,7 millones, aumentará a 36,4 millones en 2050. En ese momento, la expectativa de vida promedio de México será de 82 años (37). Dado que las fracturas osteoporóticas y por fragilidad son enfermedades asociadas con el envejecimiento, se espera que su incidencia crezca de manera acorde.

Estadísticas de crecimiento demográfico. Se calcula que la población actual de México es de 113 millones de habitantes. De los cuales, el 18% (20 millones) está representado por personas de 50 años o más y el 4.3% (5 millones) por personas de 70 años o más. Para el año 2050, se estima que el 37% (55 millones) de la población superará los 50 años y el 14% (20 millones) tendrá 70 años o más, mientras que la población total alcanzará 148 millones (37).

Epidemiología. Existen datos bibliográficos recientes con respecto a la cantidad de individuos con un diagnóstico de osteoporosis y osteopenia detectado por densitometría ósea central de acuerdo con los criterios de clasificación de la Organización Mundial de la Salud. El primer estudio se realizó en tres zonas geográficas diferentes de México. Delezé y otros compararon la densidad mineral ósea femoral y de la columna lumbar de 4,460 mujeres entre 20 y 69 años de zonas urbanas (38). Los autores descubrieron una variación significativa de la densidad mineral ósea en diferentes regiones de México. Las mujeres del norte tenían una densidad mineral ósea más alta en la columna lumbar que las mujeres del centro o sur, pero eran significativamente más corpulentas y altas que las mujeres del centro o sur. Los autores concluyeron que las diferencias regionales en la densidad mineral ósea variaban significativamente según la región de la población estudiada.

El segundo estudio se basó en mujeres mexicanas y el estudio de la prevalencia de fractura vertebral en hombres. Se invitó a que esta muestra aleatoria de 807 hombres y mujeres se realizaran una densitometría ósea de la columna lumbar y el fémur. Los resultados en la columna lumbar revelaron que el 9% y el 17% de hombres y mujeres respectivamente tenían osteoporosis y que el 30% y el 43% de hombres y mujeres tenían osteopenia respectivamente. Los resultados totales del fémur revelaron que el 6% de hombres y el 16% de mujeres tenían osteoporosis y el 56% de hombres y el 41% de mujeres tenían osteopenia (39).

Los casos de fractura de cadera registrados en el año 2000 se recabaron en todos los hospitales de atención terciaria más importantes de los dos principales sistemas de salud de la ciudad de México: el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y la Secretaría de Salud (SS). En todos los casos, los diagnósticos fueron validados a través de la revisión de casos. 169 mujeres y 98 hombres de cada 100,000 individuos sufren fracturas de cadera todos los años y estas cifras aumentan en forma exponencial con la edad en ambos sexos. En México, el riesgo de sufrir una fractura de cadera a los 50 años fue de 8.5% en las mujeres y el 3.8% en los hombres. En otras palabras, **una de cada 12 mujeres y uno de cada 20 hombres mayores de 50 años sufrirán una fractura de cadera en la edad adulta.**

Según la clasificación efectuada por Maggi y colaboradores, México presenta una tasa intermedia de fracturas de cadera en comparación con otros países; las tasas más altas se registran en Suecia o en Whites, Olmsted, EE.UU. y las tasas más bajas en China continental y Turquía (40). Un informe recientemente publicado demuestra que las tasas de fracturas de cadera específicas por edad y sexo entre 2000 y 2006 tanto para hombres como para mujeres aumentaron en un 1% por año; este mismo informe incluye las proyecciones hasta el año 2050 donde los cambios demográficos estimados para México indican que la cantidad anual de fracturas de cadera aumentará de 29,3732 en 2005 a 155,874 (estimado) en 2050. Si la incidencia específica relacionada con la edad de las fracturas de cadera continúa en aumento, la cantidad de **fracturas de cadera se incrementaría en un 46%** adicional. El costo total directo de las fracturas de cadera estimado para 2006 según la incidencia anual proyectada de las fracturas de cadera en México superó levemente los USD 97 millones. Éste cálculo se basó en la existencia de casi 22,000 casos de fracturas de cadera, con un costo individual por evento de USD 4,365.50 (41). El tiempo de hospitalización promedio por fractura de cadera es diferente en cada institución. El Instituto Mexicano del Seguro Social tiene el promedio más alto con 10,7 días por evento, mientras que la Secretaría de Salud tiene un promedio de 9,3 días y las instituciones privadas consideran 5,2 días (41). Un estudio difundió la prevalencia de las fracturas vertebrales radiográficas mediante morfometría digital en una muestra aleatoria de hombres mexicanos de 50 años o más. Los resultados demostraron que la prevalencia en hombres corresponde a la mitad de la prevalencia en mujeres (9.8%). En ambos sexos, las fracturas aumentaban con la edad. Una de las principales preocupaciones es que las fracturas vertebrales son subestimadas en gran medida. Las bases de datos consultadas incluían salas de emergencia y consultas con especialistas en todos los centros médicos

del país pertenecientes al Instituto Mexicano del Seguro Social. Ninguno de estos centros contaba con informes confiables sobre fracturas vertebrales. Una explicación posible de esta tendencia es que las fracturas vertebrales no son diagnosticadas en ningún nivel de atención médica y probablemente sean informadas como espondiloartrosis o lumbago, por lo cual, se debe prestar especial atención a este tema. El diagnóstico oportuno de las fracturas vertebrales posibilita el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad subyacente y la consecuente prevención de futuras fracturas (42).

Impacto médico

Las fracturas más comunes son las de las vértebras (columna vertebral), fémur proximal (cadera), y el antebrazo distal (muñeca). Sin embargo, la mayoría de las fracturas en los adultos mayores se deben, al menos en parte, a una baja masa ósea, aún cuando sean consecuencia de un traumatismo fuerte. Las fracturas en los adultos mayores de 50 años de edad (en cualquier sitio del esqueleto, exceptuando dedos, cara y cráneo, que están principalmente relacionados con un traumatismo severo en lugar de la fuerza del hueso subyacente), deben ser consideradas como un evento significativo para el diagnóstico de la osteoporosis.

Las fracturas de cadera se asocian con un exceso de mortalidad del 8 al 36% dentro de 1 año, con una mortalidad mayor en hombres que en las mujeres (43); además, las fracturas de cadera se relacionan con un aumento del riesgo de 2.5 veces más de futuras fracturas (44). Aproximadamente el 20% de los pacientes con fractura de cadera requiere de cuidadores profesionales a largo plazo, y sólo el 40% recupera plenamente su nivel de independencia previo a la fractura (31). La mayoría de las fracturas vertebrales inicialmente son silentes, estas fracturas se asocian a menudo con síntomas de dolor, discapacidad, deformidad y mortalidad (45).

Las fracturas vertebrales, ya sea clínicamente aparentes o silenciosas, son los principales predictores de riesgo de futuras fracturas: hasta 5 veces para la fractura vertebral posterior y de 2 a 3 veces mayor de sufrir fracturas en otros sitios.

Las fracturas de muñeca son menos incapacitantes, pero pueden interferir con algunas actividades de la vida diaria tanto como la cadera o fracturas vertebrales. Las fracturas de pelvis y las fracturas de húmero son también comunes y contribuyen al aumento de la morbilidad y la mortalidad. Las fracturas también pueden causar síntomas psicosociales, sobre todo depresión y pérdida de la autoestima, ya que los pacientes deben lidiar con el dolor, limitaciones físicas, estilo de vida y los cambios estéticos.

Costo económico

Se estima que cada año, dos millones de fracturas se atribuyen a la osteoporosis, causando más de 432,000 ingresos hospitalarios, 2.5 millones de consultas médicas, y alrededor de 180,000 admisiones a hogares de ancianos en los EE.UU. (31). El programa *Medicare* paga el 80% de esas fracturas, y el 72% de los costes de esas fracturas son las de cadera. Debido en parte al envejecimiento de la población, se espera que el costo de la atención en el 2025 será de \$ 25.3 millones (46). A pesar de la disponibilidad de los tratamientos para reducir el riesgo de fractura, sólo el 23% de las mujeres de 67 años o más que tienen una fractura relacionada con la osteoporosis, 6 meses después de la fractura reciben pruebas de densidad ósea o una receta de medicamentos para el tratamiento de la osteoporosis.

Diagnóstico

En la actualidad, no existen pruebas serológicas ni en orina exactas que determinen las anomalías de la osteoporosis. Las técnicas utilizadas actualmente son en general, marcadores bioquímicos, radiográficos y métricos de la densidad mineral ósea. Sin embargo el uso de estas técnicas está limitado por razones de costo y exactitud (47). El diagnóstico de la osteoporosis se establece mediante la medición de la DMO o por la presencia de una fractura de cadera o vértebra en la edad adulta y en ausencia de traumatismo importante (como un accidente automovilístico o historia de caídas múltiples). Las pruebas de laboratorio están indicadas para excluir causas secundarias de osteoporosis (31).

Medición de la DMO y clasificación

La tecnología utilizada para establecer o confirmar el diagnóstico de la osteoporosis es la medición DXA (absorciometría dual de rayos x) de la cadera o la vértebra; también sirve para predecir el futuro del riesgo de fractura y controlar/seguimiento a los pacientes. La DMO del área se expresa en términos absolutos de gramos de mineral por centímetro cuadrado escaneado (g/cm^2) y en una relación de dos normas: en comparación con la densidad mineral ósea de una población de la misma edad, sexo, origen étnico (Z-score) o en comparación con una población de referencia para jóvenes y adultos del mismo sexo (T-score). La diferencia entre la densidad mineral ósea del paciente y la DMO media de la población de referencia, dividido por la desviación estándar (DE) de la población de referencia, se utiliza para calcular el T-score y Z-score (ver Tabla 1). La masa ósea máxima se alcanza en la edad adulta temprana, seguido de una disminución de la DMO. La tasa de pérdida ósea se acelera en las mujeres en la menopausia y continúa progresando a un ritmo más lento en las mujeres postmenopáusicas mayores y en hombres de edad avanzada.

La DMO de un individuo se presenta como la desviación estándar por encima o por debajo de la DMO media de la población de referencia.

Tabla 1. Definición de las OMS de la osteoporosis por DMO		
Clasificación	DMO	T-score
Normal	Un valor de DMO que está dentro de 1 DE del nivel medio para una población de referencia para jóvenes y adultos	T-score hasta -1
Baja masa ósea (osteopenia)	Entre 1 y 2.5 DE debajo del nivel medio para una población de referencia para adultos jóvenes	T-score entre -1 y -2.5
Osteoporosis (preclínica)	2.5 DE o más por debajo del nivel medio para una población de referencia para adultos jóvenes	T-score inferior -2.5
Osteoporosis establecida o severa	2.5 DE o más por debajo del nivel medio para una población de referencia para adultos jóvenes con fracturas	T-score inferior -2.5 con una o más fracturas
Nomenclatura: DXA: en lugar de la DEXA T-score: en lugar de T score, t-score o t score Z-score: en lugar de Z score, z-score, o z score		

La prueba de DMO se correlaciona con la fuerza del hueso y es un excelente predictor del riesgo de fractura. En lugar de un umbral específico, se aumenta el riesgo de fractura exponencialmente a medida que disminuye la densidad mineral ósea. Aunque existen tecnologías de medición central (columna lumbar y cadera) y otros sitios esqueléticos periféricos (antebrazo, talón, dedos), la medición DXA en la cadera es el mejor predictor de riesgo futuro de fractura (la cantidad de exposición de radiación es mínima). En las mujeres posmenopáusicas y hombres mayores de 50 años, los criterios de diagnóstico de T-score (normal, baja masa ósea y osteoporosis) se aplican a la medición de la DMO por DXA central en la columna lumbar y cuello femoral (6). En las mujeres premenopáusicas, los hombres menores de 50 años de edad, y los niños, el diagnóstico y clasificación de la OMS, no deberá aplicarse la medición de la DMO. En estos grupos, el diagnóstico de la osteoporosis no debe hacerse sobre la base de criterios densitométricos solamente. La Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (ISCD) recomienda que en lugar de T-score, étnico o puntuaciones Z deben utilizarse Z-score de -2,0 o menos definidos como "densidad mineral ósea baja para la edad cronológica" o "por debajo del rango esperado para la edad" y los de arriba -2.0 ser "dentro del rango esperado para la edad" (6).

La pérdida de las trabéculas horizontales determina el crecimiento en longitud de las trabéculas verticales, por lo tanto, el mantenimiento de las trabéculas horizontales tiene una influencia sobre la

resistencia de las trabéculas verticales; en el estudio que desarrollamos, la neoformación trabecular está correlacionada positivamente con la resistencia y la resiliencia ósea (48).

También es importante destacar que la médula ósea y el hueso presentan una estrecha interdependencia funcional; las modificaciones ocurren a nivel de la médula ósea, con la disminución de la celularidad paralela a un aumento de la adiposidad a nivel medular: el aumento de la adiposidad se produce debido a la disminución de la diferenciación de los pre-osteoblastos a favor de la diferenciación adipocitaria, hay aumento del peso de las células adiposas en la médula ósea y la adiposidad medular está relacionada con la vascularización del hueso. La médula ósea, así como el hueso, depende de un suministro sanguíneo adecuado; en la OS el flujo sanguíneo disminuye en el hueso: los precursores de las células que participarán en el proceso de remodelado se encuentran en la médula ósea y su alteración tiene consecuencias sobre el proceso de remodelación (49). Estos planteamientos son compatibles con nuestros hallazgos, ya que las histologías óseas de las ratas osteoporóticas, se encuentran con esteatosis severa, no así los animales tratados con los péptidos al final del tratamiento (90 días).

Marcadores bioquímicos de recambio óseo

EL hueso es un tejido conectivo especializado que está constituido principalmente de glicoproteínas y proteoglicanos. Las fibras del hueso están compuestas principalmente por colágena tipo I impregnada con mineral de hidroxapatita. La integridad funcional y la fuerza del esqueleto están dadas por el entrecruzamiento de esa estructura. Existen varios factores que pueden estar involucrados en la determinación de la calidad del hueso, incluyendo la densidad ósea y determinantes cualitativos de la resistencia ósea, tales como la tasa de recambio óseo, la extensión de la conectividad trabecular, el tamaño del hueso cortical, periostio y la morfometría esquelética (50).

En los últimos años se han identificado los componentes celulares de la matriz del hueso y clasificado, ya sea como marcadores de formación ósea o resorción y se han desarrollado con una mejor sensibilidad y especificidad (las pruebas son fiables, rápidas, no invasivas y son ensayos rentables). Aunque estos marcadores se han utilizado en la investigación durante mucho tiempo, ahora están siendo reconocidos como herramientas en el manejo clínico de las enfermedades óseas (ver Tabla 2). Los avances tecnológicos han mejorado en gran medida la exactitud y fiabilidad de la medición de los marcadores óseos [aunque todavía hay ensayos que varían significativamente] (51).

Tabla 2. Marcadores bioquímicos de formación y reabsorción en suero y orina	
Marcadores de formación	Marcadores de reabsorción
Osteocalcina sérica (OCN)	Telopéptido C de colágena tipo I sérico (sCTX)
Fosfatasa alcalina total sérica (ALP)	Telopéptido de la terminal carboxilo de colágena tipo I sérico (ICTP)
Fosfatasa alcalina específica de hueso sérica (ALP ósea)	Fosfatasa ácida resistente al tartrato, sérica (TRACP)
Propéptido C-terminal de la procolágena tipo I sérico (P1CP)	Fosfatasa ácida 5b resistente a tartrato, sérica (s-TRACP 5b)
Propéptido N-terminal de la procolágena tipo I sérico (P1NP)	Telopéptido-N de colágena tipo I, urinario (uNTX)
	Telopéptido-C de colágena tipo I, urinario (uCTX)
	Piridolina total urinaria (uPYD)
	Desoxipiridolina total urinaria (uDPD)

El recambio óseo comprende dos etapas: resorción y formación ósea que son llevadas a cabo por el esfuerzo colaborativo y secuencial de un grupo de células que se encuentran dentro de una estructura temporaria denominada "unidad de remodelamiento óseo". La frecuencia con que la superficie ósea se activa, es decir, la frecuencia de activación, determinará el número de sitios de remodelamiento presentes en el hueso, por lo cual, la actividad remodelatoria de todo el esqueleto, puede evaluarse bioquímicamente a través de la medición de los marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo.

Los marcadores de reabsorción ósea son enzimas de las células osteoclasticas, como la isoenzima 5b de la fosfatasa resistente a tartrato (TRACP 5b), o los fragmentos proteolíticos de la matriz de colágena ósea, incluyendo las cadenas de colágena tipo I (piridinolina –PYD- y desoxipiridinolina –DPD-) y los telopéptidos relacionados (NTX y CTX) los cuales pueden ser medidos en orina o suero. El péptido CTX existe como dos formas isoméricas, la forma nativa (α CTX) y la relacionada con la edad (β CTX). Además de estos marcadores, que han sido ampliamente evaluados, también están disponibles los marcadores de reabsorción telopeptido-C de colágena tipo I generado por metaloproteasas de matriz [CTX-MMP o Telopéptido carboxiterminal sérico de colágena tipo I (ICTP)]; aunque su sensibilidad para detectar el incremento de la reabsorción ósea en la osteoporosis posmenopáusica es limitada. Los marcadores de formación de hueso sérico incluyen la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (ALP), el propéptido C y N de la colágena tipo I (P1CP y P1NP, respectivamente) y la osteocalcina total. La osteocalcina sérica también puede ser un predictor de un mayor riesgo de diabetes en mujeres posmenopáusicas, ya que se describe una asociación consistente entre osteocalcina y marcadores del síndrome metabólico (52). También se han descrito que otros marcadores relacionados con el hueso, tales como los niveles circulantes de osteoprotegerina, el Activador Receptor del ligando Nuclear Factor-kB (RANKL) o la esclerostina (53).

Recientemente, la Fundación Internacional de Osteoporosis y la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio recomendaron que P1NP y sCTX sean utilizados como marcadores de intercambio óseo en los estudios clínicos [ver Apéndice A] (54); también recomienda que las pruebas de laboratorio se deben guiar por los antecedentes y el examen clínico (55). El panel químico que puede ser útil incluye: el conteo sanguíneo completo, función de la glándula tiroides, nivel de la vitamina D 25-OH, electroforesis de proteínas séricas o urinarias, nivel de la hormona paratiroidea y niveles de calcio en orina de las últimas 24 hrs (47, 56). Los marcadores bioquímicos de recambio óseo pueden predecir el riesgo de fractura de forma independiente de la DMO e inferir la rapidez de la pérdida ósea en los pacientes no tratados, pronosticar la reducción del riesgo de fractura después de 3-6 meses de tratamiento con terapias aprobadas por la FDA, medir la magnitud del aumento de la DMO ósea con terapias aprobadas por el FDA; también ayuda a determinar la adecuación del cumplimiento del paciente y la persistencia con la terapia de la osteoporosis, ayuda a determinar la duración de "descanso de los medicamentos" y cuándo debe ser reiniciado el medicamento (57). Los marcadores bioquímicos de remodelación óseo son más sensibles cuando se adquieren por la mañana y en ayunas.

Tratamiento

El tratamiento de la osteoporosis con terapias no farmacológicas incluye medidas preventivas como el ejercicio (58), adecuada nutrición, administración de suplementos como calcio y vitamina D, sin embargo no reducen significativamente las fracturas de esta (59) y se consideran coadyuvantes fundamentales para la adición de otras terapéuticas farmacológicas. El objetivo de las terapéuticas farmacológicas es mejorar la calidad ósea y reducir el riesgo de fractura, estas se agrupan en tres categorías básicas (ver Tabla 3):

Tabla 3. Clasificación de los fármacos aprobados por las autoridades regulatorias nacionales para la prevención de fracturas osteoporóticas, según sus efectos sobre el remodelado óseo(5)	
Anticatabólicos (reducen el remodelamiento):	bifosfonatos, tratamiento hormonal de reemplazo (THR), raloxifeno, calcitonina, denosumab
Anabólicos (aumentan el remodelamiento pero con un saldo positivo a favor de la formación):	teriparatida
De acción mixta (desacoplan el proceso de remodelación reduciendo la resorción y aumentando la formación):	anelato de estroncio

Sin embargo, los tratamientos para la osteoporosis incrementan la densidad mineral ósea, sin embargo poseen efectos colaterales importantes como lo son: riesgo de desarrollar cáncer de mama, tromboembolia venosa, enfermedad de arterias coronarias e infarto, cáncer endometrial, bochornos, irritación nasal, epistaxis, irritación gastrointestinal, dolor músculo-esquelético y osteonecrosis del maxilar y mandíbula, hipercalcemia, calambres en las piernas, mareo y osteosarcomas.

La FDA actualmente ha aprobado opciones farmacológicas para la prevención y/o tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica (ver tabla 6): bifosfonatos (alendronato, además de alendronato D, ibandronato, risedronato y ácido zoledrónico), calcitonina, estrógenos (estrógeno y/o terapia hormonal), estrógeno agonista/antagonista (raloxifeno), complejo estrógeno selectivo de tejido (estrógenos conjugados/bazedoxifeno), hormona paratiroidea (PTH, teriparatida), receptor activador del factor nuclear kappa- β (RANK) y el ligando (RANKL) y denosumab.

Los beneficios antifractura de los medicamentos aprobados por la FDA en su mayoría se han estudiado en mujeres con osteoporosis posmenopáusica; los tratamientos han demostrado que disminuyen el riesgo de fracturas en pacientes que han tenido fracturas por fragilidad y/u osteoporosis por DXA. La farmacoterapia puede también reducir las fracturas vertebrales en pacientes con baja masa ósea (osteopenia) y sin fracturas, pero la evidencia es escasa.

- **Bifosfonatos**

Eficacia del fármaco: son análogos del pirofosfato y son de la clase de drogas anti-catabólicas y utilizadas para el tratamiento de la osteoporosis.

Alendronato, nombre comercial: Fosamax®, Fosamax Plus D, Binosto™, y alendronato genérico

Está aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para aumentar la masa ósea y para el tratamiento de la osteoporosis en pacientes que toman glucocorticoides (60); dosis preventiva: 5 mg al día y 35 mg comprimidos semanales, y dosis tratamiento: 10 mg al día, 70 mg por semana, 70 mg comprimidos semanal con 2.800 o 5.600 UI de vitamina D₃, y 70 mg comprimidos efervescentes. El alendronato reduce la incidencia de fracturas de la columna vertebral y fracturas de cadera en un 50% a los 3 años en pacientes con una fractura vertebral previa o en pacientes con osteoporosis en el sitio de la cadera (61). Se reduce la incidencia de fracturas vertebrales en un 48% a los 3 años en pacientes sin fractura vertebral previa (62). *Ibandronato, nombre comercial: Boniva® e ibandronato genérico.* Aprobado para la prevención y tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica; dosis: 150 mg comprimido mensual y 3 mg cada 3 meses por inyección intravenosa. El ibandronato reduce la incidencia de fracturas vertebrales en alrededor de 50% a los 3 años, pero la reducción en el riesgo de fracturas no vertebrales con ibandronato no se ha documentado (63). *Risedronato, nombre comercial: Actonel®, Atelvia™ y risedronato genérico.* Aprobado para la prevención y tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica, también para aumentar la masa ósea y para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis en pacientes que toman glucocorticoides; dosis: 5 mg comprimido al día; 35 mg comprimidos semanal; 35 mg semanales comprimidos de liberación prolongada; 35 mg comprimidos semanal con calcio 500 mg, 75 mg comprimidos en dos días consecutivos cada mes y 150 mg comprimido mensual (64). El risedronato reduce la incidencia de fracturas vertebrales en un 41 a un 49% y las fracturas no vertebrales en un 36% a los 3 años (65). *Ácido zoledrónico, nombre comercial: Reclast®.* El ácido zoledrónico está aprobado para la prevención y tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas, prevención de nuevas fracturas clínicas en pacientes que recientemente han tenido una fractura de cadera (66), para mejorar la masa ósea en hombres con osteoporosis y para la prevención y tratamiento de la osteoporosis en tratamiento con glucocorticoides durante al menos 12 meses; dosis: 5 mg en infusión intravenosa durante al menos 15 minutos una vez al año para el tratamiento y una vez cada 2 años para prevención. El ácido zoledrónico reduce la incidencia de

fracturas vertebrales en un 70% (con una reducción significativa en 1 año), las fracturas de cadera en un 41%, y las fracturas no vertebrales en un 25% (67).

Efectos adversos de los bifosfonatos

Los efectos secundarios son similares para todos los bifosfonatos orales e incluyen problemas gastrointestinales, tales como dificultad para tragar e inflamación del esófago y el estómago. Todos los bifosfonatos pueden afectar la función renal (contraindicado en pacientes con insuficiencia renal aguda), puede ocurrir inflamación ocular, osteonecrosis de la mandíbula (ONM) (68), fracturas atípicas de fémur y dolor en el área del muslo o en la ingle.

- **Calcitonina**

Eficacia del fármaco: es un agente biológico de la clase anti-catabólica. Sus efectos reflejan que es útil para incrementar la densidad mineral ósea ligeramente en la espina dorsal y cadera y se determinó que su administración reduce las fracturas vertebrales, pero no se determinó algún beneficio para reducir las fracturas de cadera o fracturas no vertebrales.

Calcitonina, nombre comercial: Miacalcin® o Fortical® y calcitonina genérica. La calcitonina de salmón está aprobada por la FDA para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres con 5 años después de la menopausia y cuando los tratamientos alternativos no son adecuados; dosis: 200 UI en una sola atomización intranasal diaria. También está disponible la administración subcutánea. *Miacalcin spray* nasal no ha demostrado aumento en la densidad mineral ósea en mujeres con menopausia temprana. La calcitonina reduce la aparición de fractura vertebral en un 30% y en aquellos con fracturas vertebrales previas no ha demostrado que reduzca el riesgo de fracturas no vertebrales. Debido a la posible asociación entre el uso de calcitonina-salmón y tumores malignos, el tratamiento debe ser reevaluado en forma periódica (69).

Efectos adversos de la calcitonina

La calcitonina intranasal puede causar rinitis, edema y congestión nasal, epistaxis y reacciones alérgicas, especialmente en aquellos con antecedentes de alergia a los salmones, náuseas, vómitos, mareos, rubor facial y riesgo de ciertos tipos de cáncer (70).

- **Terapia hormonal de reemplazo (THR)**

Eficacia del fármaco: estrogénos más progesterona reducen significativamente las fracturas vertebrales, de cadera, antebrazo y muñeca. El reemplazo hormonal alivia los síntomas de la menopausia tales como la sequedad vaginal, bochornos y reduce el riesgo de cáncer de colón.

Nombres comerciales: Climara®, Estrace®, Estraderm®, Estratab®, Ogen®, Premarin, Vivelle®, Activella®, Femhrt®, Premphase®, Prempro®. La hormona está aprobado por la FDA para la prevención de la osteoporosis, el alivio de los síntomas vasomotores y atrofia vulvovaginal asociada con menopausia; dosis: disponible en una amplia variedad oral, así como parches dérmicos. Las dosis incluyen regímenes cíclicos, secuenciales y continuos. Si se interrumpe el tratamiento, la pérdida de hueso puede ser rápida y deben ser considerados agentes alternativos para mantener la densidad mineral ósea. La terapia hormonal reduce el riesgo de fracturas vertebrales clínicas y de cadera en un 34% y otras fracturas osteoporóticas en un 23% (71).

Efectos adversos de la terapia hormonal de reemplazo

Incremento en el riesgo de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, cáncer de mama invasivo, embolia pulmonar y trombosis venosa profunda.

- **Raloxifeno (estrógeno agonista/antagonista, anteriormente conocido como SERM)**

Eficacia del fármaco: es de receptor agonista de estrógeno/antagonista y es una droga anti-catabólica y su administración incrementa la densidad ósea en la espina lumbar, en la cadera y en el cuello del fémur. Reduce el riesgo de fracturas vertebrales y recientemente el Raloxifeno recibió una aprobación adicional por parte de la FDA como una droga que permite disminuir el riesgo de cáncer de mama no invasivo.

Nombres comerciales: Evista® y el raloxifeno genérica. Aprobado por la FDA para la prevención y tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. También está indicado para la reducción del riesgo de cáncer de mama invasivo en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis (72); reduce el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria. Dosis: tableta de 60 mg. El raloxifeno reduce el riesgo de fracturas vertebrales en alrededor del 30% en pacientes con una fractura vertebral previa y alrededor del 55% en los pacientes sin fracturas vertebrales previas (68). No se ha documentado una reducción del riesgo en fracturas no vertebrales.

Efectos adversos del raloxifeno

El raloxifeno aumenta el riesgo de trombosis venosa profunda en un grado similar al observado con estrógenos; aumento de riesgo de accidente cerebro vascular. También puede aumentar los sofocos y causar calambres en las piernas.

- **La hormona paratiroidea: teriparatida**

Eficacia del fármaco: es una hormona biológica recombinante y está indicada para el tratamiento de la osteoporosis post-menopáusica y en osteoporosis en hombres. Es una droga constituida por los primeros 34 aminoácidos de la hormona paratiroidea. La Teriparatida incrementa la densidad mineral ósea en la espina y la cadera, disminuye las fracturas vertebrales y no vertebrales. No se ha probado su eficacia para el tratamiento de fracturas de cadera.

Nombres comerciales: Forteo®. PTH (1-34, *Parathyroid hormone*), la teriparatida, está aprobada por la FDA para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y hombres con alto riesgo de fractura. También está aprobada para el tratamiento de pacientes con alto riesgo de fractura asociada con la terapia con glucocorticoides (73). Dosis: la teriparatida es un agente anabólico (formador de hueso), se administra 20 µg diarios en inyección subcutánea. Una vez que se interrumpe el tratamiento, la pérdida de hueso puede ser rápida y se deben considerar agentes alternativos para mantener la densidad mineral ósea. Se recomienda que la duración del tratamiento no exceda los 18 a 24 meses. La teriparatida 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 de tratamiento (74). Después del tratamiento de teriparatida, para mantener o aumentar aún más la DMO, generalmente se pueden usar bisfosfonatos.

Efectos adversos de la teriparatida

Los efectos secundarios de la teriparatida incluyen náuseas, mareos, astenia y calambres en las piernas. Debido a que causó un aumento en la incidencia de osteosarcoma en ratas (dosis altas y tratamiento de larga duración), los pacientes con mayor riesgo de osteosarcoma (por ejemplo, pacientes con la enfermedad de Paget y los que tienen terapia de radiación antes del esqueleto), metástasis óseas, hipercalcemia o antecedentes de tumores malignos del esqueleto, no deben recibir terapia de teriparatida.

- **Inhibidor de RANKL/RANKL: denosumab**

Eficacia del fármaco: es un anticuerpo monoclonal producido contra el receptor activador del d factor nuclear $\kappa\beta$ -ligando (RANKL). Cuando el Denosumab se une a RANKL, inhibe la formación osteoclástica, su función y sobrevivencia y por esto la densidad mineral ósea se incrementa.

Nombres comerciales: Prolia®. El denosumab es aprobado por la FDA para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas con alto riesgo de fractura. También está indicado para aumentar la masa ósea en hombres con alto riesgo de fractura, tratamiento de la pérdida ósea en mujeres con cáncer de mama, y para el tratamiento de la pérdida ósea en los hombres que recibieron tratamiento de reducción de gonadotropina para el cáncer de próstata y que están en alto riesgo de fractura. Dosis: 60 mg cada 6 meses en una inyección subcutánea. Denosumab reduce la incidencia de fracturas vertebrales en un 68%, fracturas de cadera 40%, y las fracturas no vertebrales 20% en 3 años (75). Cuando el tratamiento se interrumpe, la pérdida de hueso puede ser rápida y se deben considerar agentes alternativos para mantener la densidad mineral ósea.

Efectos adversos del denosumab

Es un fármaco de reciente liberación en el mercado, por lo que el verdadero perfil de seguridad aún no está definido. Puede causar hipocalcemia; está asociado al aumento en el riesgo de infecciones graves de la piel (celulitis) y erupciones en la piel. En raras ocasiones se ha asociado con el desarrollo de la ONM, tanto cuando se utiliza para tratar la osteoporosis como para tratar pacientes con cáncer (a dosis mucho más altas), aunque es mucho más común en la segunda configuración. Denosumab también se ha asociado raramente con el desarrollo de las fracturas de fémur atípicas.

MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL PARA OSTEOPOROSIS

Los múltiples factores implicados en la osteoporosis, su compleja patogénesis, la dramática disminución de la calidad de vida, la alta incidencia de la enfermedad (especialmente en las mujeres posmenopáusicas), el costo financiero y la elevada mortalidad, hacen necesaria la experimentación en modelos animales. La investigación experimental puede mejorar la comprensión de la patogénesis y de la actividad de los agentes farmacéuticos en la prevención o el tratamiento de la OS. Aunque muchos aspectos de la OS han sido revelados, otros no están claros; la investigación actual se centra en nuevas posibilidades terapéuticas [más efectivas y con menos efectos colaterales] (25). 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 y 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 a ser examinado debe estar fácilmente disponible. Las ratas de laboratorio cumplen la mayoría de estos criterios. Además, 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 (25).

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 (76). Los mayores factores secundarios a la deficiencia 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, disminución del grosor, conectividad y número trabecular (77).

◆ **Modelo murino**

Los animales que se utilizan con mayor frecuencia para estudios experimentales son los roedores, principalmente ratas y ratones. 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 del modelo en ratas ovariectomizadas como estrategia para pruebas, tratamiento y prevención de la osteoporosis [*Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the treatment or prevention of postmenopausal osteoporosis*] (78). 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 (79). El desarrollo de la osteopenia/osteoporosis es una de las respuestas biológicas más reproducibles en la investigación ósea (22). Existen diferentes tipos de cepas de ratas, sin embargo, los resultados son muy similares entre ellas. Las ratas adultas jóvenes OVX muestran una pérdida ósea significativa, mientras que las de la mediana edad y las adultas mayores, muestran más similitud con la pérdida de hueso postmenopáusica, debido a que la formación de hueso es menos y la resorción es mayor. Existen varias intervenciones experimentales para inducir la osteopenia y la osteoporosis en la rata (véer Apéndice B). Todos los protocolos experimentales de OS pueden ser implementados en ratas esqueléticamente inmaduras o maduras (25). Aunque las ratas alcanzan la madurez sexual a los 2,5 meses, su esqueleto se considera maduro después de los 10 meses (22).

Osteoporosis posmenopáusica

El modelo de rata ovariectomizado es el más comúnmente utilizado en la investigación sobre la OS posmenopáusica. 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 (80), en el cuerpo vertebral lumbar después de 60 días (81), y en el cuello femoral después de 30 días (82). La OVX no induce la pérdida de masa ósea en las epífisis de los huesos largos, la metáfisis tibial distal, ni en las vértebras caudales (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 OVX (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 a la edad de 15 meses y en la metáfisis proximal de la tibia a la edad de 12 meses (91).

La deficiencia de hormonas 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 necesita muchas proteínas solubles como las citocinas y factores de crecimiento para que se desarrollen los osteoclastos. Los siguientes 7 días después de la OVX, se incrementan las colonias de macrófagos granulocitos, y 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 citocinas 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 OVX (presentes en osteoblastos y osteoclastos). 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, *insulin 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*).

También, después de la ovariectomía hay un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias, específicamente la interleucina 1 (IL-1, *interleukin 1*) 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 proinflamatorias, la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM 1, *intracelular adhesión moleculé 1*) se expresa en ratas OVX (lo que es importante para la osteoclastogénesis) (96). Las ratas deficientes 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 la respuesta de crecimiento rápido (Erg-1, *early growth response*) y 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 (102). Incluso el hueso cortical muestra un bajo nivel de remodelado intracortical el cual puede ser inducido por condiciones metabólicas estresantes (103, 104). El principal inconveniente del esqueleto de la rata es que algunos huesos conservan el crecimiento de por vida y no fusionan la epífisis (105). Muchas placas de crecimiento epifisario de hueso largo en la rata macho permanecen abiertas durante 30 meses (105). En contraste, el alargamiento óseo en otros sitios como la tibia proximal y la tibia distal cesa aproximadamente a los 15 meses (79, 105), y las placas de crecimiento vertebral lumbar pueden estar abiertas hasta los 21 meses. Una rata hembra a los 9 meses exhibe una velocidad de alargamiento lenta, en la tibia proximal de 3 $\mu\text{m}/\text{día}$, y la cabeza femoral de <1 $\mu\text{m}/\text{día}$. La expansión perióstica en la diáfisis de los huesos largos continúa hasta aproximadamente 10 meses, marcando la edad del pico de masa ósea (83, 106) permitiendo un amplio tiempo para los diseños experimentales para prevenir y restaurar la masa ósea y la fuerza (22).

La rata, al igual que otros modelos animales experimentales de osteopenia/osteoporosis, no tiene fracturas de fragilidad de origen natural asociadas con la osteopenia. Esta deficiencia ha sido superada mediante pruebas mecánicas de varios huesos, como el cuerpo vertebral (107-110), el eje femoral (88, 111, 112), y el fémur proximal (90, 109, 112-114). Sin embargo, tanto la pérdida y la fuerza significativa de hueso esponjoso vertebral, se puede detectar a los 3 meses después de la ovariectomía (22, 107, 108). Los métodos alternativos a la OVX quirúrgica que conduce a la OS son la administración de agentes farmacéuticos, tales como: agonista de la hormona liberadora de gonadotropina, antagonista del receptor de estrógenos y el inhibidor de la aromatasa (que es reversible después de su retirada). Estos agentes farmacéuticos que se utilizan en seres humanos para el tratamiento endocrino de la endometriosis o el cáncer de mama, se asocian con una pérdida ósea acelerada (115). La administración de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina crea un modelo hipogonadotrófico-hipogonadal, mientras que los antagonistas de los receptores de estrógeno e inhibidores de la aromatasa producen un modelo de la osteoporosis hipergonadotrófico-hipogonadal. La experimentación en la rata como modelo de osteoporosis inducida por glucocorticoides ha dado resultados inconsistentes. Algunos estudios no pudieron detectar la pérdida ósea en ratas maduras, pero otros informes corroboran la administración de glucocorticoides con la pérdida de masa ósea (116). No se dispone de pruebas que demuestren que la rata es capaz de replicar con exactitud la pérdida ósea inducida por glucocorticoides observada en humanos adultos (22, 117). Existen otras

intervenciones hormonales que resultan en osteopenia, incluyendo la hipofisectomía (118), orquidectomía (119) y paratiroidectomía (120).

Limitaciones

Un inconveniente para el uso de modelos de rata para la OS es la falta de remodelación Haversiana en el esqueleto de la rata. En los seres humanos, el aumento de la remodelación de Havers es la causa principal de la porosidad cortical, pero las ratas carecen de un sistema bien desarrollado de remodelación de Havers. En el esqueleto de la rata, la ganancia ósea cortical se produce en el periostio y el hueso cortical se pierde en el endostio (121). Para el estudio del remodelado de Havers, se recomienda los modelos animales más grandes como conejos (122), perros y primates (22). Sin embargo, las características específicas de la OS en perros (modelo inapropiado para la OS posmenopáusicas, alto costo de mantenimiento, dilemas éticos) y primates (alto costo de adquisición y mantenimiento, menor disponibilidad en centros experimentales, dilemas éticos) limitan su uso en la investigación de la OS. En todos los modelos animales, la mayor parte de la pérdida ósea se concentra en la superficie endosteal. Sin embargo, la ovariectomía (OVX) de ratas esqueléticamente maduras permite una condición similar a la menopausia, ya que la cirugía conduce a la pérdida de hueso esponjoso y endocortical al aumentar la tasa global de remodelación ósea y altera el equilibrio entre la formación ósea y la resorción ósea (22). Las pérdidas de hueso endocortical y esponjoso son las causas primarias de la OS, mientras que la pérdida de hueso inducida por remodelado intracortical en el sistema de Havers desempeña un papel menor (123). Dadas las dificultades con otros modelos animales de osteoporosis, la falta de la remodelación por el sistema de Havers en el esqueleto de rata, se considera una limitante menor (124).

La osteopenia de la rata debido a la edad, la ovariectomía (en la rata hembra) y la inmovilización tienen un fuerte parecido con la osteopenia humana, tanto en sus características anatómicas como en los estados transicionales y estacionarios de la dinámica ósea. Los principales atributos de la OS humana son fracturas espontáneas y de bajo impacto, ninguna de las cuales ha sido reproducida en ningún modelo animal (125). Sin embargo, teniendo en cuenta la definición de la Organización Mundial de la Salud, que establece que la osteoporosis está presente cuando la densidad mineral ósea (DMO) es superior a 2,5 desviaciones estándar por debajo de la media de referencia de los adultos jóvenes, con o sin la presencia de cualquier fractura (126), **la rata osteopélica (sin fracturas espontáneas) se considera un modelo apropiado para la investigación de la osteoporosis (25).**

PROTEÍNAS CEMENTO-ESPECÍFICAS

Periodonto

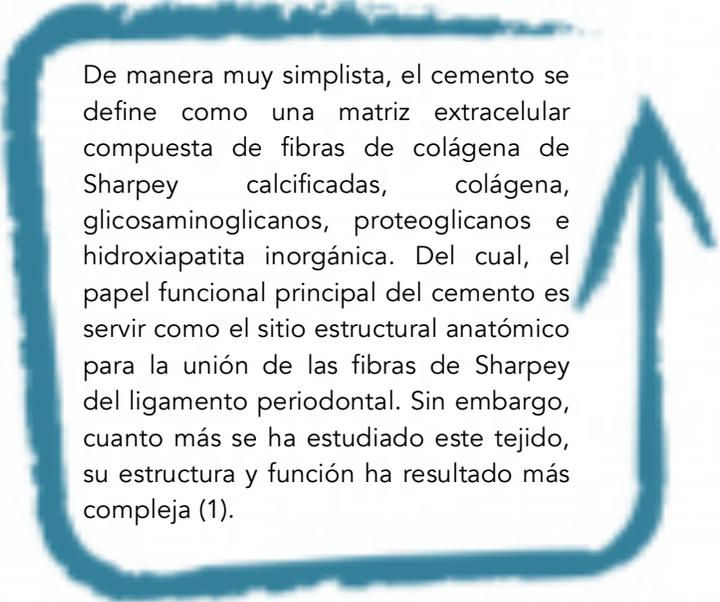
El periodonto es una unidad biofuncional y proporciona el apoyo necesario para mantener los dientes en función. Consiste de cuatro componentes principales: encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Cada uno de estos componentes periodontales tiene distinta ubicación, arquitectura de tejido, composición bioquímica y composición química, pero todos estos componentes funcionan juntos como una sola unidad. El periodonto está sometido a variaciones funcionales y morfológicas y se le ha dividido en dos partes: la encía, cuya función principal es proteger los tejidos y el aparato de inserción, compuesto por el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar. El cemento se considera una parte del periodonto porque, junto con el hueso, sirve como apoyo para las fibras del ligamento periodontal (127).

La función principal del periodonto consiste en unir el diente al tejido óseo de los maxilares y en mantener la integridad en la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal. El periodonto, también llamado "aparato de inserción" o "tejidos de sostén de los dientes" constituye una unidad de desarrollo, biológica y funcional, que experimenta determinados cambios con la edad y que además

está sometida a modificaciones morfológicas relacionadas con alteraciones funcionales y del medioambiente bucal (128).

