

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Osteoporosis Experimental en Conejas Albinas Nueva
Zelanda: Ensayo con Flavonoides: Apigenina Potásica y
Naringenina

D. Enrique Bautista Muñoz

2013



INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN
ENVEJECIMIENTO

Osteoporosis Experimental en Conejas Albinas Nueva
Zelanda: Ensayo con Flavonoides: Apigenina Potásica y
Naringenina

D. Enrique Bautista Muñoz

2013

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con el proyecto de investigación CENIT: SENIFOOD (CEN-20091006; 2009 – 2012).
Ministerio de Ciencia y Tecnología. España.

AGRADECIMIENTOS

Si no hay en tu vida

Una sola cosa

Por la que merezca la pena

Perderlo todo.

Es que no tienes nada.

Matilde Campos Aranda

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría 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 al Dr. D. Vicente Vicente Ortega 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.

De igual modo, me gustaría agradecer la ayuda recibida por los profesores el Dr. D. Luis Ramón Meseguer Olmo y el Dr. D. Francisco José Gómez García como codirectores de esta investigación, por su inestimable orientación, por su irrefutable profesionalidad, pero sobre todo, por el interés mostrado por mi trabajo.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud al Dr. D. Manuel Canteras Jordana, a mis compañeros del Servicio de Animales de laboratorio y a los del departamento de Anatomía patológica, en especial a D. Victor Bolarín, por su apoyo técnico. Gracias Fabio por tu cable en la interpretación estadística.

Gracias también a Nutrafur S.A. (especialmente a D. Julián Castillo) por su incondicional apuesta por la investigación aportando los productos y las características técnicas de los mismos, imprescindibles, para poder llevar a cabo este estudio.

A mi familia y al resto de los amigos, por su paciencia.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.- ANTECEDENTES:	
FISIOPATOLOGÍA.....	9
REMODELADO ÓSEO.....	19
FACTORES DE RIESGO.....	25
TIPOS DE OSTEOPOROSIS.....	31
DIAGNÓSTICO.....	33
TRATAMIENTO.....	37
MODELOS EXPERIMENTALES:	
1.- ESTUDIO CON FLAVONOIDES.....	51
2.- ESTUDIO CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	63
III.- OBJETIVOS.....	73
IV.- MATERIAL Y MÉTODOS	
MATERIAL:	
1.- ESTUDIO “IN VITRO”.....	79
2.- ESTUDIO “IN VIVO”.....	82
MÉTODOS:	
1.- ESTUDIO “IN VITRO”.....	85
2.- ESTUDIO “IN VIVO”.....	93

• PROTOCOLO QUIRÚRGICO.....	94
• BIOQUÍMICO.....	101
• MICRO CT.....	103
• ANATOMOPATOLÓGICO.....	115
• ICP-OES.....	119
• ESTADÍSTICO.....	121
V.- RESULTADOS	
1.- ESTUDIO “IN VITRO”.....	125
2.- ESTUDIO “IN VIVO”.....	127
• ESTUDIO DE PESOS.....	127
• BIOQUÍMICO.....	131
• MICRO CT.....	135
• ANATOMOPATOLÓGICO:	
• MICROSCOPIO ÓPTICO.....	153
• MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.....	171
• ICP-OES.....	177
VI.- DISCUSIÓN.....	183
VII.- CONCLUSIONES.....	207
VIII.- BIBLIOGRAFÍA.....	211
IX.- ANEXO	227

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

A comienzos del siglo XIX, el cirujano inglés Sir Astley Cooper, describió *“que la porosidad y la disminución de la fuerza de los huesos se adquieren en los estados más avanzados de la vida”* y que *“este estado del hueso, favorece el aumento de fracturas”* (Cooper, 1822).

El término osteoporosis (OP) procede del latín –osteo- (hueso) y –porosis- (poroso); fue definido por vez primera en 1940 por el Dr. Albright como *“disminución de la masa ósea por unidad de volumen de hueso secundaria a la ausencia de estrógenos, siendo la mineralización del hueso normal”* (Albright, 1940).

Una segunda definición fue propuesta por la revisión realizada por el Consenso para la prevención y tratamiento de la Osteoporosis en 1991, detallando que se trata de una *“enfermedad difusa del esqueleto caracterizada por una disminución de la masa ósea y alteraciones en la microarquitectura del tejido óseo como consecuencia de la cual aumenta la fragilidad ósea y la susceptibilidad para las fracturas”*.

Posteriormente, se propuso que existían dos formas de osteoporosis: la relacionada con la menopausia por deficiencia de estrógenos y aquella relacionada con la deficiencia de calcio y con la edad (Riggs, 1982). Actualmente se define la osteoporosis como una *“enfermedad esquelética diseminada y caracterizada por una resistencia ósea disminuida que incrementa el riesgo de padecer fracturas”* (NIH, 2001). Para otros autores, representa un proceso, en el

cual múltiples mecanismos patogénicos convergen para causar la pérdida de la masa ósea (Raisz, 2005).

Es una enfermedad crónica que causa en España alrededor de 90.000 fracturas de cadera y 500.000 fracturas vertebrales al año. Más de 3,5 millones de personas la padecen en nuestro país (Del Pino Montes, 2011).

Este tipo de fracturas puede provocar discapacidad y dolor, y muchas veces son ignoradas o diagnosticadas erróneamente como dolor de espalda debido a distensión muscular o artritis. Las previsiones son que, en nuestro país, una de cada tres mujeres y uno de cada cinco hombres tendrán osteoporosis y, aunque el proceso esté asociado a la edad y a la menopausia, se puede prevenir.

Dada su importancia, es ya actualmente un fenómeno especialmente grave. Sin embargo, debido al progresivo envejecimiento de la población, los expertos coinciden en que ese impacto aumentará en los próximos años de forma importante. Manuel Díaz Curiel, presidente de la Fundación Hispana de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas (Fhoemo) considera primordial la necesidad de desarrollar nuevos canales de información que ayuden a los pacientes a comprender la enfermedad y la importancia de cumplir con el tratamiento para reducir el riesgo de fractura y mantener así su calidad de vida; (Díaz Curiel, 2003).

En el tratamiento, la decisión del inicio y elección del fármaco, estará basada en la necesidad de reducir el riesgo de fractura, teniéndose en cuenta respecto al paciente además de la edad, el sexo, función renal, alergias a drogas, otras comorbilidades, tratamientos anteriores, contraindicaciones, costos, etc.

La acción de los fármacos actualmente disponibles contra la osteoporosis debe atender al perfil peculiar que dibuja la etapa menopáusica en la vida de la mujer. Entre las diversas opciones disponibles, no cabe duda de que el acercamiento hormonal, representado tradicionalmente por los estrógenos, ha supuesto un referente durante muchos años. Posteriormente, el uso de flavonoides ha complementado la opción estrogénica, aportando una serie de matices particulares. Se trata de sustancias procedentes de plantas que, por su estructura similar a los estrógenos, pueden unirse a su receptor y activarlo. Hay tres grandes familias: las isoflavonas, los cumestanos y los lignanos, si bien la información disponible se centra particularmente en el grupo de las isoflavonas.

ANTECEDENTES

FISIOPATOLOGÍA

El hueso es un tejido en remodelación continua. Cuando se rompe el equilibrio entre formación y destrucción, debido a cambios en la dieta u hormonales, se pierden los minerales que mantienen su dureza y densidad características. A esta circunstancia se le denomina *osteopenia*. Cuando la pérdida es mayor y el hueso tiene más riesgo de fractura, hablamos de *osteoporosis*. (fig. 1).

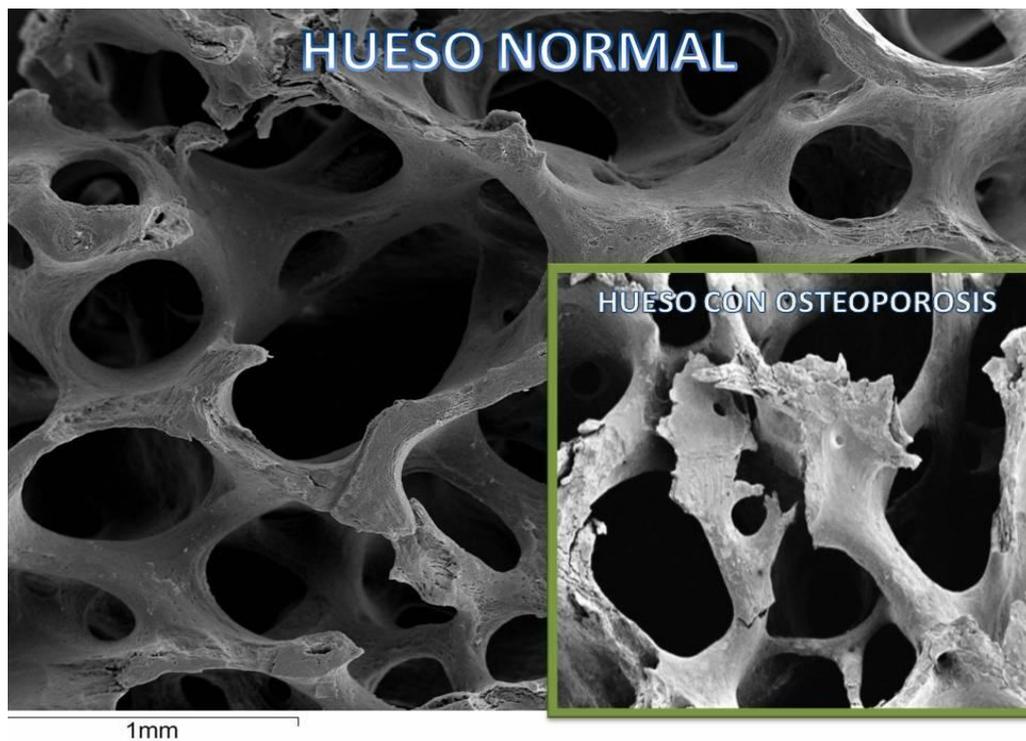


Fig.1: Microfotografía con microscopio electrónico de barrido: hueso normal / hueso osteoporótico. (barra 1mm)

La osteoporosis se caracteriza por alteraciones cuantitativas (baja masa ósea) y cualitativas (deterioro en la microarquitectura ósea) que condicionan una disminución en la competencia mecánica del hueso. Este, posee una organización anatómico-funcional que lo hace un tejido muy activo, contrariamente a su apariencia. En su composición destacan fundamentalmente dos fases:

1. *Orgánica*; constituida en más del 90% por fibras de colágeno tipo I, que se agrupan en forma especializada para originar la "matriz ósea" u osteoide. El resto, lo constituyen proteínas no colágenas tales como osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas, etc., cuyas funciones no se conocen exactamente.

2. *Inorgánica*; representada por cristales de calcio y fósforo, como hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que se depositan sobre la matriz orgánica, dándole así la dureza típica al hueso. El 65% del peso seco del hueso corresponde a esta fase mineral.

Los mecanismos de dicha alteración de la microarquitectura están relacionados con un incremento del proceso de remodelación ósea, la presencia de microfracturas, el desarrollo de perforaciones y discontinuidad de las trabéculas. Mientras que la disminución de la masa puede deberse a un pico bajo, a un incremento en la resorción o a una disminución de la formación durante el proceso de remodelamiento óseo. El papel por separado de cada uno de estos factores es difícil de precisar, aunque se sabe que el incremento de la resorción con pérdida de la estructura ósea, es la de mayor impacto.

El último componente propio del hueso son las células:

- *Osteoblastos*; de origen mesenquimal, encargados de formar hueso a través de la síntesis del osteoide y de controlar su mineralización.
 - *Osteoclastos*; derivados de la línea granulocítica-macrofágica de la hematopoyesis, encargados de destruir hueso en sitios específicos.
 - *Osteocitos*; son osteoblastos inactivos, incorporados en el seno del material osteoide mineralizado.

En el hueso de un adulto normal, observado por microscopia de luz polarizada, las fibras de colágeno se disponen preferencialmente en capas, formando una estructura típicamente laminar.

Ello permite la mayor densidad de colágeno por unidad de volumen y como resultado de esta organización, el hueso laminar tiene una mejor competencia mecánica, adaptándose a las fuerzas aplicadas. Cuando esta orientación se pierde y el colágeno se dispone en forma aleatoria, tal tipo de hueso se llama "hueso trenzado" (*woven bone*). Este último, es de menor resistencia al trauma y es típico de situaciones de gran actividad metabólica del hueso, como en la reparación de fracturas, enfermedades óseas metabólicas (osteogénesis imperfecta, hiperparatiroidismo, enfermedad de Paget) o tumores.

Respecto a su organización estructural, se reconocen dos tipos de hueso: *cortical* y *trabecular*. Cada hueso está conformado por uno o ambos tipos de estructura. El hueso cortical es un hueso denso o compacto, con gruesas capas de osteoide calcificado, que se ubica en la diáfisis de huesos largos y en los platillos vertebrales. En contraste, el hueso trabecular está compuesto de numerosas espículas óseas

que atraviesan las cavidades medulares de los huesos planos y metáfisis de huesos largos y abunda en los cuerpos vertebrales.

Aunque el 80% del esqueleto está constituido por hueso cortical, es el hueso trabecular el que determina más de la mitad de la actividad metabólica del esqueleto. Esto último se debe a que el recambio o actividad metabólica del hueso es un evento de superficie (interfase matriz-espacio extracelular) y la razón superficie/volumen del hueso trabecular es mucho más alta que la del cortical.

Como será comentado más adelante, la osteoporosis puede resultar de la pérdida de hueso cortical, trabecular o de ambos.

Después de la madurez esquelética y durante toda la vida restante, el hueso es renovado a través de la destrucción continua de pequeñas cantidades del mismo (resorción ósea) y reemplazo de éstas por hueso nuevo (formación ósea). Este proceso se denomina remodelamiento óseo y asegura el mantenimiento de la masa esquelética.

Determinantes del pico de masa ósea

En estudios efectuados en gemelos univitelinos se ha demostrado que los factores genéticos determinan entre el 40 y 80 % de la masa ósea. Asimismo, la estructura y el remodelado óseo también pueden ser genéticamente determinados (Ralston, 1997). Sin embargo, factores nutricionales (especialmente relacionados con la ingesta de calcio), ambientales y el ejercicio, tienen un efecto importante sobre este pico de masa ósea. Así, se ha demostrado que el incremento en la ingesta de calcio y la actividad física durante la infancia y adolescencia tienen un efecto positivo sobre la masa ósea.

Al mismo tiempo, aunque con resultados contradictorios entre diferentes grupos de investigadores, se ha demostrado el importante papel de distintos genes en la fisiopatología de la osteoporosis: diferentes alelos del gen que codifica el receptor de la vitamina D, están asociados con diferencias en la masa ósea (Kiel, 1997).

Se ha demostrado aumento de osteoporosis en pacientes con polimorfismo del primer intrón del gen del colágeno. También se conoce que otros genes relacionados con el receptor estrogénico, el factor transformador beta (TGF- β) y la apolipoproteína E, estarían implicados en la fisiopatología de la osteoporosis.

Mecanismos de la pérdida de hueso

Puede ocurrir por incremento de la resorción ósea o disminución de la formación osteoblástica. Biopsias de pacientes con osteoporosis demuestran incremento en los sitios de resorción, sin que exista un aumento compensatorio en la formación, por lo que el resultado final es una disminución de la masa ósea. El término de osteoporosis de alto recambio se utiliza en aquellos pacientes en los que existe un incremento importante de la resorción ósea; mientras que el de bajo recambio es para la disminución de la formación. La forma de investigar cuál de estos mecanismos está ocurriendo, es midiendo marcadores de formación y resorción ósea discutidos en otro capítulo.