- **Cemento radicular**

El cemento radicular es un tejido mesenquimal mineralizado que cubre la raíz anatómica del diente y sirve para unir el diente al hueso alveolar a través de las fibras de colágena del ligamento periodontal; en contraste con el hueso, no posee aporte sanguíneo directo, no está innervado, no cuenta con drenaje linfático ni sufre procesos de remodelación fisiológica; posee características únicas: **contiene moléculas bioactivas que promueven la migración, adhesión, y crecimiento de los fibroblastos e influyen en la síntesis de la matriz extracelular.**



De manera muy simplista, el cemento se define como una matriz extracelular compuesta de fibras de colágena de Sharpey calcificadas, colágena, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e hidroxapatita inorgánica. Del cual, el papel funcional principal del cemento es servir como el sitio estructural anatómico para la unión de las fibras de Sharpey del ligamento periodontal. Sin embargo, cuanto más se ha estudiado este tejido, su estructura y función ha resultado más compleja (1).

Existen diferencias funcionales, morfológicas e histológicas a lo largo de la longitud de la raíz, por lo cual el cemento se clasifica en: intermedio (encontrado en la unión amelo-cementaria), acelular o primario (localizado en la porción media y coronal) y celular o secundario (presente en la porción apical e interradicular, la cual contiene cementoblastos) (1).

El cemento acelular es el primer cemento en formarse, cubre aproximadamente el tercio cervical o la mitad de la raíz y no contiene células. Este cemento se forma antes que el diente alcance su plano oclusal y su espesor oscila entre 30 y 230 μm . Las fibras de Sharpey conforman la mayor parte de la estructura del cemento acelular, que tiene un papel principal en el apoyo del diente. La mayoría de las fibras se insertan casi en ángulo recto a la superficie radicular y penetran profundamente en el cemento, pero otras penetran profundamente en el cemento, pero otras entran desde direcciones diferentes. Su tamaño, número y distribución aumentan con la función. Las fibras de Sharpey están completamente calcificadas, con los cristales minerales orientados paralelos a las fibrillas, como en la dentina y el hueso, excepto en un área de 10 a 50 μm de ancho cerca de la unión amelodentinaria, donde están solo calcificadas en parte. Las porciones periféricas de las fibras de Sharpey en cemento en activa mineralización tienden a estar más calcificadas que las regiones interiores. El cemento acelular también contiene fibrillas intrínsecas de colágena calcificadas y organizadas de manera irregular o paralelas a la superficie (127).

El cemento celular, formado después de que el diente alcanza el plano oclusal, es más irregular y contiene células (cementocitos) en espacios individuales (lagunas) que se comunican entre sí mediante un sistema de canalículos anastomosados. El cemento celular es menos calcificado que el tipo acelular. Las fibras de Sharpey ocupan una porción más pequeña del cemento celular y están separadas por otras fibras que se encuentran organizadas paralelas a la superficie radicular o de un modo aleatorio. Las fibras de Sharpey pueden estar completa o parcialmente calcificadas o pueden tener un núcleo central, no calcificado, rodeado por un borde calcificado(127).

En general, los tres tipos de cemento consisten de una **matriz extracelular compuesta de fibras colágenas calcificadas de Sharpey, colágena, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e hidroxapatita inorgánica.**

Las dos fuentes principales de fibras de colágenas en el cemento son:

1. Fibras de Sharpey (extrínsecas), que son la porción incluida de las fibras principales del ligamento periodontal y están formadas por fibroblastos, y
2. Fibras que pertenecen a la matriz del cemento (intrínsecas) y son producidas por los cementoblastos

Los cementoblastos también forman los componentes no colágenos de la sustancia fundamental interfibrilar como proteoglicanos, glicoproteínas y fosfoproteínas. Los proteoglicanos suelen jugar un papel en la regulación de las interacciones célula-célula y célula-matriz, tanto en el desarrollo normal como en la regeneración del cemento; también están estrechamente relacionados con los cementoblastos y cementocitos (127).

Composición del cemento

El cemento radicular está constituido aproximadamente por un 50% de contenido inorgánico, formado principalmente por cristales de hidroxapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ es del 45 al 50%, que es inferior al del hueso (65%), esmalte (97%) o dentina (70%)] y un 50% de contenido orgánico. La mayor proporción de la matriz orgánica del cemento está compuesta por colágena tipo I (90%) y tipo III (alrededor del 5%), la cuales tienen una importante función estructural durante el proceso de biomineralización, porque sirven como depósito para la nucleación de hidroxapatita, que posteriormente se desarrollarán en cristales de apatita interfibrilar (129). Las fibras de Sharpey, que constituyen una proporción considerable del volumen de cemento están compuestas sobre todo por colágena tipo I. La colágena tipo III parece recubrir la colágena tipo I de las fibras de Sharpey. Además de las colágenas, el cemento también está constituido por mucopolisacáridos carboxilados y sulfatados (glicosaminoglicanos como versicano, decorina, biglicano, fibromodulina y lumicano). Las proteínas no colágenas del cemento radicular están presentes en el hueso, como: amelogenina, ameloblastina, enamelina, fosfatasa alcalina [ALP] (130), sialoproteína ósea (BSP), proteína de la matriz dentinaria-1 (DMP-1), fibronectina, osteocalcina, osteonectina y osteopontina, además de diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento tipo insulínico y el factor de crecimiento derivado del cemento (CGF). Hasta el momento, sólo se han reportado dos proteínas cemento específicas, la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular [CAP] (11).

Biomineralización del cemento

Como se mencionó anteriormente, la formación de cristales mineralizados se presenta inicialmente en los espacios de las fibras de colágena. Las fibras de colágena proporcionan una estructura que funcionan como andamio sobre el que se relacionan otras proteínas, las cuales cumplen diversas funciones como se describe enseguida.

Glicosaminoglicanos

Los proteoglicanos que contienen glicosaminoglicanos son grupos heterogéneos de glicoproteínas con disacáridos de repetición larga. El porcentaje de glicosaminoglicanos es elevado en los tejidos sometidos a fuerzas compresivas, como el cemento. Los proteoglicanos interactúan específicamente con colágenas en diversos tejidos. Los proteoglicanos en el cemento son componentes integrales de las matrices de fijación del substrato celular y median la unión entre el cemento antiguo y recién formado, creando así las líneas incrementales del cemento (1, 131, 132).

Los principales glicosaminoglicanos presentes en el cemento humano son el ácido hialurónico, sulfato de dermatán y el sulfato de condroitina (133, 134). El contenido de proteoglicanos en los tejidos

mineralizados, generalmente es bajo. Estas diferencias podrían reflejar diferencias en la función entre el tejido duro y el tejido blando, ya que los proteoglicanos parecen inhibir la mineralización de la colágena ocupando ubicaciones estratégicas que normalmente están destinadas a ser llenadas con hidroxiapatita. En el hueso, los proteoglicanos de sulfato de dermatán están orientados paralelamente al eje de las fibras de colágena con proteoglicanos de condroitín de sulfato y ácido hialurónico, ocupando la región interfibrilar (135). Entre otros glicosaminoglicanos presentes en el cemento, el sulfato de queratán parece ser uno de los componentes principales, que después de la digestión con queratanasa II y endo-beta-galactosidasa, produce dos proteínas principales: lumicano y fibromodulina (1).

Interesantemente, estas proteínas están localizadas predominantemente en cemento no mineralizado (área del precemento y pericementocito), lo que sugiere que desempeñan importantes funciones reguladoras durante la mineralización del cemento (136). De manera similar, también se ha determinado que el glucosaminoglicano de sulfato de condroitina presente en cemento, contiene el proteoglicano de unión al hialuronano, versicano, y los pequeños proteoglicanos intersticiales, decorina y biglicano. El versicano se localiza en las lagunas que albergan a los cementocitos. La decorina se asocia estrechamente con las fibras de colágena del ligamento periodontal y con el biglicano en el área del precemento/cementoblastos. La distribución diferente del tejido sugiere que los glicosaminoglicanos pueden desempeñar papeles distintos durante el proceso de cementogénesis además de regular la biomineralización del cemento (1, 137).

La osteoadherina, un proteoglicano que contiene sulfato de queratina, también está asociada con la fase inicial de la formación de cemento, ya que las células de la vaina de la raíz epitelial de Hertwig expresan este proteoglicano durante el desarrollo de la raíz (138), y aunque el cemento acelular no contiene proteoglicanos, la formación inicial del cemento acelular requiere una acumulación densa de proteoglicanos (1, 139).

Fosfatasa alcalina (ALP)

La fosfatasa alcalina (ALP, *Alkaline phosphatase*) es una ecto-enzima que cataliza la hidrólisis de grupos éster monofosfato. Existen cuatro genes que codifican las isoenzimas: intestinal, placentaria, células germinales y tejidos no específicos (hueso/osteoblasto, isoformas hepáticas y renales); las isoformas resultan de la glicosilación y sialación post-traduccionales. La isoforma del hueso (BALP, *Bone-specific alkaline phosphatase*) está implicada en la calcificación esquelética por varios procesos -aumentando las concentraciones locales de fosfato inorgánico, destruyendo pirofosfato que inhibe la cristalización mineral o actuando como una proteína de unión al calcio o Ca^{++} -ATPasa (140). El hígado y los huesos son las fuentes primarias de las enzimas séricas, y las moléculas se diferencian después de la traducción en su patrón de glicosilación; en el suero, el 95% de la ALP se deriva del hueso y del hígado, en cantidades aproximadamente iguales. La fosfatasa alcalina no específica de tejido es un producto predominante de los osteoblastos y de sus precursores (141), es una proteína glicosilada con actividad enzimática localizada en la porción externa de la membrana citoplasmática, también se encuentra en las vesículas de matriz, que son organelos producidos por las células mineralizantes y están localizadas en la matriz extracelular. Dichas vesículas contribuyen a la mineralización de la matriz extracelular formando fosfatos de calcio amorfos y cristales de hidroxiapatita. La fosfatasa alcalina es responsable de regular las concentraciones extracelulares de fosfatos, desfosforilando diversas moléculas. La actividad de ésta molécula se incrementa cuando inicia el proceso de mineralización de la matriz extracelular, por lo que es un marcador temprano de la biomineralización (11). Una de las principales funciones de la ALP es la hidrólisis de pirofosfato inorgánico, un potente inhibidor de la formación de hidroxiapatita. Los cementoblastos son muy sensibles a los niveles de pirofosfato inorgánico/fosfato inorgánico dentro de la matriz extracelular. Los cambios en el nivel de fosfatasa alcalina tienen un efecto significativo sobre la función de los osteoblastos, y en consecuencia sobre la mineralización de la matriz, lo que indica que la fosfatasa alcalina no específica de tejido desempeña papeles biológicos clave en la mineralización del

hueso y el cemento (1).

La ALP se expresa en la mayoría de los sitios del cuerpo durante el desarrollo embrionario, pero se limita a huesos, riñones, hígado y los linfocitos B durante la vida adulta. Su actividad se ha localizado principalmente en placas de crecimiento de cartílago, en células endosteales, células de médula ósea, osteoblastos y cementoblastos. En hueso se ha identificado en el frente de mineralización y juega un papel importante en la mineralización del esqueleto. El hecho de que también se expresa en los tejidos no mineralizados sugiere que tiene otras funciones además de los asociados con la mineralización. Entre algunas de estas otras funciones, se ha sugerido que puede regular el recambio, proliferación, diferenciación y la maduración del tejido.

La fosfatasa alcalina está altamente expresada en las células del ligamento periodontal, donde se cree que desempeñan un papel en el metabolismo del fosfato y la formación del cemento, en particular la formación de cemento acelular (1).

Sialoproteína ósea (BSP)

Esta proteína constituye hasta el 15% del total de las proteínas no colágenas del hueso y cemento radicular. Glicoproteína altamente fosforilada con altos niveles de ácido glutámico (proteína ácida), los cuales se cree que tiene relación con su capacidad de unión a la hidroxiapatita así como la nucleación de los cristales de dicho mineral (11). Posee la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp, Arginina-glicina-ácido aspártico) que se encuentra relacionada con funciones de adhesión celular (por medio de las integrinas) y participa en el inicio de la mineralización [contiene dos dominios poli-Glu, cuyas secuencias repetitivas son conocidas por unir el calcio a las superficies minerales] (1); también se le considera como un marcador de diferenciación de osteoblastos y cementoblastos. Se localiza en hueso, dentina y cemento radicular (que durante la formación de la raíz, se localiza en las células que recubren la superficie del cemento) y está asociada a zonas de neoformación ósea. Modula el proceso de cementogénesis y es una proteína quimioatrayente que está implicada en el proceso de adhesión y diferenciación de precementoblastos (142).

Tiene propiedades de fijación de células y tiene una asociación espacial con los primeros agregados minerales, se une fuertemente a la hidroxiapatita y actúa como nucleadora específica y potente para la formación de cristales de hidroxiapatita *in vitro* [por lo que se le atribuye un papel importante durante las primeras etapas de mineralización] (143).



Osteopontina (OPN)

También llamada sialoproteína ósea I (BSPI) o fosfoproteína secretada 1 (SPP1), es una proteína no colágena, altamente fosforilada (fosfoproteína), expresada en estadios tempranos del desarrollo de la raíz y del ligamento periodontal en dientes maduros. Aunque se considera un componente fundamental del hueso, también se localiza en sitios no mineralizados como riñón, células de músculo liso arterial y en la superficie luminal de células epiteliales en tejidos ductales. También se encuentra en la mayoría de las secreciones corporales como orina, leche, saliva y bilis. En el hueso se localiza en el frente de mineralización y participa en la inflamación regulando la activación de monocitos hacia macrófagos, fagocitosis y la producción de óxido nítrico. En el periodonto, la osteopontina se expresa en las células que están en estrecho contacto con el cemento acelular, así como por los cementocitos (1).

Regula la adhesión celular, la actividad osteoclástica (participa importantemente en la resorción ósea) y la mineralización de la matriz extracelular. La osteopontina se une además a colágena, fibronectina y osteocalcina. Rellena los espacios creados durante el ensamble de la colágena, además de que da cohesión al tejido mineral por lo que permite que la deposición mineral se extienda a través de toda la malla de colágena. Regula la nucleación y el crecimiento de cristales de hidroxiapatita [contiene sitios putativos de unión a calcio, lo que explica su afinidad a los cristales de este mineral] (11). Se ha

sugerido que la osteopontina y sialoproteína son necesarias para la iniciación de la formación de cristales en las fibrillas altamente ordenadas de colágena tipo I (144). Ambas proteínas son ácidas: osteopontina tiene una poli-Asp y la sialoproteína contiene dos dominios de poli-Glu, y esto es importante porque las secuencias repetitivas se sabe que unen el calcio a las superficies minerales. La sialoproteína y la osteopontina están unidas a la matriz colágena y poseen propiedades de células de fijación gracias a su secuencias arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). Se cree que desempeñan un papel en la diferenciación de las células progenitoras de cementoblastos a cementoblastos (1).

Osteocalcina (OCN)

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 (145), forma aproximadamente el 1% de la matriz orgánica del 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-carboxiglutámico (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 completamente diferenciados) 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 (140). Está asociada con la calcificación de tejidos duros. Como se menciona arriba, tiene una alta afinidad por el calcio y la hidroxiapatita a través de las interacciones con el residuo Gla. El papel fundamental de esta proteína es la regulación de la mineralización (11).

Modula el crecimiento, tamaño y forma de los cristales de hidroxiapatita, también participa en el reclutamiento de osteoclastos y en la remodelación ósea; también se ha reportado que bajas concentraciones de osteocalcina retrasan el crecimiento de cristales de hidroxiapatita *in vitro*, por lo que se especula que la osteocalcina también puede actuar como un regulador negativo más que promotor de la mineralización de la matriz (146).

Proteína del cemento 1 (CEMP1)

El proteína del cemento 1 fue aislada del cemento radicular y de un cementoblastoma de origen humano. El gen de CEMP1 se localiza en el brazo corto del cromosoma 16 [16p13.3] (12). Se compone de

247

aminoácidos

(**MGTSSTDSQQAGHRRCSTNSAENLTCLSLPGSPGKTAPLPGPAQAGAGQPLPKGCAAVKAEVGIPAPHTSQEVRIHIRRLLSWAAPGACGLRSTPCALPQALPQARPCGRWFFPGCSLPTGGAQTILSLWTWRHFLNWALQQREENSGRARRVPPVPRTPAPVSKGEGSHPPQNSNGEKVKTITPDVGLHQSLTSDPTVAVLRakrapeahpPRSCSGSLTARVCHMGVCCQGQGDTEdGRMTLM**) con un peso molecular calculado de 26 kDa, y que parece ser una proteína alcalina (pI = 9,73), sin péptido señal; hasta el momento no se han encontrado secuencias similares en otras especies. No se ha detectado la expresión del ARNm ni de la proteína en otros tejidos humanos, por lo que constituye a la fecha como el único marcador biológico para el cemento radicular, cementoblastos y los progenitores putativos en el ligamento periodontal (1, 147).

CEMP1 está constituido por prolina (11,3%), glicina (10,5%), alanina (10,1%), serina (8,9%), leucina (8,1%), treonina y arginina (7,7% cada uno) y contiene niveles bajos de triptófano, ácido aspártico, isoleucina (cada uno 2,0%) y fenilalanina (1,6%). La tirosina no está presente. La secuencia de aminoácidos indica que es probable que sea una proteína nuclear; sin embargo, no tiene motivos de unión al ADN. Los aminoácidos 30-110 muestran 48% de similitud con la colágena humana de una cadena α I (I), 46% con el tipo XI y 40% con el tipo X (1).

La proteína CEMP1 expresada en fibroblastos gingivales de origen humano se compone principalmente de hojas β (32,4% β antiparalela, 16,7% giros- β y 5,8% β paralelo), 10% de α -hélice, y 35% de conformación aleatoria (espiral). Esta característica se asocia con proteínas que tienen un alto

porcentaje de estructura de espiral al azar, las cuales se ha demostrado que son multifuncional y tienen diversas propiedades de unión; esto podría ayudar a explicar porqué la proteína CEMP1 regula la composición y el crecimiento de cristales de apatita (1).

De acuerdo con el análisis *in silico*, la proteína del cemento 1 posee dos sitios de N-glicosilación, es decir, asparagina-X-serina en aminoácidos 20 y 25. El papel exacto de los hidratos de carbono unidos a proteínas de cemento 1 es desconocida; sin embargo, la glicosilación puede afectar a la función de la proteína CEMP1 durante el proceso de mineralización porque a su superficie aniónica se pueden unir un gran número de iones Ca_2^+ y regular el crecimiento de la hidroxiapatita. Los glicanos también están implicados en la regulación de la osificación endocondral, el remodelado óseo y la reparación de fracturas (1).

La presencia de fosfato también favorece la unión de Ca_2^+ a la proteína, y las proteínas asociadas (sialoproteína y osteopontina) con el proceso de mineralización son altamente fosforiladas en residuos de treonina y serina. Por lo tanto, CEMP1 puede desempeñar un papel en las primeras etapas de mineralización durante la formación de fosfato octacálcico (130). La proteína del cemento radicular 1 no reacciona con los grupos sulfidrilos; por lo tanto, todos los residuos de cisteína podrían estar relacionados con puentes disulfuro, que generalmente juegan un papel estabilizador de estructura de proteínas (1).

En un sistema en estado estacionario con concentraciones de calcio y fosfato CEMP1 es eficaz en la promoción de la nucleación de fosfato octacálcico (en gel de agarosa). La proteína del cemento radicular 1 posee una alta afinidad por la hidroxiapatita (depósito y composición de cristales de hidroxiapatita), incluso sin modificaciones post-traduccionales. El análisis elemental realizado con análisis de rayos X de dispersión de energía identifica una relación calcio/fósforo de 1.4, que corresponde a fosfato octacálcico. Estos hallazgos indican que biológicamente, la proteína desempeña un papel durante el proceso de biomineralización (ver Fig. 1). El fosfato octacálcico es una fase transitoria durante el crecimiento de los cristales biológicos. En los cristales pequeños, se transforma completamente en hidroxiapatita por hidrólisis y sólo se puede detectar en grandes cristales debido a su cinética lenta de transformación. El fosfato octacálcico fosfato también es un precursor necesario de apatitas biológicas (1).

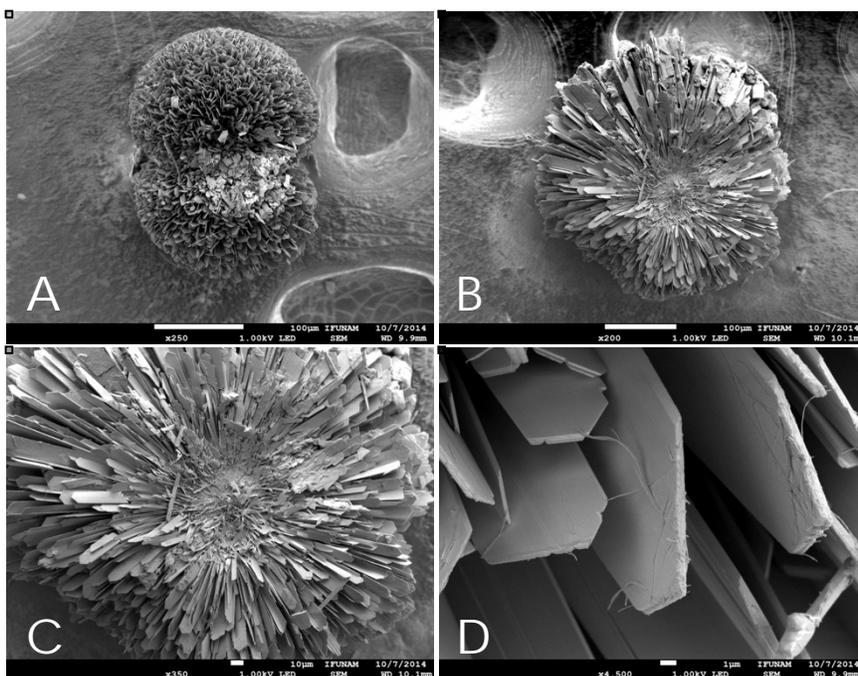


Figura 1. Los cristales de hidroxiapatita inducidos por la proteína CEMP1. Panel (A y B) Microesferas de cristales homogéneos planos y cuadrangulares de hidroxiapatita. Panel (C) el centro de la microesfera se observa un núcleo sólido con cristales de hidroxiapatita en forma de aguja que irradian. Panel (D) formación de estructuras utilizando albúmina sérica bovina (20 mg/mL), estas placas corresponden a cristales de hidroxiapatita.

En experimentos celulares, se demostró que CEMP1 participa en la regulación de la expresión de las proteínas ALP, OPN y BSP en cementoblastos, por lo que es probable que juegue un papel fundamental en la regulación local de la diferenciación de los cementoblastos y en la mineralización de la matriz extracelular del cemento. Recientemente se utilizó como marcador de cementoblastos

derivados de las superficies radiculares de humano y además se confirmó su expresión en cemento, cementoblastos y células derivadas del ligamento periodontal (1, 11).

La función de CEMP1 se ensayó adicionalmente mediante transfección en células no mineralizantes, tales como los fibroblastos gingivales humanos. En contraste con los fibroblastos gingivales humanos normales, los fibroblastos gingivales/proteína del cemento 1, mostraron un incremento en la proliferación, la formación de nódulos mineralizados, aumento de la actividad de fosfatasa alcalina específica y la expresión *de novo* de osteocalcina, osteopontina, sialoproteína, factor de transcripción 2 runt/núcleo de unión del factor alfa 1 y ARNm de la proteína de unión cemento y proteínas. Estas moléculas están todas asociados con la formación de hueso/cemento (12). Los estudios apoyan firmemente la idea de que CEMP1 tiene la capacidad de cambiar el fenotipo de las células de no mineralizantes (fibroblastos gingivales humanos) a mineralizantes (osteoblastos/cementoblastos) mediante la regulación de la proliferación y la expresión génica, lo que resulta en la diferenciación de estas células y la producción de matriz extracelular mineralizada semejante al cemento (1).

Proteína de adhesión del cemento (CAP)

El gen de la proteína CAP se localiza en el cromosoma 10 (10p13-14), con un peso molecular de 14.92 KDa, su carga eléctrica es nuestra (pI 7.78) y carece de péptido señal. Está compuesta por 140 aminoácidos

(MGRLTEAAAAGSGSRAAG
WAGSPPTLLPLSPTSPRCAA
TMASDDEDGTNGGASEAG
EDREAPGERRRLGVLATAW
LTFYDIAMTAGWLVLAIAMV
RFYMEKGTTHRGYKSIQKTL
KFFQTFALLEVSFPSCCFSA
VIFM).

Es una proteína con una movilidad relativa de 54-57 KDa que se ha aislado, caracterizado y purificado a partir de extractos de cemento maduro bovino y humano, mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal anti-CAP bovina (3G9). Se ha inmunolocalizado en la matriz del cemento radicular, en espacios endosteales del hueso alveolar y en zonas paravasculares del ligamento periodontal, así como en cementoblastos (143, 147, 148).

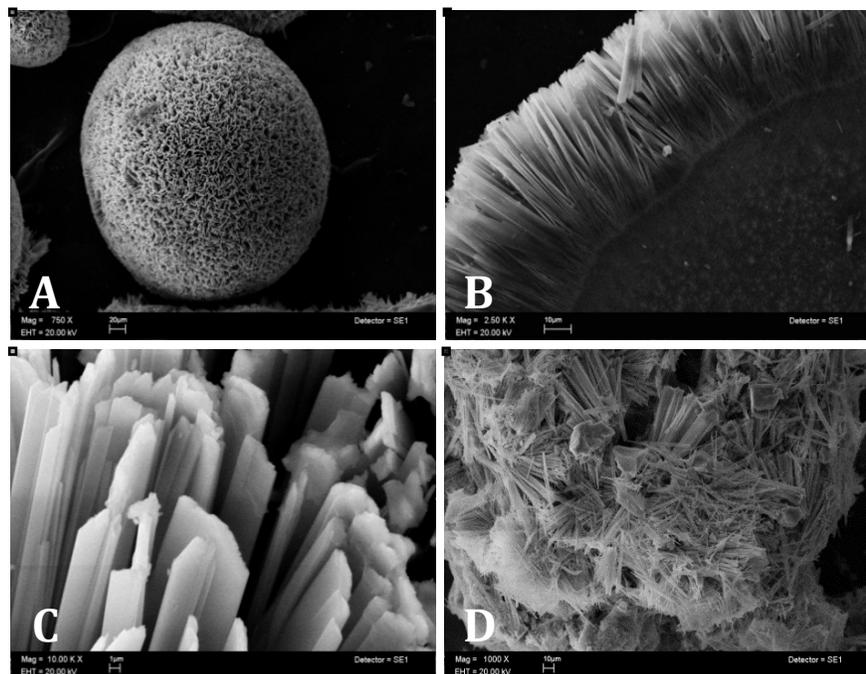


Figura 2. Cristales de hidroxiapatita inducidos en un sistema libre de células en presencia de la proteína CAP. Las imágenes de SEM muestran formaciones cristalinas laminares que crecen a partir de un núcleo agrupadas en esférulas (A y B). El tamaño de las esférulas es variable, obteniendo un promedio cercano a los 160 μm . Se observan cristales de hidroxiapatita inducidos en un sistema libre de células en presencia de CAP. Nótese la formación de microesferas y la disposición de los cristales poliédricos (C y D).

Recientemente se clonó e identificó un ARNm a partir de una biblioteca derivada de una línea celular de un fibroma cemento-osificante humano, que codifica para una isoforma truncada de la 3-hidroxiacil-Coenzima A-deshidratasa 1 (HACD1, 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase-1) cuyo homónimo es CAP. El

gen de CAP codifica para una proteína de 140 aminoácidos de los cuales los 125 aminoácidos de la Terminal-N son idénticos a HACD1, la cual codifica para 288 aminoácidos. El resto del terminal carboxilo de CAP constituye el sitio de *splicing* donador en el exón 2 de HACD1. CAP posee dos sitios transmembranales y la proteína se trunca después del segundo sitio transmembranal. Esta truncación elimina la secuencia de HACD1 que consiste de los siguientes aminoácidos: IVHCLIGIVPT; la cual es el motivo de sitio activo de fosfatasa, el cual es sustituido por la secuencia de 15 aminoácidos VSFPSCCFSIAVIFM. CAP es entonces una isoforma de HACD1, y *splicing* alternativo y homónimo de ésta (1). Como se menciona anteriormente la CAP codifica para un producto de 140 aminoácidos y el *splicing* alternativo ocurre exactamente en el sitio activo de la HACD1, por lo que se infiere que su función puede ser diferente. Este *splicing* alternativo comprende la terminal carboxilo de la proteína: VSFPSCCFSIAVIFM. Esta secuencia es única en las bases de datos. Más importante aún, el péptido que ha sido sintetizado ha demostrado poseer propiedades únicas de utilidad biológica ya que posee alta afinidad por la hidroxiapatita y asimismo, promueve la formación de cristales de hidroxiapatita *in vitro* y su organización supramolecular (ver Fig. 2).

Aunque el ARNm HACD1 se expresa ampliamente en muchos tejidos, el ARNm de CAP/HACD1 se expresa en células cemento específicas y marginalmente solo en algunas células del ligamento periodontal (en dientes humanos) y en el espacio endosteal del hueso; no se ha encontrado expresada en los dientes de rata (149), lo que sugiere que podría haber algunas diferencias entre especies.

Esta proteína tiene una secuenciación de aminoácidos que presenta cuatro secuencias que contienen repeticiones Gly-X-Y típicas de la colágena; se sugiere que ésta proteína puede ser una proteína de adhesión colágena localizada exclusivamente en el cemento (10).

Se ha demostrado que CAP une a la hidroxiapatita con más fuerza al cemento que a la superficie de la dentina (150); también se une a la fibronectina, pero se une 150 veces más fuertemente a la hidroxiapatita que a la fibronectina (151). Al igual que CAP, la proteína CAP/HACD1 también se une a la hidroxiapatita con alta afinidad (152); éstas observaciones sugieren que ésta puede jugar un papel regulador durante la formación de cemento. También se ha demostrado que la proteína de adhesión del cemento promueve la adhesión de los fibroblastos gingivales, células endoteliales y células del músculo liso (153). Las células óseas se unen más fuertemente a CAP que las células del ligamento periodontal, que a su vez, se unen más fuertemente a la proteína adhesión del cemento en comparación con las células gingivales (300% para las células óseas, 250% para las células del ligamento periodontal y 150% para las células gingivales). CAP promueve la adhesión y diferenciación de las células osteoblásticas (18, 150, 151). La adhesión de la proteína CAP por los fibroblastos gingivales humanos está mediada principalmente por la integrina $\alpha_5\beta_1$ (154), esta integrina está implicada en diversos aspectos del desarrollo (1) y es posible que también pueda desempeñar un papel importante en la cementogénesis y neo-cementogénesis través de interacciones con la proteína CAP.

Se ha reportado que CAP posee la capacidad de unir clonas progenitoras de ligamento periodontal y que esto está directamente relacionado con la expresión de fosfatasa alcalina y la formación de tejido mineralizado. Estas características se encuentran en células derivadas de un cementoblastoma, el cual produce nódulos mineralizados (1). También se detectó una correlación directa entre la expresión de fosfatasa alcalina y la formación de tejido mineralizado en clonas con alta capacidad de unión a CAP, lo que indica que la proteína de adhesión del cemento se asocia con la formación de progenitores de mineralización de formadores de tejido mineralizado en el ligamento periodontal. Los grupos de clonas que se unen a CAP y producen tejido mineralizado similar al cemento celular, representan 7% de la población del ligamento periodontal y el 15% de los clonas pertenecientes al linaje cementoblástico formadores de tejido mineralizado (1).

CAP promueve la migración celular con mayor afinidad para las células del ligamento periodontal y del hueso alveolar, incrementa la actividad específica de la fosfatasa alcalina y promueve la condrogénesis y mineralización en células mesenquimatosas, es decir, induce la diferenciación celular (155). También se ha demostrado que fibroblastos tratados con BMP-2 expresan CAP y ALP, por lo que BMP-2 puede reclutar progenitores e inducir la diferenciación celular por medio de la expresión de moléculas específicas de cemento radicular (11, 156). Las vías de señalización involucradas que se han identificado y se propone que participan en la proliferación y diferenciación celular son la vía de Smad-1 (vía canónica de señalización de BMP) y MAPK (157, 158).

PÉPTIDOS

Los péptidos son un tipo de moléculas formadas por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Los péptidos, al igual que las proteínas, están presentes en la naturaleza y son responsables de un gran número de funciones, muchas de las cuales todavía no se conocen. La unión de un bajo número de aminoácidos da lugar a un péptido, y si el número es mayor de 50 aminoácidos (aproximadamente) se considera una proteína. Los péptidos se diferencian de las proteínas en que son más pequeños (tienen menos de diez mil o doce mil daltons de masa) y que las proteínas pueden estar formadas por la unión de varios polipéptidos, tampoco poseen estructura tridimensional, pueden cumplir funciones como estimular, regular o inhibir numerosas funciones biológicas; pueden actuar como transmisores de información y coordinar distintas actividades en varios tejidos. Se han encontrado presentes en células o en fluidos del cuerpo en cantidades pequeñas, por lo cual, se consideran como posibles agentes terapéuticos (19).

En este sentido, los péptidos sintéticos han sido desarrollados con el interés de fabricar un biomaterial osteoconductor. Los péptidos ofrecen grandes ventajas como: mayor estabilidad (evita tecnología de proteínas recombinantes), tienen secuencias cortas de aminoácidos, capacidad de incorporarlos a altas concentraciones en comparación a las proteínas completas, tolerancia por sujetos (mamíferos), desempeñan un papel similar a la proteína nativa, son fáciles de sintetizar artificialmente, tienen bajo costo de producción por lo que se pueden producir a gran escala, no producen efectos adversos como: sobrecrecimiento óseo, calcificaciones en vasos sanguíneos, hematomas idiopáticos, presión en troncos nerviosos o tractos intestinales, reacción o rechazo inmunológico; también pueden modificar respuestas celulares, desencadenar vías de transducción de señales, señales mitogénicas y de diferenciación celular, entre otros procesos. Por tal motivo, los péptidos son ampliamente utilizados en ingeniería de tejidos mineralizados (capas cemento-miméticas), biomineralización (incrementar las funciones de los osteoblastos), diagnóstico (oncológico y Alzheimer), diferenciación (células madre neuronales y cardiomiocitos), inmunología (modificar la respuesta inflamatoria, activar mecanismos de reacción inmunitaria) y transducción de señales (modificar vías de señalización).

En estudios realizados previamente, los resultados han demostrado la actividad biológica de los péptidos **pHACD1/CAP (AVIFM, 5 aa)** y **pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRCSTSN, 20 aa)** en la nucleación de cristales de hidroxapatita en un sistema libre de células (**promueve el depósito de iones de calcio y fosfato**) y los hallazgos *in vivo* también nos indican claramente que estos péptidos poseen un potencial terapéutico muy importante para la regeneración ósea y el tratamiento de la osteoporosis [**controla el autoensamble del proceso de mineralización *in vivo* e *in vitro* promueven la proliferación y diferenciación celular de células derivadas del mesénquima hacia fenotipos osteoblásticos y condroblásticos**] (ver Fig. 3).

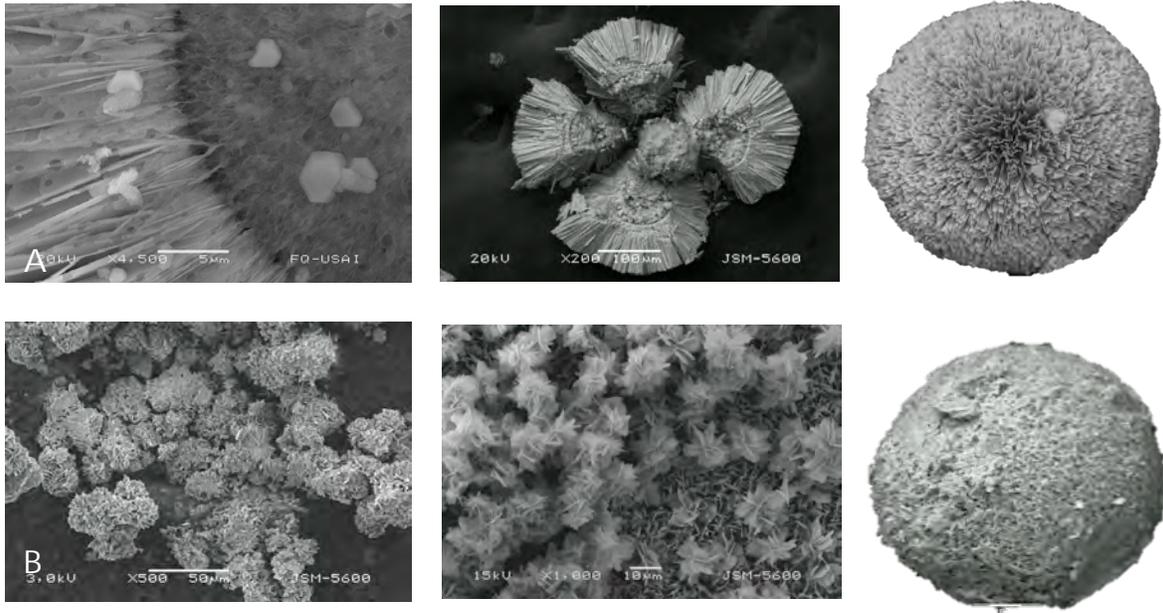


Figura 3. A. pHACD1/CAP Las imágenes de SEM (microscopía electrónica de barrido), muestran formaciones cristalinas laminares que crecen a partir de un núcleo agrupadas en esférulas. El tamaño de las esférulas es variable, obteniendo un promedio cercano a los 160 μm . **B.** Imágenes de SEM del péptido pCEMP1. Cristales de hidroxiapatita inducidos en un sistema libre de células en presencia del péptido. Se observa la formación de microsferas y disposición de los cristales en forma de hojuelas y cristales poliédricos.

En los análisis de EDS (espectroscopía por dispersión de energía de rayos X), los resultados de las muestras de ambos péptidos indican que los cristales inducidos con el péptido de **pHACD1/CAP** y **pCEMP1**, tienen una alta cantidad de fosfato de calcio, con relación estequiométrica de Ca/P 1.62 (ver Fig. 4).

Las imágenes tridimensionales de AFM (microscopía de fuerza atómica) muestran topografía cristalina irregular, el crecimiento de los cristales se observa de forma paralela y prismática, el tamaño de los prismas alcanzan 1.5 μm . La observación en alta resolución con microscopía de fuerza atómica de los cristales de hidroxiapatita son resultado del efecto biológico del péptido **pHACD1/CAP** (ver Fig. 5).

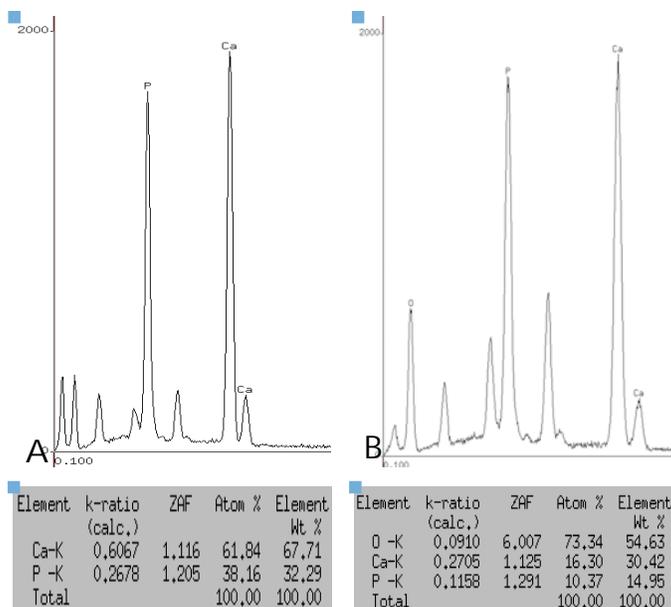


Figura 4. Espectro de energía dispersa de rayos X (EDS), de los cristales de hidroxiapatita formados en presencia del péptido **pHACD1/CAP** (A) y **pCEMP1** (B). La relación Ca/P 1.62 corresponde a hidroxiapatita de tipo biológico.

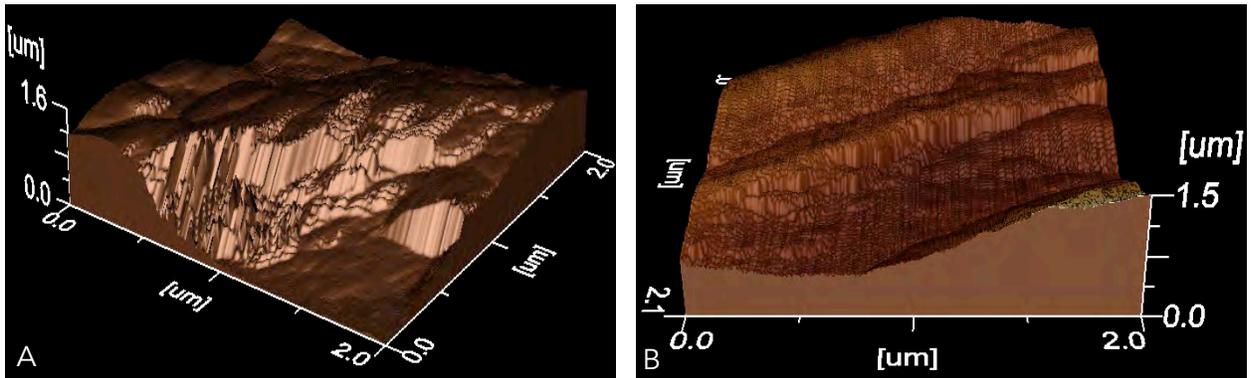


Figura 5. Los cristales de hidroxiapatita muestran un agrupamiento ordenado en forma de prismas de los péptidos pHACD1/CAP (A) y pCEMP1 (B)

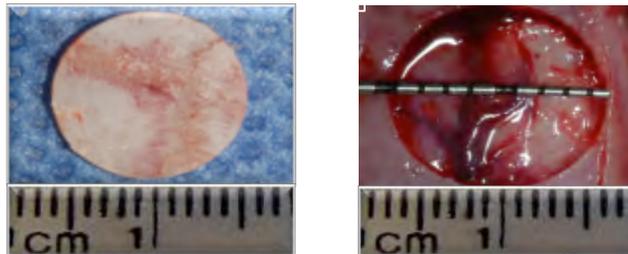


Figura 6. Estudio experimental en ratas Wistar en defectos de tamaño crítico en calvaria.

En un estudio experimental se comprobó la actividad biológica mineralizante de ambos péptidos, donde se demostró que ambos péptidos promueven la regeneración ósea *in vivo* en ratas Wistar en defectos de tamaño crítico en calvaria [9mm] (ver Fig. 6-8).