Papel de las hormonas y mediadores bioquímicos

La edad y la menopausia ocasionan una serie de cambios en la producción de distintas hormonas: las que regulan el metabolismo del calcio, las hormonas sexuales y los factores de crecimiento.

a) *Hormonas reguladoras de calcio:*

La calcitonina inhibe la resorción ósea y su disminución puede contribuir a la fisiopatología de la osteoporosis. Elevaciones discretas de la hormona paratiroidea (PTH) o alteraciones de la función de la vitamina D, pueden contribuir en la patogenia de la osteoporosis. Por otro lado, la disminución de la ingesta de calcio o vitamina D, así como la disminución de la exposición solar, pueden ocasionar cierto grado de hiperparatiroidismo secundario, que puede tener importancia en la pérdida de hueso relacionada con la vejez y las fracturas de cadera.

En algunos estudios en mujeres con fractura de cadera, se ha observado una disminución de los valores de 1-25-dihidroxitamina D₃, cuando se comparan con mujeres sin fracturas (Chapuy, 1992).

b) *Hormonas sexuales:*

b.1. *Estrógenos:* Su disminución genera una caída rápida de masa ósea, (Cummings, 1998). Es conocido que las mujeres mayores de 70 años, que continúan produciendo cantidades pequeñas de estrógenos, tienen menos riesgo de fracturas, que las que no producen estrógenos. Existen múltiples evidencias que señalan el papel de diversas citoquinas y factores de crecimiento en la fisiopatología de la osteoporosis asociada a deficiencia de estrógenos:

b.1.1. Demostración del efecto de los estrógenos sobre la apoptosis o muerte celular programada de los osteoclastos y sobre la producción del TGF- β en osteoblastos mediada por estrógenos.

b.1.2. El TNF- α incrementa el reclutamiento de osteoclastos y su producción se incrementa después de la ovariectomía en animales de experimentación.

b.1.3. La deficiencia estrogénica estimula la resorción ósea por incremento en la producción de prostaglandinas e interleuquinas IL-6 e IL.

Tiene importancia crucial no solo en las mujeres, pues recientemente se ha demostrado que en la pérdida de masa ósea observada en los hombres tiene más importancia que la misma testosterona en la pérdida de masa ósea.

Al mismo tiempo, se ha demostrado osteoporosis en hombres con defectos en el gen que codifica el receptor estrogénico o en casos de deficiencia de aromatasa, que convierte la testosterona en estrógeno.

También se ha demostrado que existe una correlación entre las concentraciones de estrógenos y la masa ósea en hombres viejos.

b.2. Andrógenos: La deficiencia produce pérdida de masa ósea con incremento del recambio óseo. Igualmente, los andrógenos estimulan la formación ósea. Esta es la razón por la cual en el hombre el déficit de esta hormona representa una de las principales causas de osteoporosis

b.3. Progesterona: Las células óseas poseen receptores para progesterona, pero existe poca evidencia de que esta hormona afecte el proceso de remodelado óseo in vivo.

c) Hormonas tiroideas:

Incrementan tanto la formación como la resorción ósea: los pacientes con hipertiroidismo o tratados con exceso de hormona tiroidea, pueden desarrollar un cuadro de alto recambio óseo. Sin embargo, no existe ninguna evidencia de que la hormona tiroidea esté involucrada en la fisiopatología de la osteoporosis primaria.

d) Glucocorticoides:

Su exceso como el observado en el Síndrome de Cushing, es una causa importante de osteoporosis.

No obstante, difiere de la osteoporosis primaria en que la anomalía más importante es una inhibición de la formación ósea, debida a una disminución de la actividad e incremento de la apoptosis de los osteoblastos. La existencia de aumento de la resorción ósea también ocurre básicamente por una disminución de la absorción intestinal de calcio y desarrollo de hiperparatiroidismo secundario.

e) Citoquinas:

La estructura y el remodelado óseo están determinados por fuerzas locales inducidas por elementos adyacentes o por las mismas células óseas. Estas incluyen a las citoquinas y los factores de crecimiento. Muchas citoquinas influyen en la función ósea, entre las que han demostrado su acción en estudios con animales de experimentación sometidos a ovariectomía: IL-1, IL-6, IL-7, IL-4, IL-13 y TNF- α .

f) Otros factores locales:

Como el factor de crecimiento dependiente de la insulina (IGF) y la TGF- β proteína morfogenética del hueso (BMP). Así mismo, el péptido relacionado a la PTH (PTHrP) tiene importancia en la regulación del desarrollo tanto del hueso como del cartílago.

REMODELADO ÓSEO

El hueso experimenta continuamente transformaciones que podemos agrupar en dos tipos: modelación y remodelación óseas.

1. *Modelación:* así se definen el conjunto de modificaciones que experimenta el hueso durante su crecimiento para mantener la forma que le es característica. Los huesos crecen en longitud mediante la formación de hueso en el cartílago de crecimiento; puesto que la zona que es metáfisis posteriormente se transformará en diáfisis (que es menos ancha), deberá sufrir fenómenos de resorción subperióstica. Por otro lado la diáfisis experimentará fenómenos de resorción para permitir el crecimiento de la cavidad medular y fenómenos de aposición subperióstica por los que crece en anchura.

2. *Remodelación:* proceso gracias al cual el hueso se renueva continuamente. Su finalidad es evitar la acumulación de lesiones de fatiga. Se lleva a cabo mediante la acción sucesiva de los osteoclastos y osteoblastos en un punto en concreto de la superficie ósea. Los primeros, fijados a componentes de la matriz ósea como la osteopontina mediante una integrina específica ($\alpha\beta3$), excavan el hueso, dando origen a las lagunas de Howship. El extremo reabsorbente del osteoclasto forma un borde rugoso especializado que está en contacto con el hueso; en su membrana se encuentran proteínas incluida una bomba de protones ATPasa especializada que contribuye a crear un medio ácido, que solubiliza la fase mineral. También es necesaria la presencia de anhidrasa carbónica (isoenzima

tipo II), para mantener el pH ácido. Otras características de los osteoclastos activos son la expresión del protooncogen c-src, la fosfatasa ácida resistente a tartrato, los receptores de superficie celular para calcitonina, las bombas de sodio tipo renal, un intercambiador de bicarbonato / fluoruro y la capacidad para resorber hueso mineralizado.

Posteriormente los osteoblastos rellenan la zona excavada. La aposición del hueso nuevo se efectúa por capas. La formación de hueso implica el depósito de una matriz orgánica por parte de los osteoblastos seguida de mineralización. El hueso recién formado no se mineraliza inmediatamente, sino que lo hace tras un tiempo de maduración (promedio de 10 días). Dicho período se conoce como tiempo de desfase de la mineralización. Ésta se realiza también por capas, siguiendo el mismo orden que la aposición ósea. La fase mineral se compone de calcio y fósforo y la concentración de estas iones en el plasma y en líquido extracelular condiciona la tasa de formación de la porción mineralizada del hueso. Al comienzo de la mineralización la fase sólida de fosfato cálcico es la brushita; conforme avanza la mineralización la fase sólida se constituye por hidroxiapatita poco cristalizada y un cociente molar calcio/fósforo bastante bajo. Con la edad y la maduración aumentan la perfección de los cristales y el cociente calcio/ fósforo. Cuando los iones de flúor se incorporan a la fase mineral, disminuye la proporción de fosfato cálcico amorfo y aumenta la estructura cristalina. La zona de transición entre el hueso mineralizado y el que no lo está constituye el “frente de mineralización”. El hueso sin mineralizar se denomina osteoide y queda por delante de dicho frente; su grosor es directamente proporcional a la velocidad de formación de la matriz orgánica, e inversamente a la de avance del frente de mineralización. La matriz ósea es resorbida en el medio ácido

adyacente al borde rugoso por las proteinasas que actúan a pH bajo, como la catepsina K, después de que se haya solubilizado la fase mineral.

Se denomina *acoplamiento* a la coordinación temporal y espacial entre los osteoclastos y los osteoblastos, en virtud de la cual los osteoblastos actúan a continuación de los osteoclastos y en el mismo lugar en que estos lo hicieron previamente.

Se piensa puede deberse a la liberación desde el hueso por parte de los osteoclastos cuando lo destruyen, de sustancias que atraen y estimulan a los osteoblastos, tales como el TGF- β .

A la inversa, el desacoplamiento óseo con predominio de la resorción conducirá a una pérdida de masa ósea. Dependiendo de la intensidad y prolongación de este desacoplamiento, entre otros factores, se agregan alteraciones de la microarquitectura ósea, por pérdida de la continuidad trabecular y aumento de la porosidad cortical. Ambos factores, determinan aumento de la fragilidad ósea y del riesgo de fractura.

Actualmente se han caracterizado componentes celulares y extracelulares del tejido óseo que reflejan específicamente tanto la formación como la resorción ósea, mediante métodos no invasivos, útiles para el estudio de la enfermedad ósea metabólica. Clásicamente se han subdividido en marcadores de la formación y de la resorción.

Marcadores de formación ósea:

1. *Fosfatasa alcalina específica del hueso:* Se determina en suero, mediante técnicas de inmunoensayo utilizando anticuerpos monoclonales. Presenta una importante variabilidad interindividual, pero con variabilidad intraindividual baja y no influida por la dieta. Es una de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina, que se diferencian por

su composición en carbohidratos. Aproximadamente los niveles circulantes de fosfatasa alcalina total proceden en un 50% de hueso y otro 50% de fuente hepática.

2. *Osteocalcina*: Es una proteína sintetizada por los osteoblastos maduros, odontoblastos y condrocitos. Se caracteriza por contener tres residuos del aminoácido ligador de calcio: ácido gammacarboxiglutámico y se determina por inmunoensayo. Se considera un marcador sensible y específico de la actividad osteoblástica, si bien en parte puede derivar de la resorción ósea.

3. *Propéptidos del procolágeno, amino y carboxiterminales, del colágeno tipo 1*: Son fragmentos procedentes de la ruptura del colágeno tipo 1 recién formado por endoproteinasas. Se considera que reflejan la fase colágena de la formación ósea, si bien también pueden proceder de otros tejidos (piel, tendones, cartílago, válvulas cardiacas, grandes vasos, etc.). Se determinan en suero, mediante inmunoensayo.

Marcadores de resorción ósea:

1. *Hidroxiprolina*: Es un aminoácido presente en todos los tipos de colágeno, liberado tras su ruptura enzimática, excretándose aproximadamente el 10% por su orina. Su falta de especificidad, la necesidad de determinarlo en orina de 24 horas, y la fuerte influencia, en sus niveles, del colágeno ingerido en las 24 horas previas ha obligado a reemplazar su determinación por otras más específicas.

2. *Fosfatasa ácida tartrato-resistente*: Es sintetizada y secretada por los osteoclastos durante la resorción activa del hueso. Puede determinarse mediante inmunoensayo en plasma y sus niveles no se influyen por la dieta.

3. *Sialoproteína ósea*: Es una fosfoproteína no colágena muy abundante en el hueso. Es sintetizada tanto por los osteoblastos como por algunos osteoclastos.

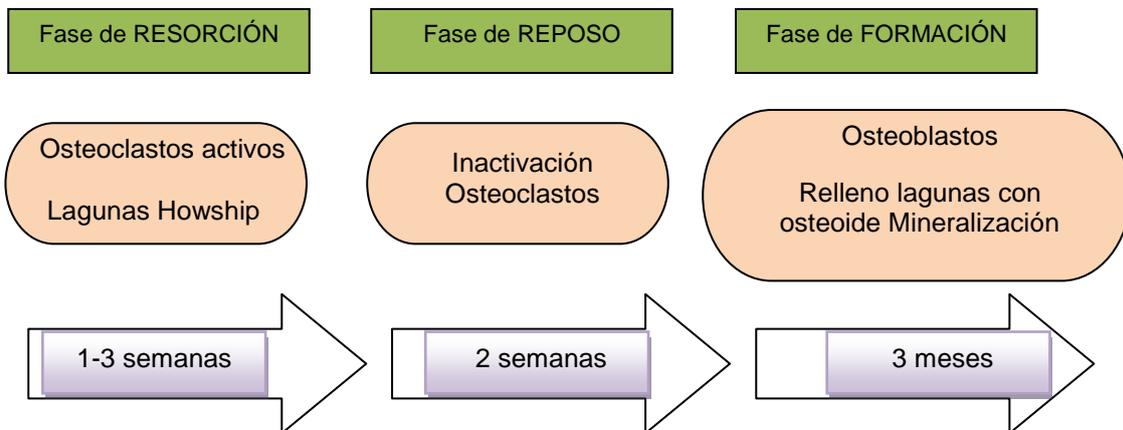


Fig. 2: Ciclos de actividad celular en las unidades de remodelado óseo

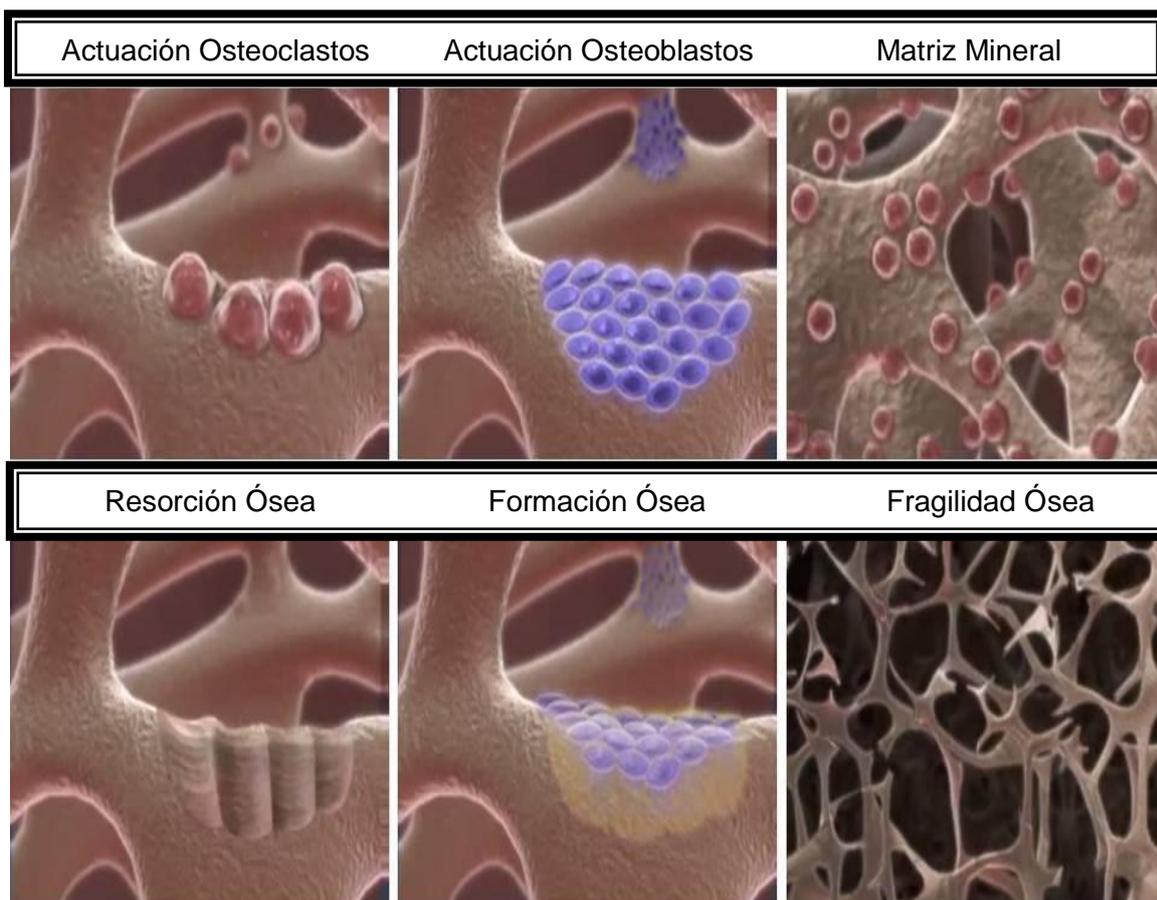


Fig. 3: Fases del Remodelado Óseo

FACTORES DE RIESGO

Pueden definirse como aquellas variables, estados o condiciones asociadas con un riesgo mayor de padecer la enfermedad, y sobre todo, sus consecuencias, las fracturas. La probabilidad individual de padecer una fractura osteoporótica está condicionada por múltiples factores. De hecho, cada localización específica de fractura tiene un perfil de factores de riesgo determinado. Generalmente no actúan de forma aislada, sino que es la combinación de varios de ellos lo que aumenta significativamente el riesgo de fractura y puede ser útil para seleccionar a individuos a los que realizar una *densitometría* ósea e incluso para decidir el inicio del tratamiento farmacológico. Entre los factores de riesgo clínicos más sólidamente relacionados con la osteoporosis y las fracturas se encuentran:

A. Genéticos o constitucionales:

A.1. Edad, sexo y raza: La mujer es el grupo poblacional más susceptible de padecer osteoporosis, principalmente en los años cercanos y posteriores a la menopausia. La prevalencia es de 15-20:1 respecto al hombre. A partir de los 50 años, la tasa de incidencia de fractura de cadera es 3♀:1♂. La osteoporosis y las fracturas osteoporóticas son más frecuentes en la raza blanca, seguida de la asiática, respecto a la raza negra y los hispanoamericanos.