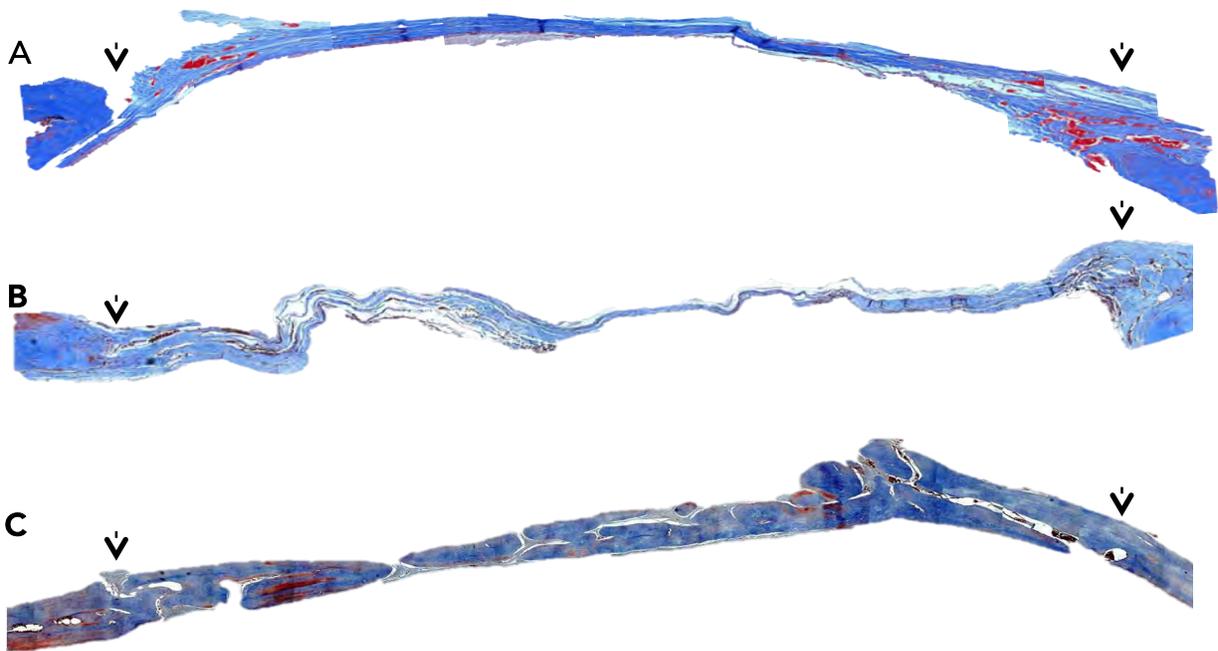


Figura 7. Reconstrucciones de fotomicrografías de cortes histológicos teñidos con Tricrómica de Masson, tomados a 20x. Estudio experimental en ratas Wistar, el péptido de pCEMP1. **A.** Péptido 60 µg/disco (3D matriz de gelatina con péptido pCEMP1), se observa neoformación ósea en la brecha del defecto en calvaria. **B.** Control (3D matriz de gelatina), nótese el tejido conectivo no mineralizado. **C.** Defecto regenerado con

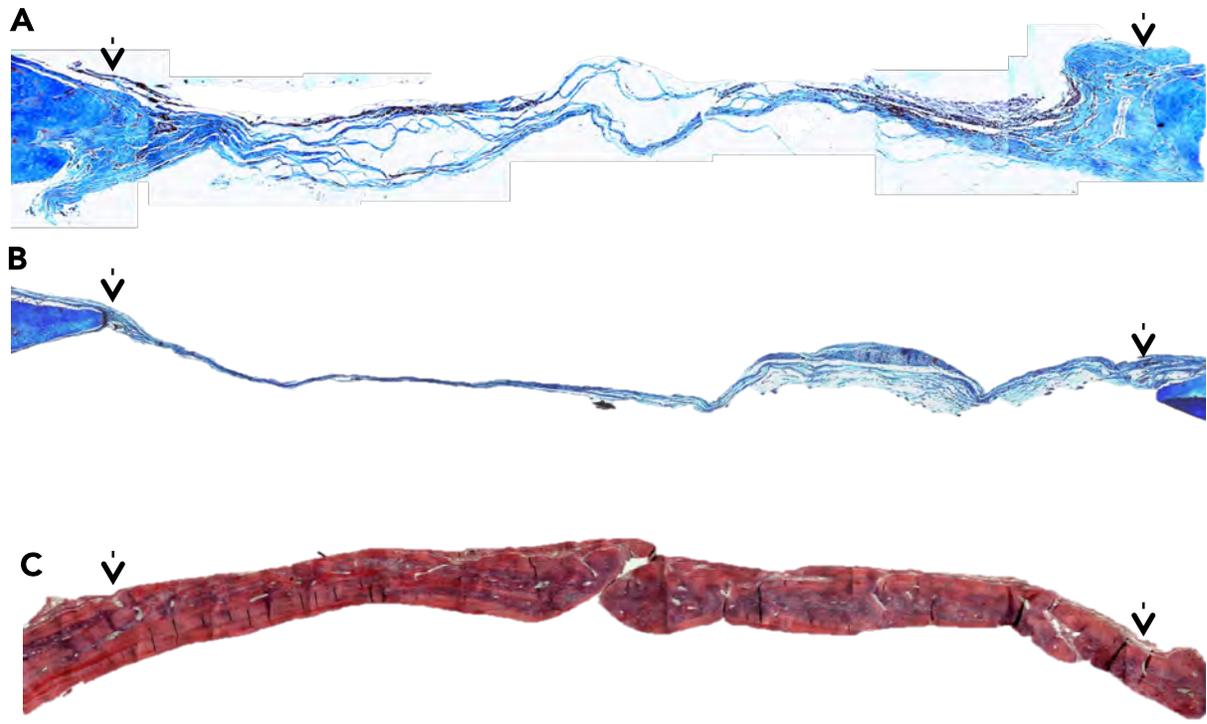


Figura 8. Reconstrucciones de fotomicrografías de cortes histológicos teñidos con Tricrómica de Masson, tomados a 20x. Estudio experimental en ratas Wistar, el péptido de pHACD1/CAP. **A.** Péptido 60 µg/disco (3D matriz de gelatina con péptido pCAP), se observa neoformación ósea en la brecha del defecto en calvaria. **B.** Control (3D matriz de gelatina), nótese el tejido conectivo no mineralizado. **C.** Defecto regenerado con control a 12 meses; después de 1 año: el péptido no promueve sobrecrecimiento óseo.

El péptido de pHACD1/CAP también ha sido probado experimentalmente en el tratamiento de fracturas segmentales de tamaño crítico en tibia de conejo Nueva Zelanda. En las microtomografías se observó una regeneración ósea en casi toda la longitud del segmento osteotomizado [70%] (ver Fig. 9).

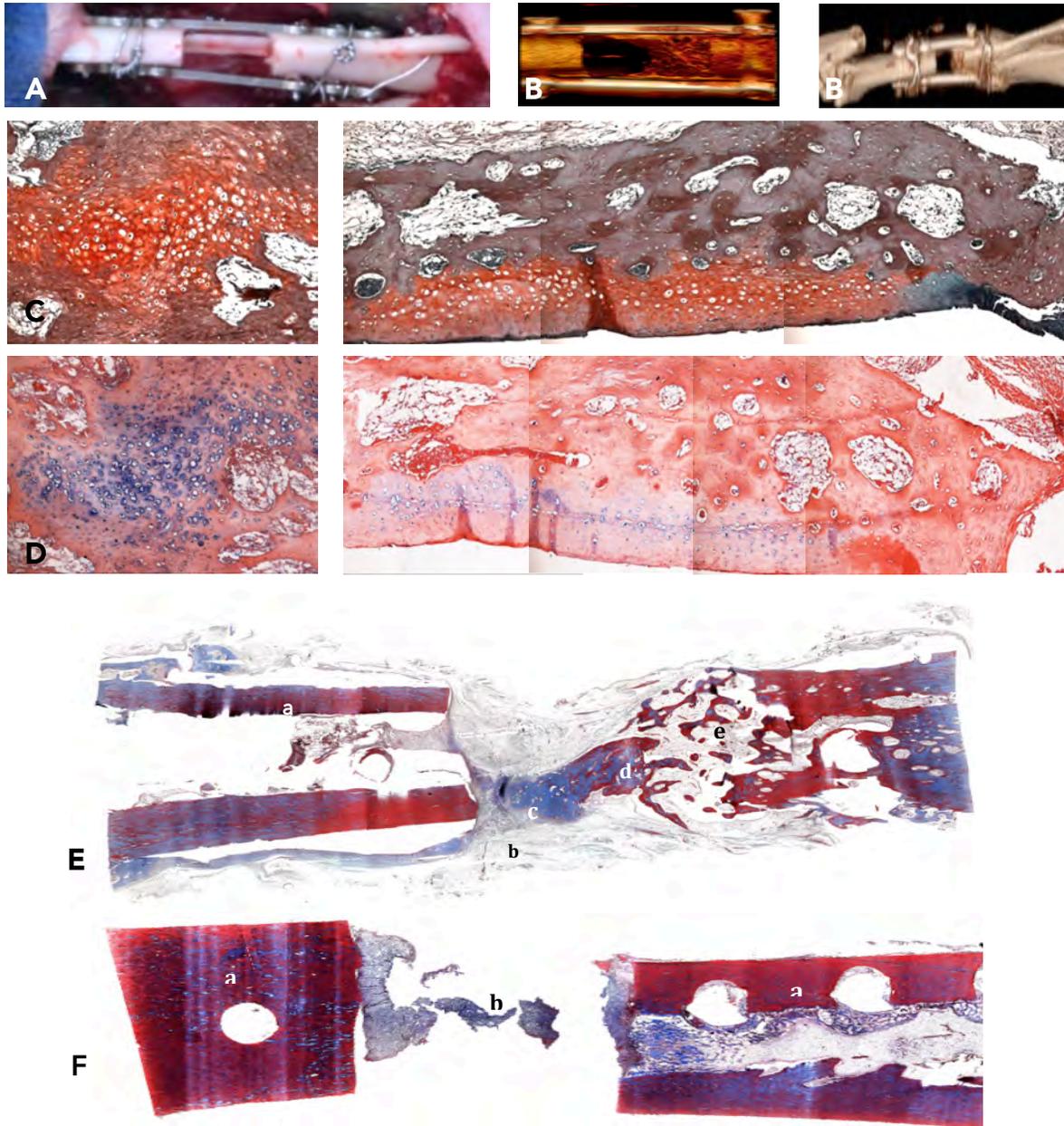


Figura 9. A, Fotografía clínica del defecto segmental de la tibia del conejo. B, Reconstrucción tridimensional de las etapas iniciales de la regeneración ósea. C, Reconstrucciones de fotomicrografías de cortes histológicos teñidos con azul de alciano, tomados a 20x, donde se observa hueso neoformado, nótese las glicoproteínas hacia fenotipo condroblástico teñidas de color azul. D, Reconstrucciones de fotomicrografías de cortes histológicos teñidos con safranina O, tomados a 20x, obsérvese el tejido mineralizado y los condroblastos teñidos. E, Reconstrucciones de fotomicrografías de cortes histológicos teñidos con tricrómica de Masson, tomados a 20x, de conejo tratado con el pCAP. Se observa un fragmento de hueso vital, el cual presenta diversas áreas de calcificación, el hueso cortical y trabecular es vital (a), presenta hacia el centro del corte una extensa zona de fibras de colágena dispuestas en forma condensada (b), se observa también una zona de cartílago vital el cual está activo y está generando calcificación ósea de tipo endocondral (c). Estas áreas se encuentran entremezcladas con áreas de tejido hematopoyético correspondiente a médula amarilla y en menor grado roja (d); dispuesto todo sobre una matriz de tejido conjuntivo fibroso denso y laxo bien vascularizado (e). F, Reconstrucciones de fotomicrografías de cortes histológicos teñidos con tricrómica de Masson, tomados a 20x, de conejo sin el tratamiento del péptido pCAP. Se observan dos fragmentos de tejido óseo compuesto por hueso cortical y trabecular vital entremezclados con áreas de médula amarilla (a). En el centro se observa un área de hemorragia mezclada con plasma.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La osteoporosis se caracteriza por la disminución en la masa ósea y el deterioro microarquitectónico del tejido óseo con la consecuente fragilidad ósea y la subsiguiente susceptibilidad a fracturas vertebrales, de cadera y muñeca. El equilibrio homeostático entre la formación de hueso y la resorción ósea, determina la masa y la integridad estructural del esqueleto, lo cual se ve afectado durante el proceso de la osteoporosis. La incidencia de las fracturas secundarias a osteopenia y/u osteoporosis va en incremento; por lo tanto, estos padecimientos óseos representan un problema de salud pública a nivel mundial (2).

Algunas alternativas terapéuticas actuales para el tratamiento de la osteoporosis, disminuyen el riesgo de fracturas osteoporóticas, reduciendo la resorción ósea y preservando su arquitectura, pero no estimulan la formación ósea, por lo tanto, también se requieren medicamentos que curen por medio de deposición de tejido mineral óseo y regeneración tisular ósea. También, varias de esos tratamientos farmacológicos presentan efectos secundarios deletéreos para el organismo humano que van desde padecimientos gastrointestinales, mareos, tinitus, epistaxis, dolores músculoesqueléticos, osteonecrosis, hasta osteosarcomas y cáncer de mama y endometrial (64-69, 75).

Para corregir las alteraciones que las entidades patológicas causan sobre el sistema esquelético, se requiere de tratamientos farmacológicos para prevenir y regenerar las estructuras óseas. Los péptidos sintetizados artificialmente promueven la síntesis de hidroxiapatita y generan señales osteoinductivas, por lo que se constituyen una alternativa de uno de los elementos fundamentales para contribuir a la deposición de tejido mineral óseo y a la regeneración tisular ósea y en general para el desarrollo de tecnologías en el campo de la ingeniería de tejido mineral óseo. Con base en esto, nos planteamos el problema: ¿Se incrementará la densidad mineral ósea del hueso osteoporótico del fémur y de la cuarta vértebra lumbar de las ratas Wistar, administrando intraperitonealmente (IP) los péptidos sintéticos derivados de la proteína de adhesión del cemento radicular (pHACD1/CAP) y de la proteína del cemento 1 (pCEMP1) durante 12 semanas ininterrumpidas, en comparación con el fémur y la cuarta vértebra lumbar de los animales sanos (control)?

JUSTIFICACIÓN

Debido al crecimiento de la población adulta y al potencial incremento en el número de pacientes con osteoporosis, es necesario establecer terapéuticas para la prevención y tratamiento de este problema (2).

Las alternativas terapéuticas actuales para el tratamiento de la osteoporosis, con la excepción de la hormona paratiroidea, disminuyen el riesgo de fracturas osteoporóticas, reduciendo la resorción ósea y preservando su arquitectura, pero no estimulan la formación ósea y la mayoría de los tratamientos son costosos o presentan efectos secundarios severos (159). Es por eso que se requiere de la fabricación de fármacos que sean económicos y que no presenten efectos secundarios en comparación a los tratamientos comerciales. Con el advenimiento de la ingeniería tisular, se abre una nueva opción para la regeneración ósea; uniendo los conocimientos de biología celular, ingeniería biomecánica, biomateriales y ortopedia. Las nuevas tecnologías terapéuticas de la ingeniería tisular, inducen la regeneración y/o remineralización ósea empleando péptidos sintéticos, factores de crecimiento, células osteogénicas, membranas biocompatibles o la combinación de estas medidas terapéuticas (148).

Los péptidos pueden modificar respuestas celulares y desencadenar vías de transducción de señales y se ha comprobado que inducen la remineralización ósea, lo cual es de suma importancia para la

utilización clínica en osteoporosis, debido a que poseen un alto potencial osteogénico, no son inmunogénicos, son fáciles de obtener y de manejar y no precisan costos elevados. Los péptidos representan una opción viable para diversos padecimientos debido a que HACD1/CAP (**AVIFM**) y CEMP1 (**MGTSSTDSQQAGHRRRCSTSN**) han sido sintetizados, caracterizados y han demostrado poseer propiedades únicas de utilidad biológica ya que poseen alta afinidad por la hidroxiapatita y asimismo, promueven la formación de cristales de hidroxiapatita *in vitro* y promueven la regeneración ósea *in vivo* (18). De tal forma que esto nos permitirá entender en el futuro mediano de un modo específico, los mecanismos celulares y moleculares regulados por estos factores durante el proceso de biomineralización; esta contribución original adicionará conocimiento novel en el área de la biología de los tejidos mineralizados y permitiría el diseño de terapéuticas predecibles para la regeneración de tejidos mineralizados particularmente enfocado en el tratamiento y prevención de la osteoporosis (18, 148, 160).

HIPÓTESIS

- ✓ Los péptidos pHACD1/CAP y pCEMP1 son inductores del proceso de mineralización e incrementan la densidad mineral ósea en un modelo de rata osteoporótica inducida (OVX), en comparación con el modelo de rata Wistar sana

H1: Los péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRRRCSTSN, 40 y 80 µg/kg) son inductores del proceso de mineralización e incrementan la densidad mineral ósea (DMO) en las ratas ovariectomizadas en comparación con las ratas sanas

H2: Los péptidos sintéticos pHACD1/CAP y pCEMP1 incrementan la resistencia a la compresión de la quinta vértebra lumbar de las ratas ovariectomizadas tratadas con los péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRRRCSTSN, 40 y 80 µg/kg) en comparación con el modelo de rata sana

H3: No existen cambios histológicos en los tejidos blandos (cerebro, corazón, pulmones, bazo, hígado, riñones); si hay cambios en el tejido óseo de la cuarta vértebra lumbar de los animales tratados con los péptidos pHACD1/CAP y pCEMP1

H4: Los niveles de biomarcadores serológicos en ratas con ovariectomía tratadas con los péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRRRCSTSN, 40 y 80 µg/kg), son similares a los del modelo de rata sana

H5: La utilización de los péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRRRCSTSN, 40 y 80 µg/kg) promueven la proliferación celular

H6: Hay expresión de marcadores relacionados a mineralización ósea en osteoblastos humanos tratados con los péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRRRCSTSN, 40 y 80 µg/kg)

OBJETIVOS

Objetivo general

- ✓ Determinar si los péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRRRCSTSN, 40 y 80 µg/kg) actúan en la corrección del estado osteoporótico en ratas Wistar ovariectomizadas durante 12 semanas de tratamiento terapéutico intraperitoneal ininterrumpido e identificar cuál de las tres dosis es la más efectiva para dicha corrección

Objetivos específicos

1. Determinar si la administración intraperitoneal (IP) de los péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRCSTSN, 40 y 80 µg/kg) **incrementan la densidad mineral ósea (DMO)** medida en: espesor, espacio y número trabecular, medido en la cabeza del fémur derecho y en la cuarta vértebra lumbar en ratas ovariectomizadas (OVX)
2. Determinar si la administración de los péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRCSTSN, 40 y 80 µg/kg) proporcionan una **resistencia a la compresión** igual o mayor al hueso sano de la quinta vértebra lumbar (expresada en Newtons)
3. Identificar si al término de la administración de los tratamientos [péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRCSTSN, 40 y 80 µg/kg)] existen **cambios histológicos** (calcificaciones y/o inflamación aguda/crónica) en: cerebro, corazón, pulmones, bazo, hígado, riñones, fémur y cuarta vértebra lumbar
4. Determinar si la administración de los péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRCSTSN, 40 y 80 µg/kg) normalizan los niveles de **biomarcadores serológicos** de osteocalcina (OCN), fosfatasa alcalina (ALP), osteoprotegerina (OPG) y ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKLβ) en ratas Wistar ovariectomizadas (OVX) en comparación con el modelo de rata sana
5. Identificar si la utilización de los péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRCSTSN, 40 y 80 µg/kg) son **citotóxicos**
6. Determinar si existe **expresión** de diferentes **marcadores** relacionados a mineralización ósea [ALP, BSP, CBFA1 (subunidad alfa-1 del factor de unión al núcleo), OCN y COL 1 (colágena 1)] en osteoblastos humanos tratados con los péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRCSTSN, 40 y 80 µg/kg)

METODOLOGÍA

Diseño. Estudio experimental; número de muestras a estudiar: 25 animales; 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. Ratas cepa Wistar, de 4 meses de edad, 250 ± 20 gr de peso, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales estuvieron en resguardo 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* (161).

Tamaño de la muestra. La muestra total fue de 25 animales (N=25 ratas). Se conformaron 5 grupos, cada uno constituido por 5 animales (n=5).

Asignación de casos. La asignación de los casos fue aleatoria; todos los animales fueron obtenidos en un solo evento. Los animales fueron aclimatados durante siete días de estancia en el bioterio de la DEPeI; después del periodo de adaptación, las ratas fueron distribuidas al azar en cada brazo del estudio (cinco grupos). El objetivo fue conseguir que los diferentes grupos fueran comparables y homogéneos, para evitar sesgos en la asignación de casos a los grupos y garantizar que las pruebas estadísticas tuvieran valores de significación estadística válidos. La asignación se realizó con una tabla de números aleatorios diseñada para producir secuencias de números sin un orden aparente [oculto al investigador] (ver Fig. 10).

Constitución de grupos. Se constituyeron 5 grupos, cada uno constituido por 5 animales (N=25 ratas):

- Grupo 1 (n=5) experimental. pCEMP1, 40 µg/kg.
- Grupo 2 (n=5) experimental. pCEMP1, 80 µg/kg.

- Grupo 3 (n=5) experimental. pHACD1/CAP, 20 µg/kg.
- Grupo 4 (n=5) control 1. Osteoporosis (OVX).
- Grupo 5 (n=5) control 2. Sanas (control)

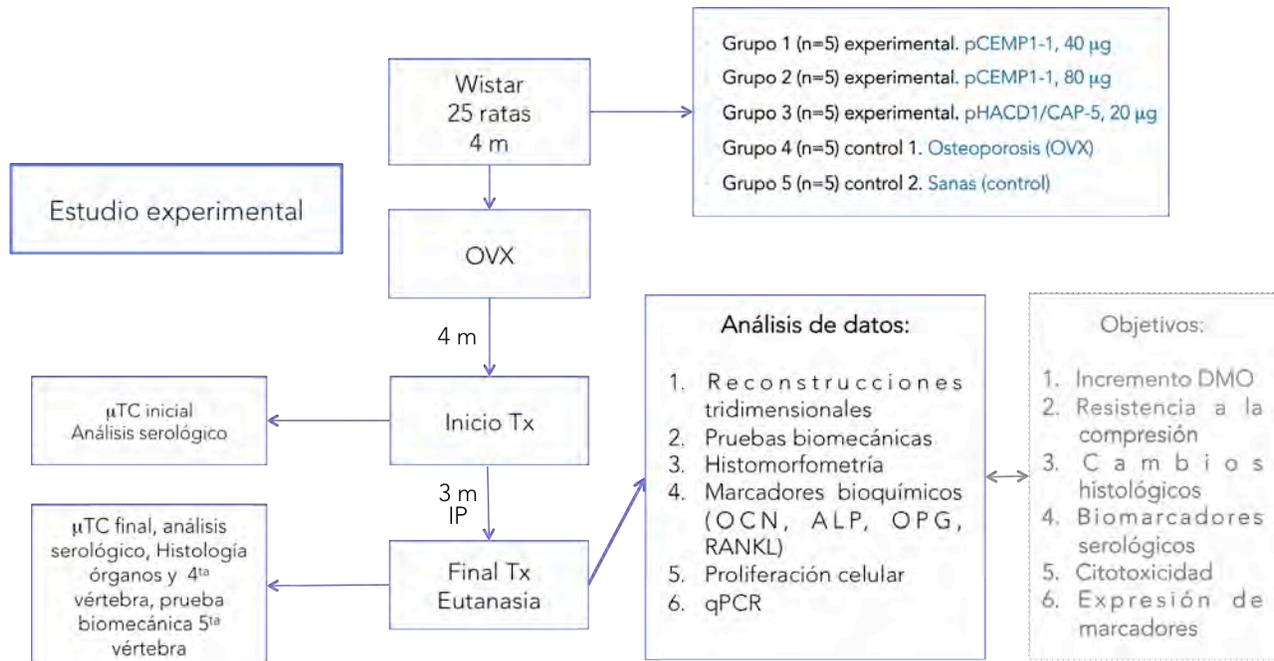


Figura 10. Flujograma de estudio experimental

Plan de trabajo

Se obtuvieron 25 animales del bioterio de la Facultad de Medicina, se aclimataron durante 7 días en el bioterio de la Facultad de Odontología. Se recolectó la sangre y se adquirieron las microtomografías (INCan) de las 25 ratas. Se realizaron 20 ovariectomías y después de 4 meses de desarrollo de la osteoporosis, se volvió a recolectar la sangre y las microtomografías [llamado "tiempo inicial"] para comprobar el estado osteoporótico de los animales. Pasados estos 4 meses (post ovariectomía), se inyectaron intraperitonealmente las 15 ratas durante 12 semanas ininterrumpidas. Terminados los 3 meses, se efectuaron las eutanasias de los 25 animales para realizarles todos los análisis [llamado "tiempo final"] (ver Fig. 10).

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 (virus, hongos, bacterias), 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.

Definición de variables

Variable independiente	Variable dependiente					
Péptido sintético pCEMP1 (MGTSSSTDSQQA GHRRRCSTSN)	DMO	Prueba biomecánica	Histomorfometría	ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)	Citotoxicidad	qRT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa reversa en tiempo real)
	Número Grosor Espacio	Resistencia a la compresión Módulo elástico	Regeneración ósea Alteraciones tisulares	Biomarcadores serológicos	Proliferación celular	Expresión de marcadores mineralizantes
Péptido sintético pHACD1/CAP (AVIFM)	Escala de medición					
	Unidades Hounsfield (UH)	N/mm ²	µm ²	µg/ml	Absorbancia a 570 (A ₅₇₀)	Cuantificación relativa (QR)

Análisis estadístico de datos. El análisis estadístico de datos se realizó mediante una prueba de homogeneidad de varianza; si ésta demostró homogeneidad, entonces se realizó Análisis de Varianza; si no hubo homogeneidad de varianza se usó estadística no paramétrica. El nivel de significancia para rechazar la hipótesis nula (H₀) fue de p<0.05. La proliferación y las pruebas serológicas, así como el PCR respecto a los tratamientos con ambos péptidos sintéticos (pHACD1/CAP y pCEMP) o ambos factores respecto a sus controles, fueron evaluados con una prueba de ANOVA de medidas repetidas de una vía para determinar la variabilidad y llevar a cabo la prueba de Tukey para determinar la significancia estadística a nivel de confianza de p<0.05. Los datos para el análisis histomorfométrico fueron analizados estadísticamente por medio de la prueba exacta de Fisher (2x2) para comparar los grupos experimentales y control. Se utilizó el programa Sigma Stat (V 9.0 /Jandel Scientific).

Consideraciones éticas. Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con 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: Aprobado CIE/06/19/03/2014 (ver apéndice C).

Métodos - Descripción de procedimientos:

Producción del péptido

El péptido sintético **AVIFM** con una pureza del 95% que representa la terminal carboxilo de la proteína de adhesión del cemento radicular humano (pHACD1/CAP) y el péptido **MGTSSSTDSQQA GHRRRCSTSN** con una pureza del 95% que representa la terminal amino de la proteína del cemento 1 (pCEMP1), se sintetizaron por el método convencional FMOC/tBu en síntesis de fase sólida (producción comercial se solicitó a Invitrogen, Carlsbad, USA).

Marcaje directo del péptido pHACD1/CAP y pCEMP para el estudio de su biodistribución

Con el objeto de conocer los órganos blanco de los péptidos y su posible acúmulo o su total eliminación del organismo, se ha determinado en estudios previos, la biodistribución de los péptidos AVIFM y MGTSSSTDSQQAGHRRRCSTSN. Para evaluar la biodistribución que presentan los péptidos pHACD1/CAP y pCEMP es necesario marcarlos con un material radiactivo, para tal objeto, primero se analizaron las estructuras de los péptidos y se utilizó el radionúclido tecnecio 99 metestable (Tc^{99m}), ya que al hacer una reducción química y llegar a su estado de oxidación +V (el cual es el más estable), se puede unir a las cisteínas que presentan los péptidos; unas de las características que presenta el tecnecio es que es un emisor gamma, con un tiempo de vida media de 6 horas y fácilmente detectable con una energía de 140 keV. El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Cancerología, Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular micro PET, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, UNAM, Dra. Janet Serrano Bello y Dr. Luis Alberto Medina.

Marcaje del péptido

Los péptidos se marcaron por medio de la técnica de marcaje directo, utilizando el tecnecio en forma de pertecnecato (TcO_4^-), con el objeto de afectar lo menos posible los dobles enlaces que presentan los péptidos. Para tal situación se ajustan las cantidades del agente reductor ($SnCl_2$ necesario para el marcaje con TcO_4^-) al mínimo nivel, sin afectar el rendimiento del marcado. Para realizar el marcaje se preparó la solución de trabajo, conteniendo los péptidos, 50 μ l de tartrato (2 mg/ml de buffer de acetato pH5), 10 μ l de $SnCl_2$ (2mg/ml HCL 0.1 N), 50 μ l de ácido gentísico (1mg/ml) y 50 μ l de $^{99m}Tc-NaTcO_4^-$ (5 mCi). Ulteriormente, se colocó el vial con dicha solución en un sonicador a 80°C durante 10 minutos.

Pureza radioquímica

La pureza radioquímica de la solución de trabajo se determinó mediante cromatografías ascendentes de papel, utilizando como fase estacionaria papel cromatográfico Whatmann 3 MM y como fases móviles: 1) solución salina fisiológica 0.9% -sistema para determinar la eficiencia de marcaje de los péptidos- y 2) metiletilcetona, MEC -sistema para cuantificar la cantidad de Tc-99m libre-.

Estabilidad

La estabilidad *in vitro*, del radioconjugado se evaluó agregando 50 μ l del radiopreparado a 450 μ l de suero humano incubándolo a 37 °C a diferentes tiempos post marcaje (0, 1 h, 3 h, 6 h y 24 h), utilizando cromatografía ascendente de papel.

Biodistribución

La biodistribución se evaluó de dos maneras, la tradicional y por imagen, esto para correlacionar los resultados y en un futuro utilizar únicamente imágenes. Para evaluar la biodistribución de manera tradicional, se formaron grupos de tres ratas a las cuales se les inyectó de manera intraperitoneal 40 μ l de los péptidos marcados, las cuales se sacrificaron con sobredosis de anestésico secuencialmente a 1, 3, 6 y 24 horas. Se colectaron muestras de sangre, corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones, estomago, intestino delgado, intestino grueso, músculo, hueso y tiroides. Dichos órganos se pesaron en una balanza analítica y posteriormente se contaron en un contador de centelleo sólido de NaI (TI) para detectar la actividad de cada uno de los órganos. Con lo anterior se obtuvo el porcentaje de la dosis inyectada por gramos de tejido (%DI/g). Los estudios de biodistribución por imagen se evaluaron de igual manera en ratas Wistar a las cuales se les administró 40 μ l de los péptidos marcados con 3 mCi de ^{99m}Tc a cada animal, por vía intraperitoneal. Posteriormente se realizó SPECT/CT en un sistema de imagen Albira μ PET/SPECT/CT a diferentes tiempos (1, 3, 6 y 24 horas) después de la inyección. Los parámetros de adquisición para el SPECT a utilizar fueron: SPECT 3D, FOV 80, PH 10 s para 1h, 20 s para 3h, 30 s para 6h y 60 s para 24 h. Los parámetros utilizados para el μ CT son: CT Best HD-HV. Posterior a la adquisición de cada una de las imágenes, se adquirió un estándar, es decir, se colocó una

actividad conocida en un tubo eppendorf y se realizó un SPECT con los mismos parámetros de adquisición de la imagen de la rata, con la finalidad de poder realizar un análisis de la actividad que se presenta en cada uno de los órganos. Por otro lado para saber si el péptido sigue unido al tecnecio, se recolectaron muestras de sangre, las cuales se pesaron y midieron. Posteriormente se centrifugaron para extraer el suero, con el cual se realizó un estudio de precipitación de proteínas y con esto se descartó que la actividad encontrada en sangre era producto del tecnecio libre: para ello se tomaron 50 µl del suero de cada animal y se diluyeron en 200 µl de albumina de suero bovino (BSA) al 4% y 250 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se incubaron por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugaron durante 15 minutos a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y se midió el precipitado en un contador de pozo de centelleo sólido de NaI (TI).

Generación del modelo osteoporótico en ratas wistar

Las ratas fueron sedadas y tranquilizadas con Zolazepam (20-40 mg/kg) y Maleato de acepromacina (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 (mepicavacaína 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. Suavemente se pinza la grasa que rodea a 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. Terminado el acto quirúrgico, se procede a realizar los mismos pasos de lado contralateral. Las ratas fueron medicadas con analgesia y antibiotioterapia postquirúrgica. Los animales fueron asignados a cada una de las diferentes condiciones previamente referidas (161).

Muestras serológicas

Todas las muestras sanguíneas se obtienen del plexo venoso retroorbital. Con el dedo índice, se empuja el tubo capilar (pipeta) insertándolo 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 coleccionar el suero.

Preparación de los péptidos

El péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular pHACD1/CAP5 (AVIFM) se diluyó en 20 microgramos por un mililitro de solución salina fisiológica. El péptido derivado de la proteína del cemento 1 pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRCSTSN) se diluyó en 40 y 80 microgramos por un mililitro (respectivamente) de solución salina fisiológica. Los péptidos se prepararon semanalmente, todos se filtraron y se organizaron en la campana UV, posteriormente se almacenaron bajo refrigeración a 4 °C.

Administración intraperitoneal

Para realizar esta administración, la aguja debe entrar en la piel en un ángulo de 20 a 45 °. Con el objetivo de que la inyección no perfora el intestino o la vejiga urinaria, es esencial insertar sólo la punta de la cánula en la cavidad peritoneal (162). Las sustancias administradas por esta vía se absorben primero en la circulación portal. La biotransformación de las sustancias inyectadas puede tener lugar en el hígado antes de alcanzar la circulación general, de modo que su biodisponibilidad es muy diferente a la de una inyección intravenosa. Las inyecciones intraperitoneales se llevaron a cabo sin anestesia y en el cuadrante inferior izquierdo del abdomen [en esta zona de la rata no hay órganos vitales, excepto el intestino delgado] (162).

Procedimiento terapéutico

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 (76). Inicialmente se pesaron, se adquirieron las microtomografías y se obtuvieron las muestras sanguíneas. Posterior a las pruebas de gabinete y laboratorio, a todas las ratas (20 ratas) se les realizó la ovariectomía bilateral (OVX) bajo sedación e infiltración local. Después de cuatro meses de realizada la ovariectomía bilateral, se corrobora microtomográficamente la osteoporosis de las hembras para poder iniciar el plan terapéutico con los péptidos. Los tratamientos fueron administrados rutinariamente de forma intraperitoneal durante 12 semanas ininterrumpidas (a la misma hora, 13 hrs) Los estudios de laboratorio (extracción de sangre para obtener mediciones de osteocalcina, fosfatasa alcalina y calcio) y gabinete (microtomografía) fueron repetidos al inicio y al final del tratamiento (semana 0 y 12 post ovariectomía) para evaluar la densidad mineral ósea (grosor, espacio y número trabecular). La eutanasia se realizó sin dolor y siguiendo lo establecido por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología. Después de la necropsia se recolectará: fémur derecho e izquierdo, columna vertebral, pulmones, corazón, bazo, estómago, riñones, hígado y cerebro. El fémur izquierdo y la vértebra lumbar número cinco fueron utilizados para análisis de fuerza compresiva. Los órganos fueron incluidos para su análisis histológico e histomorfométrico. El fémur derecho y la vértebra lumbar número cuatro fueron analizados en el microtomógrafo y ulteriormente se analizaron histomorfométricamente. Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas para separar el suero/plasma y posteriormente realizarle los estudios serológicos correspondientes. Los procedimientos siguieron los fundamentos establecidos por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología, UNAM (25).

Eutanasia

Las eutanasias se llevaron a cabo (al término del periodo de 12 semanas), 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 (161).

Microtomografía computarizada (μ TC)

Para evaluar la densidad mineral ósea (DMO) se adquirieron las microtomografías en el μ PET, μ SPECT, μ CT (Albira®, Oncovision, España) en el Instituto Nacional de Cancerología, Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular micro PET, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, UNAM, Dra. Janet Serrano Bello y Dr. Luis Alberto Medina. Se tomaron las microtomografías de 3 animales por grupo (al inicio y final del tratamiento). Se evaluó la densidad ósea de la cuarta vértebra lumbar y el fémur, la medida del escaneo es de 4 x 4 cm a una velocidad de 5 mm/seg y una resolución de 0.2 x 0.2 mm. El análisis volumétrico 3D del fémur y de la vértebra se llevó a cabo incluyendo el extremo proximal que se extendió aproximadamente 7 mm en sentido distal y paralelo a la placa de crecimiento (163). La medición se inicia en este punto y seguido distalmente a 350 cortes de análisis (20 μ m de espesor). El área osteoide y mineralizada neoformada como efecto de los tratamientos, se normalizaron a los valores de un hueso sano (164). Los resultados se analizaron utilizando el programa AxioVisionLE 4.3.6 Software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). La reconstrucción de las imágenes 3D se realizó a máxima intensidad de proyecciones con el propio software del equipo Albira, utilizando el método de retroproyección filtrada [FBP] (24, 27, 165).

El análisis se basó en la evaluación de la DMO de la cuarta vértebra lumbar y del fémur, a partir de la determinación del coeficiente de atenuación de rayos X, para describir los diferentes niveles de radiodensidad, y está expresado en unidades Hounsfield (HU). Los valores del contenido de hidroxapatita

(HA) están dados en un *Phantom* estándar con diferentes niveles de concentración de HA que se compararon con los valores obtenidos de las muestras. Se identificó una región de interés (ROI) de 1 mm³ entre la diáfisis y metáfisis de las áreas corticales del fémur y en la región central del hueso cortical del cuerpo de la vértebra. Los resultados de la DMO se muestran en valores porcentuales tomando como referencia el grupo control sano (100%). Los porcentajes de cada grupo se obtuvieron por medio de una regla de tres (24). Para evaluar la neoformación ósea se midió la intensidad ósea de las im

Histología e histomorfometría

Los especímenes (muestras óseas: cuarta vértebra lumbar y fémur; tejidos blandos: hígado, riñón, corazón, pulmón, cerebro y bazo) se fijaron en formaldehído al 10% por 48hrs. Para las muestras óseas, después del formaldehído, se colocaron en una solución de EDTA al 10% durante 4 semanas para su descalcificación (se cambió el EDTA cada semana). Posteriormente, las muestras se clarificaron con xileno y se embebieron en parafina para la realización de cortes secuenciales (espesor 5 µm), los cuales fueron teñidos con Tricrómica de Masson (TM) para la histomorfometría y para el análisis histológico. Se tomaron fotomicrografías del cuello y el cóndilo del fémur y de la cuarta vértebra lumbar con el fin de analizar la composición del hueso trabecular, patrones de remineralización ósea y/o aumento del grosor trabecular, presencia de osteocitos, osteonas, osteoblastos, vascularización y matriz osteoide (24). Para el procesamiento de los tejidos blandos, posteriormente a la fijación en formaldehído, los tejidos fueron deshidratados durante 12 horas con diferentes porcentajes de etanol. Las muestras se clarificaron con xileno y se embebieron en parafina para la realización de cortes secuenciales (espesor 5 µm), los cuales fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (HE) para la histomorfometría y para el análisis histológico. Se tomaron fotomicrografías para observar las estructuras de los tejidos, probables reacciones inflamatorias agudas o crónicas y/o reacción a cuerpos extraños. El análisis histológico se realizó mediante microscopía óptica, utilizando el microscopio AxioSkop 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Los análisis histomorfométricos se realizaron en vistas panorámicas del tejido utilizando el software Zen Lite (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Se tomaron microfotografías de los cortes histológicos con el fin de analizar la histomorfometría de los órganos y de las estructuras óseas (24).

Actividad de fosfatasa alcalina

Todas las muestras fueron ensayadas bajo condiciones que aseguraron la linealidad respecto al tiempo y a la concentración de proteína. Los grupos experimental y control se mantuvieron como se describieron anteriormente. La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método de Bradford (166), utilizando albúmina sérica bovina como estándar. La actividad específica de ALP en los grupos experimental y control se determinó de acuerdo al método Lowry, utilizando P-nitrofenil fosfato (PNP) como sustrato para la enzima y MgCl₂ mM en amortiguador de Tris Hcl 0.1 M, pH 9.8 e incubadas a 37 °C durante 30 minutos (12). La reacción se detuvo por adición de 50 ml de NaOH 0.05 N y la absorbancia se determinó a 405 nm. Los ensayos se hicieron por triplicado y se repitieron tres veces (24).

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay; ensayo por inmuoabsorción ligado a enzimas)

Todas las muestras fueron ensayadas bajo condiciones que aseguraron la linealidad respecto al tiempo y a la concentración de proteína. Los grupos experimental y control se mantuvieron como se describieron anteriormente. La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método de Bradford (166), 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), ligando del receptor activador de RANK (RANKL) y osteoprotegerina (OPG), utilizando el kit Rata Osteocalcin ELISA, ALPCO® por método directo (24, 167). Se colocaron 3 µl de muestra por cada pozo y se agregó el buffer con PBS al 1x dejándose incubar toda la noche. Al día siguiente se realizaron los lavados correspondientes y se colocó albúmina bovina (BSA) para bloquear los sitios inespecíficos. Posteriormente se hicieron lavados

y la colocación del primer anticuerpo (correspondiente a cada uno de los biomarcadores), incubándolo durante una hora; posteriormente se realizaron lavados y se colocó el segundo anticuerpo; después de una hora de incubación, se lavó y se colocó el sustrato de reacción (ABTS) durante 30 minutos. Se tomaron lecturas a 405 nm cada 15 minutos y se detuvo la reacción a los 60 minutos. Los ensayos se hicieron por triplicado y se repitieron tres veces (24).

Pruebas biomecánicas

Las pruebas biomecánicas se realizaron en el Laboratorio de Materiales Dentales de la DEPEI, con apoyo del Dr. Carlos Álvarez Gayoso). La resistencia a la compresión y el módulo elástico de la quinta vértebra lumbar (L5) se determinaron utilizando la máquina de pruebas universal Instron (modelo 5543) equipada con una celda de carga de 1,000 Newtons (N). Se realizó de la siguiente manera: se desarticuló y se disecó la quinta vértebra lumbar con un disco de diamante fino, se realizó un corte perpendicular al eje céfalo-caudal para retirar las apófisis espinosas de las vértebras; se midieron el diámetro y la longitud de cada una de las vértebras. Se colocó la muestra en posición vertical en la zona de fijación del Instron (base de la máquina) con un pistón moviéndose paralelamente al eje céfalo-caudal para la compresión de la muestra a una velocidad de 1 mm/min hasta lograr la fractura de la muestra; los datos obtenidos se transmitieron al software Merlin de la máquina Instron, reflejando la curva de deformación de la muestra. La carga máxima fue calculada de acuerdo a la curva y es expresada como Newtons (N). Con los valores de la fuerza (F) se calculó la resistencia a la compresión y el módulo elástico. Los resultados se promediaron y se reportaron como resistencia a la compresión y módulo elástico en N/mm² (24).

Proliferación celular

La proliferación celular se determinó por medio del ensayo con MTT [enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas] (168). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Las osteoblastos humanos se sembraron en cajas de cultivo de 96 pozos, a una densidad de 2.5×10^3 células por pozo; entre el segundo y tercer pasaje se incubaron 24 hrs para permitir su adhesión. El día siguiente se le asignó como día 0, se cambió el medio y se colocaron 10 µl de MTT (0.5 mg/ml) y se dejaron incubar 3 horas. Posteriormente se retiró todo el medio (MTT), se cambiaron los materiales a una caja de pozos nueva y se colocaron 1000 µl de DMSO, los platos se agitaron y se incubaron durante 15 minutos, se retiraron 150 µl de cada pozo y se leyó la absorbancia a 570 nm en el FM5. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron dos veces. El mismo número de células se evaluaron a 24, 48 y 96 horas bajo las mismas condiciones (169, 170).