A.2. Fractura osteoporótica previa: La presencia de una fractura previa por fragilidad aumenta el riesgo de nuevas fracturas entre 1,5 y 9,5 veces, dependiendo de la edad, el número de fracturas previas y su

localización. De forma global y para cualquier localización, el riesgo de fractura de un individuo con una fractura osteoporótica previa, es de 2,2 veces mayor que la de un individuo sin dicho antecedente.

A.3. Antecedente familiar de fractura: Dado que la influencia genética sobre el riesgo de osteoporosis es multifactorial, no sólo debe considerarse el antecedente de fractura de cadera en familiares de sexo femenino (madre y abuela), sino también en familiares varones de primero y segundo grado.

B. Estilo de vida y nutrición:

B.1. Baja ingesta de calcio: El consumo de calcio en las edades críticas de la vida es importante, y la infancia y la adolescencia son el momento clave para asegurar una adecuada ingesta y facilitar la formación de un buen pico de masa ósea. En la época posmenopáusica y en la etapa senil, los suplementos de calcio ayudarán a disminuir la pérdida de masa ósea y facilitarán la prevención de fracturas. En los 5 años siguientes a la menopausia existe una pérdida acelerada de la masa ósea, siendo del 3-5% anual mientras la pérdida relacionada con la edad es de aproximadamente un 1% anual. Las recomendaciones sobre la ingesta de calcio del Consensus Conference in Osteoporosis de EE.UU (Consensus Development Conference; NIH, 1994) son de 1.200 mg/día en adolescentes, 1.000 mg/día en adultos y 1.500 mg/día en mujeres posmenopáusicas y ancianos.

B.2. Déficit de Vitamina D: Produce aumento de la hormona paratiroidea con aumento en el recambio óseo y disminución de la masa ósea en ausencia de alteraciones significativas de la mineralización. Deficiencias severas y prolongadas de vitamina D producen raquitismo en el niño y osteomalacia en el adulto. La vitamina D ayuda a absorber calcio. Se recomienda 200 a 600 u.i. de vitamina D diaria.

Una exposición al sol de 30 minutos al día es normalmente suficiente para que se produzca en la piel la cantidad necesaria de vitamina D, que permita la absorción intestinal del calcio.

B.3. Ejercicio físico, inmovilización y sedentarismo: las mujeres sedentarias tienen más riesgo (20% a 40%) de fractura de cadera que las que realizan una actividad física ligera (2-4 horas de ejercicio semanales).

B.4. Variables antropométricas: El bajo peso (IMC < 19 Kg/m²) y la talla pequeña se asocian a mayor riesgo de OP. A igualdad de densidad ósea tiene menos resistencia un hueso pequeño que un hueso grande.

B.5. Tóxicos: Tabaquismo, alcohol y café: Los fumadores tienen menor densidad mineral ósea, mayor susceptibilidad a fractura vertebral y de cadera y mayor probabilidad de presentar fracturas recurrentes. El consumo crónico de alcohol tiene efecto depresor sobre la proliferación de los osteoblastos e interfiere en la absorción intestinal del calcio, además de asociarse a un proceso global de malnutrición. La cafeína aumenta la eliminación urinaria de calcio, y su uso abusivo favorece la osteoporosis.

B.6. Nutrición no equilibrada: La baja ingesta proteica es más frecuente a medida que avanza la edad y se asocia con baja densidad ósea y sedentarismo. La alta ingesta de bebidas gaseosas, especialmente bebidas tipo cola, cada vez más frecuente en jóvenes parece relacionarse también con baja densidad ósea, aunque no se ha demostrado en estudios experimentales y algunos estudios postulan que su efecto negativo se debería a desplazamiento del consumo de lácteos en la dieta.

C. Déficit de hormonas sexuales:

Menarquía tardía (> 15 años), amenorrea prolongada superior a 1 año, nuliparidad de causa hormonal, no lactar o lactar más de 6 meses, menopausia precoz (< 45 años; más riesgo si es quirúrgica), hipogonadismo en el varón, déficit de estrógenos antes de la menopausia (anovulación por anorexia nerviosa, ejercicio excesivo, estrés mental, etc.)

D. Tratamiento farmacológico crónico:

Glucocorticoides y ACTH, litio, tirosina sobredosificada, anticonvulsivantes, heparina, quimioterapia, antiandrógenos, tamoxifeno, antiácidos con fosfato o aluminio, etc.

E. Otras enfermedades:

Malabsorción intestinal y hepatopatías crónicas, enfermedades endocrinas, enfermedades renales, etc.

FACTORES DE RIESGO DE FRACTURA OSTEOPORÓTICA

- BAJA MASA ÓSEA PATOLÓGICA: OSTEOPENIA Y OSTEOPOROSIS
- EDAD: MAYOR DE 65
- FRACTURA OSTEOPORÓTICA PREVIA
- OSTEOPOROSIS EN FAMILIAR DE PRIMER GRADO
- BAJO PESO
- RIESGO AUMENTADO DE CAÍDAS

FACTORES DE RIESGO DE CAÍDAS

- TENER MÁS DE 65 AÑOS (MUJERES)
- DETERIORO RELACIONADO CON EL ENVEJECIMIENTO
- TRASTORNOS DE LA MARCHA, EQUILIBRIO Y MOVILIDAD
- DÉFICIT VISUAL
- DÉFICIT COGNITIVO O DEPRESIÓN
- PÉRDIDA DE CONOCIMIENTO SÚBITA
- RIESGOS PERSONALIZADOS: CALZADO INAPROPIADO, VESTIDO INAPROPIADO
- MULTITERAPIA: SEDANTES, ANTIHIPERTENSIVOS
- FACTORES AMBIENTALES:
- EN EL INTERIOR DE LA CASA (LUZ, SUELO, CABLES, MASCOTAS)
- EN EL EXTERIOR: CLIMA, TRÁFICO, TRANSPORTES, OBSTÁCULOS,...

Tabla 1: Otros factores de riesgo en osteoporosis

TIPOS DE OSTEOPOROSIS

1. *Osteoporosis primaria*

Se caracteriza por presentar formas comunes de osteoporosis de causa desconocida no asociada a otras enfermedades:

a) *Osteoporosis idiopática (juvenil y adulta)*: Es poco frecuente y se da en niños y adultos jóvenes (8-14 años) de ambos sexos con función gonadal normal. Debuta con dolor óseo de aparición repentina y con fracturas tras mínimos traumatismos. Es una enfermedad autolimitada, remitiendo en el plazo de 4-5 años. Hay una disminución de la DMO del hueso trabecular, que puede permanecer baja durante muchos años.

b) *Osteoporosis posmenopáusica (Tipo I de Riggs)*: Está relacionada con la pérdida de función gonadal. Predomina en mujeres entre 50 y 75 años, en una proporción de 6:1, pero también se da en hombres en casos de bajada de los niveles de testosterona sérica por cualquier motivo. La pérdida de estrógenos provoca una elevación de interleucina-6 y otras citocinas en suero que provocan la activación de los precursores de los osteoclastos en el tejido esponjoso (trabecular) que producen un incremento de la resorción ósea. Las fracturas predominantes en este tipo de osteoporosis son las que se producen en el hueso trabecular: fractura de la parte distal del radio (Colles) y aplastamiento vertebral.

c) *Osteoporosis senil (Tipo II de Riggs)*: El envejecimiento provoca un descenso gradual en el número y actividad de los osteoblastos. Los pacientes son mayores de 60 años y predominan las mujeres (2:1).

En este tipo se ve afectado el hueso trabecular y el cortical, provocando fracturas vertebrales, del cuello de fémur, de la parte proximal del húmero, parte proximal de la tibia y en la pelvis.

2. *Osteoporosis secundaria:*

Es independiente de la menopausia y la edad. Las posibles causas son muy numerosas, resaltando diferentes enfermedades endocrinológicas, gastrointestinales, hematológicas o conectivopatías, así como la inmovilización prolongada o el uso de distintos fármacos.

	TIPO I.	TIPO II.
EDAD (AÑOS)	50-75	>70
SEXO (M/V)	6/1	2/1
HUESO AFECTADO	<i>Trabecular</i>	<i>Trabecular y cortical</i>
VELOCIDAD DE PÉRDIDA	<i>Acelerada</i>	<i>No acelerada</i>
FRACTURAS	<i>Vértebra (aplastamiento) Distal antebrazo Vértebra (cuñas)</i>	<i>Cadera Húmero</i>
FUNCIÓN PARATIROIDEA	<i>Disminuida</i>	<i>Aumentada</i>
CAUSA	<i>Déficit de estrógenos</i>	<i>Envejecimiento</i>

Tabla 2: Tipos de Osteoporosis. Características fundamentales

DIAGNÓSTICO

A.- Criterio clínico

Una fractura es osteoporótica cuando reúne dos requisitos:

a) Debe ser desproporcionada al traumatismo que la ha producido e incluso haberse producido en ausencia de traumatismo. Es decir, debe ser de las denominadas “fracturas por fragilidad” (el arquetipo de traumatismo inadecuado es la caída al suelo desde la postura de bipedestación –o sedestación–, con los pies a la altura del suelo).

b) No debe identificarse otro factor que pueda justificar la fragilidad ósea (metástasis, enfermedad de Paget, etc.). Por lo que en definitiva, el diagnóstico de una fractura osteoporótica sea un diagnóstico de exclusión.

Existen además dos aspectos que facilitan la valoración de fractura osteoporótica: a) la existencia de factores de riesgo propios de la osteoporosis (vejez, sexo femenino, tratamiento esteroideo, etc.); b) que la fractura se haya desarrollado en uno de los huesos que típicamente se fracturan en esta enfermedad.

B.- Criterio densitométrico

Dado que la fractura no es sino una complicación de la osteoporosis, esperar a que se desarrolle para diagnosticar la enfermedad impide identificarla cuando aún se está a tiempo de prevenirla. El ideal, por tanto, es diagnosticar la osteoporosis antes de

que se produzca la fractura. Sin embargo, la osteoporosis, antes del desarrollo de las fracturas, es una enfermedad asintomática, por lo que no puede diagnosticarse en base a datos clínicos. La única posibilidad de detectarla antes de que aparezca la complicación estriba en identificar la alteración ósea que la caracteriza, mediante estudios densitométricos. En este sentido, se acordó un valor de DMO respecto al cual se consideraría enfermas (osteoporóticas) a las personas que se encontraran por debajo.

El establecimiento de un punto de corte concreto como el que acabamos de señalar, para una variable que es continua, tiene el inconveniente de no proporcionar la idea de continuidad respecto a la relación DMO/riesgo de fractura que corresponde a la realidad. La realidad es que el riesgo de fractura aumenta proporcionalmente a la disminución de la DMO, pero no que por encima del punto de corte no exista ningún riesgo y que por debajo de él, el riesgo sea absoluto.

Para evitar que el médico tenga una falsa sensación de seguridad en los valores inmediatamente superiores al de corte, la OMS (Tabla 3) estableció el concepto de **osteopenia**, cuando la DMO está entre $-1,0$ y $-2,5$ DE por debajo de la media juvenil. Por lo que el concepto de **normalidad** queda restringido a la situación en que la DMO está por encima de $-1,0$ DE, por debajo de dicha media juvenil. Finalmente, el comité de expertos mencionado consideró que debían distinguirse las situaciones en que el paciente no presenta fracturas de aquellas en que sí lo hace, asignando a esta última la categoría diagnóstica de **osteoporosis establecida**.

El diagnóstico debe contemplar tres fases fundamentales:

1. Anamnesis y exploración física

Edad de menopausia, amenorrea prolongada, hábitos tóxicos: alcohol, tabaco, antecedente de fractura > 40 años, fármacos (litio, corticoides, heparina, anticonvulsivantes), hábitos dietéticos. Ingesta media de calcio, enfermedad osteopenizante concomitante, pérdida de altura, etc.

2. Laboratorio

Las pruebas analíticas habituales no muestran alteración en la osteoporosis, aunque en ocasiones se observan elevaciones transitorias de la fosfatasa alcalina tras la aparición de una fractura. Sobre todo, van a ser útiles para excluir otros diagnósticos como osteoporosis secundaria, realizar el seguimiento de la enfermedad y su tratamiento y, en casos seleccionados, para valorar el recambio óseo.

3. Pruebas de Imagen:

a) *Radiológicas:* Los signos radiológicos más característicos de la osteoporosis se centran fundamentalmente a nivel de las vertebrae: pérdida de altura del cuerpo vertebral, aumento de la radiotransparencia, resalte de los platillos vertebrales (como dibujados a lápiz) y de la estriación vertical. Si bien, los signos de debilidad ósea, pueden aparecer en cualquier otra parte del cuerpo.

b) *Densitométricas:* Permiten cuantificar la pérdida o ganancia de la masa ósea en todas las regiones corporales de forma más segura y precoz que los métodos radiográficos. Se basan en la absorción o atenuación por el esqueleto de una radiación procedente de un isótopo o de una fuente de rayos X y en la correlación existente entre la

radiación absorbida y la masa ósea. La DXA: (Dual X ray absorptiometry) es un método que permite medir la densidad ósea (DO) y el contenido mineral (CM) en el total del cuerpo y en sitios específicos tanto del esqueleto axial como periférico y específicamente aquellos con mayor riesgo de fractura como columna, cadera y muñeca.

c) *Qus: (quantitative ultrasound)* es un método que usa ultrasonidos para evaluar el volumen de hueso y se aplica especialmente en calcáneo.

CATEGORÍA	DEFINICIÓN
NORMAL	DMO entre +1 y -1 DE del promedio de población adulta joven
OSTEOPENIA	DMO entre -1 y -2,5 DE del promedio de población adulta joven
OSTEOPOROSIS	DMO bajo -2,5 DE del promedio de población adulta joven
OSTEOPOROSIS GRAVE	DMO bajo -2,5 DE del promedio de población adulta joven y una o más fracturas de tipo osteoporótico

Tabla 3: Diagnóstico de osteoporosis según la OMS

TRATAMIENTO

El primer procedimiento para prevenir la osteoporosis consiste en poner todos los requerimientos necesarios para alcanzar un buen pico de masa ósea, al llegar a la época de la madurez esquelética (30-35 años), ya que a partir de ese momento comienza la pérdida de calcio y, en segundo lugar, intentar reducir la pérdida de ésta. El tratamiento, intenta que la pérdida ósea no sea acelerada y retrasarla lo más posible e impedir la aparición de fracturas si no se han producido todavía. Para decidir el inicio de un tratamiento determinado para osteoporosis, es imprescindible establecer los riesgos y beneficios para el caso de un paciente determinado. Para ello contamos con una serie de medidas bien diferenciadas, (Carrasco, 2002):

1. No farmacológicas:

A.- Prevención de caídas: La intervención más efectiva en la prevención de las caídas es la valoración multifactorial de los riesgos.

B.- Ejercicio físico: Realizado con asiduidad, produce incremento en la DMO y potencia la musculatura. Por ello, es aconsejable que los pacientes con osteoporosis realicen aquel ejercicio físico que sea adecuado a su estado de salud. Cuando una persona queda inmovilizada durante mucho tiempo por una enfermedad o traumatismo, la densidad del hueso disminuye rápidamente.

C.- Calcio y vitamina D: Después de la menopausia la disminución brusca de estrógenos puede acelerar la destrucción ósea, con la alteración consiguiente del metabolismo del calcio. Existe un acuerdo universal que recomienda a la mujer, que incremente la ingestión de calcio y realice un cálculo de su exposición al sol. Es sabido que una ingesta adecuada de calcio a través del consumo de lácteos, reduce el riesgo de osteoporosis (Tabla 4).

D.- Otros factores dietéticos: Es importante asegurar un buen aporte proteico (1 gramo de proteínas/kg/día) y de otros nutrientes (vitaminas y minerales).

- *Vitamina K:* Necesaria para la síntesis de osteocalcina y se ha sugerido que su déficit estaría involucrado en el aumento del riesgo de fracturas en adultos mayores.
- *Vitamina A:* Estudios poblacionales sugieren que el exceso de vitamina A puede aumentar el riesgo de fractura.

E.- Supresión de tóxicos: El tabaco acelera la excreción urinaria de calcio y produce una absorción menos eficiente de este mineral.

Además, el tabaquismo se asocia a situaciones de bajo peso corporal, menor ejercicio físico y peores hábitos alimentarios, con menor consumo de productos lácteos.

Por otro lado, el alcohol interfiere en el metabolismo del calcio, y se observa que la velocidad de pérdida de masa ósea se acelera en personas con alto consumo de alcohol. Así mismo, un exceso de cafeína puede estar implicado en el desarrollo de osteoporosis debido a un aumento en la excreción de calcio a nivel fecal y urinario.

Niños	mg	Grupo etáreo	RNI (IU/d)	RNI (microg/d)
0-6 meses	300-400	0-9 años	200	5
7-12 meses	400	10-18 años	200	5
1-3 años	500	19-50 años	200	5
4-6 años	600	51-65 años	400	10
7-9 años	700	65 + años	600	15
10-18 años	1300	Embarazo	200	5
Mujeres		Lactancia	200	5
19 años hasta menopausia	1000			
Postmenopausia	1300			
3º trimestre del embarazo	1200			
Lactancia	1000			
Hombres				
19-65 años	1000			
65 + años	1300			

Tabla 4: Ingesta de Calcio y Vitamina D (FAO/WHO, 2002)

Trastornos visuales	Adecuada corrección de las alteraciones de la agudeza visual Corrección quirúrgica de las cataratas cuando esté indicado
Trastornos neurológicos	Mareos. Vértigos. Estudio y tratamiento de los mismos Incapacidades neurológicas: Déficits por patología cerebrovascular.
Medicación	Hipnóticos. Fármacos con acción sobre el SNC: ansiolíticos, antidepresivos, anticomiciales, etc. Fármacos con riesgo de hipotensión postural: diuréticos, antihipertensivos.
Estudio del entorno	Iluminación adecuada en el domicilio Adaptación del cuarto de baño Evitar objetos sueltos: alfombras, cables, juguetes de niños ...

Tabla 5: Medidas aplicables para reducir el riesgo de caídas

2. Farmacológicas:

La decisión de inicio de tratamiento y elección del fármaco, estará basado en la necesidad de reducir el riesgo de fractura, teniéndose en cuenta respecto al paciente además de la edad, el sexo, función renal, alergias a drogas, otras comorbilidades, tratamientos anteriores, contraindicaciones, costos, etc.

Los pacientes a los que es recomendable el inicio de tratamiento para osteoporosis se encuentran comprendidos en alguna de las siguientes características:

- ❖ Mujeres posmenopáusicas con al menos una fractura por fragilidad.
- ❖ Mujeres posmenopáusicas sin fractura previa, pero con uno o más factores de riesgo (además de la menopausia), con un *T-score* de DMO menor o igual a -2,0 por DXA de una región esquelética axial (columna o cadera).
- ❖ Mujeres posmenopáusicas sin fractura previa ni factores de riesgo detectables, excepto que presenten un *T-score* de DMO menor o igual a -2,5 por DXA de al menos una región esquelética axial.
- ❖ Mujeres premenopáusicas con osteoporosis.
- ❖ Varones con osteoporosis.
- ❖ Pacientes que reciben terapia corticoide crónica o con dosis > 5 mg diarios de prednisona (o equivalente) más de 3 meses con *T-score* de DMO menor o igual -1,0.
- ❖ Mayores de 80 años, con *Z-score* de DMO menor a -1,5.

- ❖ Pacientes con cáncer de mama y/o con cáncer de próstata que toman drogas inductoras de pérdida de masa ósea.

Según las acciones generales del fármaco usado en el tratamiento, éstos se clasifican en: A) antirresortivos o anticatabólicos; B) osteoformadores o anabólicos; C) de mecanismo complejo (Lewiecki ,2009).

A) Fármacos anticatabólicos o antiresortivos

Destinados a frenar en forma directa o indirecta la actividad resortiva de los osteoclastos. Estas drogas disminuyen el remodelado óseo, lo que determina un incremento de la resistencia, preservan la microarquitectura e inducen un balance positivo en la unidad de remodelación, incrementado la formación y mineralización primaria y secundaria. Se consideran como tales a: Bifosfonatos, Calcitonina, Estrógenos, Raloxifeno, Calcio y Vitamina D.

A.1. Bifosfonatos

A.1.1.- Bifosfonatos orales: Sin duda son las drogas más utilizadas en la osteoporosis, consideradas de primera línea por el Consenso de la Sociedad Argentina de Osteoporosis (SAO) y la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Esta terapéutica tiene un efecto “anti-fractura” importante y reconocido. Los bifosfonatos (BF) son homólogos sintéticos del pirofosfato y potentes inhibidores de la resorción ósea. En primera instancia, se adhieren a la fase mineral del hueso maduro y al ser éste removido por

los osteoclastos, se incorporan a estas células por distintos mecanismos moleculares (formando análogos tóxicos de adenosina trifosfato (ATP), o alterando la vía del mevalonato); promueven de esta forma la muerte prematura y/o la apoptosis de los mismos e inhiben la osteoclastogénesis.

El primer bifosfonato utilizado en el tratamiento de la osteoporosis fue el *etidronato*, que es un bifosfonato no aminado que se administra en ciclos quincenales cada tres meses.

Tiene efecto positivo sobre la densidad mineral ósea lumbar y de fémur. Disminuye el riesgo de fractura vertebral sin mostrar eficacia sobre la fractura no vertebral. Los distintos tipos de BF se pueden clasificar, según su permanencia en el tejido óseo (que depende de la afinidad a la hidroxiapatita), en los de acción rápida y los de acción prolongada.

Alendronato: Ha demostrado prevenir la pérdida ósea e incrementar la densidad mineral ósea en la cadera y en la columna en 5 a 10%; la dosis utilizada es de 5 mg diarios o 35 mg en forma semanal en mujeres recientemente menopáusicas y de 10 a 70 mg en mujeres posmenopáusicas. La experiencia que se tiene de 10 años con el consumo continuo de alendronato a dosis de 5 mg/día demuestra que el incremento de la densidad mineral ósea que puede llegar a obtenerse es de 13.7% en la columna lumbar, de 10.3% en el trocánter y de 6.7% en la parte proximal del fémur.

Risedronato: Su consumo continuo ha demostrado un incremento en la densidad mineral ósea de la columna vertebral, con una dosis diaria de 5 mg/día o dosis semanal de 35 mg. El incremento reportado de la densidad mineral ósea es de 5.7% en la columna

lumbar y de 5.4% en la cadera; la terapia durante siete años reportó un incremento de la densidad mineral ósea de 11.5% y una reducción de riesgo de fractura vertebral de 41 a 49%.

Ibandronato: recientemente, se ha aprobado el de tipo oral de toma única mensual para el tratamiento de la osteoporosis menopáusica. Se trata de un nuevo bifosfonato que, como los anteriores, incrementa la DMO lumbar y femoral, y reduce los marcadores óseos de resorción y formación, de similar manera. En dosis de 2,5 mg diarios (ó 20 mg intermitente –día por medio hasta completar 12 dosis, con repetición del ciclo cada 3 meses–) redujo la incidencia de fracturas vertebrales en un 62%; un análisis *post-hoc* de pacientes que tenían un *T-score* en cuello femoral inferior a -3,0 mostró reducción del 69% en la incidencia de fracturas periféricas.

A.1.2.- Bifosfonatos intravenosos: En nuestro medio se aplican pamidronato, ibandronato y zoledronato en forma intravenosa, con el objetivo de tratar la osteoporosis primaria tanto de la mujer como del varón. Es una segunda opción ante la intolerancia digestiva de los BF orales, o ante su mala absorción. Tienen indicación precisa en fracturas vertebrales, pues por su efecto anti-edema mejoran rápidamente el dolor. Aunque no ha sido comprobado el efecto anti-fractura del *pamidronato* intravenoso, en trabajos controlados se ha observado que existe ganancia en la DMO y disminución de la remodelación ósea, homologándose a otros BF.

Efectos adversos:

Cuando se administran BF por vía oral, los efectos adversos más frecuentes son los gastrointestinales (esofagitis, gastritis, y úlceras

en el tracto digestivo superior). Se ha publicado también la presencia de exacerbación de hepatitis crónica y enfermedad de Crohn, entre otras. Se aconseja evitar permanecer en decúbito dorsal luego de la ingesta, y beber abundante cantidad de agua (200 mL) con la toma del comprimido.

Las formulaciones líquidas son de utilidad (alendronato líquido) en pacientes con intolerancia digestiva.

Con la administración intravenosa, se observó un síndrome de fase aguda, de tipo “gripal” en un 10% a 30% de los pacientes tratados. Se caracteriza por fiebre, mialgias y linfopenia.

La administración en forma rápida puede presentar complicaciones renales (caída del filtrado glomerular y tubulopatías). También se han observado uveítis, escleritis, epiescleritis y conjuntivitis en pacientes que recibieron pamidronato intravenoso. Las recientes comunicaciones de osteonecrosis de mandíbula han ocurrido, en su mayoría, en pacientes oncológicos que recibieron altas dosis de bifosfonatos potentes por vía intravenosa.

El mecanismo fisiopatológico se adscribe a la hipovascularización que promueven los BF en altas dosis, asociados a infecciones locales y/o problemas odontológicos.

Se han comunicado también “huesos congelados” en pacientes con períodos prolongados de BF (alendronato), fracturas de estrés, y fracturas de diáfisis femorales por huesos adinámicos en población predispuesta (uso crónico de corticoides, diabéticos, tratamiento prolongados con alendronato) determinado por cuánto tiempo y de qué manera es más conveniente suspender la medicación. Los BF son un arma útil, de “relativo” bajo costo, que preservan la masa ósea al reducir la resorción, evitando la destrucción de las trabéculas y de esa forma conservando la microarquitectura ósea. Incrementan también la

formación ósea en la unidad de remodelación previamente activada y su mineralización posterior.

A.2. Calcitonina

Es una hormona fisiológicamente sintetizada por las células C del tiroides que induce hipocalcemia en altas dosis, por inhibición directa de los osteoclastos. La administración puede realizarse por vía inyectable, nasal u oral. El incremento de la DMO lumbar es del 2% en 2 años según las series, sin cambios en el hueso cortical. Su efecto anti-fractura, evaluado en el estudio PROOF (Prevent Recurrence of Osteoporotic Fractures) (Chesnut, 2000), mostró una reducción de la incidencia de fracturas vertebrales del 36% a la dosis de 200 UI diarias por dos años. En un análisis posterior, se observó disminución del 50% de la incidencia de fracturas vertebrales en mujeres mayores de 75 años.

Es de destacar el efecto analgésico de la calcitonina, que es debido a la liberación de endorfinas, especialmente en la formulación nasal. Se recomienda su uso en pacientes con fracturas vertebrales agudas.

Con este tratamiento en estudios controlados, se ha constatado disminución de los días de inmovilización y de la toma de analgésicos. De acuerdo con el Consenso de la Sociedad Argentina de Osteoporosis (SAO) y la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM): ...se recomienda considerar a la calcitonina nasal como tratamiento de segunda línea en la osteoporosis post menopáusica.

A.3. Estrógenos

Tratamiento hormonal sustitutivo (ths):

En 1947, Albright señaló la importancia de la carencia de estrógenos en la osteoporosis involutiva de la mujer. Trabajos realizados en la década de los 90 como el de; Turner en 1994 o el de Riggs, en 1998; han evidenciado que los estrógenos disminuyen la prevalencia de fracturas vertebrales y de cadera, y de otras no vertebrales. Se verificó que las mujeres sustituidas conservaban la talla, a diferencia de las no tratadas.

Estudios poblacionales dan cuenta de que la estrógeno-terapia mantiene la masa ósea a través de los años y previene las fracturas de cadera.

El estudio WHI (Intervención en Salud de la Mujer) en el que se evaluaron aproximadamente 16.000 mujeres, mostró que la disminución del riesgo de padecer fracturas vertebrales y de cadera es de 34% aproximadamente.

Sin embargo, en esa misma investigación se observó un incremento de complicaciones no deseables, tales como trombosis de venas profundas, embolia de pulmón, accidentes cerebro vasculares, infarto de miocardio y cáncer de mama. Esto ha desalentado el uso de esta importante terapéutica en la prevención de fracturas óseas.

El Consenso de la Sociedad Argentina de Osteoporosis (SAO) y la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM) sugieren el uso de estrógeno-terapia como primera línea de tratamiento en las mujeres con síntomas climatéricos, atrofia genitourinaria, menopausia precoz, temprana espontánea, o quirúrgica, e intolerancia a los bifosfonatos.

A.4. Raloxifeno

El raloxifeno pertenece al grupo de fármacos denominados moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERM), actuando como agonista de los receptores estrogénicos en el esqueleto y como antagonista en la mama y en el útero. Otros SERM son: tamoxifeno, tomerifeno, droloxifeno, miproxifeno e idoxifeno. Es una droga especialmente diseñada para actuar sobre el receptor de estrógeno y modularlo en forma selectiva, evitando las complicaciones más temidas de los estrógenos: el cáncer de mama y de endometrio.