Expresión génica

Extracción de ARN

El ARN total purificado de las células de los osteoblastos cultivados mediante la técnica de tiocinato de guanidina fenol cloroformo (Trizol® Reagent, Invitrogen USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante (171). El ARN purificado fue cuantificado espectrofotométricamente mediante Nanodrop 2000-200c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA™) con 2 µl de muestra y una absorbancia de 260 nm. El rango de absorbancia se estableció entre 260 y 280nm para medir la pureza del RNA; se consideró adecuado si se encontraba entre 1.8 y 2 de densidad óptica.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa (qRT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa (RT-qPCR, *Reverse transcription polymerase quantitative chain reaction*) es una variante de PCR; técnica de laboratorio usada en biología molecular para generar una gran cantidad de copias de ADN, proceso llamado

"amplificación". En el RT-qPCR, sin embargo, un templado de ARN es retrotranscrito en ADN complementario (ADNc) mediante una enzima llamada transcriptasa reversa: un templado de ADN, un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, una ADN polimerasa; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo, en un termociclador que albergue sensores ópticos. Para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (170). Se realizó RT-qPCR con ARN total para determinar la expresión de los genes. La cadena de ADNc fue sintetizada del ARN total. Se determinaron transcritos de la línea osteoblástica mediante reacciones de qRT-PCR, para lo cual se utilizaron 10 ng de RNA. RT-qPCR se usaron los *primers* específicos como se muestra en la tabla 7 y el kit SuperScript [®]III Platinum[®] SYBR[®] Green-Step qRT-PCR (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). Se realizó el análisis por triplicado, tanto por los diferentes marcadores relaciondos a mineralización ósea como por tiempo de cultivo (0, 3 y 10 días). La programación fue la siguiente: dos periodos de desnaturalización a 60°C durante 30 segundos y realineamiento a 60°C por 30 segundos; la extensión fue a 72°C por un minuto (172). Para determinar la expresión relativa se utilizó el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta$ CT ($2^{-[\text{delta}][\text{delta}]} \text{ Ct}$) (173) y se utilizó a GAPDH como control endógeno (170, 174).

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión génica con RT-qPCR

Gen (primer)	Secuencia F (5'-3')	Secuencia R (5'-3')
GAPDH	CAACGGATTTGGTCGTATTGG	GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTA
ALP	AGCACTCCCACCTTCATCTGGAA	GAGACCCAATAGGTAGTCCACATTG
BSP	AACGAAGAAAGCGAAGCAGAA	TCTGCCTCTGTGCTGTTGGT
OCN	GGGCTCCCAGCCATTGAT	CAAAGCCTTTGTGTCCAAGCA
CBFA1	ACCCAGAAGGCACAGACAGAAG	AGGAATCGCCCCTAAATCACT
COL1	CGAAGACATCCCACCAATCAC	CGTTGTGCGCAGACGCAGAT

RESULTADOS

✓ Microtomografía computarizada (μ CT)

Para determinar la DMO en el fémur y en la cuarta vértebra lumbar, se obtuvieron las imágenes del μ CT al inicio (día cero) y al final del tratamiento (90 días). En la cuarta vértebra lumbar, se seleccionó una ROI de 1 mm³ en la región central superior del hueso cortical (ver Fig. 11). La ROI seleccionada para el fémur fue de 1 mm³ en la región cortical en la intersección entre la metáfisis y la diáfisis del fémur.

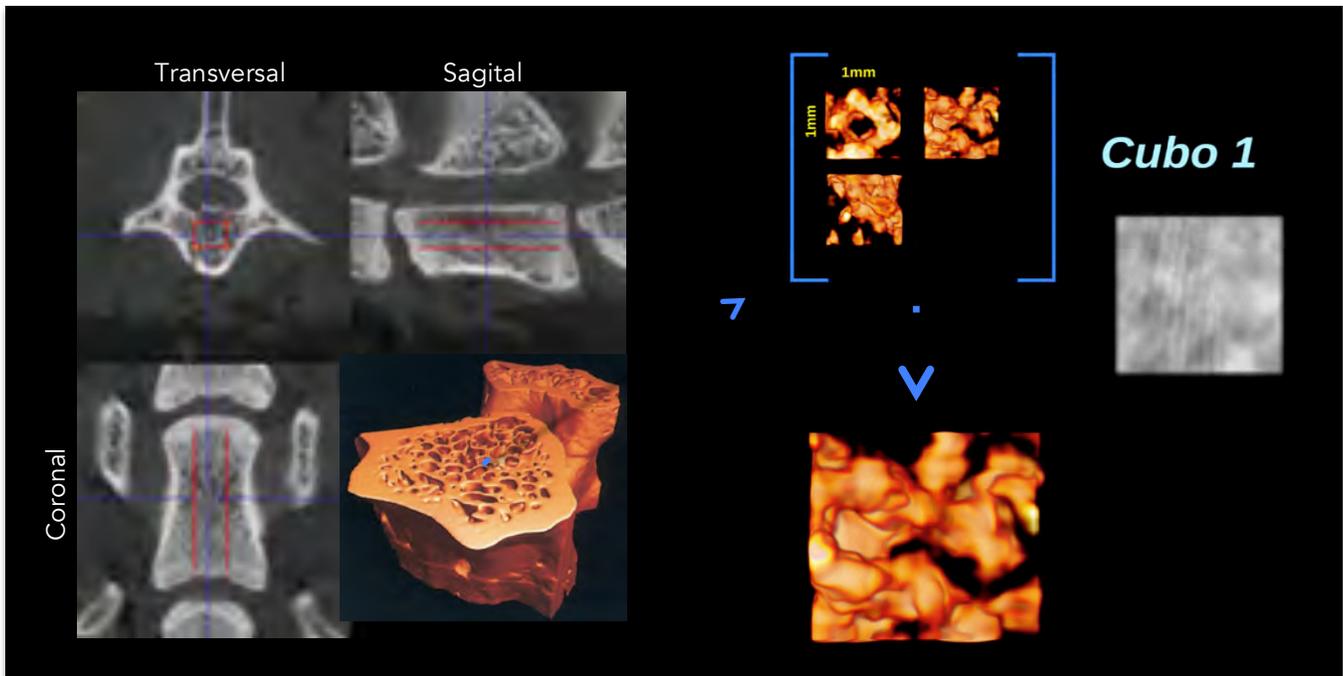


Figura 11. Microtomografía de cuarta vértebra lumbar, se observa misma región de interés vista desde diferentes secciones (coronal, transversal y sagital). Se selecciona el ROI de la región central.

La Tabla 5 resume las cantidades obtenidas de la DMO, de la cantidad de HAmg/cc de la ROI del la cuarta vértebra lumbar y del fémur; los porcentajes obtenidos son con base en los valores del grupo sano [100%] (ver Fig. 12). El análisis estadístico de pruebas pareadas mostró igualdad con respecto al control sano. *Pruebas pareadas * igualdad, $p > 0.05$*

Tabla 5. Comparación de la DMO a los 0 y 90 días entre el grupo control y los grupos experimentales		
Grupo	Vértebra	Fémur
Sano	100 %	100 %
OVX	55 %	67 %
pCEMP1, 40 μ g	91 %	99 %
pCEMP1, 80 μ g	92 %	81 %
pCAP, 20 μ g	98 %	94 %

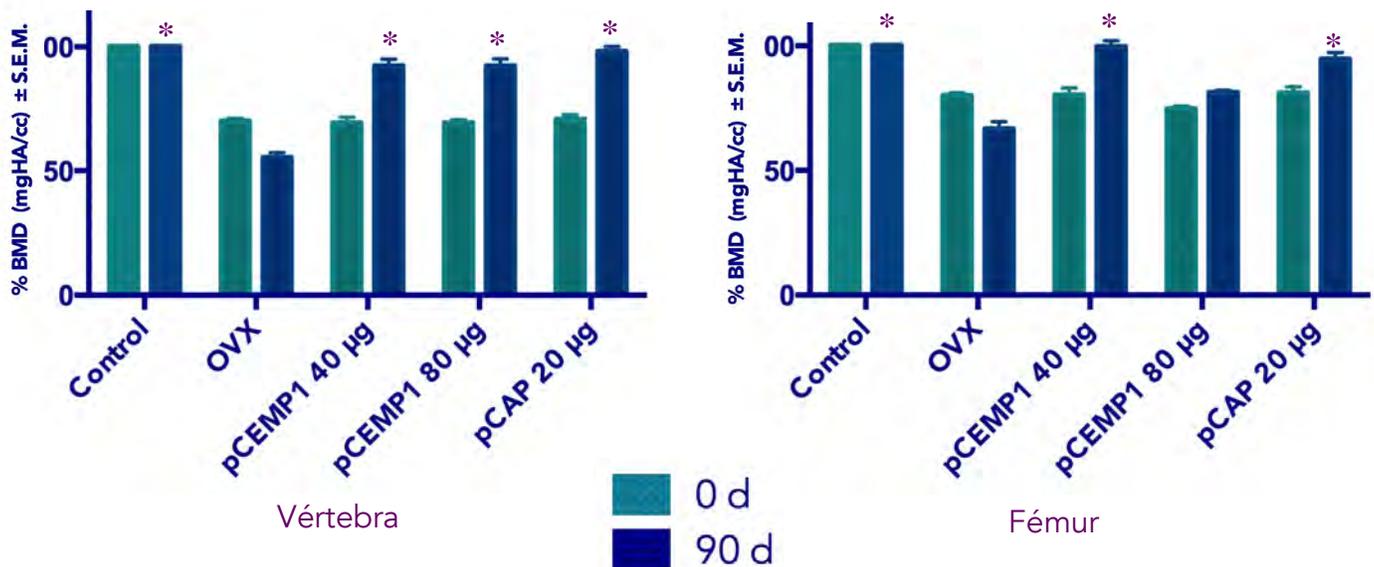


Figura 12. Comparación de la DMO a los 0 y 90 días entre el grupo control y los grupos experimentales, Pruebas pareadas * igualdad, $p > 0.05$

En la Figura 13 se presentan las imágenes obtenidas a través de microtomografía computarizada (μ CT) y reconstrucción tridimensional del cuerpo vertebral de la cuarta vértebra lumbar de ratas Wistar que no fueron sometidas a ovariectomía y por lo tanto es representativo del grupo control sano, del grupo al que se le realizó la ovariectomía y que no recibió tratamiento con los péptidos y del grupo al que se le realizó la ovariectomía y 4 meses después se inició el tratamiento con los péptidos sintéticos: **A**, se observa la imagen supero-inferior de la cuarta vértebra lumbar del grupo control sano, particularmente el cuerpo de esta, con todos sus componentes anatómicos incluidas las apófisis transversas y espinosa, el agujero vertebral, donde se observa la cortical ósea como una línea compacta, así como el hueso esponjoso ocupando todo el espacio de esta entidad anatómica, sin presentar espacios. **B**, imagen obtenida a través de microtomografía computarizada de la cuarta vértebra lumbar de rata Wistar sometida a ovariectomía, que desarrolló osteoporosis y que no recibió tratamiento. Se observan las características anatómicas vertebrales en una posición supero-inferior y descrita en la figura A. La reconstrucción tridimensional indica que el cuerpo vertebral presenta espacios medulares de mayor tamaño y disminución de las trabéculas óseas así como de su grosor. En la imagen insertada se observa a detalle el hueso esponjoso, cuyos espacios aparecen más grandes y hay zonas donde es evidente la ausencia de hueso esponjoso. **C**, imagen obtenida a través de microtomografía computarizada de la cuarta vértebra lumbar de rata Wistar sometida a ovariectomía, que desarrolló osteoporosis y que recibió como tratamiento la formulación farmacéutica del pCAP disuelto en solución fisiológica salina, e inyectada intraperitonealmente, diario y durante 90 días a partir de 4 meses después de realizada la ovariectomía. En la reconstrucción tridimensional, se observa la imagen supero-inferior de la cuarta vértebra lumbar con todos sus componentes anatómicos. La imagen tridimensional nos muestra la cortical electrodensa del cuerpo de la vértebra así como el hueso esponjoso con pequeños espacios y donde el hueso esponjoso está presente en casi la totalidad del cuerpo vertebral. **D**, se observa la imagen supero-inferior de la cuarta vértebra lumbar del grupo control sano. **E**, imagen obtenida a través de microtomografía computarizada de la cuarta vértebra lumbar de rata Wistar sometida a ovariectomía, que desarrolló osteoporosis y que no recibió tratamiento. La reconstrucción tridimensional indica que el cuerpo vertebral presenta espacios medulares de mayor tamaño y disminución de las trabéculas óseas así como de su grosor; el hueso esponjoso presenta espacios más grandes y zonas donde es evidente la ausencia de hueso esponjoso. **F**, imagen obtenida a través de microtomografía computarizada de la cuarta vértebra lumbar de rata Wistar sometida a ovariectomía, que desarrolló osteoporosis y que recibió como tratamiento la formulación farmacéutica del pCEMP1

disuelto en solución fisiológica salina, e inyectada intraperitonealmente, diario y durante 90 días a partir de 4 meses después de realizada la ovariectomía. En la reconstrucción tridimensional, se observa la imagen supero-inferior de la cuarta vértebra lumbar con todos sus componentes anatómicos. La imagen tridimensional nos muestra la cortical electrodensa del cuerpo de la vértebra así como el hueso esponjoso con pequeños espacios y donde el hueso esponjoso está presente en casi la totalidad del cuerpo vertebral.

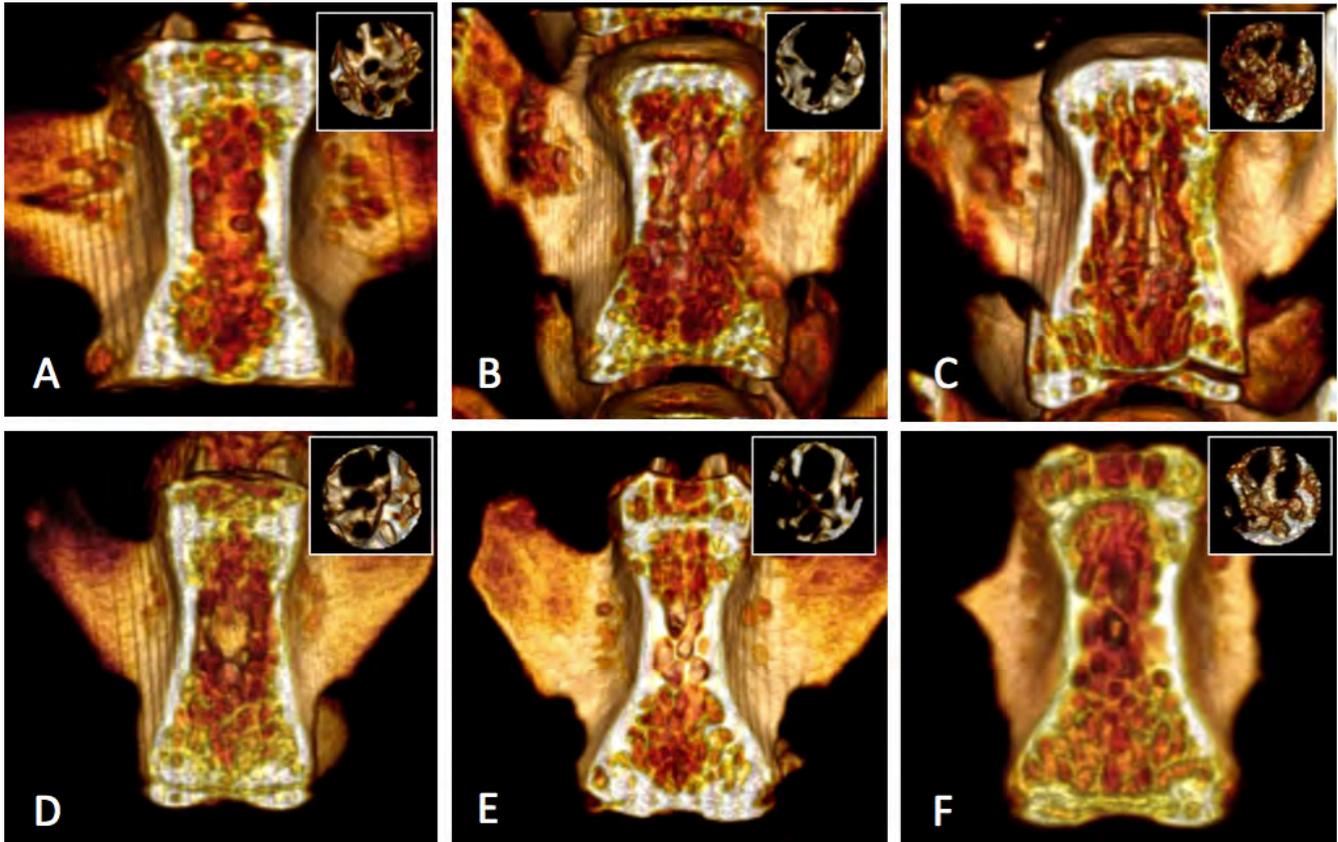


Figura 13. Se presentan las imágenes obtenidas a través de microtomografía computarizada (μ CT) y reconstrucción tridimensional del cuerpo vertebral de la 4^a vértebra lumbar de ratas Wistar.

Los resultados del análisis de la vértebra indican que en el día 0 (al inicio del tratamiento), los grupos de tratamiento fueron iguales al grupo ovariectomizado; en el día 90 (al final del tratamiento), los grupos de tratamiento [pCEMP1 40 μ g (91%), pCEMP1 80 μ g (92%) y pCAP 20 μ g (98%)] fueron iguales al sano, con lo cual se demuestra un incremento de la DMO en los animales tratados con los péptidos, al final del tratamiento. Los resultados del análisis del fémur indican que en el día 0 (al inicio del tratamiento), los grupos de tratamiento fueron iguales al grupo ovariectomizado; en el día 90 (al final del tratamiento), los grupos de tratamiento [pCEMP1 40 μ g (99%) y pCAP 20 μ g (94%)] fueron iguales al sano, con lo cual se demuestra un incremento de la DMO en los animales tratados con los péptidos, al final del tratamiento. Cabe destacar que el pCEMP1 80 μ g (81%) no fue estadísticamente significativo, sin embargo, también se demuestra una mejoría de la DMO con respecto a los animales ovariectomizados (67%). Todas las diferencias son estadísticamente significativas.

Para determinar si la administración intraperitoneal (IP) de los péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 μ g/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRCSTSN, 40 y 80 μ g/kg) incrementan la regeneración ósea,

También se midió el grosor (Tb.Th), separación (Tb.Sp) y número (Tb.N) trabecular de la cuarta vértebra lumbar y de la cabeza femoral. Se obtuvieron las imágenes del μ TC al inicio (día cero) y al final del tratamiento (90 días). En la cuarta vértebra lumbar, se seleccionó una ROI de 1 mm³ en la región central superior del hueso cortical (ver Fig. 37). La ROI seleccionada para el fémur fue de 1 mm³ en la región cortical en la intersección entre la metáfisis y la diáfisis del fémur (ver Fig. 14).

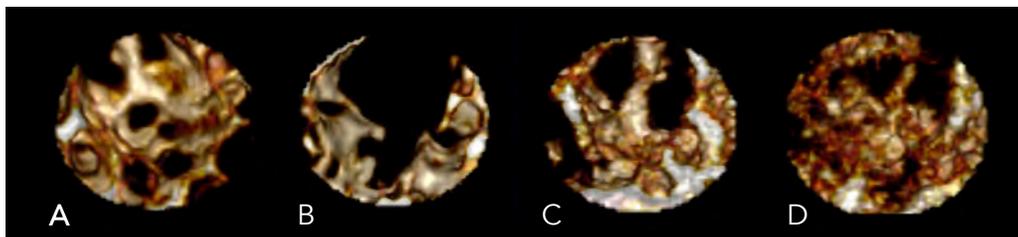
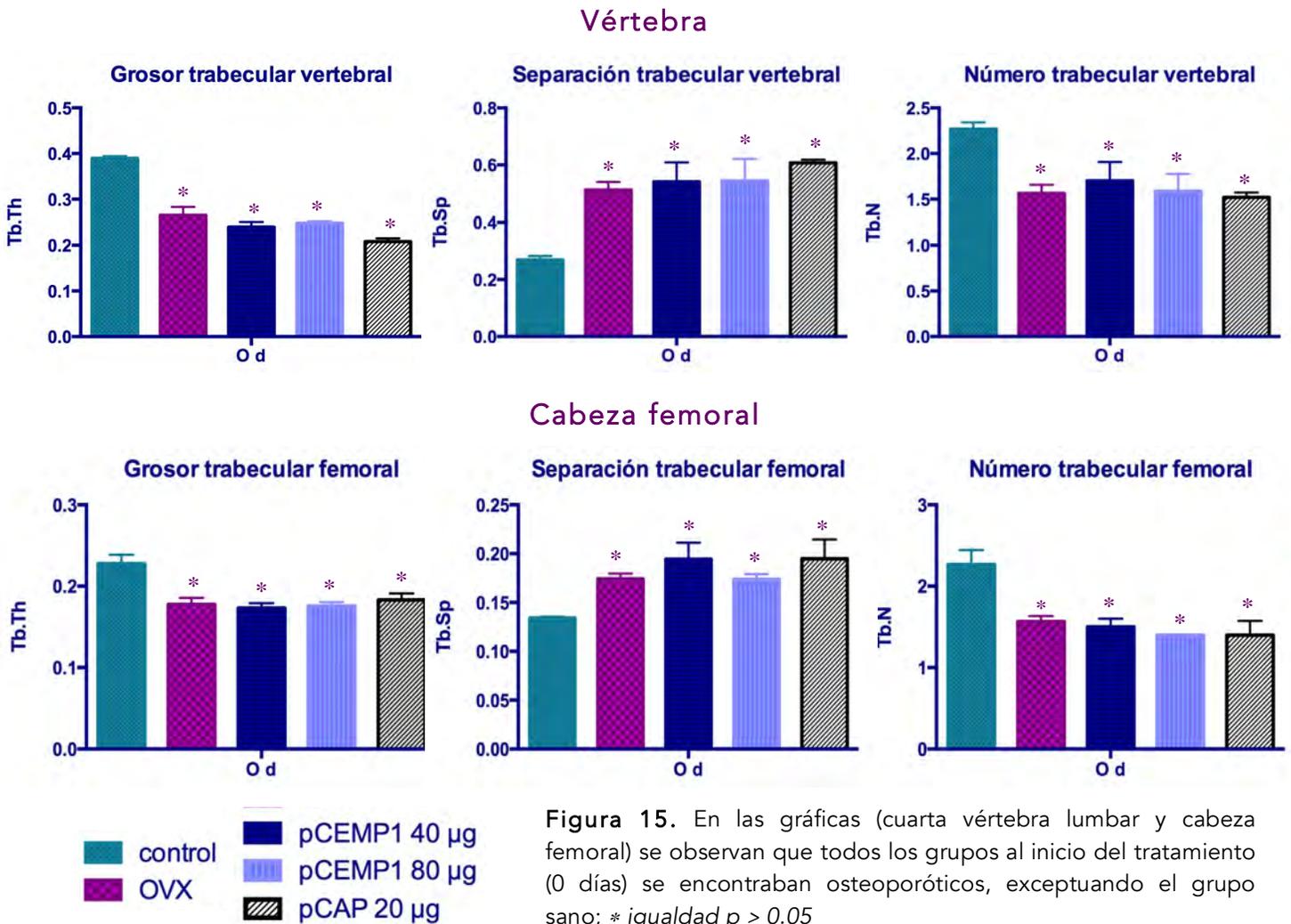


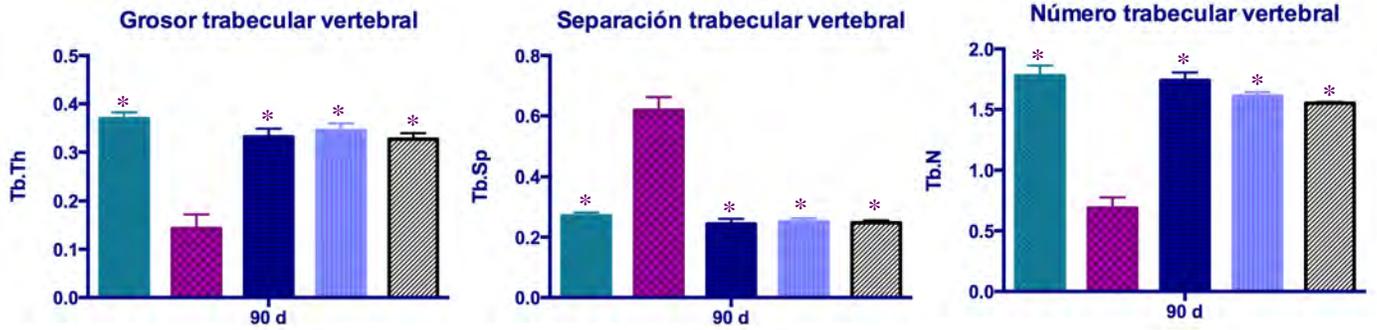
Figura 14. Fotografía de la reconstrucción tridimensional del VOI para medir el grosor, separación y número trabecular. A animal sano, B animal ovariectomizado (con osteoporosis), C animal tratado con pCEMP1 80 µg y D animal tratado con pCAP 20 µg.

Para valorar la confición final, los resultados del análisis de la vértebra y fémur, indican que en el día 0 (al inicio del tratamiento), los grupos de tratamiento fueron iguales al grupo ovariectomizado; en el día 90 (al final del tratamiento), los grupos de tratamiento debieran ser iguales al sano (ver Fig. 15). En las gráficas se observan que todos los grupos al inicio se encontraban osteoporóticos, exceptuando el grupo sano. Todas las diferencias son estadísticamente significativas.

Los resultados del análisis de la vértebra y fémur, indican neoformación ósea. En las gráficas se observan que todos los grupos, excepto las ratas osteoporóticas (OVX), al finalizar los tratamientos (pCEMP1 40 µg, pCEMP1 80 µg y pCAP 20 µg), presentan formación de nuevas trabéculas, las cuales tienen características de trabéculas sanas: son gruesas y la distancia que hay entre trabécula y trabécula, es menor; también se comprueba que en el día 90 (al final del tratamiento), los grupos de tratamiento son iguales al sano. Todas las diferencias son estadísticamente significativas (ver Fig. 16).



Vértebra



Cabeza femoral

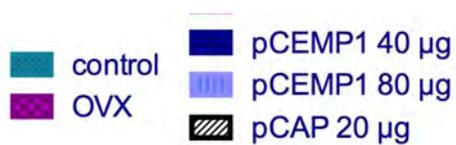
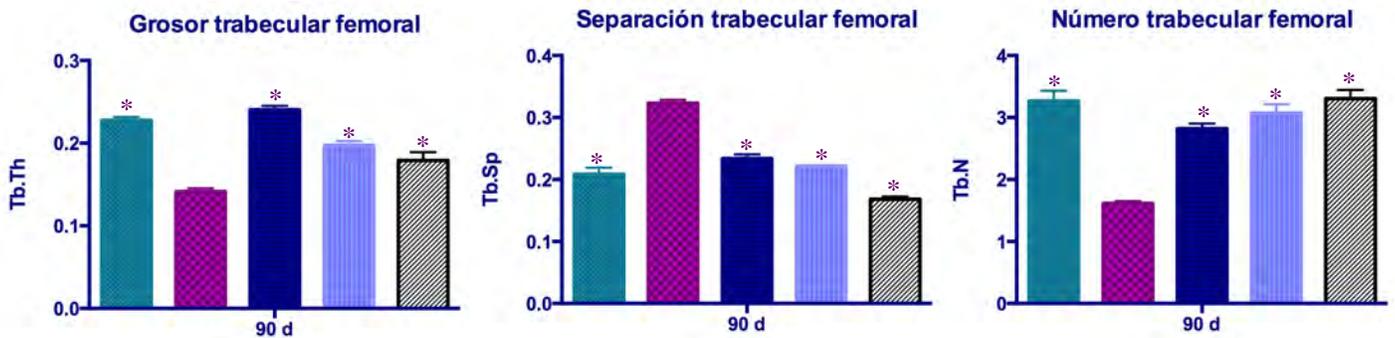


Figura 16. En las gráficas (cuarta vértebra lumbar y cabeza femoral) se observan que todos los grupos experimentales, al finalizar los tratamientos (90 días), los resultados del análisis de la vértebra y fémur, indican neoformación ósea. El grupo OVX se encuentra diferente a todos los grupos; * *igualdad* $p > 0.05$

✓ Pruebas biomecánicas

La prueba de la resistencia a la compresión y módulo elástico son los principales puntos que se utilizan para la evaluación biomecánica. La **resistencia** se define como la carga máxima antes del punto de fractura y el **módulo elástico** es la capacidad de un material, mecanismo o sistema para recuperar su estado inicial cuando ha cesado la carga a la que había estado sometido. Para determinar si los tratamientos (pCEMP1 40 µg, pCEMP1 80 µg y pCAP 20 µg) proporcionaban soporte a cargas mecánicas y si el hueso neoformado tenía las características clínicas de un hueso humano (de resiliencia), se realizaron las pruebas biomecánicas. En las gráficas (ver Fig. 17) se muestra la resistencia a la compresión del cuerpo vertebral de la quinta vértebra lumbar obtenidas de ratas Wistar al término del periodo experimental que fue de 90 días después de un periodo de 4 meses de realizada la ovariectomía. Se realizaron pruebas de resistencia mediante la Máquina de Pruebas Universal Instrón en el cuerpo de la quinta vértebra lumbar con una velocidad comprimida de 1mm/min hasta lograr la fractura de la muestra. La fuerza ejercida se expresa en N/mm². Se analizaron los cuerpos vertebrales de la quinta vértebra lumbar de 5 ratas Wistar sanas, 5 ratas Wistar ovariectomizadas y 15 ratas Wistar ovariectomizadas osteoporóticas tratadas con los péptidos (pCEMP1 40 µg, pCEMP1 80 µg y pCAP 20 µg) disueltos en solución fisiológica salina, e inyectados intraperitonealmente, diario y durante 90 días a partir de 4 meses después de realizada la ovariectomía. Como se observa en la gráfica (ver Fig. 43), los niveles la resistencia de los cuerpos vertebrales de la quinta vértebra lumbar de las ratas osteoporóticas (OVX) presentan una disminución de resistencia a la compresión de un 58%. Las ratas osteoporóticas y tratadas con el péptido pCAP 20 µg, presentan valores similares con las ratas control sanas de resistencia a la compresión, exhibiendo una diferencia del 2% respecto al control. Los niveles la resistencia de los cuerpos vertebrales de la quinta vértebra lumbar de las ratas osteoporóticas y tratadas con el péptido pCEMP1 40 µg, pCEMP1 80 µg presentan valores similares con las ratas control sanas de resistencia a la compresión, exhibiendo una diferencia del 19% respecto al control (pCEMP1 80 µg). Los datos de los módulos elásticos de las quintas vértebras lumbares de las ratas osteoporóticas (OVX) presentan una disminución del módulo elástico de un 73%. Las ratas osteoporóticas y tratadas con los péptidos pCEMP1 40 µg, pCEMP1 80 µg y pCAP 20 µg, presentan valores similares con las ratas control sanas de módulo elástico. Todas las diferencias son estadísticamente significativas. Estos resultados indican que el tratamiento de la osteoporosis con cualquiera de los tres péptidos,

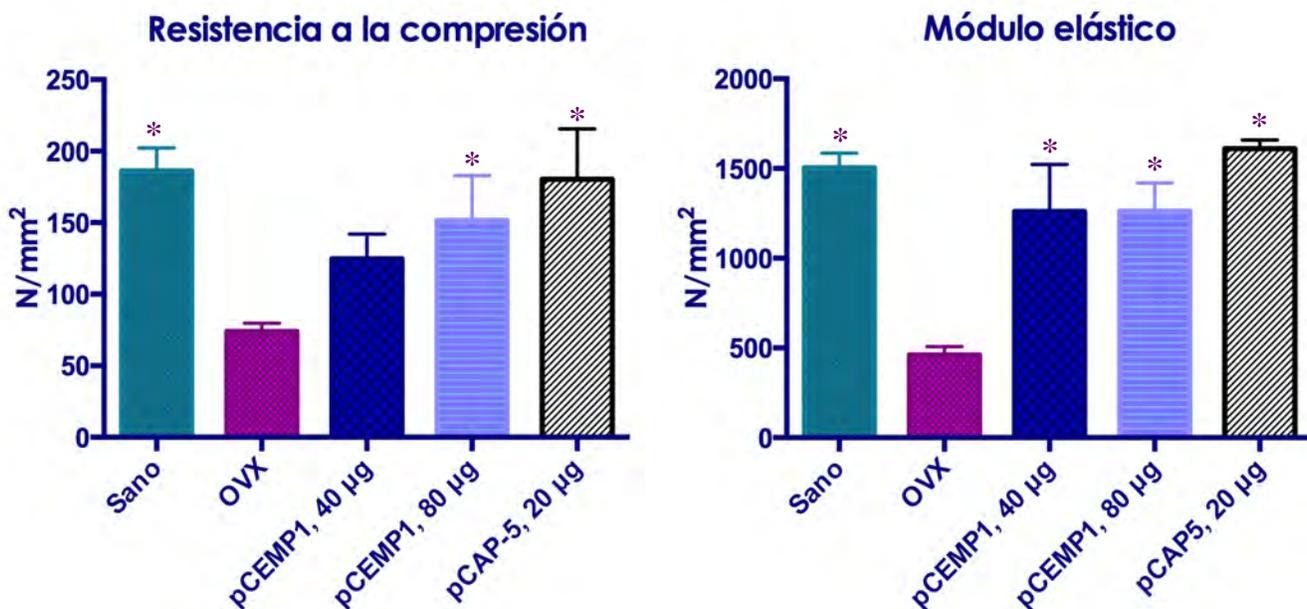


Figura 17. Pruebas biomecánicas: comparación de la resistencia a la compresión y del módulo elástico en la 5^{ta} vértebra lumbar entre los grupos a los 90 días; * igualdad $p > 0.05$

promueven la resistencia a la compresión y resistencia a la fractura similar al hueso control sano, indicando que cualquiera de estos péptidos promueven el incremento de la densidad mineral ósea.

✓ **Histología e histomorfometría**

Para identificar si al término de la administración de los tratamientos [péptidos sintéticos pHACD1/CAP (AVIFM, 20 µg/kg) y pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRRRCSTSN, 40 y 80 µg/kg)], éstos desencadenaban alguna respuesta inflamatoria (aguda/crónica), a cuerpo extraño y/o calcificaciones, se recolectaron los órganos (cerebro, corazón, pulmones, bazo, riñón e hígado) de todos los grupos de estudio para su observación a través del microscopio invertido (5X, 10X, 20X y 40X). En la figura 44 se presentan microfotografías del corte histológico de un grosor de 5 µm y que muestra las características histológicas de diversos tejidos de ratas Wistar que no presentan osteoporosis y ratas Wistar sometidas a ovariectomía, que desarrollaron osteoporosis y se trataron con los péptidos pCEMP1 40 µg. En el hígado se identificó las triadas hepáticas (vena, arteria y conducto biliar) para delimitar los lóbulos hepáticos y las células de Kuffer; no se observó ninguna alteración. Los tejidos del riñón (túbulos renales y glomérulos), no presentaron alteración. Se examinó la porción del ventrículo del corazón hacia la zona externa del pericardio, en el cual se observó el músculo cardiaco sin alteraciones. En el pulmón se examinaron los alveólos y bronquios, observándose una arquitectura normal (se detectó infiltrado crónico leve, característica del estado normal de esta región). En el cerebro se examinó el plexo coroideo, se analizó cerebelo y sus componentes como la capa molecular, la capa de la célula de Purkinje, la capa granular y la sustancia blanca, todo sin alteraciones. El bazo y sus estructuras, como la pulpa blanca (nódulos esplénicos con linfocitos T y B) y la pulpa roja (sinusoides esplénicos llenos de sangre y con láminas de tejidos linfoides), no presentaron anomalías o alteraciones. No se observan diferencias microscópicas en los tejidos, ni alteraciones en la microarquitectura de estos, por lo que los tejidos tratados experimentalmente con los péptidos objeto de este estudio, no producen daño celular, ni tisular, ni alteraciones morfológicas, observándose características normales y similares a las de un sujeto sano. Esto implica que los péptidos sintéticos son inocuos como fármacos para el tratamiento de la osteoporosis, no produciendo reacciones adversas o secundarias a nivel celular o tisular (ver Fig. 18).

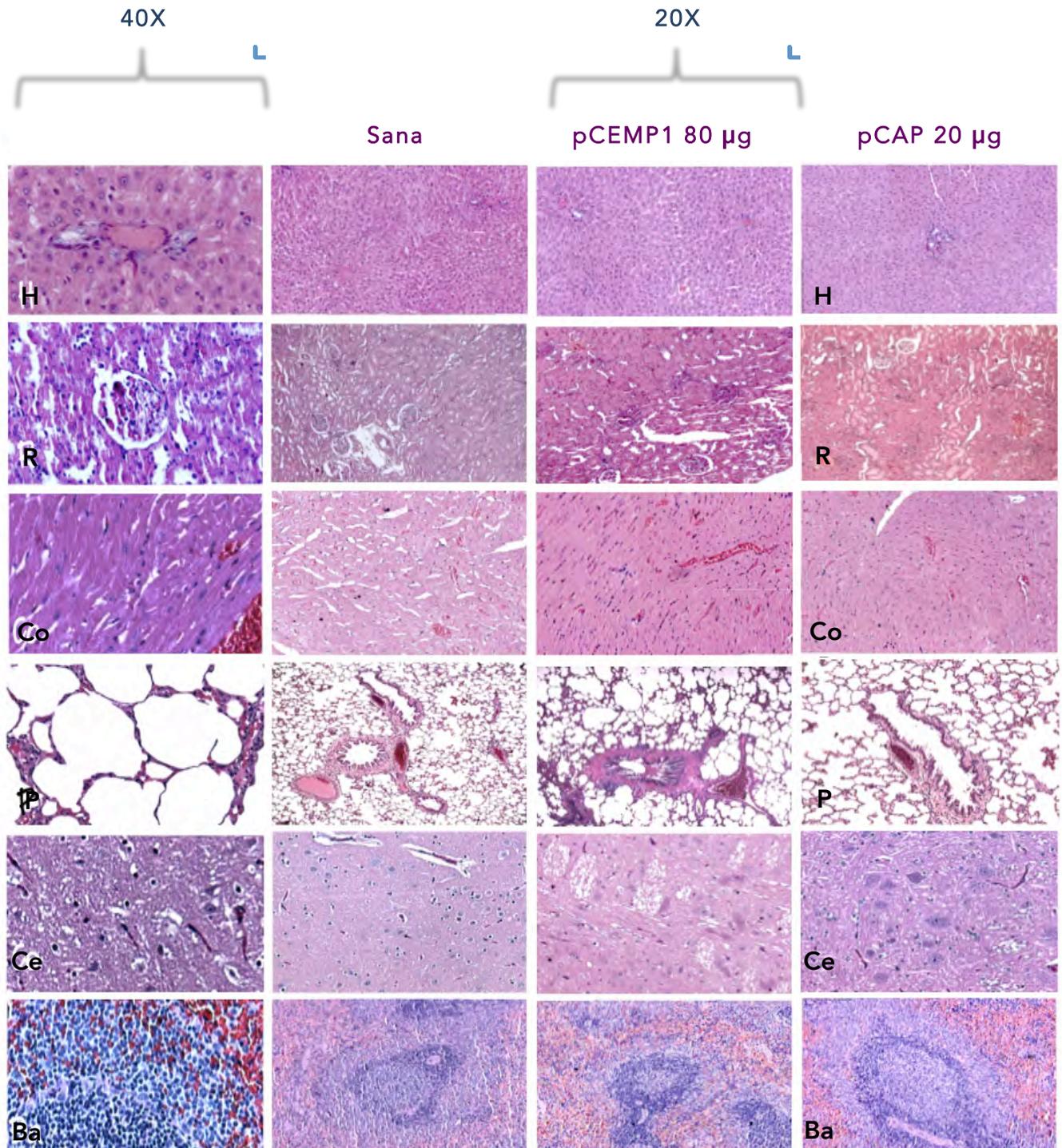


Figura 18. Análisis histológico. Fotomicrografías de cortes histológicos teñidos con H&E , tomados a 20X y 40X, de los animales sanos y los ovariectomizados tratados con los péptidos. H, hígado. R, riñón. Co, corazón. P, pulmón. Ce, cerebro. Ba, bazo.

Los fémures de los grupos controles sanos fueron examinados y se observó el tamaño trabecular, línea epifisiaria y cuerpo femoral normal. En la figura 45 se observan los cortes histológicos de 5 μm de grosor y teñidos con la tinción Tricrómica de Masson en los cuales la microarquitectura de la epífisis del fémur de rata Wistar se analiza a detalle.

La letra (A) corresponde al grupo sin ningún tratamiento y es grupo control sano. En el corte histológico teñido con la tinción Tricrómica de Masson, se observa la microarquitectura normal de la epífisis del fémur con hueso esponjoso y los espacios medulares llenos de médula ósea y hueso ocupando los espacios intermedulares y se observa también la placa epifisiaria y el cartílago articular. La letra (B) muestra la microarquitectura de la epífisis del fémur de rata Wistar y que corresponde al grupo que fue sometido a ovariectomía, que desarrolló osteoporosis y que recibió como tratamiento la inyección del vehículo (solución fisiológica salina) después de cuatro meses de realizada la ovariectomía. El tratamiento con el vehículo tuvo una duración de 90 días. El análisis de los tejidos al término del periodo experimental con solución fisiológica salina revela en la microfotografía las características histológicas de la epífisis del fémur de rata Wistar. Se observa la microarquitectura donde los espacios medulares en la epífisis contienen escasa médula ósea por lo que estos están vacíos por lo que el hueso se observa poroso y da la apariencia de esponja (pérdida de continuidad trabecular, trabéculas delgadas y escasa cantidad de las mismas). Estos espacios se observan de dimensiones variables. Abundante esteatosis. Las letras (C, D y E) muestran la microarquitectura de la epífisis del fémur de rata Wistar que corresponde a los grupos que fueron sometidos a ovariectomía y que desarrollaron osteoporosis y que recibieron como tratamiento la formulación farmacéutica consistente con pCEMP1 40 μg , pCEMP1 80 μg y pCAP 20 μg . En estos cortes histológicos teñidos con la tinción Tricrómica de Masson, se observa la microarquitectura normal de la epífisis del fémur con hueso esponjoso y donde los espacios medulares se observan llenos de médula ósea y hueso ocupando los espacios intermedulares y se observa también la placa epifisiaria y el cartílago articular. Se observan nuevas trabéculas óseas de grosor semejante al de las ratas sanas. No se observa pérdida de continuidad. Estas microfotografías con las características histológicas antes mencionadas, demuestran que las ratas Wistar sometidas a ovariectomía, que desarrollaron osteoporosis y fueron tratadas con los péptidos, muestran características de hueso normal sano (ver Fig. 19).