Si bien en el estudio controlado MOORE (Múltiples Variables de la Evaluación de Raloxifeno), el raloxifeno ha mostrado eficacia en la prevención de fracturas vertebrales (reduce el riesgo en un 30% en pacientes con fracturas vertebrales previas y en un 55% en pacientes sin éstas), no ha evidenciado eficacia en la prevención de fracturas no vertebrales.

El incremento de la DMO de poca magnitud, no se correlaciona con el efecto anti-fractura. Se comprobó inhibición de los marcadores de resorción.

Los efectos adversos más frecuentes son: sofocos, calambres, edemas e incremento del riesgo de trombosis venosa profunda (0.7% en las mujeres tratadas durante 3 años).

El riesgo de trombosis es similar a las mujeres tratadas con TSH y tamoxifeno. Se debe suspender en situaciones de encamamiento prolongado.

A.5. Calcio y vitamina D

El buen aporte de calcio y vitamina D es de importancia en la salud ósea. La deficiencia de estos elementos favorece la resorción mediada

por el hiperparatiroidismo secundario que desencadena. El aporte dietario de calcio mayor a 1.000 mg/día inhibe esta actividad en adultos mayores en un 10% a 20%. Es dosis dependiente e incrementa la DMO

Con la edad, la absorción intestinal de calcio disminuye y se adscribe a la pérdida de receptores de vitamina D o a la resistencia de acción de éstos al calcitriol. La hipovitaminosis D en ancianos constituye un problema mundial de salud pública. Se ha asociado a la pérdida ósea y las fracturas. La consecuencia de la deficiencia de vitamina D genera mala absorción de calcio, insuficiente formación de calcitriol, favoreciendo el hiperparatiroidismo secundario y el alto remodelado óseo. La carencia de calcio y vitamina D favorece las fracturas. La hipovitaminosis D también contribuye a la debilidad muscular y en consecuencia a las caídas.

B) Fármacos anabólicos u osteoformadores

Son drogas terapéuticas de reciente aprobación internacional y nacional que actúan en la progenie osteoblástica y en los osteoblastos maduros, promoviendo la formación de hueso “nuevo” y logrando resistencia ósea con la ganancia de masa ósea. Se consideran como tales a: Teriparatida, PTH (1-34), PTH 1-84, Ranelato de estroncio.

B.1. Teriparatide y pth 1-84

La hormona paratiroidea (PTH) es un polipéptido de 84 aminoácidos secretado por las glándulas paratiroides en respuesta a los cambios en la concentración de calcio sérico.

La exposición crónica a altas cantidades de PTH sérica (como sucede en el hiperparatiroidismo primario o secundario) conlleva a un

proceso de resorción ósea, lo cual haría pensar que la PTH exógena no es una buena opción para el tratamiento de la OP. Sin embargo, la administración intermitente de la PTH (molécula completa 1-84 o su fragmento 1-34), ha mostrado estimular la formación ósea dado un incremento en el número y actividad de los osteoblastos, llevando a un aumento de la masa ósea y una mejoría en la arquitectura del hueso trabecular y cortical.

B.2. Ranelato de estroncio

El ranelato de estroncio (RE) es una molécula compuesta de una fracción orgánica (ácido ranélico) y dos átomos de estroncio, con un mecanismo de acción dual: inhibe la actividad osteoclástica disminuyendo la resorción ósea (como los BF) y estimula la actividad osteoclástica, incrementando, por tanto, la formación de hueso (como el teriparatide). Es usado en algunos países de Europa para el tratamiento de la OP postmenopáusica, reduciendo el riesgo de fracturas vertebrales y de cadera. Los alimentos, los lácteos y los suplementos de calcio disminuyen su absorción, por lo que deberá administrarse al menos dos horas después de la cena. Los efectos adversos más comunes son náuseas y diarrea, usualmente leves.

MODELOS EXPERIMENTALES

Estudio con flavonoides

La acción de los fármacos actualmente disponibles contra la osteoporosis debe atender al perfil peculiar que dibuja la etapa menopáusica en la vida de la mujer. Entre las diversas opciones disponibles, no cabe duda de que el acercamiento hormonal, representado tradicionalmente por los estrógenos, ha supuesto un referente durante muchos años. Posteriormente, el uso de flavonoides ha complementado la opción estrogénica, aportando una serie de matices particulares. Se trata de sustancias procedentes de plantas que, por su estructura similar a los estrógenos, pueden unirse a su receptor y activarlo. Hay tres grandes familias; las isoflavonas, los cumestanos y los lignanos, si bien la información disponible se centra particularmente en el grupo de las isoflavonas.

La afinidad por el receptor es muy inferior, y el reciente descubrimiento de dos tipos de receptor estrogénico, el alfa y el beta, ha permitido encontrar que hay una afinidad preferencial por la forma beta. Evidentemente, esto ha abierto un campo nuevo de enormes esperanzas, donde se trata de investigar qué puede traducirse de esta acción más selectiva hacia este subtipo de receptor cuyo papel diferencial está aún caracterizado parcialmente. Datos preliminares ponen de manifiesto que esta acción se traduce en escasa capacidad proliferativa sobre el endometrio o la mama, de donde se concluye que pueda derivarse una acción menos dudosa en cuanto a potencial oncogénico. Sin embargo, la bibliografía sobre estudios clínicos y

experimentales comienza ya a ser insistente, evidenciando un efecto protector de los fitoestrógenos. Así, un estudio italiano de 24 meses de evolución ha demostrado que la ipriflavona mantiene masa ósea frente a la pérdida observada en el grupo control no tratado.

Sin duda, estamos sólo en los inicios, pero todo parece indicar que la participación en la vía de los estrógenos confiere a estas sustancias también un efecto protector (Gennari, 1998).

En el organismo se producen constantemente reacciones metabólicas de oxidación y reducción que originan una variedad de subproductos químicos altamente reactivos, entre los que se incluyen los famosos radicales libres. Estos radicales actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que, a concentraciones elevadas, pueden actuar como potentes oxidantes tóxicos para las células. Para prevenir y proteger a los componentes celulares del daño inducido por los radicales libres, los organismos que consumen oxígeno han desarrollado un elaborado mecanismo de defensa, el llamado sistema de defensa antioxidante.

El concepto de antioxidantes se remonta a la antigüedad, de hecho ya eran utilizados por los antiguos egipcios que conservaban los cadáveres, en parte, mediante el uso de plantas ricas en polifenoles.

En los últimos años se está dando una importancia creciente al uso de productos naturales con capacidad antioxidante por sus probados efectos beneficiosos para la salud. Dentro de la variedad de sustancias con propiedades antioxidantes destacan los flavonoides.

Por otro lado, la existencia de datos significativos, como los reportados por (Chiechi, 2002) en favor de la terapia con flavonoides como agentes de estímulo osteoblástico en la masa ósea, determinan su consideración como una herramienta terapéutica más para el

abordaje de la complicación más temida de la menopausia, la afectación ósea. Del mismo modo, la consecución de mejoras en el incremento de la densidad mineral ósea, en grado similar a la proporcionada por otras alternativas terapéuticas, determina el interés por seguir analizando y profundizando en sus efectos y mecanismos de actuación a éste nivel. Se ha demostrado que la genisteína y la daidzeína inhiben la formación de radicales libres, peróxido de hidrógeno y aniones superóxido.

En consecuencia, estos compuestos tienen la capacidad de proteger de la oxidación al colesterol LDL por lo que ejercen un efecto preventivo ante la aterosclerosis. La práctica inexistencia de efectos secundarios, tales como sangrados o trombos tan característicos de otras terapias, determina que el tratamiento con fitoestrógenos (isoflavonas) sea una herramienta beneficiosa para pacientes con síntomas postmenopáusicos. Por este motivo, estos compuestos son los que más se utilizan como alternativa a la terapia hormonal sustitutiva (THS), para tratar los síntomas de la menopausia y prevenir sus consecuencias.

El empleo de fitoestrógenos en los últimos años ha desarrollado un creciente interés en los estudios relacionados con las enfermedades típicas del envejecimiento. Algunos autores, (Krizt-Silverstein, 2002) no dudan en clasificarlas como bloqueadoras o moduladoras naturales selectivas del receptor estrogénico, (*SERMs selective estrogen receptor modulators*) por estas razones, las isoflavonas realizan su acción sobre hueso, cerebro, sistema cardiovascular y ovario, lo que explica su utilidad para: 1.- mejorar los síntomas vasomotores; 2.- prevenir la osteoporosis; 3.- aparentemente, reducir el riesgo de cáncer

de mama; 4.- inducir patrón lipídico antiaterogénico (disminución del colesterol total, LDL y triglicéridos y ligero aumento del HDL.

Aunque la tradición y experiencia de las culturas orientales avala su seguridad y tolerabilidad, el aumento de su consumo como tratamiento alternativo a la terapia hormonal sustitutiva (THS) en los últimos años hace necesarios más estudios que confirmen sus propiedades y garanticen su eficacia y seguridad a largo plazo.

Polifenoles en la naturaleza

A lo largo de la evolución las plantas vasculares han adquirido la capacidad de sintetizar una serie de sustancias químicas derivadas de su metabolismo secundario que les confieren ventajas adaptativas frente a sus depredadores, parásitos u otras agresiones del entorno. En dichas sustancias, destaca su función como pigmentos atrayentes de animales para la dispersión de polen y semillas (Havsteen, 2002), capacidad por el enzima polifenol oxidasa en zonas dañadas evitando la entrada de patógenos y parásitos (Stevenson, 2007; Adams, 2007).

Además, otorgan a la planta cierto nivel de protección frente a sus depredadores bien por su sabor amargo bien por la capacidad de algunos polifenoles de insolubilizar y precipitar proteínas en el sistema digestivo de mamíferos dificultando la digestión. También juegan un papel fundamental para su supervivencia en el metabolismo del nitrógeno de leguminosas para el cual la planta debe establecer una estrecha simbiosis con determinadas especies bacterianas presentes en el suelo. En esta relación, los flavonoides sintetizados en la planta se liberan al suelo por las raíces donde actúan como atrayentes específicos de las bacterias simbióticas (Srivastava, 1999) actuando

mediante mecanismos distintos de la quimiotaxis estimulada por nutrientes (Pandya, 1999).

Así mismo, actúan como quelantes de metales pesados y como antioxidantes protegiendo a estructuras subcelulares de los radicales libres generados durante la fotosíntesis (Gould, 2006).

Por otra parte, se conoce su relevante papel como inhibidores e inductores de enzimas y genes tanto vegetales como animales. En este sentido la industria agroalimentaria ha enfocado su atención en estas propiedades cuyo conocimiento en profundidad permitiría importantes aplicaciones en los sectores alimentario, médico y económico (Moyano, 1996).

Actualmente se conocen unos 8000 flavonoides vegetales y todos comparten la estructura básica benzo-y-pirona a la cual se adiciona uno o más grupos hidroxilo, cetona y/o metilo fundamentalmente, lo que permite por sí solo, adquirir un gran número de configuraciones estructurales. Sin embargo, es la glicosilación de la estructura, el factor que multiplica la variabilidad estructural de esta familia.

Se trata pues, de un grupo muy heterogéneo tanto en relación con su estructura molecular como por sus características químicas, así como por sus funciones en las plantas que los sintetizan; que oscilan desde pequeñas moléculas solubles e inestables hasta macromoléculas de elevado peso molecular e insolubles.

Fundamentalmente confluyen dos rutas biosintéticas para generar la estructura C6-C3-C6 característica de los flavonoides. Por un lado, a partir del ácido shikímico se genera un fenilpropanoide que constituirá el anillo B y el puente tricarbóxico. Por otro lado el anillo A se constituye tras una serie de condensaciones de acetyl-CoA. A partir de estos dos puntos de partida se producen todas las subfamilias de

flavonoides: flavanoles, flavan-3-oles, catequinas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, antocianidinas y procianidinas

Esta gran variabilidad estructural ha permitido explotar por parte de las plantas funciones fisiológicas evolutivamente ventajosas.

Flavonoides y alimentación

Las principales fuentes de flavonoides en la dieta son con diferencia vegetales y frutas, y en particular; uvas, cítricos, manzanas, legumbres, cacao manufacturado como chocolate negro y bebidas como el café, té verde, té negro y el vino (Crozier, 2009).

La dieta varía en función de muchos factores, principalmente socio-económicos, de cualquier sociedad actual. Así como en países orientales, como China o Japón, las infusiones de té en muchas de sus variedades, representan el principal aporte de flavonoides en ingesta diaria (Aherne, 2002), en países denominados anglosajones como EEUU o Australia, son los cítricos y el té verde (Johannot, 2006).

Algunos proponen que el consumo conjunto de flavonoides en países occidentales es de entre 100-150 mg/día (Manach, 2004). Pero en estudios detallados de consumo por países se ponen de manifiesto diferencias significativas. Desde las cantidades más bajas de Japón y Finlandia de 24 mg (Knekt, 2002) y 63 mg (Arai, 2000) al día respectivamente, hasta unos 190 mg/día (Chun, 2007) en USA; en Australia el consumo medio alcanza a 454 mg/día (Johannot, 2006). Otra fuente de variaciones en cuanto a resultados es la diferente metodología de los trabajos pues los resultados varían en función del número de flavonoides estudiados.

Sin embargo otros autores ponen en duda la fiabilidad de estos estudios pues la mayoría no tienen en cuenta las alteraciones que sufren a lo largo del sistema digestivo, su absorción, su detoxificación además del procesado previo tanto el que se lleva a cabo a nivel industrial como el casero en la preparación de los alimentos (Clifford, 2004).

La ingesta de determinados tipos de flavonoides la determina en última instancia el clima y la herencia cultural de las sociedades que se estudie. El ejemplo más llamativo se encuentra en el consumo de isoflavonas de la soja en países asiáticos donde se alcanzan 40 mg/día en contraposición a unos pocos miligramos en Europa.

Efectos de los flavonoides sobre la salud

La medicina tradicional de muchas culturas coincide en mayor medida en la aplicación de especies vegetales como medio de prevención y curación de un amplio abanico de dolencias, trastornos o desequilibrios de la salud.

Con el paso del tiempo los conocimientos colectivos de civilizaciones diversas han incluido en sus terapias un escogido grupo de sustancias, mayoritariamente extraídas del reino vegetal, con papel terapéutico requerido ante cada tipo de trastorno de la salud. Sin embargo, sólo desde hace unas décadas, la medicina, bioquímica y biología molecular está desvelando los principios activos que contienen toda esa farmacopea de conocimientos tradicionales acumulados.

En la bibliografía abundan cada vez más, los estudios que relacionan el consumo de flavonoides en la dieta con la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas. De algunos se conoce su capacidad antioxidante, anti-inflamatoria, antialérgica, antiviral,

antiproliferativa y anticancerígena, junto con su papel en la regulación del metabolismo en animales y seres humanos (Ren, 2003).

Una de las capacidades que primero recibió la atención de estudios científicos fue el gran potencial antioxidante de que disponen algunos flavonoides. En condiciones normales el organismo mantiene un delicado equilibrio entre producción y eliminación de radicales libres, moléculas muy inestables por su configuración electrónica y por tanto con una elevada capacidad oxidante (que pueden derivar del oxígeno (ROS; peróxido de hidrógeno, hidroxilo, anión superóxido) o de moléculas nitrogenadas (RNS; NO, NO₂). Una fuente importante de ROS procede de la cadena de transporte de electrones de la membrana interna mitocondrial que acoplada a un sistema de transporte de protones (H⁺) genera el ATP necesario para el mantenimiento de la mayoría de las reacciones metabólicas.

La cadena de transporte de electrones dispone de un receptor final, un átomo de oxígeno que se va reduciendo progresivamente hasta generar una molécula de agua. Sin embargo, en un pequeño porcentaje se libera accidentalmente una molécula intermedia con electrones desapareados: el anión superóxido (O₂⁻) un radical libre altamente reactivo por su gran inestabilidad electrónica y que actúa como un oxidante muy agresivo de sustancias orgánicas e inorgánicas.

Otra fuente significativa de radicales libres es el sistema inmunitario en su respuesta primaria y los mecanismos de inflamación aguda en los que están vinculados los macrófagos y neutrófilos que los emplean de forma controlada siendo una de las primeras líneas de defensa frente a bacterias, virus u otros cuerpos foráneos.

También el NO procedente de diversas respuestas celulares y las radiaciones ionizantes son una fuente de radicales libres muy agresivos contra los ácidos grasos de las membranas celulares.

En condiciones normales el organismo dispone de mecanismos efectivos que inactivan los radicales libres inmediatamente tras su formación.

Dichos mecanismos consisten en antioxidantes propios (ubiquinol, tocoferol, ácido ascórbico, glutatión, ácido úrico) y enzimas y sistemas enzimáticos (peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa) que inactivan los radicales libres generados por el metabolismo normal o respuestas inflamatorias controladas mediante una serie de reacciones red-ox.

En un principio se le atribuyó a los flavonoides, entre otras moléculas orgánicas presentes en la dieta, un papel directo antioxidante desde el plasma sanguíneo (Gay, 1987), confiriéndoseles un mecanismo de acción *in vivo* similar al que tiene lugar *in vitro*, ya que eran evidentes los efectos protectores frente a radicales libres y se consideraron varias posibles rutas antioxidantes.

Una de ellas era la captura de radicales libres impidiendo la reacción en cadena oxidativa que desencadenan. Para ello es fundamental la estructura molecular y los grupos funcionales (Heijnen, 2002) y depende de la presencia de un doble enlace entre C-2 y C-3 y de dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B y otros dos en C-3 y C-5 (Benavente-García, 2008).

Sin embargo en los últimos años la evidencia del papel fundamental de la estructura molecular de los flavonoides junto con detalladas investigaciones sobre biodisponibilidad, absorción y metabolismo de estas moléculas aportadas en la alimentación modificó la estrategia de abordar los distintos modos de acción en el organismo. De este modo los estudios del papel beneficioso para la salud de los flavonoides no se limitan a la capacidad antioxidante directa sobre radicales libres, sino que además buscan otros mecanismos de acción

indirecta muy importantes sobre los sistemas antioxidantes propios del organismo regulando la actividad y la expresión de enzimas endógenas encargadas de la reducción de ROS a moléculas menos reactivas (Myhrstad, 2006).

Cultivos celulares en investigación.

Los estudios *in vitro* con cultivos de células animales permiten obtener datos preliminares del efecto biológico de cualquier molécula, sustancia o medicamento sobre células eucariotas en un sistema de variables ambientales muy controladas.

De este modo mediante tests de proliferación y citotoxicidad bien contrastados pueden determinarse, como es uno de los objetivos de este trabajo, valores de crecimiento y viabilidad celular de cultivos en contacto con la sustancia a ensayar respecto de cultivos control sin tratamiento.

Cuantitativamente, uno de los datos farmacéuticos más relevantes que suele extraerse de estos tests biológicos es el valor de IC 50, que permite conocer la concentración a la cual una sustancia provoca una inhibición de funciones sobre un sistema biológico *in vitro*, de modo que puede determinarse de manera precisa la concentración de sustancia que provoca una inhibición de la proliferación celular de un 50 % respecto del control.

En particular, la línea celular Vero (European Collection of Cell Cultures) células adherentes establecida a partir de células del epitelio de túbulos renales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), se utiliza en investigación fundamentalmente para realizar bioensayos de nuevos fármacos en los que se pretende comprobar en primera instancia su citotoxicidad o el efecto sobre la proliferación de

células animales sanas. Esta línea, presenta características genotípicas adecuadas, puesto que está relativamente libre de variabilidad con el tiempo frente a otras líneas de células sanas; no posee genes tumorales naturales ni inducidos, ausencia de agentes externos o contaminantes, su cariotipo es aneuploide estable por lo que no forma tumores dentro de un rango amplio de subcultivos y su rápido crecimiento y adaptabilidad rentabilizan los ensayos, además de presentar una alta sensibilidad.

Por todo ello fue la línea celular de elección para nuestro estudio junto al hecho de que la bibliografía es relativamente escasa en el sentido de que se relacionen sustancias extraídas de materias primas vegetales con determinadas estructuras moleculares.

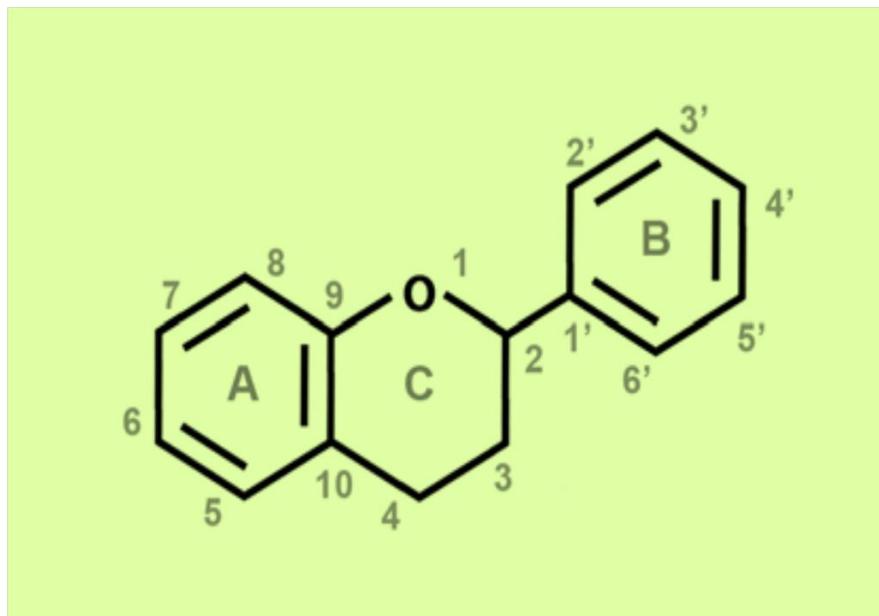


Fig. 4: Estructura general de los flavonoides

Estudio con animales de experimentación

Seleccionar un modelo experimental adecuado para la investigación implica tener en cuenta diversas consideraciones (Davidson, 1987):

a) *Analogía* entre el modelo a utilizar y el sistema a investigar, de lo cual, se desprende la medida en que los resultados que se obtengan serán extrapolables a dicho sistema y puedan ser generalizados a sistemas afines.

b) *Homogenidad* genética del organismo animal, para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

c) *Características biológicas* del modelo experimental, con vistas a establecer las condiciones que garanticen la validez del diseño experimental, la racionalidad de su selección, así como la factibilidad de la realización del estudio respecto al objetivo de la investigación.

d) *Aspectos de disponibilidad*, costo y facilidad de manipulación experimental, como aspectos prácticos que garanticen que se seleccione el modelo que mejor permita lograr el objetivo, pero que a la vez, resulte el de manipulación más sencilla y el más económico.

e) *Aspectos ecológicos*, derivados del uso de especies animales en la investigación y el impacto que ello representa sobre el medio ambiente, incluido el equilibrio ecológico.

f) *Aspectos éticos* relacionados con el uso de animales, que impliquen el uso de la mínima cantidad posible, siempre que con ello se logre el objetivo planteado con el nivel adecuado de certidumbre estadística y biológica. Además, garantizar el mínimo de sufrimiento de los animales en estas experiencias.

g) *Que el modelo seleccionado* no introduzca variables que interfieran con las que serán evaluadas. Idealmente, el modelo escogido debe reproducir los aspectos de génesis, progresión y patología de la enfermedad en el humano.

Obviamente, ningún modelo animal puede satisfacer todos los criterios a tener en cuenta a la hora de ser escogido, pero deben analizarse todas las posibilidades y escoger la mejor.

Los modelos apropiados para la evaluación de los efectos de un fármaco o suplemento nutricional sobre la osteoporosis son capaces de brindar información que no se puede obtener en los ensayos clínicos, tales como datos sobre posibles cambios en la calidad y estructura del hueso obtenidos a partir del análisis de la masa ósea, la arquitectura y la fortaleza del hueso. Por ello, los modelos animales de osteoporosis son primordiales para predecir la eficacia y la seguridad del tratamiento y evaluar su influencia sobre la calidad del hueso. El uso apropiado de modelos animales y la interpretación de los resultados son puntos críticos del desarrollo exitoso de una nueva terapia en este campo.

El manejo de la osteoporosis incluye dos alternativas terapéuticas fundamentales: la prevención y el tratamiento de la enfermedad. Cada alternativa requiere validaciones diferentes en los modelos experimentales.

Así, cuando se evalúa el potencial de un tratamiento en la prevención de la osteoporosis resulta esencial probar la capacidad del agente para prevenir la activación de la remodelación ósea que conduce a la pérdida ósea.

En cambio, cuando se evalúa el potencial de un tratamiento para reparar el daño causado por la enfermedad es necesario probar su capacidad para reparar y reconstruir las estructuras óseas en un esqueleto osteopénico.

Debido a que una sola especie animal no es capaz de reproducir todas las características de la osteoporosis humana, la Agencia Reguladora de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) recomienda llevar a cabo la evaluación de los efectos potenciales de una sustancia en el tratamiento de la enfermedad en dos especies animales, utilizando modelos que tratan de reproducir las características fundamentales de la osteoporosis primaria, uno de estos es la ovariectomía en ratas. Como segundo modelo se recomienda utilizar una especie no roedora. No obstante, existen otros que también pueden resultar muy útiles, especialmente los que reproducen la osteoporosis inducida por diversos agentes, los cuales modelan algunas variantes de osteoporosis secundaria (Thompson, 1995).

El modelo animal, el diseño del estudio y los criterios terminales de eficacia usados son diferentes de acuerdo con los requerimientos terapéuticos (Davidson, 1987). La FDA exige que el diseño de los estudios en animales deba estar en correspondencia con la indicación clínica posterior.

Para una indicación preventiva deben existir datos previos de estudios preventivos en animales, y para una indicación terapéutica

deben existir estudios preclínicos del efecto del agente en el tratamiento de la enfermedad.

La diferencia entre estos dos diseños está dada por el momento de iniciar el tratamiento.

En el primero, debe comenzarse inmediatamente después de practicada la ovariectomía, mientras que en el otro, debe demostrarse que existe una pérdida significativa de hueso trabecular antes de iniciar el tratamiento.

Sin embargo, la evaluación preclínica de una de estas dos indicaciones es usualmente suficiente para aprobar el inicio de estudios clínicos para la otra indicación. La duración del tratamiento está determinada por el número de ciclos completos de resorción y formación por año de la especie animal utilizada.

El tratamiento debe prolongarse hasta garantizar que el número de ciclos que ocurren en el animal sea equivalente al que se produciría en 4 años en las personas. Si en los humanos es aproximadamente 2 a 4 por año, en la especie animal deben producirse alrededor de 12 ciclos antes de concluir el tratamiento. La forma de tratamiento (continuo o intermitente) debe corresponderse con el empleo posterior que se hará del agente en humanos.

Se recomienda utilizar dos niveles de dosis, una efectiva máxima en la especie utilizada y otra, cinco veces mayor. La dosis efectiva máxima puede ser determinada en un estudio dosis respuesta utilizando como criterios de eficacia los indicadores y(o) variables para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. La evaluación de esta dosis aportará información relevante sobre la relación entre estos indicadores y la fortaleza del hueso, mientras que la dosis cinco veces mayor permitirá evaluar el margen de seguridad.

La especie animal deberá seleccionarse de acuerdo con el proceso predominante, de modo tal que hay especies con predominio de la modelación o remodelación ósea.

Estas especies pueden ser a su vez clasificadas por la forma en que se induce la enfermedad en el modelo animal escogido como de resorción ósea acelerada o de formación ósea disminuida.

Actualmente, no existe un modelo que reproduzca totalmente la patofisiología de la enfermedad. Aunque existen diversos factores de riesgo, la deficiencia de estrógenos es uno de los más importantes, sobre todo, al reproducir la osteoporosis inducida por la menopausia.

Por ello, los animales ovariectomizados (ovx) son los modelos preferidos en la evaluación preclínica de sustancias que ofrezcan un interés prometedor para el manejo de esta enfermedad.

Al estudiar los distintos modelos de animales de experimentación con osteoporosis, es imprescindible tener en cuenta una serie de requisitos que debe cumplir un modelo animal:

a) *Crecimiento y madurez esquelética definidos*: Está claro que toda especie animal tiene un período de crecimiento, pero no todas alcanzan una verdadera “madurez esquelética”, entendida ésta como el cierre de la placa fisaria. La importancia de estas dos fases radica en que los procesos de modelado y remodelado óseo son radicalmente diferentes, predominando el modelado durante la fase de crecimiento y el remodelado en la madurez.

La mayoría de razas de ratas y ratones, por ejemplo, no alcanza plena madurez, o lo hacen sólo parcial y tardíamente. Un modelo ideal de OP debería contener ambos periodos (crecimiento y madurez).

b) *Periodicidad estral*: La especie humana es la única con menarquía y ciclos ovulatorios frecuentes y regulares que experimenta

una disminución clara de la masa ósea tras el cese espontáneo de la función ovárica.

c) *Menopausia natural*: La mayoría de modelos de depleción estrogénica son por ovariectomía (OVX) médica o quirúrgica. Sólo los primates presentan un proceso biológico similar al climaterio y menopausia humana.

d) *Desarrollo de fracturas*: A pesar de disponer de buenos modelos animales de OP postmenopáusica, son escasos los que presentan fracturas espontáneas. El único modelo actual con disminución del pico de masa ósea y fracturas por fragilidad es el modelo murino SAM/P6.

e) *Remodelado óseo*: un modelo animal adecuado debería presentar remodelado cortical o Haversiano bien desarrollado. Así, la rata ovariectomizada es un buen modelo para el estudio del hueso trabecular, pero carece de remodelado cortical, por lo que se recomienda el empleo de una segunda especie con remodelado cortical demostrado en los estudios preclínicos para la evaluación de nuevos fármacos.

Modelos animales

En este apartado describiremos las ventajas y limitaciones de los modelos más utilizados para el estudio de la OP humana, (Rodgers, 1993).

- *Ratas*: La rata madura OVX constituye el “patrón oro” para el estudio de la OP postmenopáusica. Ha sido el modelo más

ampliamente estudiado en cuanto a marcadores bioquímicos, histomorfometría, metodología densitométrica y evaluación biomecánica. Asimismo, presenta una excelente respuesta al tratamiento estrogénico sustitutorio. Resulta útil para estudiar los factores nutricionales, endocrinos y ambientales que influyen en la adquisición del pico de masa ósea. El principal inconveniente de las ratas radica en que prácticamente carecen de remodelado haversiano endocortical, y no llegan a alcanzar una verdadera madurez esquelética (Thompson, 1995). Tampoco constituye un modelo adecuado para ensayos longitudinales que requieran temas sanguíneos o biopsias repetidas o evaluación de implantes sobre hueso osteopénico.