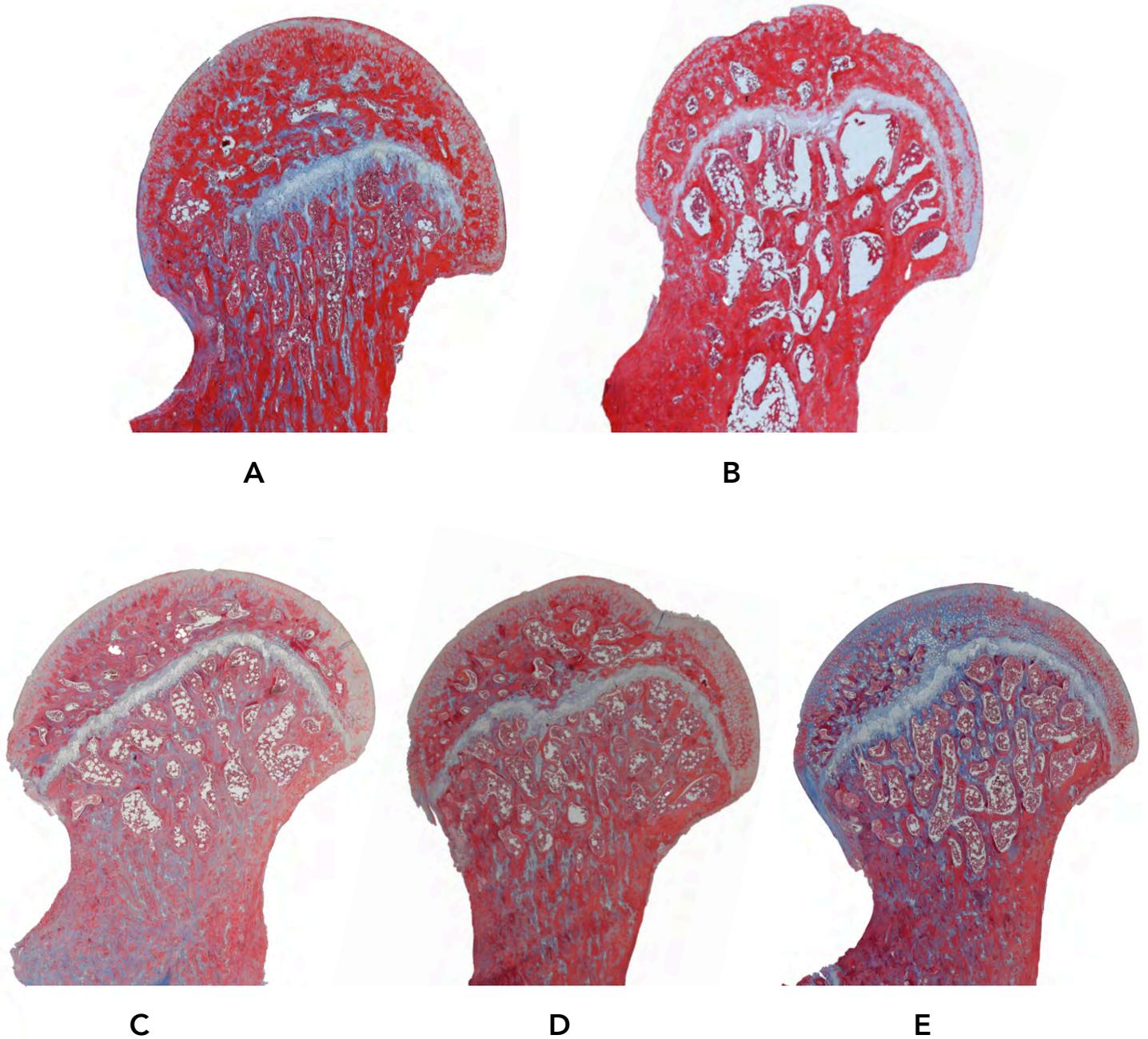
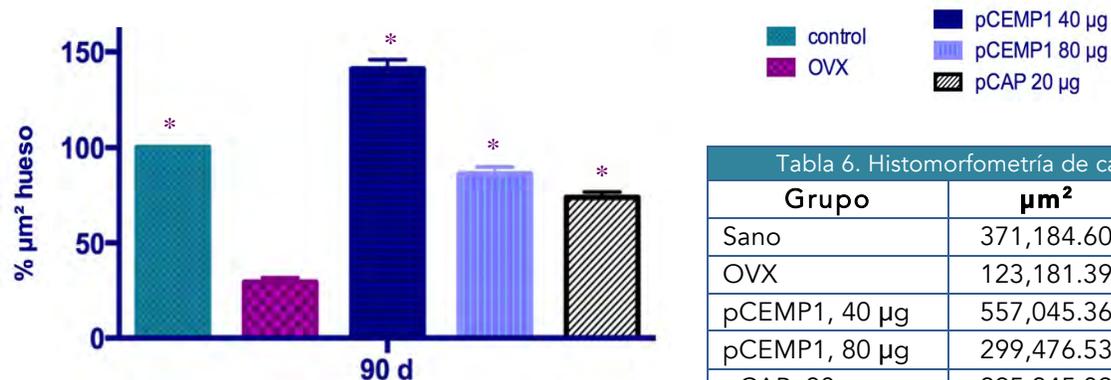


Figura 19. Fotomicrografías tomadas 10X, Tinción TM. Histología de cabeza femoral. A, rata sana. B, rata osteoporótica (OVX), obsérvese la reducción en el grosor y disminución del número trabecular y aumento en la separación trabecular, abundante esteatosis. C, rata tratada con pCEMP1 40 µg. D, rata tratada con pCEMP1 80 µg. E, rata tratada con pCAP 20 µg. En los animales tratados con los péptidos, casi no se observa la presencia de médula ósea amarilla. Se observa coloración rojiza alternada con predominio azul como característica propia del cartílago de crecimiento. Abundante médula ósea roja.

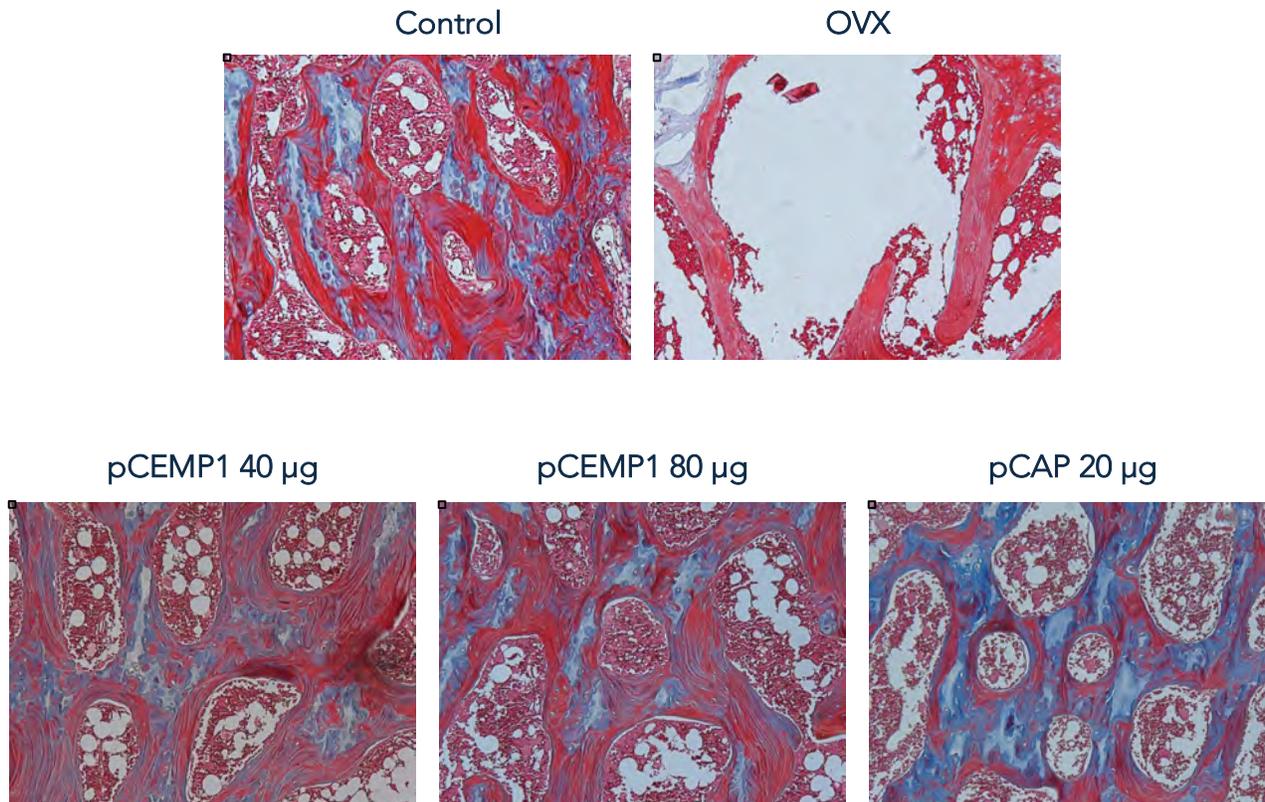
Se realizaron las histomorfometrías respectivas de las cabezas femorales, las fotomicrografías de los cortes histológicos teñidos con Tricrómica de Masson, fueron tomados a 20x; la tabla 9 presenta los datos y los porcentajes obtenidos. Los porcentajes obtenidos son con base en los valores del grupo sano [100%]. Todas las diferencias son estadísticamente significativas. Los animales osteoporóticos disminuyeron más del 60% su área ósea con respecto a los animales sanos. Los animales tratados con los péptidos durante 90 días obtuvieron mayor área ósea [los animales tratados con el péptido pCEMP1 40 µg tuvieron 50% más de ganancia ósea que los controles sanos; el pCEMP1 80 µg y pCAP 20 µg tuvieron casi la misma cantidad de hueso que las ratas sanas (80%)], es decir, presentaron neoformación ósea (ver Fig. 20 y 21).



Grupo	μm^2	%
Sano	371,184.60	100
OVX	123,181.39	33.18±1
pCEMP1, 40 µg	557,045.36	150±1
pCEMP1, 80 µg	299,476.53	80.68±1
pCAP, 20 µg	295,245.09	79.54±1

Figura 20. Histomorfometría femoral: comparación de la regeneración ósea por μm^2
 * igualdad, $p > 0.05$

Histomorfometría, cortes histológicos teñidos con Tricrómica de Masson, al 20x (ver Anexo C)



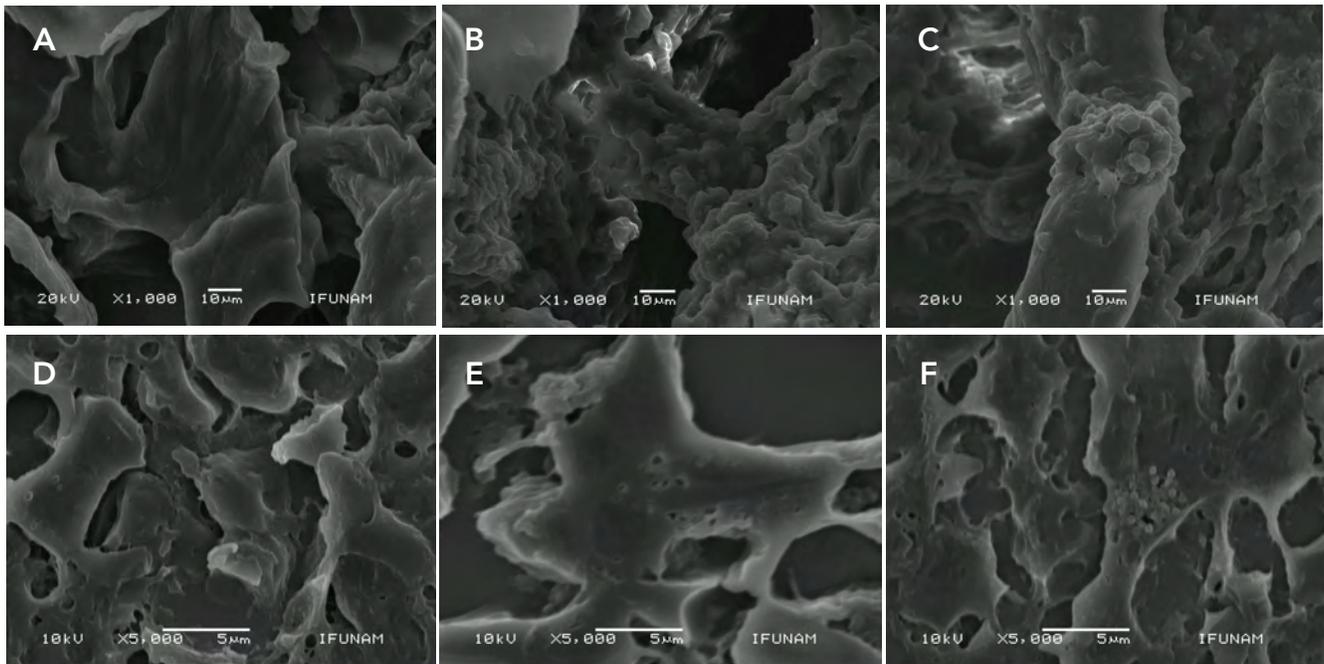


Figura 21. Fotografías de microscopía electrónica de barrido del fémur A, B y C a 1,000X; D, E y F a 5,000X. A, rata sana (control), obsérvese la integridad de la trabécula. B, rata osteoporótica. C, rata osteoporótica tratada con el pCAP, la trabécula está regenerándose. D, rata sana, múltiples trabéculas con estructura íntegra. E, rata osteoporótica, el hueso se ve con múltiples perforaciones. F, rata tratada con el péptido pCAP, en el centro de la imagen se observan micoesferas compatible con hidroxipatita.

Se observaron las microfotografías de cortes histológicos de 5 μm de grosor del cuerpo de las cuartas vértebras lumbares en los planos transversal y sagital, teñidas con la tinción Tricrómica de Masson (ver Fig. 22). La letra (A) corresponde a el cuerpo de la cuarta vértebra lumbar en los planos transversal (a) y sagital (a') de rata Wistar sana, en donde se puede observar que el número, tamaño y espacio trabecular son normales sin pérdida de la continuidad de la estructura ósea y los espacios están ocupados con médula ósea. La coloración rojiza corresponde al depósito del tejido biomineral sobre la matriz extracelular normal de hueso. La letra (B) de la figura 48, corresponde a el cuerpo de la cuarta vértebra lumbar en los planos transversal (b) y sagital (b') de rata Wistar osteoporótica tratada con solución salina fisiológica; se observan la cortical ósea y el trabeculado óseo de un grosor más delgado que las ratas Wistar sanas, se observa pérdida de la continuidad trabecular con apariencia lagunar, los espacios medulares entre el trabeculado óseo ocupado por tejido graso (esteatosis), siendo estos espacios de mayor área si se comparan con el control sano. Se observa una coloración azul que corresponde a la pérdida de tejido mineral, ya que la tinción es específica para colágena, mostrando la pérdida de tejido mineral. Las letras (C, D y E) muestran la microarquitectura de la cuerpo de la cuarta vértebra lumbar de rata Wistar que corresponde a los grupos que fueron sometidos a ovariectomía y que desarrollaron osteoporosis y que recibieron como tratamiento respectivamente con la formulación farmacéutica consistente con pCEMP1 40 μg , pCEMP1 80 μg y pCAP 20 μg . En estos cortes histológicos teñidos con la tinción Tricrómica de Masson, se observa la microarquitectura normal de la cuarta vértebra lumbar; los tres grupos osteoporóticos tratados con los péptidos presentan coloración rojiza similar al que se observó en el control sano, recuperación de número y grosor trabecular, se observa un trabeculado óseo denso bien organizado con los espacios ocupados por médula ósea.; la

cortical ósea es similar al presentado por las ratas Wistar sanas. Estas microfotografías con las características histológicas antes mencionadas, demuestran que las ratas Wistar sometidas a ovariectomía, que desarrollaron osteoporosis y fueron tratadas con los péptidos, muestran características de hueso normal sano.

Se realizaron las histomorfometrías respectivas de las las cuartas vértebras lumbares, las fotomicrografías de los cortes histológicos teñidos con Tricrómica de Masson, fueron tomados a 20x; la tabla 10 presenta los datos y los porcentajes obtenidos. Los porcentajes obtenidos son con base en los valores del grupo sano [100%]. Todas las diferencias son estadísticamente significativas. Los animales osteoporóticos disminuyeron el 69% su área ósea con respecto a los animales sanos. Los animales tratados con los péptidos durante 90 días obtuvieron mayor área ósea [los animales tratados con el péptido pCEMP1 40 µg tuvieron 18% y el pCEMP1 80 µg 13% más de ganancia ósea que los controles sanos; el pCAP 20 µg tuvieron casi la misma cantidad de hueso que las ratas sanas (96%)], es decir, presentaron neoformación ósea (ver Fig. 23).

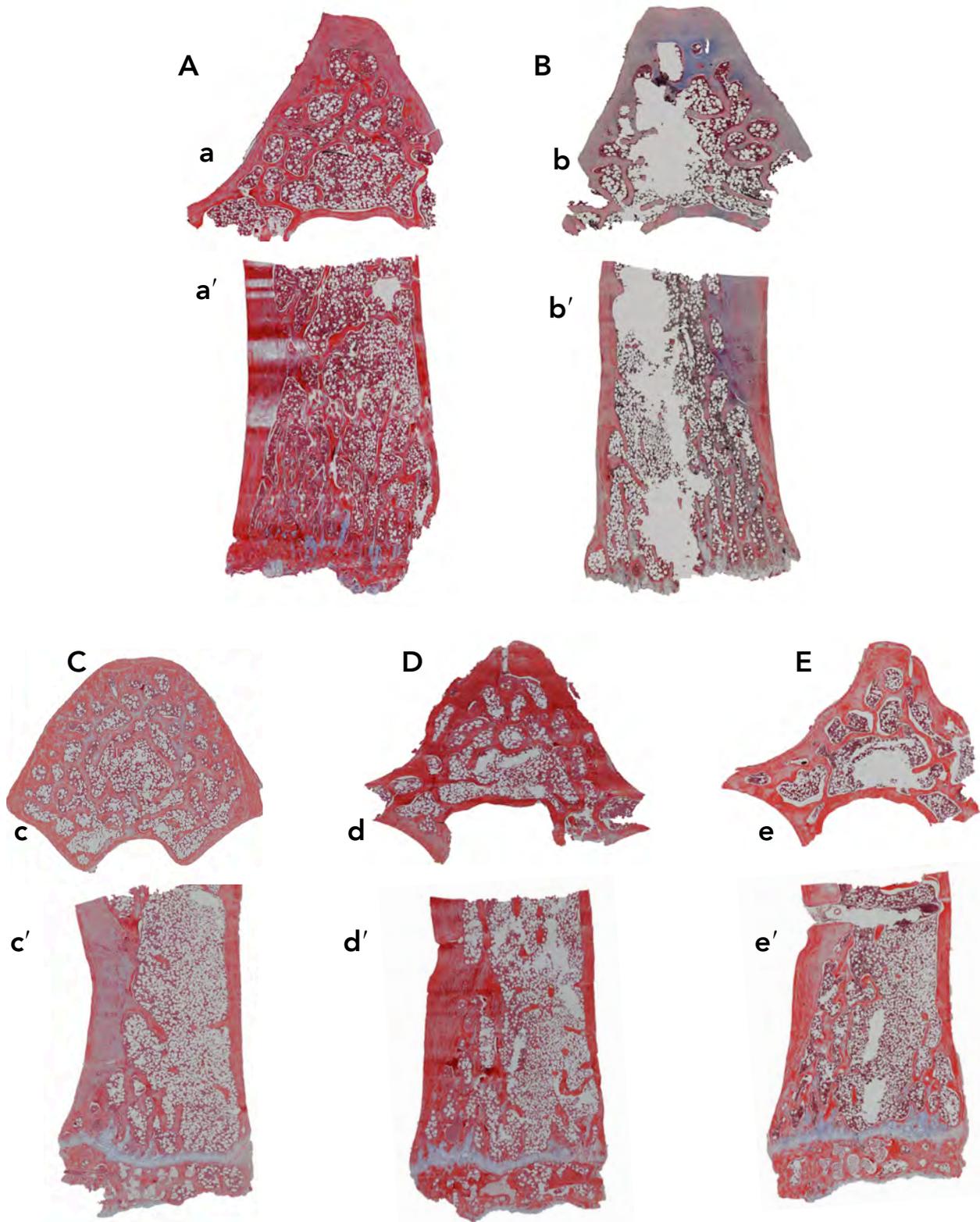
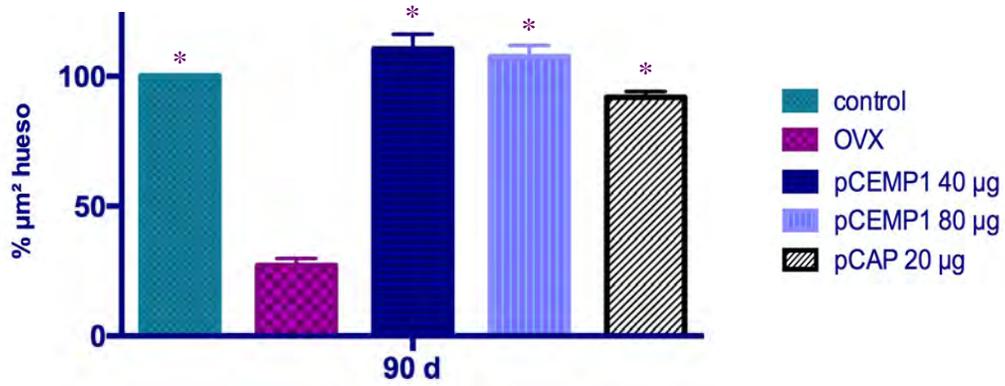


Figura 22. Fotomicrografías tomadas 10X, Tinción TM. Histología de cuarta vértebra lumbar. A, rata sana. (a) corte transversal, (a') corte sagital. B, rata osteoporótica (OVX), obsérvese la reducción en el grosor y disminución del número trabecular y aumento en la separación trabecular, abundante esteatosis. C, rata tratada con pCEMP1 40 µg. D, rata tratada con pCEMP1 80 µg. E, rata tratada con pCAP 20 µg. En los animales tratados con los péptidos, no se observa la presencia de médula ósea amarilla. Abundante médula ósea roja.

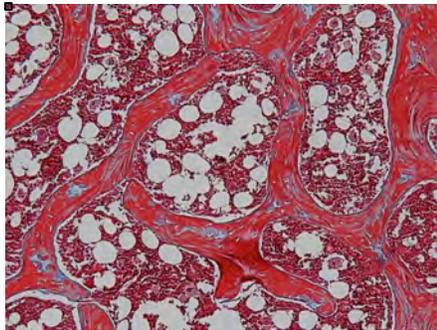
Tabla 7. Histomorfometría de cuarta vértebra lumbar		
Grupo	μm^2	%
Sano	177,694.79	100
OVX	55,753.16	31.37 \pm 1
pCEMP1, 40 μg	210,031.16	118.19 \pm 1
pCEMP1, 80 μg	201,388.45	113.33 \pm 1
pCAP, 20 μg	171,174.52	96.33 \pm 1

Figura 23. Histomorfometría vertebral: comparación de la regeneración ósea por μm^2 * igualdad, $p > 0.05$

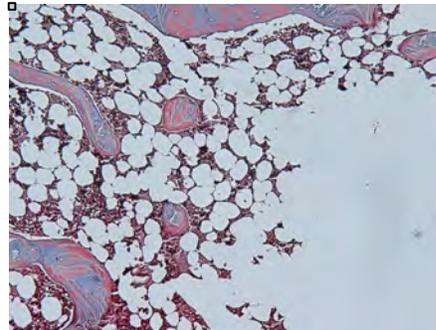


Histomorfometría, cortes histológicos teñidos con Tricrómica de Masson, al 20x (ver Anexo D)

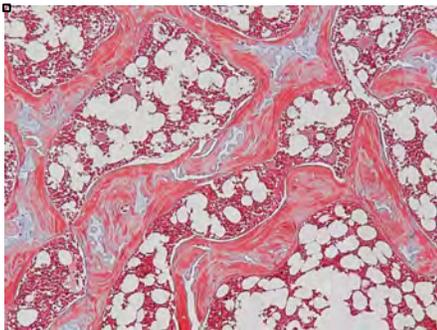
Control



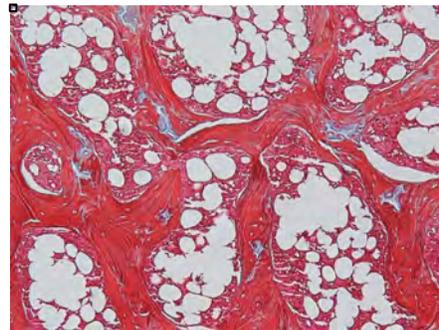
OVX



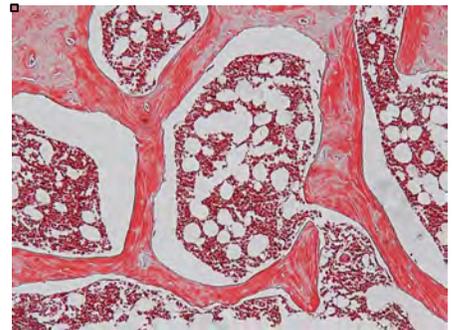
pCEMP1 40 μg



pCEMP1 80 μg



pCAP 20 μg



✓ Biomarcadores serológicos

Se evaluaron los niveles de expresión proteica a nivel sérico de los biomarcadores asociados al proceso de biomineralización, se realizó el ensayo de la actividad de la fosfatasa alcalina (TNP) y se llevaron a cabo ensayos ELISA para determinar los niveles de expresión sérica de la osteocalcina (OCN), osteoprotegerina (OPG) y el ligando del receptor activador de RANK (RANKL).

Fosfatasa alcalina (ALP)

Se analizó la actividad específica de la fosfatasa alcalina a partir del suero de las ratas Wistar sanas, ratas Wistar ovariectomizadas y ratas Wistar ovariectomizadas osteoporóticas tratadas con el péptido pCAP y pCEMP1. Como se observa en la gráfica (ver Fig. 24) al comienzo del tratamiento (0 días), las ratas osteoporóticas muestran un incremento del 53% de la actividad específica de la fosfatasa alcalina en suero con respecto a los valores de esta misma enzima en las ratas normales sanas. A los 90 días, final del tratamiento, las ratas Wistar osteoporóticas tratadas con el péptido pCAP 20 µg, muestran una reducción del 1% respecto a las ratas Wistar controles sanas y una disminución del 48% respecto a la actividad específica de la fosfatasa alcalina que se mantiene elevada en las ratas osteoporóticas. Estos resultados indican que el péptido pCAP 20 µg, es capaz de regular la actividad específica de la fosfatasa alcalina y por lo tanto el péptido participa en el proceso de remineralización ósea en el tratamiento de la osteoporosis. Los resultados son estadísticamente significativos (ANOVA one-way $p < 0.05$). En la gráfica (ver Fig. 25) se puede observar que al comienzo del tratamiento (0 días), las ratas osteoporóticas muestran un incremento del 47% de la actividad específica de la fosfatasa alcalina en suero con respecto a los valores de esta misma enzima en las ratas normales sanas. Al final del tratamiento (90 días), las ratas Wistar osteoporóticas tratadas con el péptido pCEMP1 80 µg, muestran una reducción del .8% respecto a las ratas Wistar controles sanas y una disminución del 50% respecto a la actividad específica de la fosfatasa alcalina que se mantiene elevada en las ratas osteoporóticas. Estos resultados indican que el péptido pCEMP1 80 µg, es capaz de regular la actividad específica de la fosfatasa alcalina y por lo tanto el péptido participa en el proceso de remineralización ósea en el tratamiento de la osteoporosis. Los resultados son estadísticamente significativos (ANOVA one-way $p < 0.05$).

Osteocalcina

La osteocalcina circulante en suero extraído de ratas Wistar al inicio y al término del periodo experimental que fue de 90 días después de un periodo de 4 meses de realizada la ovariectomía. Como se puede observar en la gráfica (ver Fig. 26) los niveles de osteocalcina en suero se incrementa en un 156% respecto a los niveles de osteocalcina determinados en el suero de ratas controles sanas. Sin embargo, a los 90 días al término del tratamiento, en las ratas osteoporóticas sin tratamiento los niveles de osteocalcina en suero se incrementan hasta un 205%, mientras que las ratas osteoporóticas tratadas con el péptido pCAP 20 µg muestran una reducción del 61% cuando se comparan con los valores de osteocalcina en ratas osteoporóticas sin tratamiento. Esto indica que la administración del péptido pCAP 20 µg promueve la disminución de los niveles de osteocalcina en suero cuando se compara con ratas osteoporóticas sin tratamiento, indicando que los péptidos promueven el proceso de remineralización ósea. Los resultados son estadísticamente significativos (ANOVA one-way $p < 0.05$). Para los animales tratados con pCEMP1 80 µg (ver Fig. 27), los niveles de osteocalcina en suero se incrementa en un 193% respecto a los niveles de osteocalcina determinados en el suero de ratas controles sanas. Sin embargo, a los 90 días al término del tratamiento, en las ratas osteoporóticas sin tratamiento los niveles de osteocalcina en suero se incrementan hasta un 197%, mientras que las ratas osteoporóticas tratadas con el péptido pCEMP1 80 µg, muestran una reducción del 70% cuando se comparan con los valores de osteocalcina en ratas osteoporóticas sin tratamiento. Esto indica que la

administración del péptido pCEMP1 80 µg, promueve la disminución de los niveles de osteocalcina en suero cuando se compara con ratas osteoporóticas sin tratamiento, indicando que los péptidos promueven el proceso de remineralización ósea. Los resultados son estadísticamente significativos (ANOVA one-way $p < 0.05$).

Ligando del receptor activador RANK (RANKL)

Se determinaron los niveles de RANKL por medio de ensayo de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), a partir del suero de ratas Wistar sanas, ratas Wistar ovariectomizadas y que recibieron como tratamiento la inyección intraperitoneal de solución fisiológica salina durante 90 días y ratas Wistar ovariectomizadas osteoporóticas tratadas con pCAP 20 µg/kg disuelto en solución fisiológica salina, e inyectada intraperitonealmente, diario y durante 90 días a partir de 4 meses después de realizada la ovariectomía. Como se observa en la gráfica (ver Fig. 28) los niveles de RANKL en ratas osteoporóticas al inicio del tratamiento están aumentados en un 155% respecto al control sano. A los 90 días de concluido el tratamiento con los péptidos pCAP 20 µg, muestran un incremento de 305% de RANKL en suero de ratas osteoporóticas respecto al control sano. Los niveles de RANKL en las ratas Wistar osteoporóticas tratadas con el péptido pCAP 20 µg, muestran una disminución del 49% respecto a los niveles de RANKL encontrados en ratas osteoporóticas, las cuales recibieron como tratamiento la inyección intraperitoneal de la formulación farmacéutica consistente con solución fisiológica salina durante 90 días. Los resultados son estadísticamente significativos (ANOVA one-way $p < 0.05$). Estos resultados indican que el tratamiento con pCAP, inhiben el proceso de resorción ósea (ver Fig. 54). Para los animales tratados con pCEMP1 80 µg/kg (ver Fig. 29), se determinaron los niveles de RANKL, los niveles de RANKL en ratas osteoporóticas al inicio del tratamiento están aumentados en un 80% respecto al control sano. A los 90 días de concluido el tratamiento con los péptidos pCEMP1 80, muestran un incremento de 273% de RANKL en suero de ratas osteoporóticas respecto al control sano. Los niveles de RANKL en las ratas Wistar osteoporóticas tratadas con el péptido pCEMP1 80 µg, muestran una disminución del 27% respecto a los niveles de RANKL encontrados en ratas osteoporóticas, las cuales recibieron como tratamiento la inyección intraperitoneal de la formulación farmacéutica consistente con solución fisiológica salina durante 90 días. Estos resultados indican que el tratamiento con pCEMP1, inhiben el proceso de resorción ósea. Los resultados son estadísticamente significativos (ANOVA one-way $p < 0.05$).

Osteoprotegerina

Se determinaron los niveles de osteoprotegerina por medio de ensayo de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), a partir del suero de ratas Wistar sanas, ratas Wistar ovariectomizadas y que recibieron como tratamiento la inyección intraperitoneal de solución fisiológica salina durante 90 días y ratas Wistar ovariectomizadas osteoporóticas tratadas con el péptido pCAP 20 µg/kg disuelto en solución fisiológica salina, e inyectada intraperitonealmente, diario y durante 90 días a partir de 4 meses después de realizada la ovariectomía. Como se observa en las gráficas de la figura 30, los niveles de osteoprotegerina en suero de ratas osteoporóticas al inicio del tratamiento disminuyen en un 30% respecto al control sano. A los 90 días de concluido el tratamiento con el péptido pCAP 20 µg, se muestra un incremento de osteoprotegerina circulante en suero y que alcanza niveles similares al control sano con solo una diferencia del 5%. Los resultados son estadísticamente significativos (ANOVA one-way $p < 0.05$). Se determinaron los niveles de osteoprotegerina para los animales tratados con pCEMP1 80 µg. En las gráficas de la figura 31, se observa que los niveles de osteoprotegerina en suero de ratas osteoporóticas al inicio del tratamiento disminuyen en un 36% respecto al control sano. A los 90 días de concluido el tratamiento con el péptido pCEMP1 80 µg, se muestra un incremento de osteoprotegerina circulante en suero y que alcanza niveles similares al control sano con solo una diferencia del 2%. Los resultados son estadísticamente significativos (ANOVA one-way $p < 0.05$). Los resultados indican que la administración de cualquiera de los dos péptidos, incrementan los niveles de osteoprotegerina en suero, lo que se interpreta como un papel regulador en el metabolismo óseo.

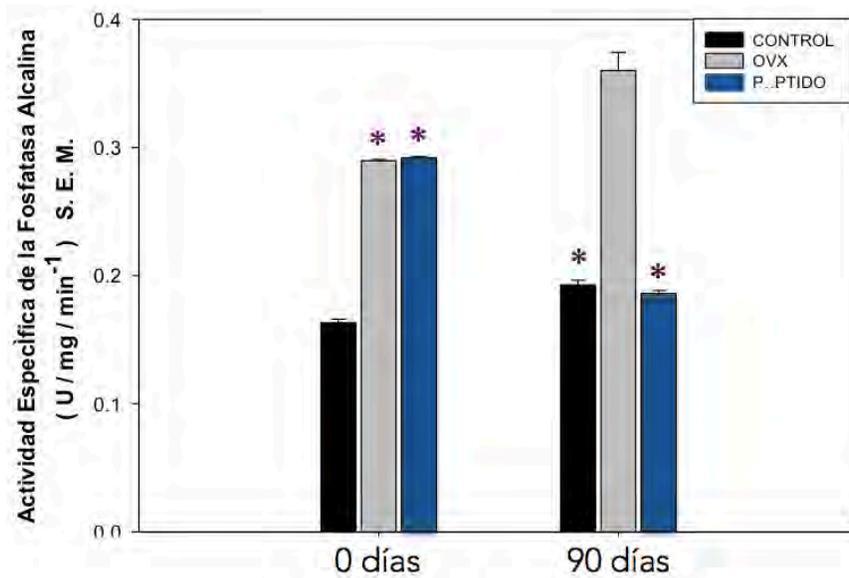


Figura 24. Actividad específica de la fosfatasa alcalina en suero extraído de ratas Wistar normales (control), con osteoporosis (OVX) y con osteoporosis que recibieron tratamiento con el péptido pCAP a una dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ peso y durante 90 días de administración diaria por vía intraperitoneal. La actividad específica de la fosfatasa alcalina fue determinada al inicio y al final del tratamiento.

* igualdad, $p > 0.05$

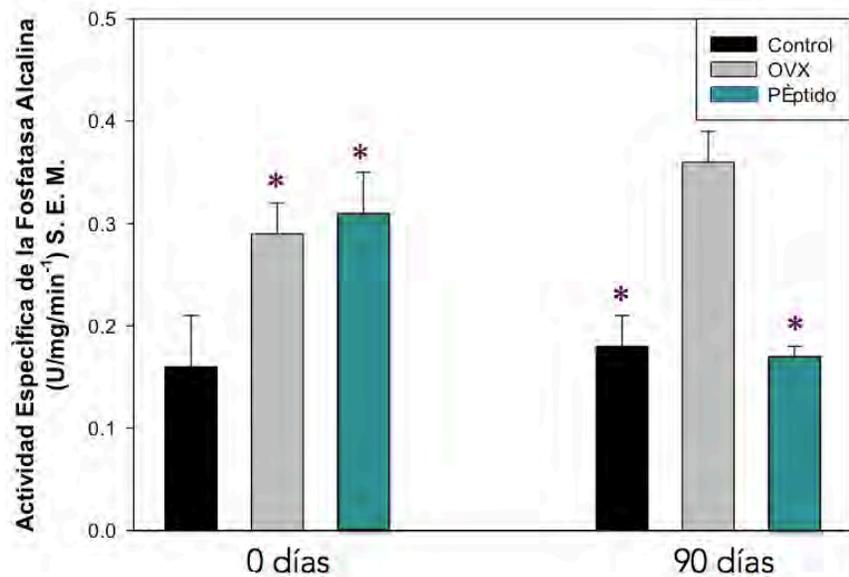


Figura 25. Actividad específica de la fosfatasa alcalina en suero extraído de ratas Wistar normales (control), con osteoporosis (OVX) y con osteoporosis que recibieron tratamiento con el péptido pCEMP a una dosis de 80 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ peso y durante 90 días de administración diaria por vía intraperitoneal. La actividad específica de la fosfatasa alcalina fue determinada al inicio y al final del tratamiento.

* igualdad, $p > 0.05$

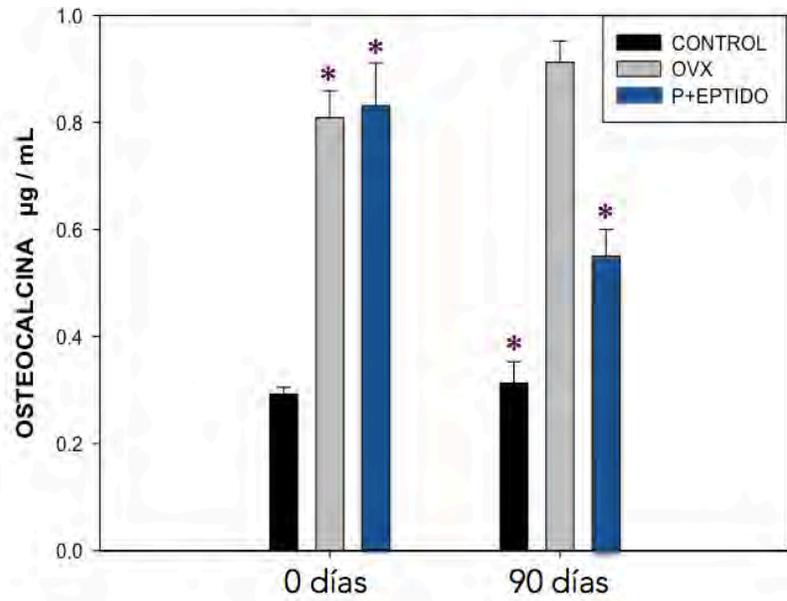


Figura 26. Niveles de osteocalcina circulante en suero extraído de ratas Wistar normales (control), con osteoporosis (OVX) y con osteoporosis que recibieron tratamiento con el péptido pCAP a una dosis de 20 µg/Kg peso y durante 90 días de administración diaria por vía intraperitoneal. La actividad específica de la fosfatasa alcalina fue determinada al inicio y al final del tratamiento.
 * igualdad, $p > 0.05$

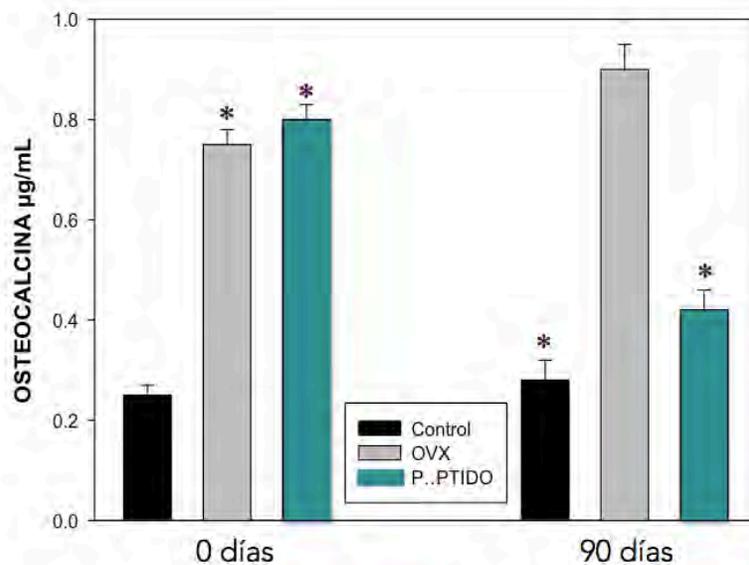


Figura 27. Niveles de osteocalcina circulante en suero extraído de ratas Wistar normales (control), con osteoporosis (OVX) y con osteoporosis que recibieron tratamiento con el péptido pCEMP1 a una dosis de 80 µg/Kg peso y durante 90 días de administración diaria por vía intraperitoneal. La actividad específica de la fosfatasa alcalina fue determinada al inicio y al final del tratamiento.
 * igualdad, $p > 0.05$

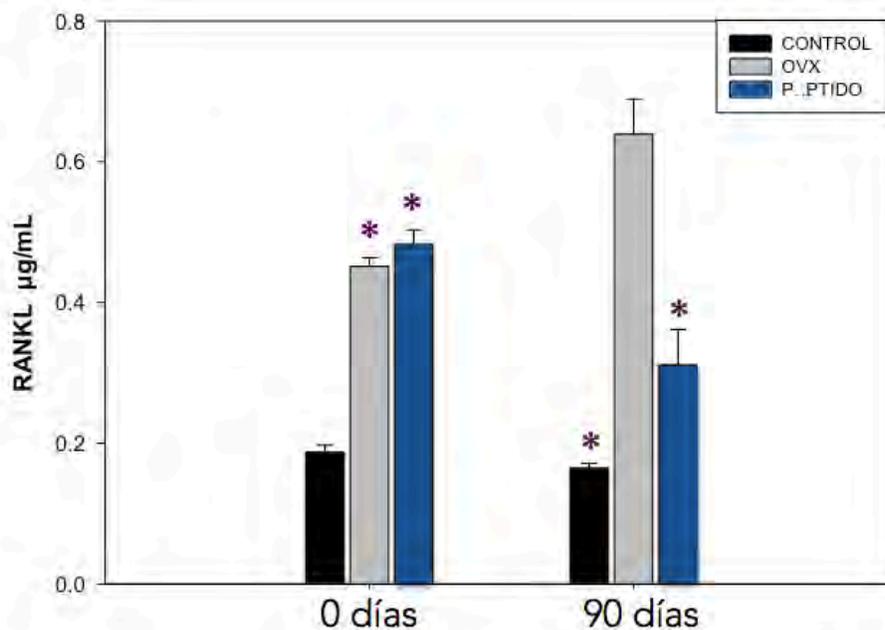


Figura 28. Concentración del ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) circulante en suero extraído de ratas Wistar normales (control), con osteoporosis (OVX) y con osteoporosis que recibieron tratamiento con el péptido pCAP a una dosis de 20 μ g/Kg peso y durante 90 días de administración diaria por vía intraperitoneal. La actividad específica de la fosfatasa alcalina fue determinada al inicio y al final del tratamiento.

* igualdad, $p > 0.05$

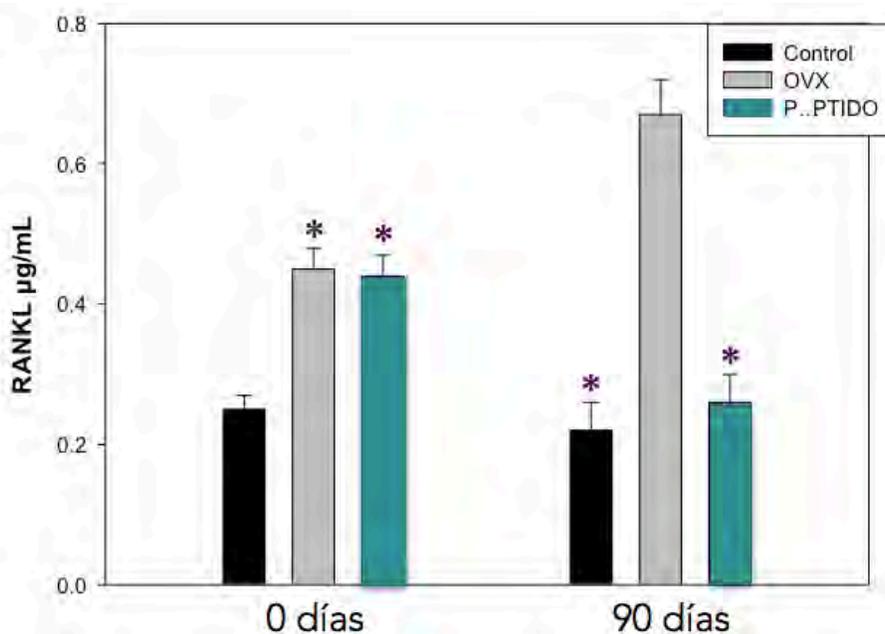


Figura 29. Concentración del ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) circulante en suero extraído de ratas Wistar normales (control), con osteoporosis (OVX) y con osteoporosis que recibieron tratamiento con el péptido pCEMP a una dosis de 80 μ g/Kg peso y durante 90 días de administración diaria por vía intraperitoneal. La actividad específica de la fosfatasa alcalina fue determinada al inicio y al final del tratamiento.