- *Ratones*: Constituye el principal animal de laboratorio para el estudio de la contribución genética en la adquisición del pico de masa ósea y en la pérdida ósea relacionada con la edad. Representa la especie ideal para los estudios de manipulación genética. La OVX en el ratón produce también osteopenia trabecular e incremento del turnover óseo. El ratón es un modelo prometedor para el estudio de la OP relacionada con la edad. De hecho, existen razas de senescencia acelerada (SAM/P6), que es de las pocas que presentan fracturas espontáneas por fragilidad.

- *Perros*: Presenta un remodelado endocortical que le hace adecuado para estudiar dicho compartimento. A diferencia de otras especies, los perros son di-estros, por lo que sólo tienen dos ovulaciones al año, generalmente en primavera y otoño, por lo que no resulta adecuado para estudiar la OP postmenopáusica dada la resistencia del esqueleto canino a los cambios producidos por la privación estrogénica. Sin embargo, es extremadamente útil para

evaluar problemas relacionados con la consolidación de fracturas, efectos de la inmovilización o el efecto a largo plazo de determinados agentes osteoactivos: aloinjertos, osteointegración y problemas derivados del remplazo articular. Han sido usados como segunda especie en los estudios de seguridad a largo término de agentes que actúan sobre la calidad del hueso, Sin embargo, algunos estudios han mostrado pérdidas insignificantes de masa ósea al cesar las funciones ováricas en las perras (Boyce, 1990).

- *Gatos*: Se han realizado estudios de los efectos de medicamentos que actúan sobre la formación ósea, como los fluoruros, utilizando gatos (Chavassieux, 1990). La osteopenia puede ser inducida en esta especie por inmovilización, una dieta baja de calcio o elevada en fósforo. Se presenta la enfermedad en los huesos en gatos jóvenes alimentados con una dieta de carne sin suplementos de calcio. Estos hallazgos, así como su fácil alojamiento y mantenimiento sugieren que el gato puede ser útil para el estudio de la osteoporosis.

- *Cerdos*: los estudios de OP tras OVX son escasos y generalmente en animales inmaduros. Sin embargo, el ciclo reproductor del cerdo es continuo y similar a la especie humana en duración (18-21 días). Su esqueleto presenta un remodelado multicelular similar al humano. Posee un pico de masa ósea bien definido a los 2,5-3 años. En algunas razas se han detectado fracturas vertebrales espontáneas; sin embargo, su tamaño, costes y agresividad, son serios inconvenientes que limitan su uso. Estos problemas se han intentado reducir con la introducción del cerdo enano ("*minipig*"), pero los costes son aún más elevados.

- *Ovejas*: Se trata de un animal dócil, de fácil manejo, naturaleza pasiva y un coste no demasiado elevado. Ha sido referida la pérdida ósea por deficiencia de estrógenos en ovejas, (Pastoureau, 1989) y su perfil hormonal es temporal y cuantitativamente similar al de la mujer. Se ha utilizado también como modelo de OP inducida por GC. Es ideal para seguimientos longitudinales (biopsias, etc.) e implantación de prótesis articulares. No obstante, presenta algunas desventajas: alimentación herbívora con marcadas diferencias al humano, diferente homeostasis mineral especialmente en el metabolismo del fósforo, ovulaciones y variaciones hormonales cíclicas pero estacionales, e importantes dificultades técnicas en el posicionamiento del animal para realizar las densitometrías.

- *Primates no humanos*: tienen un aparato digestivo, sistema endocrino y metabolismo óseo parecidos a la especie humana, lo que les convierte en un modelo ideal para estudiar la OP humana. La respuesta a la supresión de las hormonas ováricas se asemeja a lo que ocurre en las mujeres (Hodgen, 1977). Las especies más utilizadas son los papiones o babuinos y algunos macacos. Los primates desarrollan un descenso de su masa ósea tras el cese de la función ovárica. Además, son los únicos que presentan una menopausia natural similar a los humanos, con pérdida espontánea de la masa ósea; aunque estos cambios suelen ser más tardíos, generalmente alrededor de los 30 años. No obstante, y a pesar de estas ventajas indiscutibles, su utilización está muy restringida por su elevado coste, larga vida media, agresividad, dificultades de manejo y los problemas éticos y legislativos que conllevan. No hay que olvidar que además pueden transmitir enfermedades infecciosas (zoonosis) y ser reservorio de agentes peligrosos, como retrovirus (SIDA, virus de ébola, etc.).

- *Conejos*: son animales idóneos por su tamaño, disponibilidad, temperamento, bajo coste y por disponer de razas genéticamente homogéneas. Por estos motivos, los conejos son utilizados en numerosos estudios que evalúan la osteointegración de implantes dentales. La localización elegida con mayor frecuencia para la inserción del implante es la tibia del animal. Desde el punto de vista óseo, alcanza verdadera madurez esquelética a los 8-10 meses de edad, siendo la especie más pequeña de las habitualmente utilizadas con verdadero remodelado óseo animal. El conejo ofrece la ventaja de presentar un remodelado óseo rápido en comparación con otras especies animales. La OP puede ser inducida en el conejo por combinación de ovariectomía y tratamiento con glucocorticoides (GC) de manera predecible. La pérdida de hueso trabecular y cortical es significativa y se obtiene en cortos periodos de tiempo (Castañeda, 2006).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Estudiar en un modelo “in vitro”, el efecto de los flavonoides: apigenina potásica (AK) y naringenina potásica (NK) sobre la viabilidad celular de la línea Vero y la posible relación estructura-actividad.
2. Desarrollar un modelo experimental de inducción de osteoporosis en conejas albinas Nueva Zelanda, mediante deprivación estrogénica por ovariectomía.
3. Determinar los efectos de estos flavonoides sobre la regeneración ósea a través de los estudios: bioquímico, de micro CT, morfológico (óptico y MEB) e ionómico.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

1. ESTUDIO “IN VITRO”

a) Línea celular.

Para todos los ensayos hemos utilizado la línea celular Vero (European Collection of Cell Cultures), células adherentes establecida a partir de células del epitelio de túbulos renales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Fue establecida el 27 de marzo de 1962 por Yasumura y Kawakita en la Universidad de Chiba, Japón. Se trata de una línea celular continua muy estable, libre de agentes contaminantes o infecciosos y de marcada aneuploidía. Desde su establecimiento como línea continua se ha extendido su utilización en laboratorios de todo el mundo debido fundamentalmente a su alta sensibilidad y a que durante décadas ha constituido el sustrato para la obtención de la vacuna de la poliomeilitis.

b) Medio de cultivo y reactivos.

El medio nutritivo para el mantenimiento del cultivo fue Medio Mínimo Esencial de Dulbecco, o DMEM (Gibco, USA) con rojo fenol como indicador de pH. Suplementamos el medio de cultivo con 10% de suero bovino fetal (Gibco, USA), glutamina 4 mM (Gibco, SA) y los antibióticos penicilina (100µg/mL) y estreptomina (100u/mL)(Gibco, USA). Bromuro de 3-(4-4 dimetiltriazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio (Sigma-Aldrich, USA) o MTT. Dimetil sulfóxido (Sigma-Aldrich, USA).

c) **Compuestos polifenólicos.**

Nuestros criterios para seleccionar los extractos a investigar consistieron en considerar productos o moléculas que fueran foco de atención actual de investigaciones y mercados gracias a referencias bibliográficas y compendios de artículos científicos con resultados concluyentes tanto clínicos como *in vivo* en animales de experimentación.

Los flavonoides (en forma de sal potásica) obtenidos a partir de frutos inmaduros de pomelo: Apigenina potásica (AK) y Naringenina potásica (NK), fueron aportados gratuitamente por el laboratorio Nutrafur S.A. (Murcia, España).

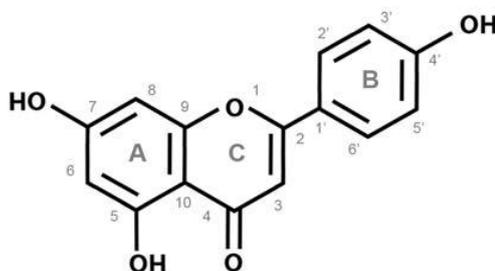


Fig. 5: Estructura química de la apigenina en su forma no salina

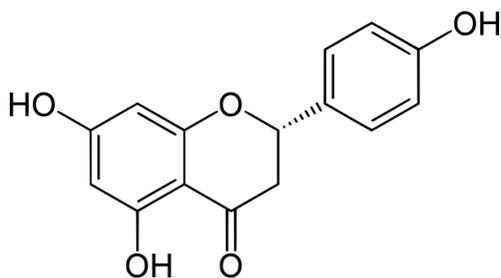


Fig. 6: Estructura química de la naringenina en su forma no salina

La Apigenina (4', 5, 7 trihidroxiflavona), es una flavona obtenida de la flavanona-glicosilada de origen natural naringina. Para los ensayos, hemos utilizado un derivado hidrosoluble, la apigenina potásica (C₁₅H₉O₅K). *

La Naringenina (5, 7, 4 trihidroxiflavanona) es un flavonoide presente en los cítricos, pero especialmente en el pomelo Nutrafur obtiene la naringenina a partir de la naringina mediante tecnología propia y con una elevada pureza.

APIGENINA POTÁSICA	NARINGENINA POTÁSICA
Apariencia: Presentación en polvo de color amarillento.	Apariencia: Polvo beige.
Solubilidad: soluble en agua al 1% peso/volumen	Solubilidad: soluble en agua al 1% peso/volumen
Humedad: Menos de 5% (Karl Fisher)	Humedad: Menos de 5% (Karl Fisher)
Ash: Menos del 0,5% (3 horas, a 800 °C)	Ash: Menos del 0,5% (3 horas, a 800 °C)
Metales pesados: A menos de 20 pp	Metales pesados: A menos de 20 pp
Ensayo: K: 90% HPLC	Ensayo: K: 92% HPLC
Ensayo microbiología: Recuento total en placa: Menos de 1,000 / g Levaduras y mohos: menos de 100 / g E. coli: Negativo / g Salmonella: Negative/25g	Ensayo microbiología: Recuento total en placa: Menos de 1,000 / g Levaduras y mohos: menos de 100 / g E. coli: Negativo / g Salmonella: Negative/25g
Propiedades: Anti-inflamatorio, Agregación plaquetaria, Función cognitiva	Propiedades: Regulación del colesterol, Regulación Hiperglucemia. Síndrome metabólico.

Tabla 6: Ficha técnica de los extractos: apigenina y naringenina potásicas.

*Patente Apigenina potásica: (sol: 04380155.4-1216 /20.07.2004/Ref.: PXEP00416/2004)

2. ESTUDIO “IN VIVO”

a) *Animales*

Hemos utilizado 16 conejas albinas de raza Nueva Zelanda esqueléticamente maduras (3,5-6,3 kg de peso) suministradas por la Granja San Bernardo (Pamplona). Se aclimató a los animales durante dos semanas mediante su manejo en jaulas individuales de 60 x 60 x 60 cm en el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia (SAI; nº REGAES 300305440012). Las condiciones ambientales se mantuvieron de manera constante a lo largo de todo el estudio, consistiendo en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, temperatura estable entre 22-24°C, humedad constante entre 55% ± 10% y con acceso *ad libitum* al agua y comida comercial estándar para conejos (Panlab ®, Barcelona). Cada coneja fue identificada mediante una chapa adherida al cartílago de la oreja izquierda, asignándose el mismo número en el libro de ensayos. A los animales tratados con los flavonoides se les administró el compuesto de forma diaria a través de una gelatina neutra, incorporándolo al resto de la comida, según el peso de cada coneja, a dosis de 12,63 mg/Kg/día para la apigenina potásica y 13,04 mg/Kg/día para la naringenina potásica.



Fig. 7: coneja de raza Nueva Zelanda e identificación para su registro

b) Aparatos

APARATOS	REFERENCIAS
ANALIZADOR DE BIOQUÍMICA	VetScan VS2®. Abaxis, Inc. Darmstadt. Alemania.
DENSITÓMETRO	Prodigy de cuerpo entero DEXA (Dual Energy X-Ray Absortimetry) (Cortesía de GE Healthcare)
EQUIPOS MICRO CT	1. SkyScan 1172 (Bruker microCT NV, Kontich, Bélgica) Trabeculae®, Empresa de base tecnológica, S.L. Parque Tecnológico de Galicia, 32900 San Cibrao das Viñas, Ourense. 2. Skyscan microtomografía de rayos X 1076 (Kontich, Bélgica). Parque Científico de la Universidad Autónoma de Barcelona.
MICROSCOPIO ÓPTICO	Leica DM5000B con cámara digital (Leica Microsystems, Barcelona, España)
MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB)	Jeol JSM-6.100 (SAI.UM. Murcia. España)
ANÁLISIS POR ICP-OES	ICAP 6500 DUO/IRIS INTREPID II XDL CSIC (Murcia)

Tabla 7: Aparatos utilizados para nuestro estudio

c) Agentes

AGENTES	REFERENCIAS
FLAVONOIDEOS	Apigenina potásica (4', 5, 7 trihidroxiflavona). Nutrafur S.A. (Murcia, España) Naringenina potásica (5, 7, 4 trihidroxiflavanona). Nutrafur S.A. (Murcia. España)
ANESTÉSICO	Clorhidrato de Ketamina; ("Imalgene 1000", Merial®. Laboratorios Merial. Francia) Xilacina; ("Xilagesic" al 2% .Laboratorios Calier, S.A. Barcelona. España), 1ml/kg
ANALGÉSICO	Hidrocloruro de buprenorfina 0,3mg/ml (Divasa-Farmavic S.A. Barcelona.España).
ANTIBIÓTICO	Erofloxacina 25mg; ("ALSIR" 2,5%, Veterinaria – Esteve. Barcelona. España).
EUTANÁSICO	Pentobarbital sódico (Dolethal®; Lab. Vetoquinol. Cédex. Francia)

Tabla 8: Agentes utilizados en el estudio

MÉTODOS

1. ESTUDIO “IN VITRO”

a) Mantenimiento de la línea celular

El cultivo masivo en monocapa se llevó a cabo en frascos de 75 cm² (Nunc, USA) en estufa de cultivo (Jouan IG 650, España) a 37°C, y atmósfera con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa.

Para optimizar el tiempo y la puesta en práctica de los ensayos de este trabajo tratamos de mantener sin interrupción la fase exponencial de crecimiento. Por ello los subcultivos, o pases, se realizaban antes de que la monocapa de células en proliferación ocupase toda la superficie del fondo del frasco de cultivo, ya que el contacto de unas células con otras, entre otros estímulos, provoca la entrada en la fase G₀ o de quiescencia en que las células dejan de dividirse. Subcultivamos cada 2-3 días siguiendo siempre el siguiente procedimiento:

Añadimos al cultivo 2'5 ml de tripsina durante tres minutos e incubamos en estufa a 37°C para conseguir la completa pérdida de adherencia de las células a la base del frasco. Inmediatamente adicionamos al frasco 3 ml de medio de cultivo con suero bovino fetal con el objeto de inactivar la acción de la tripsina evitando posibles daños celulares que afectasen a la supervivencia. Recogimos el volumen total y centrifugamos a 200 g durante 10 minutos (Heraeus mod. Multifuge 1L-R, España).