* igualdad, $p > 0.05$

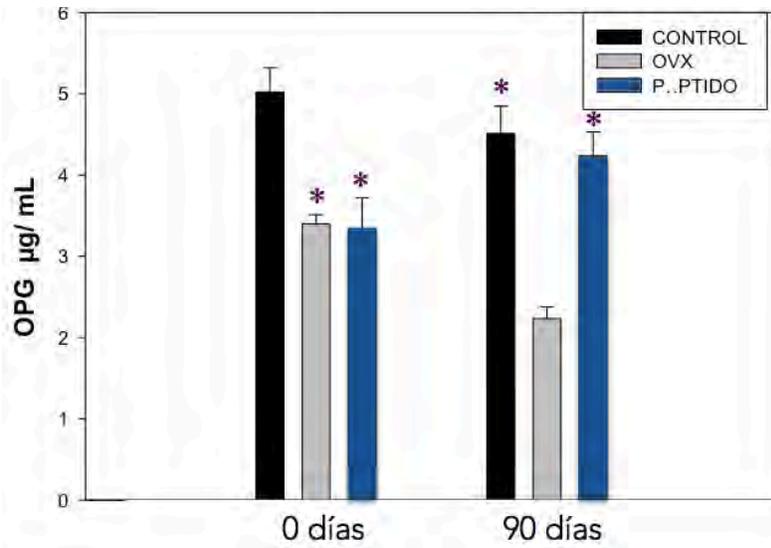


Figura 30. Nivel de la osteoprotegerina (OPG) circulante en suero extraído de ratas Wistar normales (control), con osteoporosis (OVX) y con osteoporosis que recibieron tratamiento con el péptido pCAP a una dosis de 20 µg/Kg peso y durante 90 días de administración diaria por vía intraperitoneal. La actividad específica de la fosfatasa alcalina fue determinada al inicio y al final del tratamiento.
* igualdad, $p > 0.05$

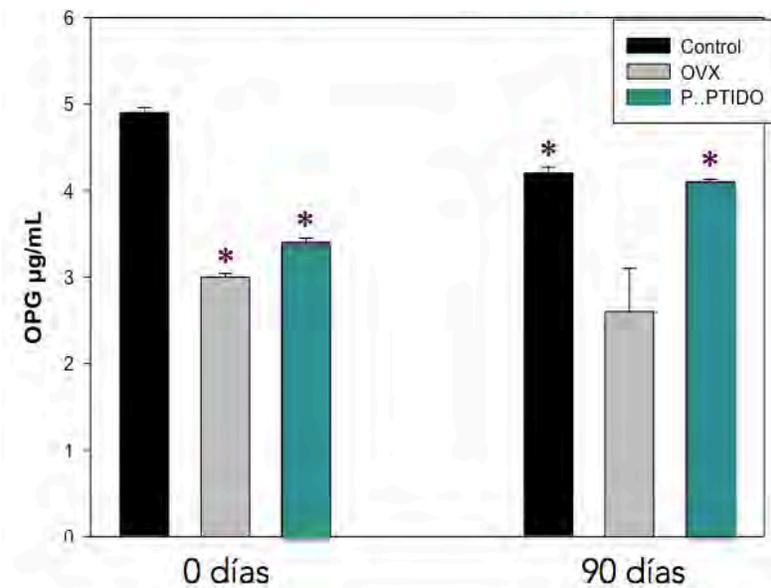


Figura 31. Nivel de la osteoprotegerina (OPG) circulante en suero extraído de ratas Wistar normales (control), con osteoporosis (OVX) y con osteoporosis que recibieron tratamiento con el péptido pCEMP a una dosis de 80 µg/Kg peso y durante 90 días de administración diaria por vía intraperitoneal. La actividad específica de la fosfatasa alcalina fue determinada al inicio y al final del tratamiento.
* igualdad, $p > 0.05$

✓ Proliferación celular

El efecto citotóxico y el efecto sobre la proliferación celular fue evaluado por medio del ensayo colorimétrico MTT (tetrazolium) [3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide], durante 1, 2, 3 y 4 días. Osteoblastos humanos derivados de hueso alveolar se sembraron a una densidad de 1×10^4 en placas de 96 pozos. Las células fueron tratadas con los péptidos (independientemente) durante 4 días con las concentraciones 1, 3 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada uno de los péptidos. El medio se reemplazó diariamente y los péptidos administrados de igual forma. Los controles utilizados fueron medio con suero fetal bovino al 10% (control positivo) y medio con suero fetal bovino al 0.5% (control negativo). Los péptidos se administraron a las diversas concentraciones contenidos en medio al 0.5%. Al final de cada día de tratamiento 10 μL de la solución de MTT (5mg/mL) se adicionaron a los pozos y se incubaron durante 3 horas. Al término se retiró el sobrenadante y se realizó la extracción por medio de DMSO durante 1 hora a 37°C. La densidad óptica del sobrenadante se leyó en un lector para ELISA a 570 nm.

La densidad óptica refleja el número de células vivientes presentes en el cultivo. Los resultados indican que la administración de 5 μg de ambos péptidos utilizados independientemente, promueven la proliferación celular (ver Fig. 32). Los resultados indican que el péptido pCAP (AVIFM) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a los 4 días, promueve la proliferación en un 82% respecto al control positivo (10% suero fetal bovino) (A). El péptido pCEMP1 (MGTSSTDSQQAQHRCSTSN) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ promueve la proliferación celular a un 92% respecto al control positivo (10% suero fetal Bovino) (B). Los resultados son estadísticamente significativos (ANOVA one-way $p < 0.05$). Estos resultados indican que ambos péptidos promueven la proliferación celular y no son citotóxicos para los osteoblastos humanos.

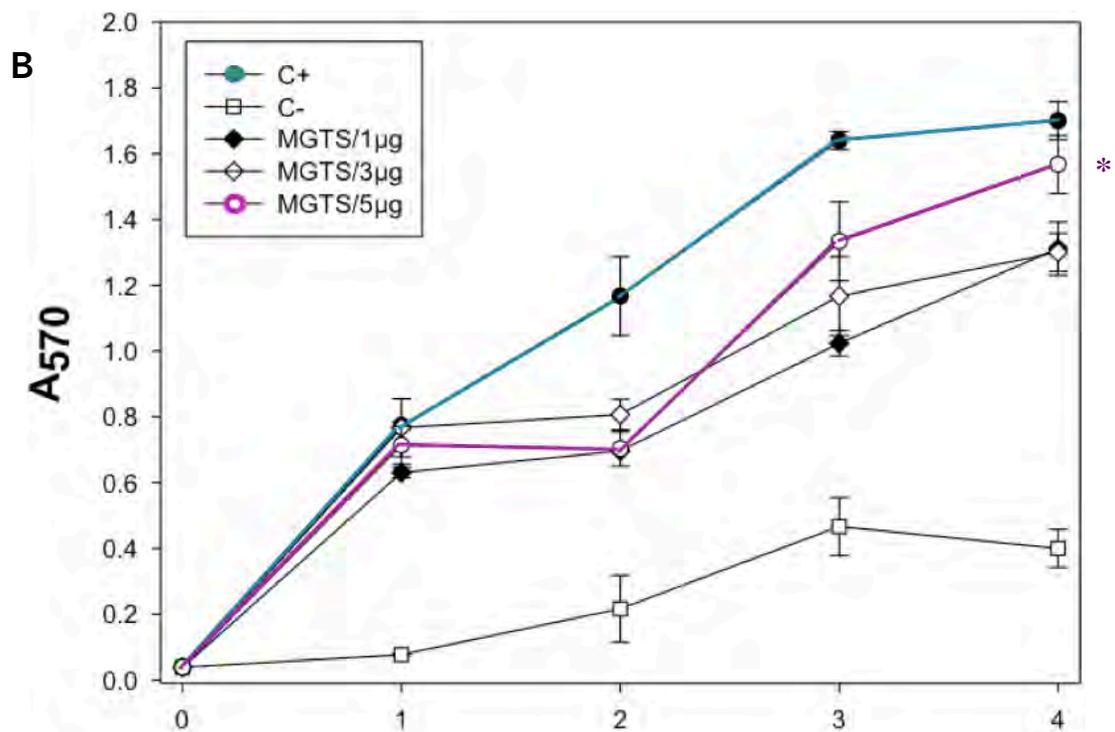
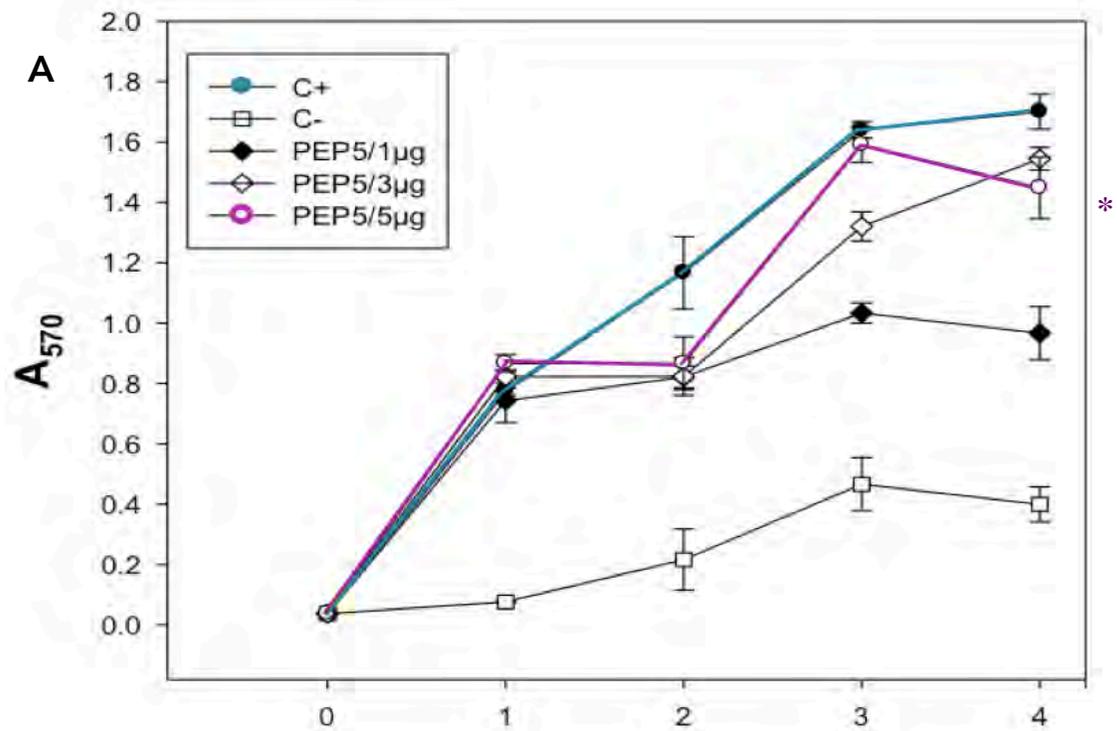


Figura 32. Citotoxicidad y proliferación *in vitro* utilizando los péptidos pCAP (A) y péptido pCEMP1 (B) a concentraciones crecientes: 1, 3 y 5 µg/ml. $p < 0.05$

✓ **Reacción en cadena de la polimerasa reversa en tiempo real, cuantificación relativa (RT-qPCR)**

Se utilizó el análisis $\Delta\Delta$ CT para obtener la expresión relativa de cada gen comparado contra el GAPDH y su tiempo 0. Se analizaron a 3 y 10 días.

pCAP

En el análisis a los 3 días, ALP se encontraba más expresado en los osteoblastos tratados con pCAP, sin embargo, no se encontró diferencia significativa con la expresión obtenida a los 10 días ($p < 0.0.1$). BSP se encontraba expresada en los osteoblastos igualmente a los 3 que a los 10 días ($p = 0.0001$). CBFA1 se expresó a los 3 días, pero se sobre expresó significativamente a los 10 días. OCN fue incrementando su expresión gradualmente en los periodos de tiempo; se encontraba más expresada a los 10 días ($p < 0.0.1$). COL1 se expresó a los 3 días, pero no fue significativo su crecimiento en comparación con los osteoblastos con y sin tratamiento, sin embargo, incrementó su expresión a los 10 días (ver Fig. 33).

pCEMP1

En el análisis a los 3 días todos los genes se encontraban expresados (ALP, BSP, CBFA1, OCN, COL1), sin embargo no fueron significativos con respecto a los osteoblastos sin tratamiento. Sólo OCN a los 3 días tuvo una diferencia significativa ($p < 0.0.1$). ALP fue incrementando su expresión gradualmente en los periodos de tiempo; se encontraba más expresada a los 10 días ($p < 0.0.1$). El resto de los genes se expresaron a los 10 días pero no significativamente ($p > .05$) (ver Fig. 34).

Figura 33. Expresión Relativa por $\Delta\Delta$ CT del qRT-PCR en osteoblastos tratados con el péptido pCAP. Se observa diferencia significativa en la cantidad de transcrito para los marcadores ALP, BSP y CBFA1 a los 3 días; BSP, CBFA1 y OCN a los 10 días, $p < 0.01$.

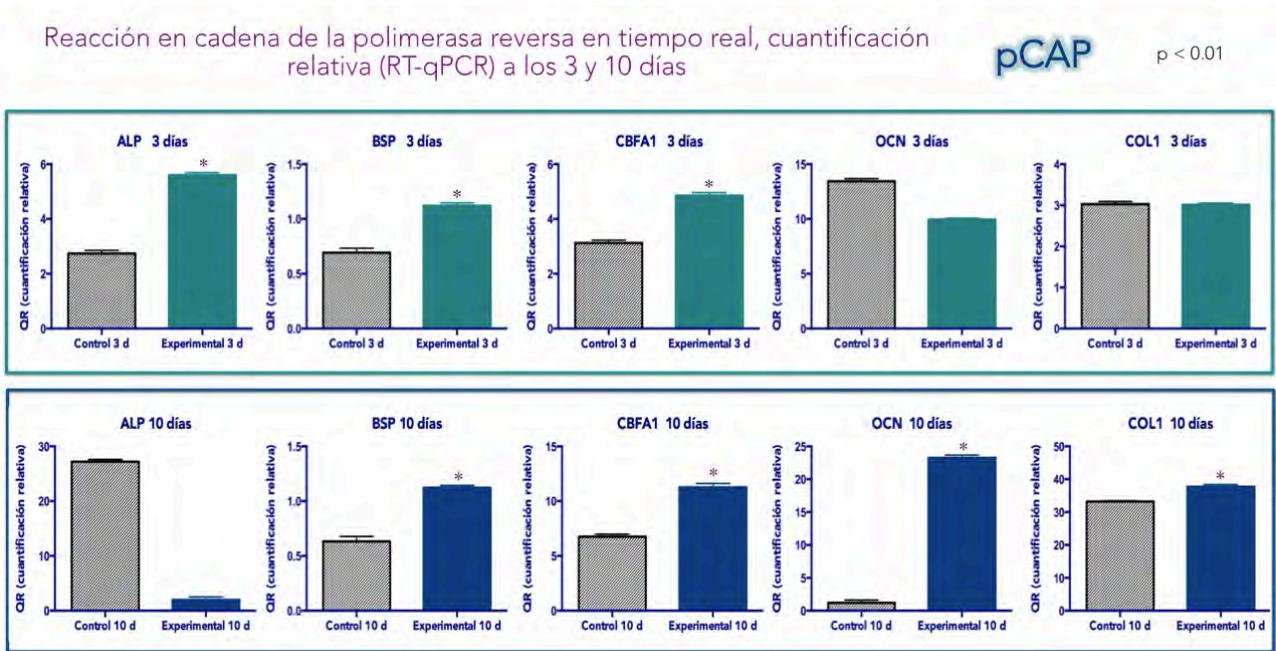
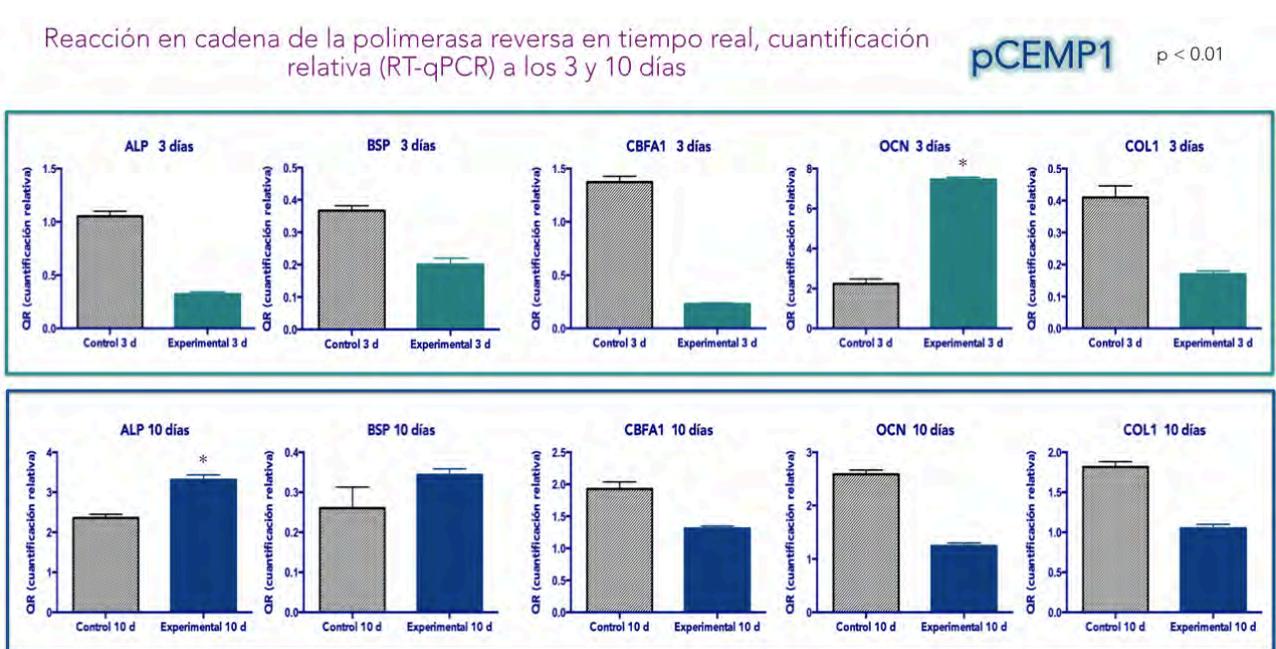


Figura 34. Expresión Relativa por $\Delta\Delta$ CT del qRT-PCR en osteoblastos tratados con el péptido pCEMP. Se observa diferencia significativa en la cantidad de transcrito para los marcadores OCN a los 3 días y ALP para 10 días, $p < 0.01$.

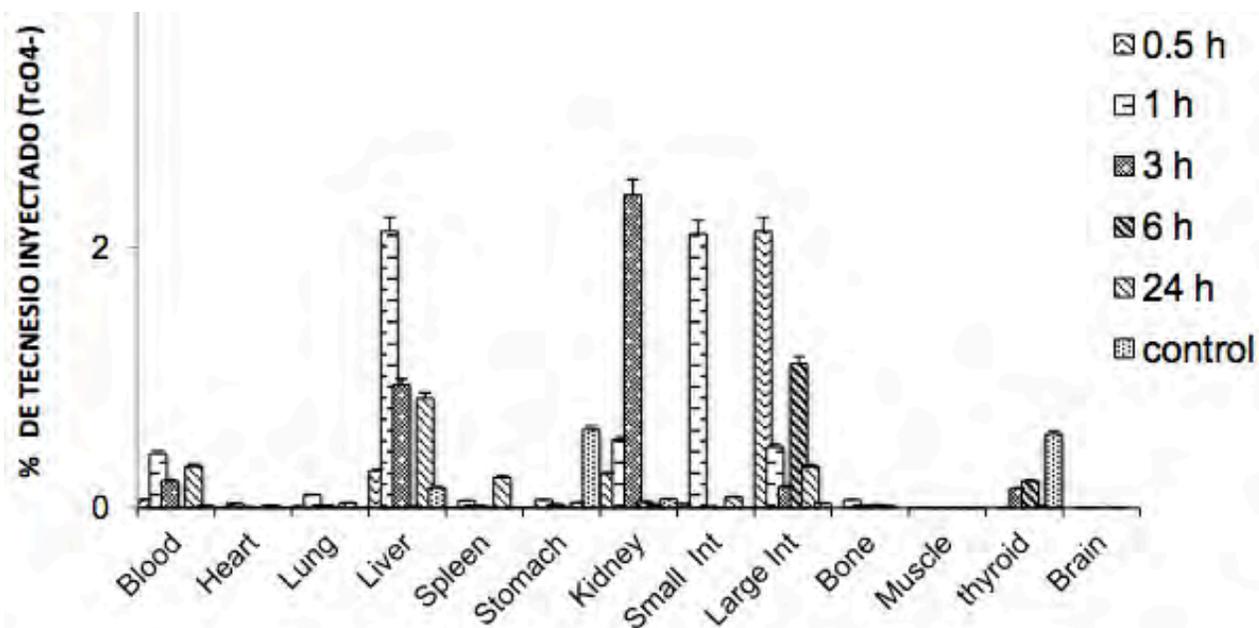


✓ Biodistribución

Para conocer la biodistribución de los péptidos (pCAP 20 y pCEMP1), se marcaron utilizando el tecnecio en forma de pertecnato (TcO_4^-). Para realizar el marcaje se preparó la solución de trabajo, la cual contenía: 40 μ g de los péptidos objeto de esta invención, 50 μ l de tartrato (2 mg/ml de buffer de acetato pH5), 10 μ l de $SnCl_2$ (2mg/ml HCL 0.1 N), 50 μ l de ácido gentísico (1mg/ml) y 50 μ l de $^{99m}Tc-NaTcO_4^-$ (5 mCi). Se utilizaron ratas Wistar machos de 250 g de peso, las cuales se encontraban a una temperatura de 22°C, con un fotoperiodo de 12 horas y humedad relativa a 50%, la alimentación y el agua fue *ad libitum*. Para evaluar la biodistribución, fue formando grupos de tres ratas a las cuales se les inyectó de manera intraperitoneal 40 μ l del péptido marcado, las cuales se sacrificaron con sobredosis de anestésico a los 30 minutos, 1, 3, 6 y 24 horas. Se colectaron muestras de sangre, corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones, estómago, intestino delgado, intestino grueso, músculo, hueso, tiroides, cerebro y diente. Dichos órganos fueron pesados en una balanza analítica y posteriormente se metieron en un contador de pozo de centelleo sólido de NaI (TI) para detectar la actividad de cada uno de los órganos. Con lo anterior se obtuvo el porcentaje de la dosis inyectada por gramos de tejido (%DI/g).

Los resultados indicaron que el péptido pCAP (AVIFM) presentaron el máximo valor en el intestino grueso de un 2.1% a los 30 minutos, disminuyendo sus valores a 0.3% a las 24 horas. En el momento de la administración del péptido, los órganos donde hubo mayor presencia del péptido con un porcentaje de 2.1% fueron el hígado e intestino delgado, disminuyendo a 0.8 y 0.08% de péptido remanente a las 24 horas respectivamente. En el riñón alcanzó su máximo de presencia de 2.4% a las 3 horas de inyectado el péptido y disminuyó al 0.02% a las 24 horas de administrado. En la figura 35 se aprecia la gráfica (A) y la tabla de biodistribución de este péptido en los diferentes tiempos que fueron analizados (B). Los resultados indican a que a los 30 minutos, el péptido pCEMP1 (MGTSSTDSQQAQHRCSTSN) alcanza un máximo nivel de 3.6% en el intestino grueso para disminuir a niveles de 0.006% a las 24 horas. En el hueso se presenta el 1.3% a los 30 minutos y 1.4% a la hora, disminuyendo a las 24 horas al 0.4%. En el hígado el porcentaje de péptido remanente en este órgano alcanza porcentajes de 3.4% a la hora de inyectado el péptido, disminuyendo al 0.2% a las 24 horas. En el riñón se presentan porcentajes de 1.6, 2.6 y 1.3, a la 1, 3 y 6 horas respectivamente, disminuyendo la presencia del péptido a las 24 horas a un 0.9%. Por lo consiguiente, son estos los órganos donde se determinó el mayor porcentaje de péptido remanente. Esto se aprecia en la figura 36, donde se presenta la gráfica (A) y la tabla con los porcentajes de presencia del péptido en los diferentes órganos examinados (B). La eficiencia del marcaje del péptido fue estable de 0 a 24 hrs [98.5% p <0.0.5] (ver Fig. 37 y 38).

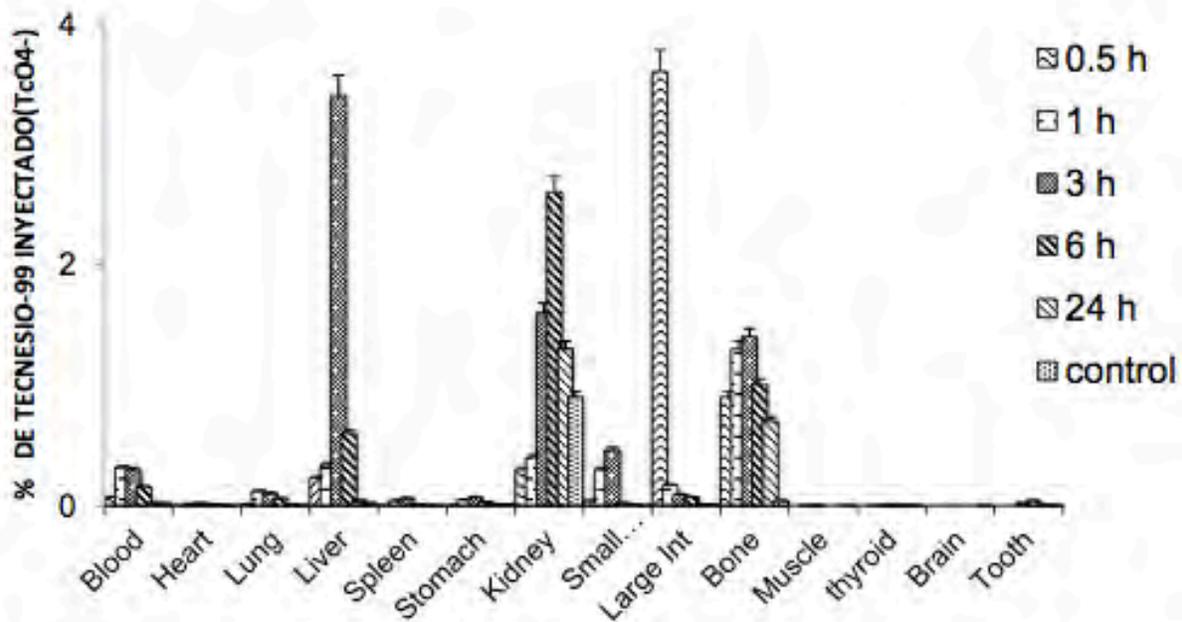
Figura 35. Biodistribución del péptidos pCAP con marca de pertecnecato (TcO_4^-), niveles detectados en los diferentes tejidos y sangre de Ratas Wistar.



DISTRIBUCIÓN DE TECNESIO-99 EN DIFERENTES ÓRGANOS

ORGÁNOS	0.5 h	1 h	3 h	6 h	24 h	control
Sangre	0.061	0.416	0.206	0.002	0.316	0.018
Corazón	0.003	0.032	0.006	0.001	0.018	0.003
Pulmón	0.012	0.099	0.020	0.007	0.038	0.003
Hígado	0.284	2.121	0.943	0.010	0.841	0.154
Bazo	0.003	0.055	0.015	0.007	0.231	0.000
Estómago	0.004	0.061	0.025	0.006	0.039	0.599
Riñón	0.261	0.521	2.400	0.045	0.022	0.068
Int. Del	0.029	2.100	0.010	0.004	0.082	0.005
Int. Gru.	2.122	0.464	0.161	1.106	0.315	0.034
Hueso	0.000	0.062	0.013	0.022	0.012	0.000
Músculo	0.001	0.000	0.003	0.003	0.004	0.001
Tiroides	0.000	0.003	0.147	0.204	0.012	0.564
Cerebro	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
Diente	0.000	0.001	0.020	0.000	0.012	0.000

Figura 36. Biodistribución del péptido pCEMP1 con marca de pertecnato (TcO_4^-), niveles detectados en los diferentes tejidos y sangre de Ratas Wistar.



DISTRIBUCIÓN DE TECNESIO-99 EN DIFERENTES ÓRGANOS

ORGANOS	0.5 h	1 h	3 h	6 h	24 h	control
Sangre	0.071	0.300	0.155	0.019	0.020	0.020
Corazón	0.001	0.019	0.009	0.004	0.001	0.002
Pulmón	0.015	0.100	0.060	0.006	0.003	0.002
Hígado	0.230	3.400	0.600	0.040	0.020	0.002
Bazo	0.002	0.060	0.010	0.002	0.001	0.001
Estómago	0.004	0.070	0.030	0.008	0.008	0.002
Riñón	0.300	1.600	2.600	1.300	0.900	0.004
Int. Del	0.040	0.460	0.020	0.006	0.004	0.005
Int. Gru.	3.600	0.090	0.070	0.009	0.006	0.005
Hueso	0.900	1.400	1.000	0.700	0.040	0.000
Músculo	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001
Tiroides	0.000	0.000	0.003	0.004	0.001	0.002
Cerebro	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Diente	0.000	0.020	0.040	0.002	0.004	0.000

Figura 37. Tomografía de emisión por fotón único. Véase la distribución de la administración del péptido marcado: 1 hr se encuentra en el sitio de inyección y vejiga; 3 hr, riñones e hígado, gastrocólico y vejiga; 6 hr, riñones y menor cantidad en hígado; 24 hr: riñones y colon, y en menor cantidad en el hígado.

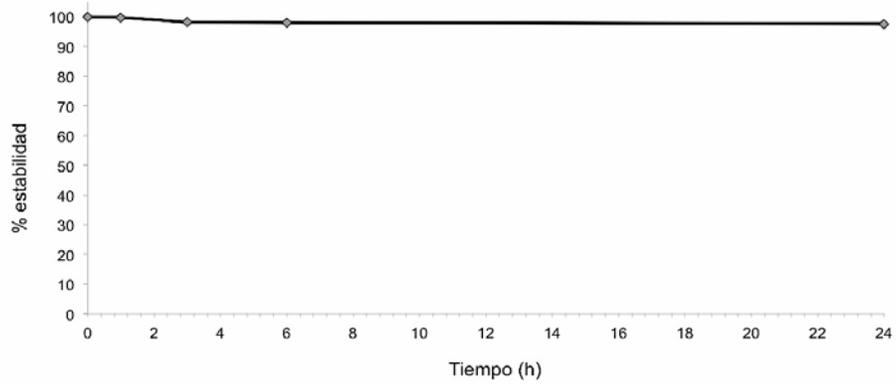
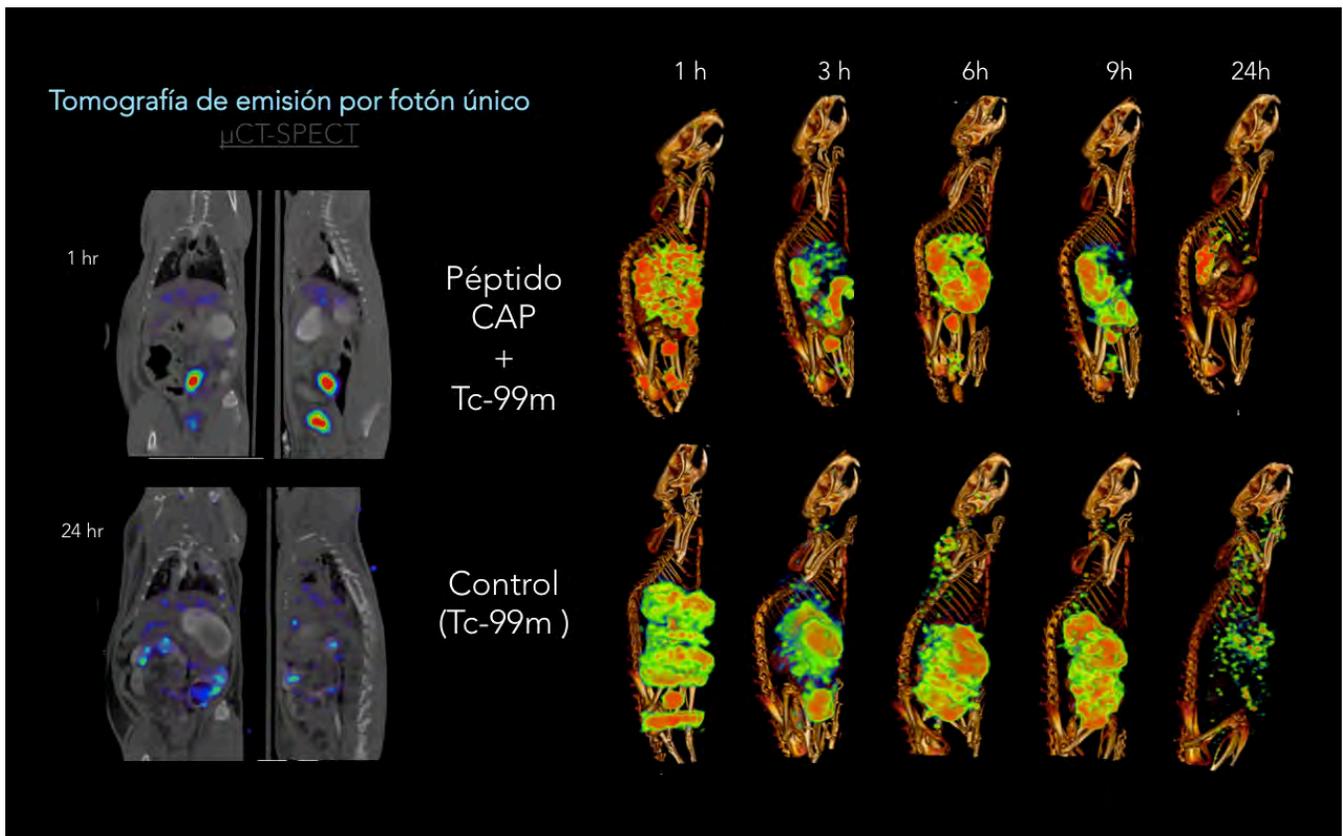


Figura 38. La eficiencia del marcaje del péptido fue estable de 0 a 24 hrs [98.5% p <0.0.5].



DISCUSIÓN

Actualmente existen pocos estudios sobre la utilización de péptidos que promuevan la nucleación de cristales de hidroxiapatita. Los péptidos han estado a la vanguardia de la investigación científica de las últimas décadas; su diversidad estructural y alto nivel de selectividad los posicionan como principales candidatos para el desarrollo terapéutico. El campo de estudio de la síntesis química de péptidos se hizo factible por el desarrollo de la técnica de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS) en 1960 por Bruce Merrifield (Premio Nobel Química, 1984). Además de hacer la síntesis de péptidos práctica, esta técnica permite la introducción de aminoácidos no nativos y modificaciones post-traduccionales (PTMs) de manera regulada. A medida que el uso terapéutico de proteínas nativas o recombinantes para la remineralización aún no es viable, la investigación se ha centrado en el desarrollo de compuestos peptídicos miméticos o a la identificación de dominios funcionales dentro de proteínas de origen natural. Los péptidos naturales son en su mayoría fragmentos de proteínas de tejido óseo que se sabe están implicados en la mediación de la formación de hidroxiapatita. La secuencia de aminoácidos de los péptidos pCAP y pCEMP1, son capaces de unirse a dicho mineral y hacer una plantilla para la integración estructural de matrices orgánicas e inorgánicas. También existen proteínas no colágenas involucradas en la biomineralización, las cuales son ricas en aminoácidos con residuos ácidos que tienen la capacidad de unirse con iones metálicos e inician el proceso de mineralización. Por ejemplo, los péptidos de unión a calcio derivados de la proteína de matriz de dentina 1 (DMP1) afectan a la nucleación *in vitro* de hidroxiapatita, y la región rica en ácido glutámico de BSP, está involucrada en la nucleación de cristales. Aunque muchas investigaciones se han dedicado a la aplicación de péptidos relacionados con la mineralización, hay poca evidencia acerca del empleo de péptidos naturales (19). Sin embargo, características propias de las proteínas/péptidos como punto isoeléctrico, presencia de grupos fosfato o carboxilato y la propia carga-neta de la secuencia de aminoácidos juegan un papel predominante en la interacción con minerales. Siempre se debe tomar en cuenta que los estudios *in vitro* son sólo aproximaciones de lo que sucede en sistemas biológicos, ya que *in vivo* existe un gran número de variables (distintos iones, pequeñas moléculas y/o macromoléculas); así pues, el proceso de cristalización de la hidroxiapatita aún no es claro y los mecanismos moleculares de la interacción de proteína-proteína y proteína-mineral son poco conocidos, por lo que descifrar dichas interacciones permitirá establecer estrategias promisorias en la regeneración de tejidos mineralizados *in vivo* (19).

El presente estudio muestra evidencia sobre el efecto de la utilización de dos péptidos sintéticos derivados de la proteína de adhesión del cemento radicular (pHACD1/CAP -AVIFM-) y el péptido derivado de la proteína del cemento 1 (pCEMP1 - MGTSSSTDSQQAGHRRRCSTSN) en un modelo animal osteoporótico. Estudios previos han permitido establecer las características que poseen ambos péptidos: tienen el potencial de actuar como nucleadores de cristales de hidroxiapatita, por lo tanto, se les asocia a procesos de biomineralización; también se ha evidenciado que los péptidos pCAP y pCEMP1 promueven la formación de nuevo tejido óseo *in vivo* en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata Wistar (175) y en defectos segmentales en tibias de conejos Nueva Zelanda (20). Por lo cual, estos resultados nos encauzaron a preguntarnos si ambos péptidos serían capaces de ejercer un efecto regenerativo a nivel sistémico aplicados a una enfermedad metabólica generalizada como la osteoporosis; para lo cual, tuvimos que partir de una dosis terapéutica basada en los estudios reportados en los ensayos clínicos aleatorizados de la teriparátida (74, 176) [forteo®, fragmento biológicamente activo de la hormona paratiroidea o parathormona (PTH), utilizada en el tratamiento de la osteoporosis establecida. La PTH y sus fragmentos han demostrado ser potentes estimuladores de la formación y resorción óseas. La administración diaria en forma subcutánea de PTH estimula la formación ósea pero tiene diferentes efectos sobre la resorción ósea y la masa ósea], la cual se

administra subcutáneamente a una concentración de 20 μg diarios (177). De igual forma, en el estudio realizado por Montoya *et al* (19), concluye que el péptido de la proteína de adhesión del cemento a una concentración de 20 μg promueve la formación de cristales de hidroxiapatita y que dicho péptido tiene la capacidad de regular la morfología y fase cristalina en un sistema libre de células, el cual se basa en la precipitación de una fase móvil desde soluciones supersaturadas de calcio y fosfato, concluyendo también que la capacidad de controlar la organización de iones de calcio y promover la formación de hidroxiapatita es dependiente de la concentración del péptido. Cabe mencionar que el mecanismo exacto de cómo el pCAP favorece la agrupación de los iones para la formación cristalina de la hidroxiapatita no es clara, pues el péptido es altamente hidrofóbico, por lo que presumiblemente se den interacciones entre varias moléculas peptídicas y a su vez, cada uno de los radicales de aminoácidos establezcan interacciones interatómicas con los iones calcio, brindando la capacidad reguladora que tiene dicho péptido, por lo cual, hacen falta estudios moleculares más específicos para determinar la interacción precisa de los péptidos con los iones y los cristales de hidroxiapatita (19).

Pese a que en la literatura casi no hay estudios experimentales en regeneración ósea por péptidos, menos cemento-específicos, nosotros obtuvimos datos contundentes de regeneración ósea. Los datos recolectados en este estudio corroboran microtomográficamente los cambios estructurales óseos evaluados en diversos periodos de tiempo con el objetivo de monitorizar la progresión de la enfermedad y la eficacia del tratamiento. Con lo cual observamos que con la administración de ambos péptidos, los animales osteoporóticos sometidos a la administración de pCAP y pCEMP1, regeneraron trabéculas óseas con características similares a los animales sanos (controles) y mejoraron su densidad mineral ósea, esto probablemente debido a que el papel exacto de los hidratos de carbono unidos a la proteína del cemento 1 es desconocida; sin embargo, la glicosilación puede afectar a la función de la proteína CEMP1 durante el proceso de mineralización porque a su superficie aniónica se pueden unir un gran número de iones Ca_2^+ y regular el crecimiento de la hidroxiapatita. Los glicanos también están implicados en la regulación de la osificación endocondral, el remodelado óseo y la reparación de fracturas (1). La presencia de fosfato también favorece la unión de Ca_2^+ a la proteína, y las proteínas asociadas con el proceso de mineralización (sialoproteína y osteopontina), son altamente fosforiladas en residuos de treonina y serina. Por lo tanto, CEMP1 puede desempeñar un papel en las primeras etapas de mineralización durante la formación de fosfato octacálcico (130). Por otro lado, ^{32}P promueve la migración celular con mayor afinidad para las células del ligamento periodontal y del hueso alveolar, incrementa la actividad específica de la fosfatasa alcalina y promueve la condrogénesis y mineralización en células mesenquimatosas, es decir, induce la diferenciación celular (155). También se ha demostrado que fibroblastos tratados con BMP2 expresan CAP y ALP, por lo que BMP2 puede reclutar progenitores e inducir la diferenciación celular por medio de la expresión de moléculas específicas de cemento radicular (11, 156). Las vías de señalización involucradas que se han identificado y se propone que participan en la proliferación y diferenciación celular son la vía de Smad-1 (vía canónica de señalización de BMP) y MAPK (157, 158).

La calidad ósea es un parámetro importante para la evaluación de la OS, el riesgo de fracturas y el tratamiento de la misma. La resistencia ósea está comprometida con la DMO y la calidad ósea. Los hallazgos de este estudio están de acuerdo con informes previos en ratas OVX en demostrar que las disminuciones en la DMO y las propiedades biomecánicas se producen más rápidamente en las vértebras que en el fémur (5). La resistencia ósea no depende solamente de su masa, sino de sus propiedades geométricas, estructurales y materiales, englobadas en un concepto: calidad ósea. El comportamiento biomecánico del hueso resulta extremadamente complejo debido a su carácter heterogéneo, anisotrópico y viscoelástico (178). En múltiples estudios, la resistencia a la flexión de la vértebra disminuyó significativamente en la OS como con el grosor cortical. La disminución de la resistencia ósea está relacionada con las características estructurales y de composición de la matriz ósea. En nuestros grupos de estudio, el área cortical y el grosor cortical disminuyeron en las OVX, y

aumentaron en los animales tratados con los péptidos (179). Cualquiera que sea el tipo de fuerza a la que se somete un hueso, el módulo elástico siempre es proporcional a la DMO, por lo que la carga necesaria para la deformación del hueso será proporcional al grado de mineralización del mismo (60-80% resistencia biomecánica del hueso; 40-20% calidad ósea); el descenso en el número de trabéculas disminuye la resistencia. También se ha estudiado la relación lineal entre la fuerza y la densidad, donde ésta es la característica más valiosa en las propiedades mecánicas del hueso trabecular, reflejándose en el incremento de la resistencia mecánica (24, 180). En los resultados obtenidos de los grupos tratados con los dos péptidos, se observó una ganancia trabecular desde el estado osteoporótico hacia un fenotipo parecido al sano, observándose un incremento del número trabecular; esto es sumamente importante debido a que Caeiro *et al* (2015) reportó que una estructura ósea con mayor número, grosor y conectividad entre trabéculas es más resistente, que otra con menor número, menor grosor y mayor separación, aunque ambas presenten la misma masa ósea (181). También es importante señalar que Hoffler *et al* (2000) publicó que no se ha encontrado un efecto en la edad, el género o el índice de masa corporal en el módulo elástico o la dureza de las trabéculas, por lo que puede deducirse entonces que el módulo elástico y la dureza de la matriz del hueso entero podrían ser debidas a otros factores, como cambios en la masa y la organización del tejido (181, 182), y teniendo en cuenta esto, debemos inferir que nuestro estudio experimental versó en animales de especie pequeña y que la extrapolación a humanos, podría significar una diferencia importante en dureza y en la resiliencia ósea.

El análisis de la arquitectura ósea en la osteoporosis tiene una importancia particular para la comprensión de ciertas manifestaciones clínicas y de ciertas complicaciones porque se sabe que los cambios estructurales afectan la calidad del hueso (183). Los resultados de nuestra investigación son similares a los resultados de otros estudios especializados (184); esto significa que en la mayoría de las secciones óseas examinadas con la tinción tricrómica Masson, se identificaron las diferencias del tejido osteoide (coloración azul) y de la matriz ósea mineralizada (coloración rojiza). Tanto en las vértebras como en los fémures de las ratas osteoporóticas tratadas con ambos péptidos, se observó mayor tendencia a la coloración rojiza, que de acuerdo a las características descritas por Gruber *et al* (185), corresponde a un depósito mineral en proceso de constituir una nueva matriz ósea (inmadura) (24). Aparte, la disminución de la conectividad trabecular, así como la aparición de perforaciones trabeculares y la esteatosis, son fenómenos que se vuelven más evidentes con el envejecimiento y la osteoporosis. La médula ósea y el hueso presentan una estrecha interdependencia funcional; las modificaciones ocurren a nivel de médula ósea, con la disminución de la celularidad paralela a un aumento de la adiposidad a nivel medular. El aumento de la adiposidad se produce debido a la disminución de la diferenciación de los osteoblastos de los precursores de las células estromales en favor de la diferenciación adipocitaria (183). Nuestros resultados coinciden con otros estudios (186), que también muestran el aumento del tamaño de las células adiposas en el nivel de la médula ósea en las laminillas de los huesos osteoporóticos. Otra causa que puede atribuirse al aumento de la adiposidad medular está relacionada con la vascularización del hueso. Para realizar óptimamente sus funciones, la médula ósea, así como el hueso, dependen de un suministro sanguíneo adecuado. Siguiendo un conjunto de investigaciones a nivel femoral, Griffith *et al* (49) señaló que en la osteoporosis hay una reducción del flujo sanguíneo en el hueso; el mismo autor mostró la importancia de la conexión entre la perfusión sanguínea del tejido óseo y la de la médula ósea, existiendo una disminución del suministro sanguíneo a nivel medular seguida por el aumento del contenido adiposo de la médula. Esto puede explicarse por el hecho de que la médula muestra una estrecha dependencia funcional; siendo las células de la médula ósea las precursoras de las células que participarán en el proceso de remodelado: su alteración tendrá consecuencias sobre el proceso de remodelación (183). A diferencia de nuestro estudio, cabe destacar que nuestros animales osteoporóticos esteatóticos progresaron a cavidades medulares con neoformación trabecular. Este enfoque es prometedor destacando las propiedades curativas de ambos péptidos.

Marcu *et al* (2011) en un estudio de biopsias de hueso osteoporótico de fémur y vértebras, menciona que en las etapas avanzadas de la enfermedad, las trabéculas óseas se adelgazan, éstas aunque más frágiles debido a la osteólisis excesiva, histológicamente representan una disminución del número y de la conectividad trabecular, así como la aparición de perforaciones óseas (183). Los resultados de nuestra investigación son similares a los resultados de otros estudios especializados (184): el mantenimiento de la conectividad del sistema trabecular es de gran importancia para la resistencia ósea (183, 187), lo cual coincide con nuestros resultados de la histomorfometría (100% sano, 33.18 ± 1 OVX, 150 ± 1 pCEMP1 40 μg , 80.68 ± 1 pCEMP1 80 μg , 79.54 ± 1 % pCAP 20 μg). En la histomorfometría vertebral, corresponde a la misma respuesta positiva con la utilización de los péptidos (100% sano, 31.37 ± 1 OVX, 118.19 ± 1 pCEMP1 40 μg , 113.33 ± 1 pCEMP1 80 μg , 96.33 ± 1 % pCAP 20 μg). Las particularidades histológicas antes mencionadas, demuestran que las ratas Wistar sometidas a ovariectomía, que desarrollaron osteoporosis y que fueron tratadas con los péptidos, muestran características de hueso normal sano. Se han estudiado las funciones de CEMP1 mediante ensayos de transfección de células no mineralizantes (HGF-CEMP1). Las células HGF-CEMP1 mostraron una mayor proliferación, formación de nódulos de calcio, aumentaron la actividad específica de la ALP, y la expresión de OCN, OPN, BSP, CAP, entre otras. Estas moléculas están asociadas a la formación de hueso y cemento (12). Los estudios apoyan firmemente la idea de que CEMP1 tiene la capacidad de cambiar el fenotipo de las células de no mineralizantes (HGF) hacia fenotipos osteo/cementoblásticos, regulando la proliferación y la expresión génica, lo que resulta en la diferenciación de estas células y la producción de una matriz extracelular mineralizada y probablemente sea ésta la razón por la cual el pCEMP1 regeneró trabéculas óseas en los modelos osteoporóticos.

En los estudios histológicos de los órganos vitales, se percibe que con la utilización de los péptidos no se observan diferencias microscópicas en los tejidos, ni alteraciones en la microarquitectura de estos, por lo que los tejidos tratados experimentalmente con los péptidos objeto de este estudio, no producen daño celular, ni tisular, ni alteraciones morfológicas, observándose características normales y similares a las de un sujeto sano. Esto implica que los péptidos sintéticos son inocuos como fármacos para el tratamiento de la osteoporosis, no produciendo reacciones adversas o secundarias a nivel celular o tisular. Nuestros resultados sugieren que probablemente por el peso molecular de los péptidos pCAP (1.65kDa) y pCEMP1 (2.18 kDa) y que éstos derivan de una proteína endógena, el sistema inmunológico no desencadenó ninguna reacción inflamatoria.

Wheater *et al* (51), reporta que el recambio óseo se correlaciona con la presencia de ciertos marcadores bioquímicos en el suero y en la orina que resultan de la actividad metabólica del hueso (51), y aunque en un principio se determinaban en orina, actualmente es posible evaluarlos en suero (188). Los marcadores bioquímicos de recambio óseo pueden predecir el riesgo de fractura de forma independiente de la DMO e inferir en la rapidez de la pérdida ósea en los pacientes no tratados, pronosticar la reducción del riesgo de fractura después de tres meses de tratamiento, medir la magnitud del aumento de la DMO, la adecuación del cumplimiento del paciente y la persistencia del tratamiento (140). En nuestra investigación medimos la fosfatasa alcalina (ALP), enzima de membrana celular del OB, la cual es sintetizada por los osteoblastos maduros y sus precursores; y aunque su función precisa no ha sido aún bien establecida, es sabido que juega un rol importante en la formación e iniciación de la mineralización ósea; implicada en la calcificación del esqueleto: aumenta en las concentraciones locales de fosfato inorgánico, destruyendo el pirofosfato que inhibe la cristalización mineral y actúa como una proteína de unión a Ca_2^+ . El aumento del remodelado óseo que ocurre después de la menopausia, incrementa los niveles de actividad de ALP dos veces el rango de referencia (también la presencia de microfracturas). Por ello, la medición de su actividad en suero es una medida indirecta del proceso de formación. Las ratas OVX tuvieron un incremento del 53% de la actividad específica de la ALP con respecto a los valores en las ratas normales sanas. Al final del tratamiento, las ratas OVX tratadas con el péptido pCAP 20 μg , mostraron una reducción del 1% respecto a las ratas

Wistar controles sanas y una disminución del 48% respecto a las ratas osteoporóticas. Se observaron resultados muy similares para el péptido pCEMP1. Estos resultados indican que los péptidos pCAP y pCEMP1, son capaces de regular la actividad específica de la ALP y por lo tanto, los péptidos participan en el proceso de remineralización ósea en el tratamiento de la osteoporosis (189). La medida de la formación ósea dada por la fosfatasa alcalina es indirecta, y depende del exceso de enzima secretada por los osteoblastos activos y probablemente también por los preosteoblastos, células de revestimiento y osteocitos. Por lo tanto, al igual que con todos los estudios de recambio óseo, la correlación cuantitativa entre los niveles séricos de ALP y la tasa real de deposición ósea no puede ser simple o constante entre los pacientes (141); lo mismo aplica para estudios animales, por lo tanto, esto explica la variabilidad intragrupal encontrada en nuestro estudio. La osteocalcina (OCN o proteína Gla del hueso) es una proteína no-colágena más abundante en la matriz ósea y dentina (145), producida por el osteoblasto, con una alta afinidad por calcio e hidroxapatita; su distribución está limitada a tejidos mineralizados. Está implicada en la regulación de la mineralización; modula el crecimiento, tamaño y forma de los cristales de hidroxapatita: inhibe la precipitación de PO y Ca_2^+ evitando la excesiva mineralización de la matriz ósea (190). La OCN recién sintetizada se incorpora en gran medida a la matriz ósea extracelular, sin embargo se libera una pequeña fracción a la circulación, proporcionando un marcador de formación ósea. Es un marcador tardío de la actividad osteoblástica, en comparación con la síntesis de ALP y colágena tipo I. Los niveles séricos de OCN se correlaciona bien con la tasa de formación ósea [evaluado tanto por histomorfometría ósea y por cinética de calcio] (191). La osteocalcina se degrada rápidamente *in vivo* e *in vitro*, así que la molécula intacta y los fragmentos (1-43 aa) coexisten en la circulación (140). Algunos fragmentos de OCN también se liberan durante la resorción ósea (192). Según algunos estudios relacionados a tratamientos experimentales de osteoporosis, la osteocalcina sérica presenta niveles bajos en mujeres de 20 a 49 años de edad, con un aumento progresivo después de los 50 años e incluso después de 60 años (53). Lo visto en nuestros resultados es conforme lo reportado en la literatura: se incrementa en condiciones asociadas con el aumento del remodelado óseo. En OS, donde la resorción y la formación se encuentran desacopladas, la OCN sólo sirve como un marcador de formación ósea. En las ratas OVX los niveles de osteocalcina en suero se incrementan hasta un 156%, mientras que las ratas tratadas con el péptido pCAP 20 μg muestran una reducción del 61%; en los animales tratados con pCEMP1 80 μg , hay una reducción del 70% en comparación con las ratas OVX ($p < 0.05$). Esto indica que la administración de ambos péptidos, promueven la disminución de los niveles de OCN en suero cuando se comparan con ratas OVX sin tratamiento, indicando que los péptidos promueven el proceso de remineralización ósea.

El ligando del receptor activador del factor nuclear κB (RANKL)/receptor activador del factor nuclear κB (RANK)/osteoprotegerina (OPG) es un importante sistema de señalización en la diferenciación de los osteoclastos: mantienen el equilibrio metabólico e integridad ósea entre la formación y la resorción ósea mediada por osteoblastos y osteoclastos (193). Numerosas hormonas y citocinas están implicadas en la regulación de osteoblastos y osteoclastos, entre los cuales el sistema RANKL/RANK/OPG juega un papel clave. Los osteoblastos y las células estromales de la médula ósea secretan RANKL, que se combina con RANK en osteoclastos/células precursoras de huesos osteoporóticos para mediar la maduración de los osteoclastos y aumentar la resorción ósea (194). Simultáneamente, expresan OPG, que se combina competitivamente con RANKL para inhibir la generación y maduración de osteoclastos (195). La OPG también promueve la apoptosis de los osteoclastos para inhibir la resorción ósea (196). De acuerdo a los estudios de Berenson *et al*, el sistema OPG/RANKL/RANK regula la diferenciación, la activación y la apoptosis de los osteoclastos para promover la formación ósea mediante el avance del contacto con las células osteogénicas (197). Entre las 3 proteínas, la relación OPG/RANKL puede ser un factor clave que afecta a la reacción mediada por osteoblastos. Una mayor relación OPG/RANKL se ha

correlacionado con una función mediada por osteoblastos más fuerte (198). La relación OPG/RANKL en el tejido óseo osteoporótico es mucho menor que la del tejido óseo humano normal, lo que sugiere que la formación de osteoclastos es mayor en el tejido óseo osteoporótico que en el tejido óseo normal. La formación de osteoclastos es probablemente el principal mecanismo patológico de la OS. Los estudios se han centrado en la relación entre osteoporosis y el sistema RANKL/RANK/OPG durante el período de la menopausia (193). En múltiples estudios reportados en la literatura, la determinación del papel del sistema OPG/RANK/RANKL en la regulación del metabolismo óseo creó nuevas vías para el desarrollo de fármacos para prevenir y controlar la OS. La expresión de OPG o RANKL en la vía de señalización OPG/RANK/OPG se ha convertido en el objetivo terapéutico más relevante para la enfermedad osteolítica (193, 194, 199, 200).

Los estrógenos reducen la expresión de RANKL, aumentan la secreción de OPG (188). En un estudio realizado por Syed y Khosla (2005), el hueso trabecular aumentó significativamente en ratas ovariectomizadas tratadas con OPG, pero disminuyó en ratas ovariectomizadas no tratadas. Cuando los niveles de estrógeno disminuyen, incrementan los niveles de RANKL (ya que los estrógenos limitan a RANKL) y por consiguiente, también disminuyen los niveles de osteoprotegerina (140). En la osteoporosis, los niveles de osteoprotegerina disminuyen, aumentando los niveles de RANKL activando la función osteoclástica (51). Nuestros resultados son concordantes con lo reportado en la literatura, los niveles de RANKL en ratas OVX al inicio del tratamiento están aumentados y concluido el tratamiento con los péptidos, muestran una disminución. Estos resultados indican que el tratamiento con ambos péptidos, inhiben el proceso de resorción ósea. Los niveles de OPG que se determinaron, muestran un incremento estadísticamente significativo; los resultados demuestran que la administración de los péptidos pCAP y pCEMP1, incrementan los niveles de osteoprotegerina en suero, lo que se interpreta como un papel regulador en el metabolismo óseo inhibiendo el proceso de resorción y promoviendo la remineralización ósea, la cual se refleja en el incremento de la densidad mineral ósea y en el incremento de las propiedades mecánicas del tejido óseo.

Los resultados del desempeño de los péptidos pCAP y pCEMP1 muestran que para las ratas con osteoporosis, la ausencia de tratamiento no evita la pérdida ósea ni la presencia de espacios medulares vacíos en la epífisis de fémur, ni evita la resorción ósea como se observa en la cuarta vértebra lumbar, acompañada de la reducción en el grosor de la cortical ósea que rodea o cubre el cuerpo vertebral. Asimismo y como consecuencia de dicha pérdida ósea, los marcadores bioquímicos involucrados en el proceso de resorción y aposición ósea presentes en el suero, indican que la fosfatasa alcalina y la osteocalcina presentan valores elevados respecto a lo normal como consecuencia en el incremento de la resorción ósea. Otros marcadores como la osteoprotegerina y RANKL presentan valores disminuidos respecto al normal como consecuencia del incremento de la resorción ósea. Los animales tratados con los péptidos presentan los espacios medulares llenos, sin evidencia de espacios osteoporóticos, con microarquitectura ósea normal. Los marcadores bioquímicos del proceso de resorción y aposición ósea presentes en suero muestran valores similares a los obtenidos de ratas Wistar sanas. Los tejidos examinados histológicamente y presentados en este proyecto, no muestran alguna diferencia en los controles sanos y los obtenidos de ratas Wistar tratadas con cualquiera de los péptidos: con la utilización de ambos péptidos, los niveles de ALP, OCN y el sistema RANKL/OPG se encuentran dentro de los parámetro de niveles sanos.

La medición de la viabilidad celular y la proliferación (201) forman la base de numerosos ensayos *in vitro* como respuesta de una población celular a factores externos (202). En un estudio hecho por Li *et al*, exploraron los mecanismos subyacentes de un nuevo medicamento (*Andrografolida*) en la proliferación de osteoblastos, con la esperanza de proporcionar nuevas direcciones para diseñar terapias innovadoras en el tratamiento de las enfermedades óseas. Las primeras 48 hr de cultivo celular, la proliferación de osteoblastos fue lenta; las tasas de proliferación comenzaron a acelerarse a partir de

las 72 hr de cultivo celular y entraron en la fase de crecimiento exponencial. Y al igual que nuestros resultados, el ensayo de MTT mostró que las tasas de proliferación de osteoblastos aumentaron a concentraciones crecientes del medicamento/péptidos [las tasas de proliferación aumentaron al aumentar el tiempo de cultivo] (203) y a diferencia de su estudio, nosotros también comprobamos que los péptidos utilizados en esta investigación, aparte de no ser citotóxicos, también presentaban pruebas biomecánicas satisfactorias y compatibles con huesos sanos. Nuestros resultados indicaron que ambos péptidos a una concentración de 5 µg/mL a los 4 días, promueven la proliferación celular (82% pCAP y 92% pCEMP1, $p < 0.05$) y no son citotóxicos para los osteoblastos humanos. Otro estudio para el desarrollo de un nuevo medicamento para la osteoporosis, la amentoflavona (bioflavonoide) medicina tradicional china, la cual tiene efectos anti-inflamatorios, antioxidantes, antivirales y anticancerígenos y que es conocida por ser beneficiosa en el tratamiento de trastornos óseos (efecto anabólico sobre el metabolismo óseo), también probaron el efecto de la amentoflavona en la proliferación de osteoblastos. Sus resultados mostraron que la amentoflavona aumentaba la proliferación de una manera dependiente de la dosis (204), sin embargo, su medicamento no proporcionaba neoformación de trabéculas óseas, y a diferencia de nuestros estudios experimentales, los péptidos son efectivos para promover el crecimiento celular a dosis crecientes y también participan en el proceso de neoformación trabecular.

En este estudio se evaluó *in vivo* la capacidad que tienen los péptidos para promover la regeneración ósea. *In vitro*, nuestros resultados muestran un incremento importante en la expresión de CBFA1 (Subunidad alfa-1 del factor de unión al núcleo [*core-binding factor subunit alpha-1* (CBF-alpha-1), también conocido como RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*)], el cual es un factor de transcripción clave asociado con la diferenciación de los osteoblastos, codificado en humanos por el gen RUNX2, perteneciente a la familia de factores de transcripción RUNX; éste es esencial en la diferenciación osteoblástica y en la morfogénesis del esqueleto, y actúa como una proteína estructural para los ácidos nucleicos y factores reguladores implicados en la expresión génica relacionada con el esqueleto. La necesidad de Runx2 se ha analizado en varios estudios, su ausencia provoca pérdida parcial de osteoblastos y problemas esqueléticos severos (205). En nuestro ensayo, los resultados indican que los genes involucrados en el proceso de mineralización, incrementan su expresión en los osteoblastos humanos tratados con los péptidos objeto de este estudio y todos los marcadores están relacionados a mineralización ósea (206), en especial CBFA1.

En este estudio se emplearon dos péptidos de proteínas que se han demostrado participar activamente en el proceso de biomineralización (19), y la vía de administración es importante debido a su distribución biológica dentro del sistema circulatorio. En el ensayo de biodistribución (farmacocinética), se analizaron las acciones de la sustancia activa (péptidos) sobre el organismo de los animales una vez que se administraron intraperitonealmente. Se observó que el péptido presenta una marca estable de las 0 a las 24 horas ($p < 0.05$), lo cual es de relevancia clínica porque en comparación con otras proteínas como las BMP-2 y BMP-7/OP1, aparte de requerir grandes dosis o aplicaciones múltiples para lograr el efecto osteogénico deseado, estas proteínas poseen una vida media de 1 a 4 horas y necesitan dosis de aplicación exógena de BMP equivalente a la cantidad endógena presente en 1,000 seres humanos. Lo anterior representa una seria preocupación respecto a su seguridad y costo, adicionalmente se han relacionado complicaciones clínicas severas incluyendo hematomas generalizados en tejido blando y resorción ósea peri-implante (207), debido a concentraciones suprafisiológicas como resultado de una cinética de liberación imperfecta de BMPs, donde el 30% del encapsulado es perdido en la fase inicial. Otro efecto colateral de la administración de BMP es que éstas promueven el crecimiento óseo excesivo, lo que trae como consecuencia presión sobre el tracto gastrointestinal y raíces nerviosas, y son inductoras potentes de la calcificación arterial, lo que puede predisponer a los individuos

recipientes a complicaciones serias como ateromas o trombosis; luego entonces, la administración de los péptidos es satisfactoria clínicamente con respecto a otros medicamentos por mantener su marca estable con el paso de las horas y sin evidencia de patologías locales o sistémicas.

Pese a que la información reportada en este trabajo es contundente con respecto al proceso favorecedor del uso de los péptidos en la neoformación ósea, también es importante mencionar que presenta algunas limitaciones: los resultados contenidos en este trabajo no recaban información sobre los mecanismos específicos de acción que pueda orientarnos a distinguir las propiedades de los diferentes péptidos, por lo que se sugiere abrir otra línea de investigación para dilucidar el mecanismo de acción de ambos péptidos con respecto a su potencial regenerador; el estudio fue impulsado para determinar la corrección del estado osteoporótico, pero no para detectar cambios en el seguimiento a largo plazo ni como tratamiento correctivo; en este estudio se utilizó una sólo dosis del péptido pCAP, la vía de administración fue intraperitoneal diaria y se trabajó con la muestra mínima. Sin embargo, este estudio es sólo un ejemplo del potencial regenerador a nivel sistémico óseo de ambos péptidos. Por lo que en estudios posteriores será necesario ampliar las investigaciones para clarificar completamente su agente regenerador así como hacer un seguimiento a largo plazo (diferentes dosis y tiempos) con y sin tratamiento de tejido óseo y órganos, aumentar el número de grupos de estudios con diferentes dosis de pCAP, determinar terapéuticas preventivas, incrementar el número del tamaño de muestra, realizar los estudios en otra especie animal (primate u oveja) y modificar la vía de administración (vía oral o subcutánea semanal).

El presente estudio cuenta con registro de patente: Instituto Mexicano de la Protección Intelectual Número de solicitud: MX/a/2012/005314; Mayo 7, 2012 (ver apéndice D). El proyecto fue realizado con apoyo: DGAPA-UNAM IT200414, CONACyT 224081.

CONCLUSIONES

Este trabajo se relaciona al campo de la medicina, especialmente en la utilización de péptidos sintéticos biológicamente activos. El péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular [pHACD1/CAP, (AVIFM)] y el péptido derivado de la proteína del cemento 1 [pCEMP1, (MGTSSTDSQQAGHRRRCSTSN)], inducen la regeneración ósea (osteoinductivos), detentan una actividad biológica inductora de la diferenciación osteoblástica y de biomineralización, por lo tanto se trata de péptidos útiles para el tratamiento de la osteoporosis, desempeñan un papel similar a la proteína nativa, promueven el depósito de sales de calcio y fosfato, participan en la nucleación de cristales de hidroxapatita, controlan el autoensamblaje del proceso de mineralización *in vivo*, son fáciles de sintetizar artificialmente, gozan de un bajo costo de producción, por lo tanto, poseen mayor factibilidad de manufacturar a gran escala, también presentan una masa molecular pequeña, lo que les da la característica de evitar reacciones inmunológicas, finalmente, los péptidos pueden mejorar el índice clínico de efectividad (efectos secundarios indeseables), así como el impacto positivo en el costo de los tratamientos para la osteoporosis (la mayoría de los tratamientos utilizados actualmente son costosos).

Los péptidos pCEMP1 a concentraciones de 40 y 80 µg/kg y pCAP a concentración de 20 µg/kg muestran eficacia terapéutica para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo experimental. A mayor concentración, mejor resultado en la densidad ósea y en la resistencia a la compresión. El péptido pCAP demostró ser más eficaz respecto a la densidad mineral ósea, resistencia a la compresión e histomorfometría, que los resultados observados con la utilización del pCEMP1. Esta propuesta es ventajosa ya que estos péptidos podrían disminuir la pérdida de la densidad mineral ósea así como sus efectos colaterales (fracturas de cadera, vertebrales, cabeza del fémur, etc.) debido a su actividad biológica inductora de la diferenciación osteoblástica y de biomineralización así que, son muy útiles para el tratamiento de la osteopenia y/u osteoporosis, por lo tanto, los resultados proporcionan una alternativa para futuras terapias contra dichos padecimientos.

Queda determinada la eficacia clínica en la utilización de los péptidos sintéticos biológicamente activos para el tratamiento de la osteoporosis por lo que con base en esto, se podría plantear una estrategia metodológica y de análisis con el objeto de determinar su eficacia y viabilidad en una fase preclínica, también abre la posibilidad de trabajar en nuevas líneas de investigación acerca del uso a largo plazo, múltiples dosificaciones, uso en otras especies y/o mayor número de animales experimentales así como su administración preventiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol 2000*. 2015;67(1):211-33.
2. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet*. 2002;359(9321):1929-36.
3. Cauley JA. Osteoporosis in men: prevalence and investigation. *Clin Cornerstone*. 2006;8 Suppl 3:S20-5.
4. Rickard DJ, Hofbauer LC, Bonde SK, Gori F, Spelsberg TC, Riggs BL. Bone morphogenetic protein-6 production in human osteoblastic cell lines. Selective regulation by estrogen. *J Clin Invest*. 1998;101(2):413-22.
5. Schurman L, Bagur A, Claus-Hermberg H, Messina OD, Negri AL, Sánchez A, et al. [Guidelines for the diagnosis, prevention and treatment of osteoporosis, 2012]. *Medicina (B Aires)*. 2013;73(1):55-74.
6. 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;25(10):2359-81.
7. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol 2000*. 2000;24:73-98.
8. Arzate H, Jimenez-Garcia LF, Alvarez-Perez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res*. 2002;81(8):541-6.
9. Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J*. 1992;6(11):2990-5.
10. Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res*. 1996;11(5):686-92.
11. E RA. Caracterización estructural de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y su relación con la función biológica. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
12. Carmona-Rodríguez B, Alvarez-Perez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, et al. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(3):763-9.
13. Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nunez J, Gaitan L, et al. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int*. 2012;36(2):129-36.
14. Serrano J, Romo E, Bermudez M, Narayanan AS, Zeichner-David M, Santos L, et al. Bone regeneration in rat cranium critical-size defects induced by Cementum Protein 1 (CEMP1). *PLoS One*. 2013;8(11):e78807.
15. Alvarez-Perez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodriguez Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone*. 2006;38(3):409-19.
16. Nunez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Munoz F, Arzate H, Villalobos C, et al. Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells. *J Periodontol Res*. 2012;47(1):33-44.
17. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*. 2012;227(2):649-57.
18. Pitaru S, Narayanan SA, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, et al. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodontol Res*. 1995;30(5):360-8.
19. de MATEdcicepdlpdadcrCeusldcUNA.
20. F. S. Tesis: Inducción de la regeneración ósea en defectos óseos severos por el efecto del péptico novel derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP). Universidad Nacional Autónoma de México, agosto, 2014.
21. Moayyeri A, Ahmadi-Abhari S, Hossein-nezhad A, Larijani B, Soltani A. Bone mineral density and estimated height loss based on patients' recalls. *Osteoporos Int*. 2006;17(6):834-40.
22. Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001;1(3):193-207.
23. Netto CC, Vieira VC, Marinheiro LP, Agellon S, Weiler H, Maróstica MR. Are skeletally mature female rats a suitable model to study osteoporosis? *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012;56(4):259-64.
24. Hernández S. Tesis: Péptido derivado de CAP para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo animal. Universidad Nacional Autónoma de México DdEdPel.
25. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008;58(5):424-30.
26. 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):323-7.

27. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1468-86.
28. Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone.* 1997;20(4):315-28.
29. Kinney JH, Haupt DL, Balooch M, Ladd AJ, Ryaby JT, Lane NE. Three-dimensional morphometry of the L6 vertebra in the ovariectomized rat model of osteoporosis: biomechanical implications. *J Bone Miner Res.* 2000;15(10):1981-91.
30. Bauer JS, Link TM. Advances in osteoporosis imaging. *Eur J Radiol.* 2009;71(3):440-9.
31. General OotS. Bone health and osteoporosis: a report of the Surgeon General. US: Office of Surgeon General (US), Rockville (MD); 2004.
32. Wright NC, Looker AC, Saag KG, Curtis JR, Delzell ES, Randall S, et al. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. *J Bone Miner Res.* 2014;29(11):2520-6.
33. nation. NOFAsbhtsooalbmio. America's bone health: the state of osteoporosis and low bone mass in our nation. Washington, DC. 2002. <http://www.nof.org/> 2002 [Available from: <http://www.nof.org/>].
34. Foundation NO. Fast Facts. National Osteoporosis Foundation.
35. Riera-Espinoza G. Epidemiology of osteoporosis in Latin America 2008. *Salud Publica Mex.* 2009;51 Suppl 1:S52-5.
36. Wark JD. Osteoporosis: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 1999;77(5):424-6.
37. Bureau USC. International Database. 2011.
38. Deleze 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):562-9.
39. P. C. The prevalence of low bone mineral density in a random sample of Mexican women and men 50 years and older. A population study. . ISCD 12th Annual Meeting; San Diego CalFeb 1-4.
40. Maggi S, Kelsey JL, Litvak J, Heyse SP. Incidence of hip fractures in the elderly: a cross-national analysis. *Osteoporos Int.* 1991;1(4):232-41.
41. 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):269-76.
42. The Latin America Regional Audit. In: Consejo Asesor Regional MS, editor. *Epidemiología, costos e impacto de la osteoporosis en 2012: International Osteoporosis Foundation; 2012.*
43. Abrahamsen B, van Staa T, Ariely R, Olson M, Cooper C. Excess mortality following hip fracture: a systematic epidemiological review. *Osteoporos Int.* 2009;20(10):1633-50.
44. Colón-Emeric C, Kuchibhatla M, Pieper C, Hawkes W, Fredman L, Magaziner J, et al. The contribution of hip fracture to risk of subsequent fractures: data from two longitudinal studies. *Osteoporos Int.* 2003;14(11):879-83.
45. Lewiecki EM, Laster AJ. Clinical review: Clinical applications of vertebral fracture assessment by dual-energy x-ray absorptiometry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(11):4215-22.
46. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res.* 2007;22(3):465-75.
47. Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(2 Suppl):S3-11.
48. Liu XL, Li CL, Lu WW, Cai WX, Zheng LW. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(4):392-8.
49. Griffith JF, Yeung DK, Tsang PH, Choi KC, Kwok TC, Ahuja AT, et al. Compromised bone marrow perfusion in osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2008;23(7):1068-75.
50. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008;61(5):577-87.
51. Wheeler G, Elshahaly M, Tuck SP, Datta HK, van Laar JM. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *J Transl Med.* 2013;11:201.
52. García-Martín A, Cortés-Berdonces M, Luque-Fernández I, Rozas-Moreno P, Quesada-Charneco M, Muñoz-Torres M. Osteocalcin as a marker of metabolic risk in healthy postmenopausal women. *Menopause.* 2011;18(5):537-41.
53. Biver E. Use of bone turnover markers in clinical practice. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19(6):468-73.
54. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int.* 2011;22(2):391-420.

55. Miller PD. Guidelines for the diagnosis of osteoporosis: T-scores vs fractures. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006;7(1-2):75-89.
56. Blake GM, Fogelman I. Role of dual-energy X-ray absorptiometry in the diagnosis and treatment of osteoporosis. *J Clin Densitom*. 2007;10(1):102-10.
57. Burch J, Rice S, Yang H, Neilson A, Stirk L, Francis R, et al. Systematic review of the use of bone turnover markers for monitoring the response to osteoporosis treatment: the secondary prevention of fractures, and primary prevention of fractures in high-risk groups. *Health Technol Assess*. 2014;18(11):1-180.
58. Bouxsein ML, Szulc P, Munoz F, Thrall E, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Contribution of trochanteric soft tissues to fall force estimates, the factor of risk, and prediction of hip fracture risk. *J Bone Miner Res*. 2007;22(6):825-31.
59. Parker MJ, Gillespie WJ, Gillespie LD. Hip protectors for preventing hip fractures in older people. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005(3):Cd001255.
60. Saag KG, Emkey R, Schnitzer TJ, Brown JP, Hawkins F, Goemaere S, et al. Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Intervention Study Group. *N Engl J Med*. 1998;339(5):292-9.
61. Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC, et al. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Lancet*. 1996;348(9041):1535-41.
62. 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. *Jama*. 1998;280(24):2077-82.
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):1241-9.
64. Eastell R, Devogelaer JP, Peel NF, Chines AA, Bax DE, Sacco-Gibson N, et al. Prevention of bone loss with risedronate in glucocorticoid-treated rheumatoid arthritis patients. *Osteoporos Int*. 2000;11(4):331-7.
65. 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. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *JAMA*. 1999;282(14):1344-52.
66. 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):1799-809.
67. 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):1809-22.
68. 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. *J Bone Miner Res*. 2007;22(10):1479-91.
69. Chesnut CH, 3rd, 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. PROOF Study Group. *Am J Med*. 2000;109(4):267-76.
70. Overman RA, Borse M, Gourlay ML. Salmon calcitonin use and associated cancer risk. *Ann Pharmacother*. 2013;47(12):1675-84.
71. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-33.
72. Cauley JA, Norton L, Lippman ME, Eckert S, Krueger KA, Purdie DW, et al. Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. *Breast Cancer Res Treat*. 2001;65(2):125-34.
73. Saag KG, Shane E, Boonen S, Marín F, Donley DW, Taylor KA, et al. Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med*. 2007;357(20):2028-39.
74. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 2001;344(19):1434-41.
75. Cummings SR, San Martin J, 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):756-65.
76. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991;15(3):175-91.
77. Wronski TJ, Cintrón M, Doherty AL, Dann LM. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 1988;123(2):681-6.
78. Guidelines for Preclinical and Clinical Evaluation of Agents used in the Prevention or Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. Division of Metabolism and Endocrine Drg Products: Food and Drug Administration (draft) 1994.
79. Kimmel DB. Animal model for in vivo experimentation in osteoporosis research. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J (eds) *Osteoporosis*. Academic Press, San Diego, 1996; 671-690.

80. Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1988;43(3):179-83.
81. Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone.* 1989;10(4):295-301.
82. Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone.* 1997;20(1):55-61.
83. Li XJ, Jee WS. Adaptation of diaphyseal structure to aging and decreased mechanical loading in the adult rat: a densitometric and histomorphometric study. *Anat Rec.* 1991;229(3):291-7.
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;64(4):318-24.
85. Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH. The effects of ovariectomy and 17 beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Miner Res.* 1987;2(2):115-22.
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;12(6):439-46.
87. Kimmel DB, Wronski TJ. Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1990;46(2):101-10.
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;52(1):26-33.
89. Ke HZ, Jee WS, Zeng QQ, Li M, Lin BY. Prostaglandin E2 increased rat cortical bone mass when administered immediately following ovariectomy. *Bone Miner.* 1993;21(3):189-201.
90. Yamamoto N, Jee WS, Ma YF. Bone histomorphometric changes in the femoral neck of aging and ovariectomized rats. *Anat Rec.* 1995;243(2):175-85.
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;66(7):755-60.
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;87(7):2683-92.
93. Zhou S, Zilberman Y, Wassermann K, Bain SD, Sadovsky Y, Gazit D. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J Cell Biochem Suppl.* 2001;Suppl 36:144-55.
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;88(12):5134-8.
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;93(5):1959-67.
96. Gao Y, Morita I, Kubota T, Murota S, Aso T. Expression of adhesion molecules LFA-I and ICAM-I on osteoclast precursors during osteoclast differentiation and involvement of estrogen deficiency. *Climacteric.* 2000;3(4):278-87.
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;580(5):1251-6.
98. Kanematsu M, Sato T, Takai H, Watanabe K, Ikeda K, Yamada Y. 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 Miner Res.* 2000;15(7):1321-9.
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;105(9):1279-87.
100. Erben RG. Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling? *Anat Rec.* 1996;246(1):39-46.
101. Yao W, Jee WS, 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;25(6):697-702.
102. Hagaman JR, Ambrose WW, Hirsch PF, Kiebzak GM. Age-related changes in rat trabecula, endosteal and cortical bone demonstrated with scanning electron microscopy. *Cells and Mater* 1992; (Suppl) 1:37-46.
103. RUTH EB. Bone studies. II. An experimental study of the Haversian-type vascular channels. *Am J Anat.* 1953;93(3):429-55.
104. 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;17(4):303-16.
105. Dawson AB. The age order of epiphyseal union in the long bones of the albino rat. *Anat Rec* 1925; 31:1-17.
106. Schapira D, Laton-Miller R, Barzilai D, Silbermann M. The rat as a model for studies of the aging skeleton. *Cells Mater* 1992; (Suppl) 1:181-188.

107. Mosekilde L, Danielsen CC, Knudsen UB. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. *Bone*. 1993;14(1):1-6.
108. Yoshitake K, Yokota K, Kasugai Y, Kagawa M, Sukamoto T, Nakamura T. Effects of 16 weeks of treatment with tibolone on bone mass and bone mechanical and histomorphometric indices in mature ovariectomized rats with established osteopenia on a low-calcium diet. *Bone*. 1999;25(3):311-9.
109. Jiang Y, Zhao J, Genant HK, Dequeker J, Geusens P. Long-term changes in bone mineral and biomechanical properties of vertebrae and femur in aging, dietary calcium restricted, and/or estrogen-deprived/-replaced rats. *J Bone Miner Res*. 1997;12(5):820-31.
110. Beall PT, Misra LK, Young RL, Spjut HJ, Evans HJ, LeBlanc A. Clomiphene protects against osteoporosis in the mature ovariectomized rat. *Calcif Tissue Int*. 1984;36(1):123-5.
111. Aerssens J, Van Audekercke R, Geusens P, Schot LP, Osman AA, Dequeker J. Mechanical properties, bone mineral content, and bone composition (collagen, osteocalcin, IGF-I) of the rat femur: influence of ovariectomy and nandrolone decanoate (anabolic steroid) treatment. *Calcif Tissue Int*. 1993;53(4):269-77.
112. Ferretti JL, Tessaro RD, Delgado CJ, Bozzini CE, Alippi RM, Barceló AC. Biomechanical performance of diaphyseal shafts and bone tissue of femurs from protein-restricted rats. *Bone Miner*. 1988;4(4):329-39.
113. Peng Z, Tuukkanen J, Väänänen HK. Exercise can provide protection against bone loss and prevent the decrease in mechanical strength of femoral neck in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 1994;9(10):1559-64.
114. Søgaard CH, Wronski TJ, McOsker JE, Mosekilde L. The positive effect of parathyroid hormone on femoral neck bone strength in ovariectomized rats is more pronounced than that of estrogen or bisphosphonates. *Endocrinology*. 1994;134(2):650-7.
115. Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, et al. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001;2(1):117-27.
116. Nitta T, Fukushima T, Nakamuta H, Koida M. Glucocorticoid-induced secondary osteopenia in female rats: a time course study as compared with ovariectomy-induced osteopenia and response to salmon calcitonin. *Jpn J Pharmacol*. 1999;79(3):379-86.
117. Sampson HW, Perks N, Champney TH, DeFee B. Alcohol consumption inhibits bone growth and development in young actively growing rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996;20(8):1375-84.
118. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y, Yeh JK. Effect of vitamin K2 and growth hormone on the long bones in hypophysectomized young rats: a bone histomorphometry study. *J Bone Miner Metab*. 2007;25(1):46-53.
119. Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Differential effect of short-term etidronate treatment on three cancellous bone sites in orchidectomized adult rats. *Keio J Med*. 2004;53(1):12-7.
120. Berdud I, Martin-Malo A, Almaden Y, Aljama P, Rodriguez M, Felsenfeld AJ. The PTH-calcium relationship during a range of infused PTH doses in the parathyroidectomized rat. *Calcif Tissue Int*. 1998;62(5):457-61.
121. Turner AS. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater*. 2001;1:66-81.
122. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res*. 1984;2(1):97-101.
123. Iwaniec UT, Turner RT. 2008. Animal models of osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ, editors. *Osteoporosis*, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier. p 985-1110.
124. Cavolina JM, Evans GL, Harris SA, Zhang M, Westerlind KC, Turner RT. The effects of orbital spaceflight on bone histomorphometry and messenger ribonucleic acid levels for bone matrix proteins and skeletal signaling peptides in ovariectomized growing rats. *Endocrinology*. 1997;138(4):1567-76.
125. Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner*. 1992;18(3):227-36.
126. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int*. 1994;4(6):368-81.
127. F C. Carranza's clinical periodontology. 12th edition ed. Newman M TH, Carranza F, editor. Louis, MO: Saunders Elsevier; 2015. xxiii, 875 pp p.
128. Lidhe J, Niklaus P, Thorkild K. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 5a edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, 2011.
129. Glimcher MJ. Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat Rec*. 1989;224(2):139-53.
130. Montoya Ayala G. Proteína recombinante de adhesión del cemento radicular (hrCAP) induce la diferenciación de células troncales derivadas del ligamento periodontal humano y regula el proceso de mineralización in vitro. División de Estudios de Posgrado e Investigación. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
131. Scott JE. Collagen--proteoglycan interactions. Localization of proteoglycans in tendon by electron microscopy. *Biochem J*. 1980;187(3):887-91.
132. Vogel KG, Paulsson M, Heinegård D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J*. 1984;223(3):587-97.
133. Bartold PM, Miki Y, McAllister B, Narayanan AS, Page RC. Glycosaminoglycans of human cementum. *J Periodontal Res*. 1988;23(1):13-7.

134. Pearson CH, Gibson GJ. Proteoglycans of bovine periodontal ligament and skin. Occurrence of different hybrid-sulphated galactosaminoglycans in distinct proteoglycans. *Biochem J.* 1982;201(1):27-37.
135. Scott JE, Orford CR. Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem J.* 1981;197(1):213-6.
136. Cheng H, Catterson B, Neame PJ, Lester GE, Yamauchi M. Differential distribution of lumican and fibromodulin in tooth cementum. *Connect Tissue Res.* 1996;34(2):87-96.
137. Cheng H, Catterson B, Yamauchi M. Identification and immunolocalization of chondroitin sulfate proteoglycans in tooth cementum. *Connect Tissue Res.* 1999;40(1):37-47.
138. Petersson U, Hultenby K, Wendel M. Identification, distribution and expression of osteoadherin during tooth formation. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(2):128-36.
139. Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Arambawatta AK, Wakita M. Immunolocalization of proteoglycans and bone-related noncollagenous glycoproteins in developing acellular cementum of rat molars. *Cell Tissue Res.* 2004;317(3):299-312.
140. Brown JP, Albert C, Nassar BA, Adachi JD, Cole D, Davison KS, et al. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clin Biochem.* 2009;42(10-11):929-42.
141. Eyre DR. Bone biomarkers as tools in osteoporosis management. *Spine (Phila Pa 1976).* 1997;22(24 Suppl):17S-24S.
142. MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Piotrowski B, Somerman MJ. Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res.* 1995;33(1-3):1-7.
143. G MA. proteína recombinante de adhesión del cemento radicular (hrCAP) induce la diferenciación de células troncales derivadas del ligamento periodontal humano y regula el proceso de mineralización *in vitro* México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
144. Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int.* 1994;18(6):617-28.
145. Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem.* 2000;37 (Pt 4):432-46.
146. Menanteau J, Neuman WF, Neuman MW. A study of bone proteins which can prevent hydroxyapatite formation. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1982;4(2):157-62.
147. Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernandez-Lagunas L, Diaz de Leon L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodontal Res.* 1996;31(2):144-8.
148. Saito M, Narayana AS. Signaling reactions induced in human fibroblasts during adhesion to cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res.* 1999;14(1):65-72.
149. Schild C, Beyeler M, Lang NP, Trueb B. Cementum attachment protein/protein-tyrosine phosphatase-like member A is not expressed in teeth. *Int J Mol Med.* 2009;23(2):293-6.
150. Pitaru S, Savion N, Hekmati H, Olsen S, Narayanan SA. Binding of a cementum attachment protein to extracellular matrix components and to dental surfaces. *J Periodontal Res.* 1992;27(6):640-6.
151. Pitaru S, Savion N, Hekmati H, Olson S, Narayanan SA. Molecular and cellular interactions of a cementum attachment protein with periodontal cells and cementum matrix components. *J Periodontal Res.* 1993;28(6 Pt 2):560-2.
152. Valdes De Hoyos A, Hoz-Rodriguez L, Arzate H, Narayanan AS. Isolation of protein-tyrosine phosphatase-like member-a variant from cementum. *J Dent Res.* 2012;91(2):203-9.
153. Olson S, Arzate H, Narayanan AS, Page RC. Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. *J Dent Res.* 1991;70(9):1272-7.
154. Ivanovski S, Komaki M, Bartold PM, Narayanan AS. Periodontal-derived cells attach to cementum attachment protein via alpha 5 beta 1 integrin. *J Periodontal Res.* 1999;34(3):154-9.
155. Arzate H, Portilla Robertson J, Aguilar Mendoza ME. Recombination of epithelial root sheath and dental papilla cells in vitro. *Arch Med Res.* 1996;27(4):573-7.
156. Pitaru S, Pritzki A, Bar-Kana I, Grosskopf A, Savion N, Narayanan AS. Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):257-64.
157. Komaki M, Kang M, Narayanan AS. Role of MAP kinases p42erk-2/p44erk-1 in cementum-derived attachment-protein-mediated cell attachment. *J Dent Res.* 2000;79(10):1789-93.
158. Serrano J, Romo E, Bermúdez M, Narayanan AS, Zeichner-David M, Santos L, et al. Bone regeneration in rat cranium critical-size defects induced by Cementum Protein 1 (CEMP1). *PLoS One.* 2013;8(11):e78807.
159. Keen R. Osteoporosis: strategies for prevention and management. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2007;21(1):109-22.
160. Yokokoji T, Narayanan AS. Role of D1 and E cyclins in cell cycle progression of human fibroblasts adhering to cementum attachment protein. *J Bone Miner Res.* 2001;16(6):1062-7.

161. Suckow M WS, Franklin C. The laboratory rat. American College of Laboratory Animal Medicine Series. 2d edition. Elsevier.. San Diego, California. 2006. 2d edition ed. Series. ACoLAM, editor. San Diego, California.2006.
162. Martínez L. Tesis: Efecto de la administración intraperitoneal subcrónica de limarían uddlyspc, química sanguínea y pruebas de funcionamiento hepático de la rata Wistar. Universidad Veracruzana, Facultad de Química Farmacéutica Biológica. 2015.
163. Odgaard A, Gundersen HJ. Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3-D reconstructions. *Bone*. 1993;14(2):173-82.
164. Hildebrand T, Ruegsegger P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*. 1997;1(1):15-23.
165. Doube M, Kłosowski MM, Arganda-Carreras I, Cordelières FP, Dougherty RP, Jackson JS, et al. BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone*. 2010;47(6):1076-9.
166. Fajardo RJ, Muller R. Three-dimensional analysis of nonhuman primate trabecular architecture using micro-computed tomography. *Am J Phys Anthropol*. 2001;115(4):327-36.
167. Villarreal-Ramirez E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chavez-Pacheco JL, Narayanan AS, Gil-Chavarria I, et al. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): primary role in biomineralization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384(1):49-54.
168. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes*. 2015;8:47.
169. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
170. División de Estudios de Posgrado e Investigación. 2017. BOTIdlpfyqsdtbdeepddc/VUNAdM.
171. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
172. Tang L, Li N, Xie H, Jin Y. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *J Cell Physiol*. 2011;226(3):832-42.
173. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
174. Zhang C, Li J, Zhang L, Zhou Y, Hou W, Quan H, et al. Effects of mechanical vibration on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol*. 2012;57(10):1395-407.
175. Montoya G, Arenas J, Romo E, Zeichner-David M, Alvarez M, Narayanan AS, et al. Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone*. 2014;69:154-64.
176. Deal C. The use of intermittent human parathyroid hormone as a treatment for osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2004;6(1):49-58.
177. Ebeling PR, Russell RG. Teriparatide (rhPTH 1-34) for the treatment of osteoporosis. *Int J Clin Pract*. 2003;57(8):710-8.
178. Guede D GP, Caeiro JR. Biomechanics and bone (I): Basic concepts and classical mechanical trials. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2013, 43-50.
179. Han SM, Szarzanowicz TE, Ziv I. Effect of ovariectomy and calcium deficiency on the ultrasound velocity, mineral density and strength in the rat femur. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 1999;14(3):I.
180. Galante J, Rostoker W, Ray RD. Physical properties of trabecular bone. *Calcif Tissue Res*. 1970;5(3):236-46.
181. Caeiro JR GP, Guede D. Biomechanics and bone (II): Trials at different hierarchical levels of bone and alternative techniques fos determining bones strength. *Osteoporos Metab Miner*. 2015, 99-108.
182. Hoffer CE, Moore KE, Kozloff K, Zysset PK, Goldstein SA. Age, gender, and bone lamellae elastic moduli. *J Orthop Res*. 2000;18(3):432-7.
183. Marcu F, Bogdan F, Muțiu G, Lazăr L. The histopathological study of osteoporosis. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(1 Suppl):321-5.
184. Rehman MT, Hoyland JA, Denton J, Freemont AJ. Histomorphometric classification of postmenopausal osteoporosis: implications for the management of osteoporosis. *J Clin Pathol*. 1995;48(3):229-35.
185. Gruber HE. Adaptations of Goldner's Masson trichrome stain for the study of undecalcified plastic embedded bone. *Biotech Histochem*. 1992;67(1):30-4.
186. Compston JE. Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol*. 2002;173(3):387-94.
187. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987;2(6):595-610.
188. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006;12(1):17-25.
189. Licata AA. Biochemical markers of bone turnover: useful but underused. *Cleve Clin J Med*. 2008;75(10):751-2.

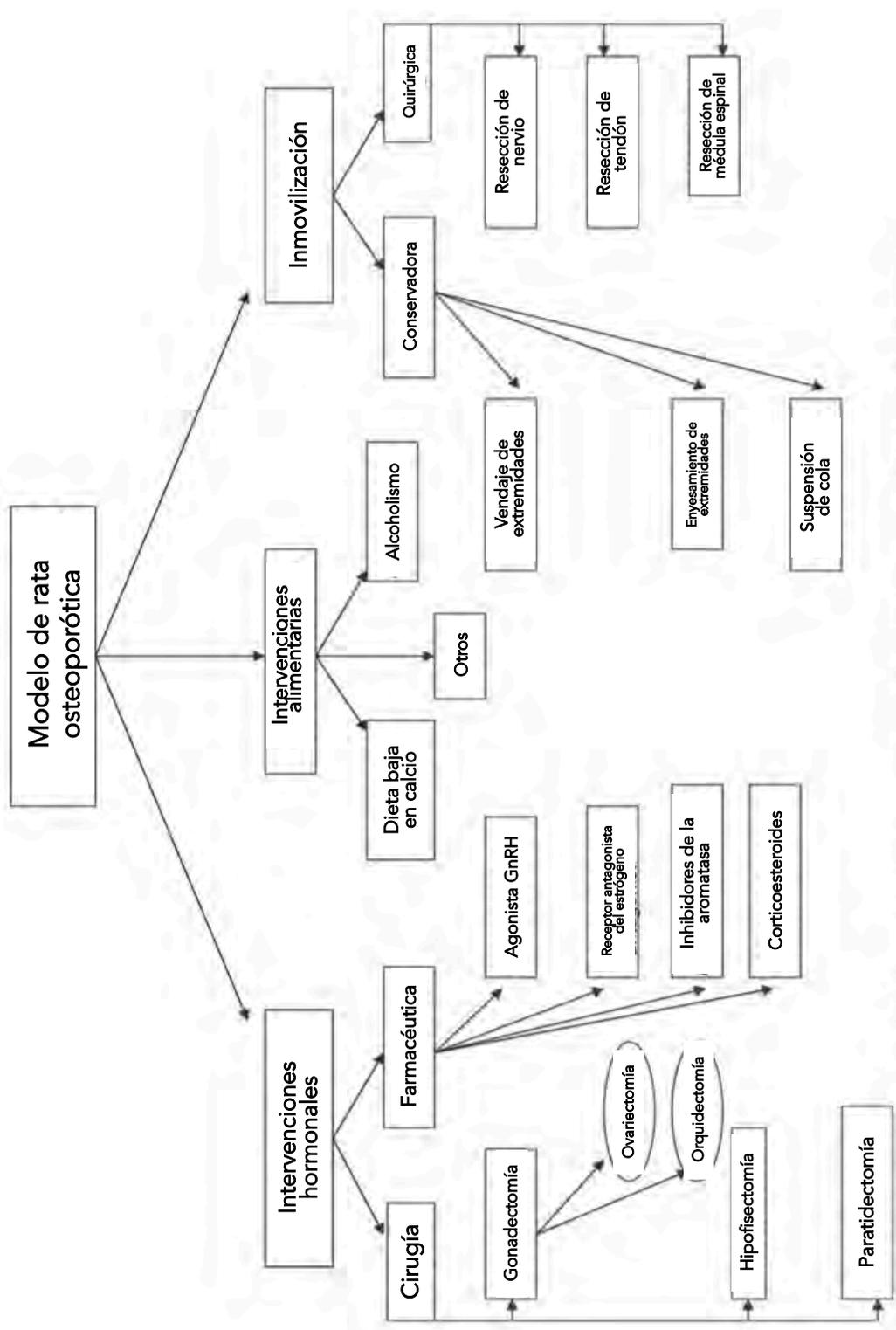
190. Garnero P. Biomarkers for osteoporosis management: utility in diagnosis, fracture risk prediction and therapy monitoring. *Mol Diagn Ther.* 2008;12(3):157-70.
191. Delmas PD, Malaval L, Arlot ME, Meunier PJ. Serum bone Gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone.* 1985;6(5):339-41.
192. Delmas PD, Christiansen C, Mann KG, Price PA. Bone Gla protein (osteocalcin) assay standardization report. *J Bone Miner Res.* 1990;5(1):5-11.
193. Li CW, Liang B, Shi XL, Wang H. Opg/Rankl mRNA dynamic expression in the bone tissue of ovariectomized rats with osteoporosis. *Genet Mol Res.* 2015;14(3):9215-24.
194. Tanaka H, Mine T, Ogasa H, Taguchi T, Liang CT. Expression of RANKL/OPG during bone remodeling in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411(4):690-4.
195. Marie P, Halbout P. [OPG/RANKL: role and therapeutic target in osteoporosis]. *Med Sci (Paris).* 2008;24(1):105-10.
196. Reid P, Holen I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *Eur J Cell Biol.* 2009;88(1):1-17.
197. Berenson JR, Rajdev L, Broder M. Pathophysiology of bone metastases. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(9):1078-81.
198. Macmillan D, Bill RM, Sage KA, Fern D, Flitsch SL. Selective in vitro glycosylation of recombinant proteins: semi-synthesis of novel homogeneous glycoforms of human erythropoietin. *Chem Biol.* 2001;8(2):133-45.
199. Sasaki N, Kusano E. [Bone and bone related biochemical examinations. Bone and collagen related metabolites. Measurement and clinical role of OPG]. *Clin Calcium.* 2006;16(6):956-62.
200. Van Staa TP, Leufkens HG, Abenham L, Zhang B, Cooper C. Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res.* 2000;15(6):993-1000.
201. 1994. vdLAIM-.
202. 1990. FMIM-.
203. Li B, Hu RY, Sun L, Luo R, Lu KH, Tian XB. Potential role of andrographolide in the proliferation of osteoblasts mediated by the ERK signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:1335-44.
204. Zha X, Xu Z, Liu Y, Xu L, Huang H, Zhang J, et al. Amentoflavone enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells through JNK and p38 MAPK pathways. *J Nat Med.* 2016;70(3):634-44.
205. Ma B, Zhang Q, Wu D, Wang YL, Hu YY, Cheng YP, et al. Strontium fructose 1,6-diphosphate prevents bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis via the OPG/RANKL/RANK pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2012;33(4):479-89.
206. Wei J, Wang J, Gong Y, Zeng R. Effectiveness of combined salmon calcitonin and aspirin therapy for osteoporosis in ovariectomized rats. *Mol Med Rep.* 2015;12(2):1717-26.
207. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2(2-3):81-96.

Variabilidad en los marcadores bioquímicos de recambio óseo		Ventajas		Desventajas		Tipo de muestra y análisis	
Marcador óseo (abreviatura)	Fuente	Acción	Ventajas	Desventajas	Tipo de muestra y análisis		
Fosfatasa alcalina ósea (BAP)	Enzima presente en las membranas de los osteoblastos	pH alcalino Degradación enzimática del inhibidor de la mineralización pirofosfato a pH alcalino	Baja variabilidad intra-individual <10%. No afecta la función renal. La comida tiene poco efecto. Vida media circulatoria larga 1-2 días. Estabilidad de la muestra	Hasta un 20% de reactividad cruzada con isoformas del hígado. Cambios con el tratamiento mínimo es decir menos de LSC del 25%. 2 picos a las 14:00 y 23:30 h Nadir 30% ↓ a las 06:30. Múltiples metodologías. Puede medir la masa o la actividad	Inmunoensayos automatizados y manuales Suero, plasma EDTA		
Osteocalcina (OC)	Principales proteínas Gla de hueso no colágeno. Producido por osteoblastos durante la formación ósea y unido a hidroxipatita	Influye en la mineralización osteoideal. Proporciona retroalimentación negativa durante el proceso de remodelación	EDTA muestra más estable. Marcador tardío de la actividad osteoblástica	Molécula intacta inestable. Gran variabilidad entre laboratorios. Liberado durante la formación y reabsorción. Vida media corta de unos pocos minutos. Influído por el estado Vit K, la función renal y la variabilidad circadiana. Gen OC regulado a nivel transcripcional por 1,25-OH ₂ Vit D Vit K factor esencial para la γ -carboxilación de OC resultando en ↑ afinidad por Ca y la hidroxipatita	Inmunoensayos automatizados y manuales, microarreglos, suero, plasma, EDTA		
Procolágena tipo 1 propéptido carboxiterminal (P1CP)	Producto específico de la proliferación de osteoblastos y fibroblastos.	Escindido de la pro-colágena tipo 1 por las proteasas durante la formación de la colágena tipo 1	Medida cuantitativa de la nueva forma de colágena tipo 1 termoestabilidad	Medida vida corta 6-8 mins. Eliminado en el hígado por el receptor de manosa tan sensible a las hormonas tiroideas e IGF-1. Altos niveles 01:30-04:30, hasta 20% más alto que el nadir 11:00-15:00. Carece de sensibilidad a los cambios durante la menopausia	Inmunoensayos automatizados y manuales, suero, plasma, EDTA		
*Procolágena tipo 1 aminoterminal propéptido (P1NP)	Producto específico de la proliferación de osteoblastos y fibroblastos.	Escindido de la pro-colágena tipo 1 por las proteasas durante la formación de la colágena tipo 1	Baja variabilidad intra-individual. Pequeño ritmo circadiano. Estable a temperatura ambiente. Buena precisión de ensayo. Superior para monitorización de PMO. Cambio de base ↑ hasta 80% con anti-reabsorción y ↓ hasta 200% Con la medicación de PTH dentro de 3 meses	Ensayo total afectado por eliminación retardada de la fracción monomérica, P. Ej. en insuficiencia renal o enfermedad ósea metastásica	Inmunoensayos automatizados y manuales, microarreglos, fracciones totales o Intactas, suero, plasma, EDTA		
Marcadores de reabsorción derivados de la colágena							
*Telopéptidos reticulados carboxi-terminal de la colágena tipo 1 (CTX)	Colágena tipo 1 principalmente la isomerización a β aspartil ocurre en colágena madura	Clivado de la colágena tipo 1 por catepsina-K durante la resorción ósea	Variabilidad ↓ ayuno. Estabilidad de la muestra, especialmente EDTA. Substancial ↓ post tratamiento antirresortivo. Muestra de sangre ahora preferencial	Variación circadiana grande -más alta 01:30-04:30 aprox 2x nadir 11:00-15:00	Inmunoensayos automatizados y manuales, microrreglo, orina, suero, plasma, EDTA		
Telopéptidos reticulados carboxi-terminal de la colágena tipo 1 (ICTP o CTX-MMP)	Colágena de tipo 1 sintetizado de nuevo, predominantemente hueso	Clavado de la colágena tipo 1 por MMP durante la resorción ósea		Variación circadiana grande. Influenciado por la función renal y hepática. No responde a los tratamientos osteoporóticos habituales	Inmunoensayo manual		
Telopéptidos interconectados y no terminales de colágena tipo 1 (NTX)	Colágena tipo 1 principalmente hueso	Clivado de la colágena tipo 1 por catepsina-K durante la resorción ósea	Muestra de orina estable. uNTX sig predictor de riesgo de fractura en mujeres posmenopáusicas. Pequeña influencia en la dieta, es preferible la muestra de sangre en ayunas	Variación circadiana grande influenciada por la función renal y hepática. Unidades basadas en el calibrador del fabricante, es decir, equivalentes de colágena óseo	Inmunoensayos automatizados y manuales, orina, suero, plasma, EDTA		
Tipo 1 colágena alfa 1 péptido helicoidal (HELP)	Colágena tipo 1 Secuencia de aminoácidos 620-633 de la cadena α	Escindido de la región helicoidal de la colágena tipo 1 por catepsina-K durante la resorción ósea	Alta correlación con otros marcadores de la degradación de la colágena	Recolección de 24 horas -difícil de recoger 2a recolección de la mañana con corrección de la creatinina- variabilidad analítica adicional. La validez clínica necesita más investigación	Inmunoensayo manual Marcador urinario		
Deoxipiridinolina (DPP)	Colágena tipo 1 madura	El enlace cruzado se libera cuando la colágena tipo 1 madura	Solo reflejan la degradación de la colágena madura específica del hueso. Independiente de las fuentes dietéticas. Menos invasivo que la sangre	24 horas de recolección -difícil de recoger 2º vacío de la mañana con la corrección de creatinina- Variabilidad analítica adicional. Variación circadiana	Inmunoensayos automatizados y manuales, marcador urinario		

Marcadores de resorción						
Enzimas osteoclásticas						
Tartrato Resistente Ácido Fosfatasa - isoforma 5b (TRAP5b)	Isoforma de la fosfatasa ácida, resistente al tartrato, escindida por las proteasas en 5b, presente en el borde oscilante de los osteoclastos	Escindido de la colágena tipo 1 en fragmentos	Característica de la actividad osteoclástica	Inestable a temperatura ambiente. Variabilidad circadiana ↑ inmediatamente después del ejercicio	Inmunoensayos automatizados y manuales	
Catepsina K	La catepsina proteasa presente en el borde de los osteoclastos activamente reabsorbentes	Regiones escindidas del telopeptido y helicoïdal de colágena tipo 1	Biomarcador específico de la actividad osteoclástica	Inestable a temperatura ambiente. La validez clínica necesita investigación adicional	Inmunoanálisis manual, suero, plasma EDTA	
Marcadores de actividad de osteocitos						
Ligando del receptor activador del factor nuclear Kappa B (RANKL)	Producido por osteoclastos, activado por células B y T	Se liga a RANK, que se expresa sobre osteoclastos y sus precursores, estimulando su diferenciación y actividad	Biomarcador nuevo. Proporcionar datos de seguridad, eficacia y farmacocinética para confirmar los mecanismos y el modo de acción del fármaco para uso futuro	Problemas analíticos. Se puede medir libre o por la unión OPG. Los niveles circulantes pueden no reflejar el microambiente del hueso. Afectados por la función tiroidea. Sólo el método de investigación. La validez clínica y analítica necesita una investigación más profunda	Ensayo inmunológico de grado de investigación manual. Formularios totales o solubles en suero	
Osteoprotegerina (OPG)	Secretada por osteoclastos	El receptor Decoy a RANKL reduce la resorción ósea al unirse a RANK y prevenir la osteoclastogénesis	Biomarcador nuevo. Proporcionar datos de seguridad, eficacia y farmacocinética para confirmar los mecanismos y el modo de acción del fármaco para uso futuro	Afectado por la función tiroidea. Sólo el método de investigación. La validez clínica y analítica necesita más investigación	Ensayo de inmunoensayo de grado de investigación manual, suero	
Proteína 1 relacionada con Dickkopf (DKK1)	Producido por osteocitos	Inhibición de la vía de señalización de Wnt a través de la unión a LRP5/6, bloqueando los efectos de Wnt sobre osteoclastos y disminuyendo la formación ósea	Papel clave en la regulación de la rotación ósea	Sólo el método de investigación. La validez clínica y analítica necesita investigación adicional	Investigación manual - inmunoanálisis de grado, suero	
Esclerostina (SCL)	Producido por osteocitos	Inhibición de la vía de señalización de Wnt a través de la unión a LRP5/6, bloqueando los efectos de Wnt sobre osteoclastos y disminuyendo la formación ósea	Significativo ↓ con PTH terapia	Sólo el método de investigación. Afectado por la inmovilidad ↑ en la diabetes tipo 1 y 2. La validez clínica y analítica necesita más investigación	Inmunoensayo manual de grado de investigación Serum	
<p>★ P1NP y CTX (destacados en negrita) son los marcadores de elección, recomendados por el IOF, IFCC (2011) y NBHA (2012). La fosfatasa alcalina de ALP, la fosfatasa alcalina específica de hueso de BSAP, los telopeptidos de CTX reticulados carboxi-terminales de la colágena tipo 1, la proteína 1 relacionada con dickkopf de DKK-1, la DPD deoxipiridinolina, el ácido etilendiaminotetraacético de EDTA, el péptido helicoïdal alfa 1 de colágena tipo 1 de HELP, Terminal de colágena tipo 1, factor de crecimiento similar a insulina IGF-1, proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad LRP, metaloproteinasas de matriz de MMP, telopeptido reticulado con terminal amino NTX de colágena tipo 1, OPG Osteoprotegerina, OC osteocalcina, PICP procolágena tipo 1 propéptido carboxi-terminal, PINP procolágena tipo 1 propéptido amino-terminal, PYD piridinolina, RANK receptor activador de factor nuclear kappa B, RANKL receptor activador de factor nuclear kappa B ligando, SCL esclerostina, TRAP tartrato Resistente a la fosfatasa.</p> <p>Wheater et al. Journal of Translational Medicine 2013, 11:201 http://www.translational-medicine.com/content/11/1/201</p>						

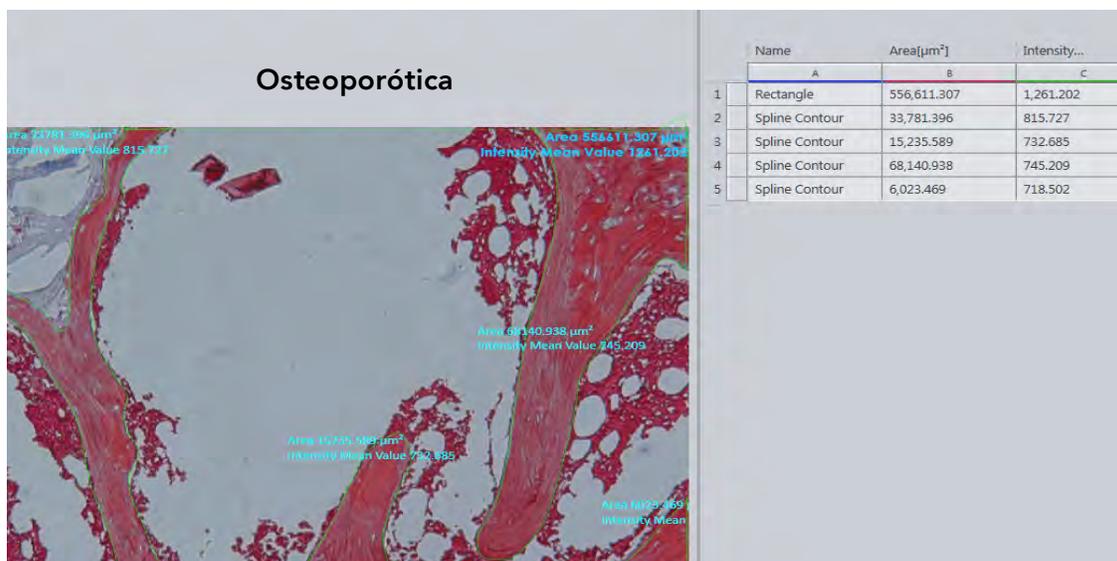
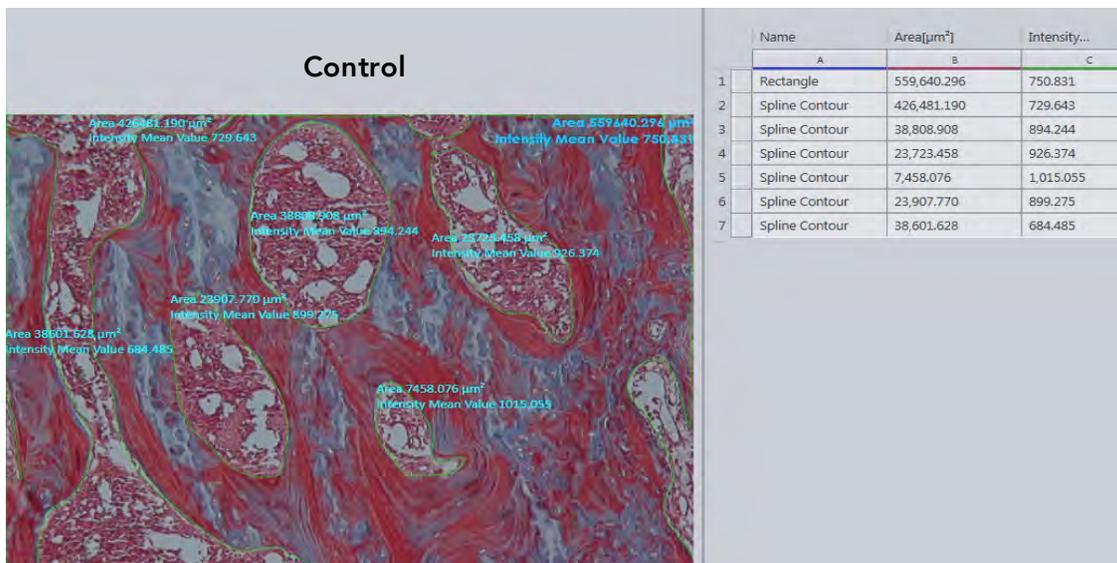
ANEXO B

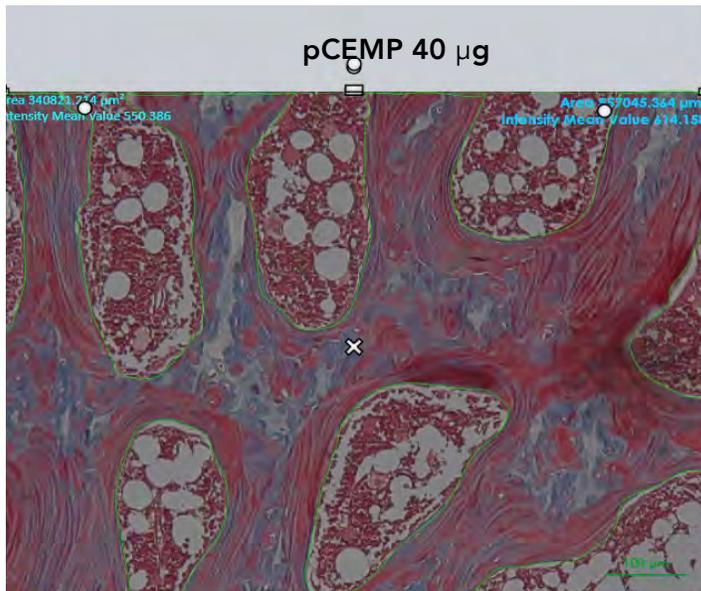
Algoritmo para la selección de intervenciones experimentales para inducir osteopenia y/u osteoporosis en las ratas de laboratorio (25).



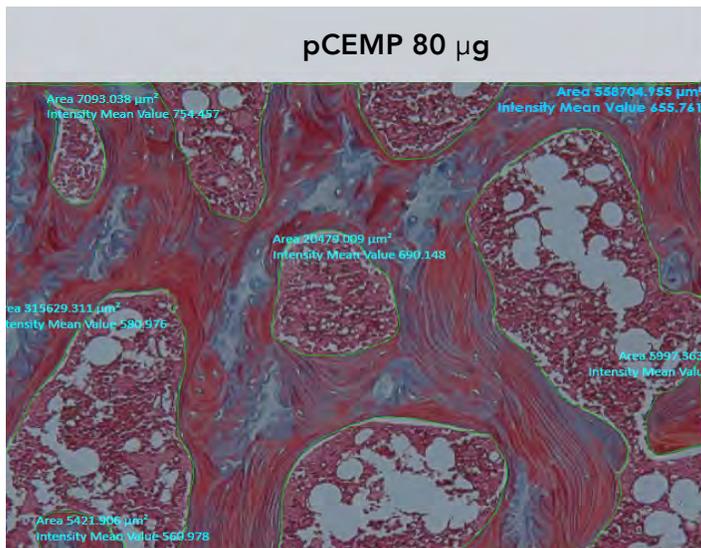
ANEXO C

Histomorfometrías respectivas de las cabezas femorales, las fotomicrografías de los cortes histológicos teñidos con Tricrómica de Masson, fueron tomados a 20x.

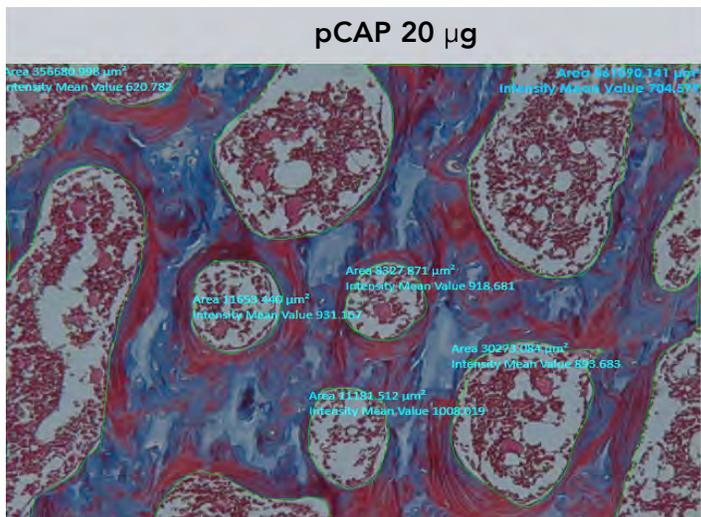




	Name	Area(µm ²)	Intensity...
	A	B	C
1	Rectangle	557,045.364	614.158
2	Spline Contour	340,821.214	550.386



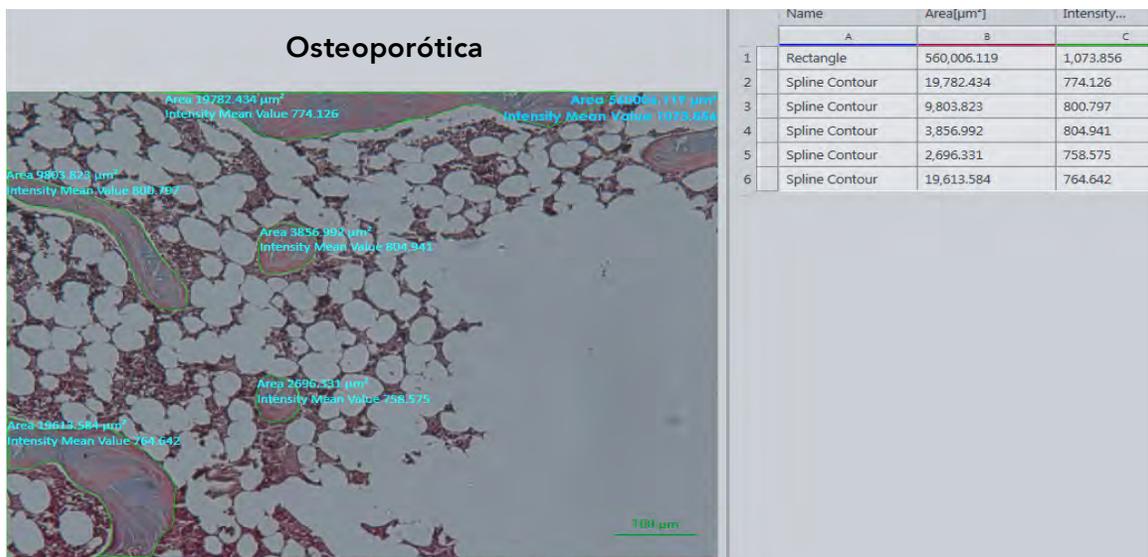
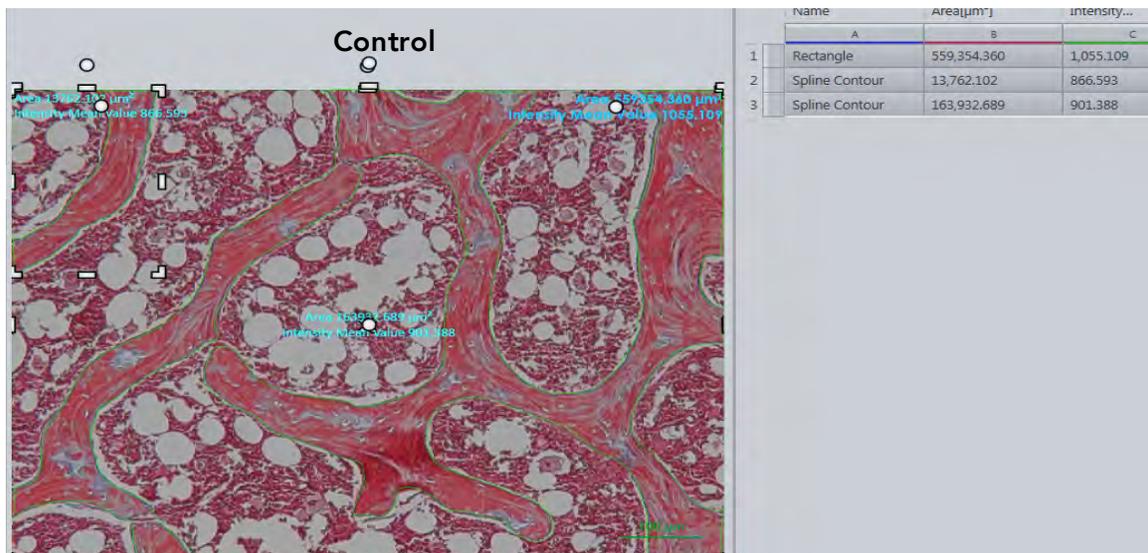
	A	B	C
1	Rectangle	558,704.955	655.761
2	Spline Contour	315,629.311	580.976
3	Spline Contour	5,421.906	560.978
4	Spline Contour	20,479.009	690.148
5	Spline Contour	7,093.038	754.457
6	Spline Contour	5,997.363	483.003



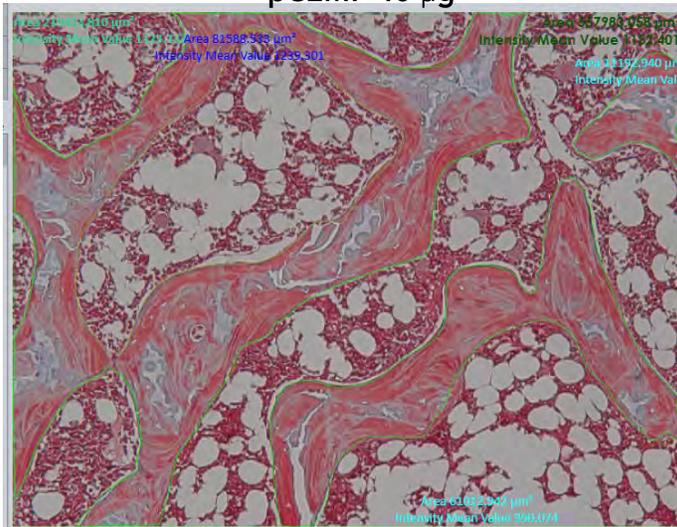
	A	B	C
1	Rectangle	561,090.141	704.579
2	Spline Contour	356,680.998	620.782
3	Spline Contour	11,633.440	931.167
4	Spline Contour	8,327.871	918.681
5	Spline Contour	30,273.084	893.683
6	Spline Contour	11,181.512	1,008.019

ANEXO D

Histomorfometrías respectivas de las cuartas vértebras lumbares, las fotomicrografías de los cortes histológicos teñidos con Tricrómica de Masson, fueron tomados a 20x.

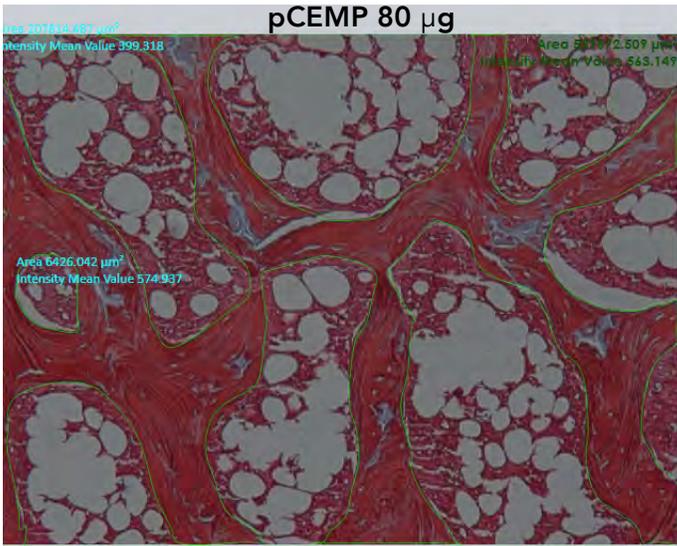


pCEMP 40 µg



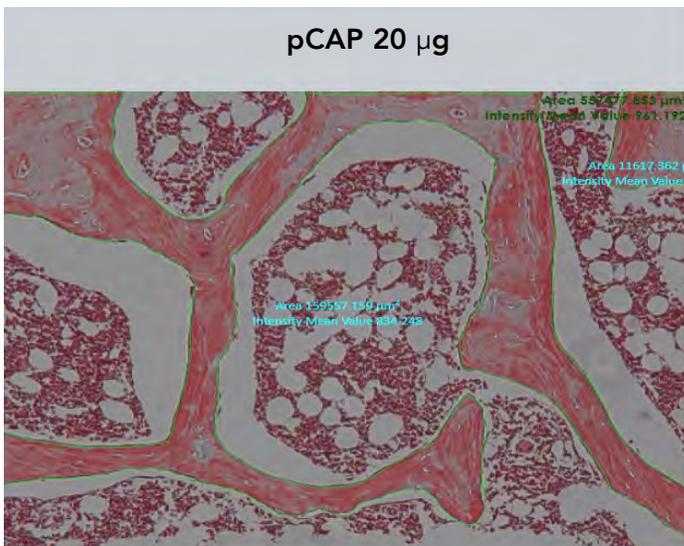
	Name	Area[µm²]		Intensity...
		A	B	C
1	Spline Contour	219,413.810		1,123.132
2	Spline Contour	81,588.533		1,239.301
3	Spline Contour	11,192.940		1,036.378
4	Spline Contour	61,012.942		990.074
5	Rectangle	557,983.058		1,132.401

pCEMP 80 µg



2	Spline Contour	207,814.487		399.318
3	Spline Contour	6,426.042		574.937

pCAP 20 µg



	Name	Area[µm²]		Intensity...
		A	B	C
1	Rectangle	557,477.853		961.192
2	Spline Contour	159,557.159		834.248
3	Spline Contour	11,617.362		843.171

ANEXO E



COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CIE/06/19/03/2014

ASUNTO: Proyecto: PÉPTIDO DERIVADO DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (PTPLA/CAP) PARA LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS

Dr. Higinio Arzate

PRESENTE

Este Comité de Investigación y Ética, reunido el día Miércoles 19 de Marzo del año en curso, a las 13:00 horas en la sala de juntas de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología y estando presentes los siguientes miembros del CIE: Dr. Javier Portilla Robertson, Dra. Patricia Tato Zaldívar, Dr. Eduardo Llamosas Hernández, Dra. Elba Leyva Huerta, Mtro. Carlos Hernández Hernández y Dr. Higinio Arzate, al hacer la evaluación de dicho proyecto manifiesta por unanimidad que:

HA SIDO APROBADO Y SE OTORGA EL AVAL PARA REALIZARSE EN LAS INSTALACIONES DEL BIOTERIO DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNAM.

Este proyecto describe la forma humanitaria y sin dolor para llevar a cabo el proceso de eutanasia de los animales de experimentación.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos Hernández Hernández', is written over a horizontal line. Below the signature, the word 'Atentamente' is printed in a standard font.

Mtro. Carlos Hernández Hernández

Secretario



US 20170088584A1

(19) **United States**
 (12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2017/0088584 A1**
ARZATE et al. (43) **Pub. Date: Mar. 30, 2017**

(54) **USE OF PEPTIDIC DRUGS FOR
 OSTEOPOROSIS TREATMENT AND BONE
 REGENERATION**

(71) Applicant: **UNIVERSIDAD NACIONAL
 AUTONOMA DE MEXICO**, Distrito
 Federal (MX)

(72) Inventors: **Higinio ARZATE**, Distrito Federal
 (MX); **Fabiola SALGADO
 CHAVARRIA**, Distrito Federal (MX);
Gonzalo MONTOYA AYALA, Distrito
 Federal (MX)

(21) Appl. No.: **14/865,909**

(22) Filed: **Sep. 25, 2015**

Publication Classification

(51) **Int. Cl.**
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
 (52) **U.S. Cl.**
 CPC *C07K 7/08* (2013.01); *C07K 7/06*
 (2013.01); *A61K 38/00* (2013.01)

(57) **ABSTRACT**
 The present invention provides osteogenic peptides derived from the Cementum-derived attachment protein (HACD1/CAP) and another derived from the Cementum Protein 1 (CEMP1) and pharmaceutical compositions of these peptides for the prevention and treatment of osteopenia and osteoporosis. These peptides increase bone mineral density in an osteoporotic model and without in vivo side effects, demonstrating clinical effectiveness in the prevention and treatment of osteopenia and osteoporosis in vivo as well as bone repair and/or regeneration.