Decantamos el sobrenadante y resuspendimos con 3 ml de medio

de cultivo el sedimento obtenido. A continuación obtuvimos la densidad de células vivas por mililitro mediante recuento celular. Para ello empleamos una cámara hemocitométrica a la que aplicamos una muestra del resuspendido previamente obtenido y teñido con el colorante vital azul tripán. Esta técnica de uso habitual se basa en la compleja estructura del colorante, que le impide atravesar la membrana plasmática intacta de células viables. Por el contrario la desestructuración frecuente de la membrana plasmática en las células inviables o muertas permite la entrada y tinción del citoplasma de un color azul brillante fácilmente reconocible al microscopio. Una vez conocida la densidad de células viables calculamos la cantidad de inóculo necesario para la propagación del cultivo.

b) Crioconservación de la línea celular

Conservamos varios viales con 1×10^6 de células en un tanque de nitrógeno líquido hasta su empleo, previa descongelación y readaptación de las células a una nueva serie de ciclos de crecimiento. El reestablecimiento del contenido del vial congelado consistía en una rápida descongelación por inmersión en baño a 37°C. Inmediatamente en cabina de flujo laminar trasvasamos el contenido del vial a un tubo de centrifuga estéril y adicionamos 5 ml de medio de cultivo; de este modo diluimos el agente crioprotector, reduciendo sus efectos negativos sobre la supervivencia de las células descongeladas. A continuación centrifugamos durante 10 minutos a 200 g, tras lo cual eliminamos el sobrenadante. Resuspendimos el *pellet* con 2 ml de medio de cultivo. Tomábamos una alícuota del resuspendido, la teñimos con el colorante vital azul tripán y llevábamos a cabo un recuento celular en una cámara hemocitométrica de Neubauer,

estimando con los resultados obtenidos la viabilidad celular tras la congelación.

c) Análisis cromatográfico y cuantificación de los extractos vegetales polifenólicos: Flavonoides apigenina potásica y naringenina potásica

Con objeto de comprobar la distribución de flavonoides de las dos sustancias objeto de estudio, así como de confirmar el contenido real de principio activo, se procedió al análisis mediante cromatografía líquida (HPLC) de ambas sustancias.

Preparación de muestra: pesar exactamente en una balanza analítica de precisión (Sartorius SACP124S) aproximadamente 60 mg de flavonoide en un matraz aforado de 20 ml. Adicionar DMSO (grado HPLC suministrado por Panreac) y enrasar. Introducir un núcleo magnético de agitación y agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Detener la agitación y filtrar directamente la disolución a través de un filtro de cartucho con membrana de nylon de 0,45 μm (jeringa acoplada específica de HPLC).

Método (condiciones de análisis y gradiente HPLC):

- Cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard serie 1200
- Columna: C18, 5 μm , 250 x 4 mm id
- Detector: UV de array de diodos a longitud de onda de 280 nm.
- Flujo: 1 ml/min
- Horno: 30°C
- Inyección: 20 μl

- Fase móvil:
 - Disolvente A: ácido acético glacial al 1% (grado HPLC)
 - Disolvente B: metanol (grado HPLC)

Para realizar la correcta separación, identificación y cuantificación de los compuestos activos se diseñó un perfil cromatográfico de elución basado en un sistema de gradiente. Dicho gradiente aparece descrito en la siguiente Tabla:

tiempo (min)	% A	% B
0	50	50
5	50	50
25	0	100
35	0	100
40 (reequilibrado)	50	50

Procedimiento.

Se realizó el análisis HPLC siguiendo criterios generales de normas GMP (Good Manufacture Practices), realizando por tanto 3 análisis de cada muestra incluyendo entre cada uno de ellos un “blanco”, para evitar el posible arrastre de compuestos del análisis anterior.

Cálculos:

$$\text{Porcentaje de activo} = (\text{ArPb}/\text{ArStd}) \times (\text{Wt Std}/ \text{Wt Pb}) \times 100$$

Donde: ArPb: Área de activo en la muestra problema

ArStd: Área de activo en la muestra de referencia (“patrón”).

Wt Pb: Peso de muestra problema en mg.

Wt Std: Peso de la muestra de referencia (“patrón”) en mg.

Las sustancias empleadas como referencia para la cuantificación de los activos principales fueron apigenina y naringina puras suministradas por Extrasynthése (Genay, France). La siguiente tabla muestra los resultados del análisis:

Compuesto	Activo principal. Contenido (%)	Principal de los flavonoides minoritarios (%)	Otros flavonoides minoritarios
Naringenina K	92.8	Naringina (1.9)	Naringenina-7-glucosido
Apigenina K	90.5	Rhoifolina (1.8)	Apigenina-7-glucosido

C.1.Solubilización

En todos los casos procedimos a preparar disoluciones de *stock* a la concentración más adecuada que permitiese la total disolución de los productos, lo cual se comprobaba apreciando la ausencia de sedimento o partículas en suspensión. Todos resultaron ser relativamente bien solubles en el disolvente, que en nuestro caso fue medio de cultivo DMEM con todos los suplementos antes expuestos salvo el indicador de pH rojo fenol. De este modo fijamos una

concentración de *stock* para los flavonoides mayoritarios en cada extracto de entre 0'5mM y 2mM. En todos los casos realizamos esterilización física de cada una de las disoluciones resultantes mediante el empleo de filtros con tamaño de poro 0'22 μ m (Millipore Co, USA.)

Posteriormente alicuotamos en tubos Eppendorf y los almacenamos a una temperatura de -4°C hasta su empleo en los ensayos.

C.2. Control de osmolalidad.

Cualquier sustancia que forme parte del medio de cultivo es susceptible de modificar el potencial osmótico modificando la viabilidad, proliferación e incluso la supervivencia de las células en cultivo. Comprobamos que las concentraciones seleccionadas con las que realizamos los ensayos no alteraban significativamente la osmolaridad del medio de cultivo. Para ello preparamos alícuotas de cada uno de los extractos a 50 μ M. Se empleó un osmómetro de vapor de vacío (Wescor, Vapro 5520, USA). Todos los valores obtenidos se comparaban con el valor de una alícuota control de DMEM suplementado y sin rojo fenol. En ningún caso encontramos variación significativa.

C.3. Cuantificación de la viabilidad y proliferación.

Para evaluar el efecto de los extractos sobre la viabilidad y proliferación de células VERO aplicamos el test de formación de

cristales de formazano tras la aplicación de bromuro de 3-(4-5 dimetiltriazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio (MTT).

Utilizamos placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, USA) con capacidad máxima de 300 μ L por pocillo.

Sembramos 1600 células por pocillo para asegurar un crecimiento exponencial durante todo el ensayo. Pasadas 24 horas tras la siembra, para permitir la adhesión de las células al fondo de los pocillos, procedimos a aplicar los distintos tratamientos con los extractos.

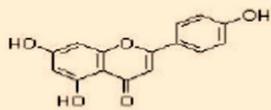
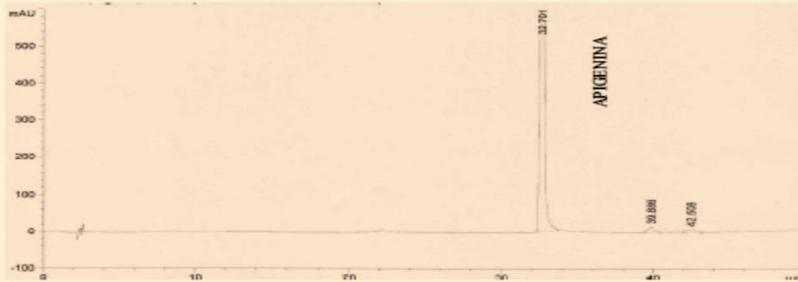
Por cada placa dispusimos 6 réplicas de cada concentración de extracto además de 12 réplicas control sin tratamiento y pocillos-blancos que contenían únicamente tratamientos sin células.

Las concentraciones utilizadas fueron 1, 5, 10, 25 y 50 μ M. Realizamos el ensayo a dos tiempos: 24, 48 horas desde la aplicación de cada extracto.

Mantuvimos todas las placas a una temperatura de 37°C, 90% humedad relativa y un 7'5% CO₂ en estufa de incubación (Jouan, IG650).

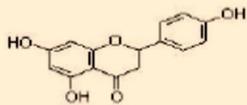
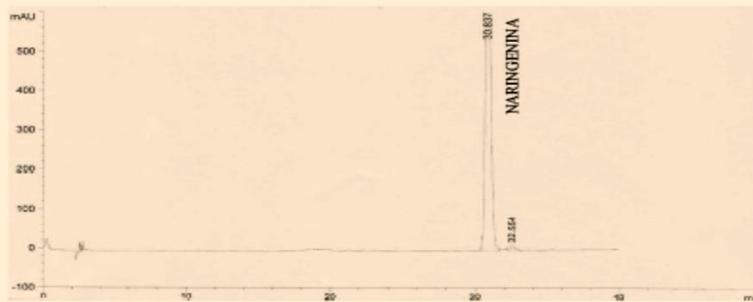
Pasado el tiempo correspondiente eliminamos el medio y agregamos a cada pocillo 50 μ l de una disolución de MTT a 5 mg/ml más 200 μ l de DMEM sin suplementos, de modo que la concentración final de MTT fuese 1 mg/ml. Dejamos incubar durante 4 horas en oscuridad a 37°C. Vaciamos los pocillos dejando sólo las células, adheridas al fondo de los pocillos y procedimos a disolver el formazano sintetizado en el interior celular mediante la adición de 100 μ l de DMSO a cada pocillo. Tras una agitación de 10 minutos a 80 rpm procedimos a la lectura de absorbancia en espectrofotómetro (Labsystems, Mulstiskan MCC340, Finlandia) a longitudes de onda 570 nm y 690 nm.

APIGENINA



Apigenina potásica 90%

NARINGENINA



Naringenina 92%

Fig. 8- 9: Cromatograma (HPLC) para Apigenina y Naringenina.

2. ESTUDIO “IN VIVO”

Procedimiento Experimental

Todos los animales usados en este estudio fueron mantenidos y utilizados siguiendo la guía establecida por la Unión Europea sobre la protección de los animales utilizados en experimentación (86/609/CEE).

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité ético local y en todos los procedimientos se respetó la normativa de la UE (BOE 223/1988 y 265/1990) para la manipulación de animales de experimentación.

Los tratamientos se realizaron en el quirófano experimental del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia.

GRUPO	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	Nº ANIMALES
CONTROL (I)	sanos	4
OVARIECTOMÍA (II)	ovariectomía	4
APIGENINA POTÁSICA (III)	ovariectomía / Apigenina Potásica / 12,63 mg/Kg/día	4
NARINGENINA POTÁSICA (IV)	Ovariectomía/ Naringenina Potásica / 13,04 mg/Kg/día	4

Tabla 9: Grupos de Animales de estudio: Procedimiento experimental

Protocolo Quirúrgico de la Ovariectomía

Para llevar a cabo con éxito la fase quirúrgica (ovariectomía), se realizó un estudio detallado del modelo anatómico de la coneja de Nueva Zelanda.

Los ovarios están ubicados más caudalmente que en otros roedores, en la mitad de la cavidad abdominal, en posición lateral, suspendidos por un ligamento laxo, que da una fijación más flexible y móvil en relación a la pared abdominal, y en contacto menos cercano con los cuernos.

Las trompas de Falopio se extienden desde el extremo fimbriado de la bolsa, sustentadas por una hoja de peritoneo, el mesosalpinx. Las trompas u oviductos son largas y muy flexuosas. El útero es un órgano músculo membranoso tubular, con 2 largos y delgados cuernos; de aspecto muy curvado en dirección caudal ubicado en el abdomen caudal, dorsal a la vejiga, que generalmente lo oculta en decúbito dorsal.

Cada cuerno posee un cervix propio con irrigación propia que se distribuye en un mesometrio profusamente infiltrado con grandes depósitos de grasa que dificulta su identificación, aislamiento y hemostasis.

La vejiga urinaria es un reservorio de paredes muy delgadas y flácidas, se ubica ventralmente al útero y es intrapélvica, cuando se llena alcanza hasta la línea media, y con sus paredes delgadas es fácil de dañar accidentalmente. La uretra desemboca en el límite proximal del vestíbulo vaginal que es más profundo en relación a las especies tradicionales. La irrigación procede de las arterias ováricas, que nacen de la aorta abdominal, caudales a las arterias renales y alcanzan cada

ovario en forma perpendicular enviando pequeñas ramas al oviducto y una rama de anastomosis a la arteria uterina, que corre paralela a los cuernos, dando brazos de irrigación hacia ellos desde su ingreso al mesometrio a nivel de cervix. Las venas ováricas y uterinas siguen un curso similar al de las arterias.

Fases del protocolo quirúrgico:

A.- Fase preanestésica: Se realizó profilaxis antibiótica con erofloxacina 25mg, a la vez que se procedió a minimizar el dolor mediante analgesia; hidroclocloruro de buprenorfina 0,3mg/ml, antes de la cirugía y los 3 días posteriores.

B.- Fase anestésica: Tras la anestesia intramuscular del animal realizada con ketamina (Imalgene 1000®) a dosis de 0,75 mg. por kg. y xilacina (Xylagesic®) a dosis de 0,25 mg. por kg., se rasuró el abdomen y con la coneja en decúbito dorsal, se aisló el campo operatorio en la zona de abordaje mediante paños de campo. Después se procedió a la desinfección de la piel con povidona yodada (Betadine ®).

C.- Fase quirúrgica: Se hizo el abordaje mediante incisión mediana, retro umbilical, cuidando no dañar accidentalmente la vejiga que puede estar distendida bajo la incisión. En la zona mesogástrica, se retrae el extremo anterior de la incisión, mediante separador Farabeuf, para facilitar la ubicación y exteriorización de los ovarios y los cuernos uterinos. Una vez aislado mediante compresas se explora y se localizan los vasos sanguíneos:

C.1.- De vasos en unión cuerno-cervix: Se aísla y expone ambos

cuernos. Se hace una transfixión que ocluye la arteria y vena uterina fijándola a lado derecho e izquierdo a nivel del punto de unión con el respectivo cérvix uterino.

C.2.- De vasos en mesometrio: Se realizan ligaduras hemostáticas en ambos ligamentos anchos, cubriendo el espacio de mesometrio comprendido desde la union Cervico-uterina hasta los vasos ováricos.

C.3.- De vasos ováricos: pasando una aguja atraumática con hebra doble de material de sutura, a través de un punto avascular caudal a los vasos ováricos.

Se corta el hilo preparando 2 hebras paralelas, que no se entrecruzan y anudándolas: la primera hacia el extremo craneal, ocluyendo los vasos ováricos antes de que alcancen el ovario, y la segunda, hacia la unión útero - ovárica, ocluyendo la anastomosis vascular útero –ovárico derecho. Se repite la misma maniobra al lado izquierdo.

Ovario histerectomía: Se corta por detrás de las ligaduras ováricas seccionando luego el mesometrio por entre las ligaduras ya realizadas, Se colocan 2 pinzas Kelly rectas craneal y caudal a las ligaduras utero-cervix y se corta el útero entre ambas.

Cierre del muñón uterino: el muñón uterino se puede cerrar de distintas formas, según su tamaño. Si es ancho y hay infección asociada a él, se realiza su cierre aséptico con la técnica de Parker-Kerr . Si es pequeño y normal se cierra mediante una transfixión simple y 2 ó 3 puntos simples de sutura en su extremo. La pared abdominal se cierra de acuerdo a la técnica clásica en 2 planos; línea alba a puntos

simples separados y la piel con sutura subcuticular y punto simple separado.

D.- Fase postoperatoria: Tras completar las suturas, se desinfecta la zona con povidona yodada (Betadine®) inmediatamente y se proporciona al animal una solución analgésica postoperatoria mediante una inyección intramuscular de hidroclicloruro de buprenorfina 0,3mg/ml.



Fig. 10: Aplicación intramuscular de anestesia y analgesia



Fig. 11: Identificación de cuernos uterinos

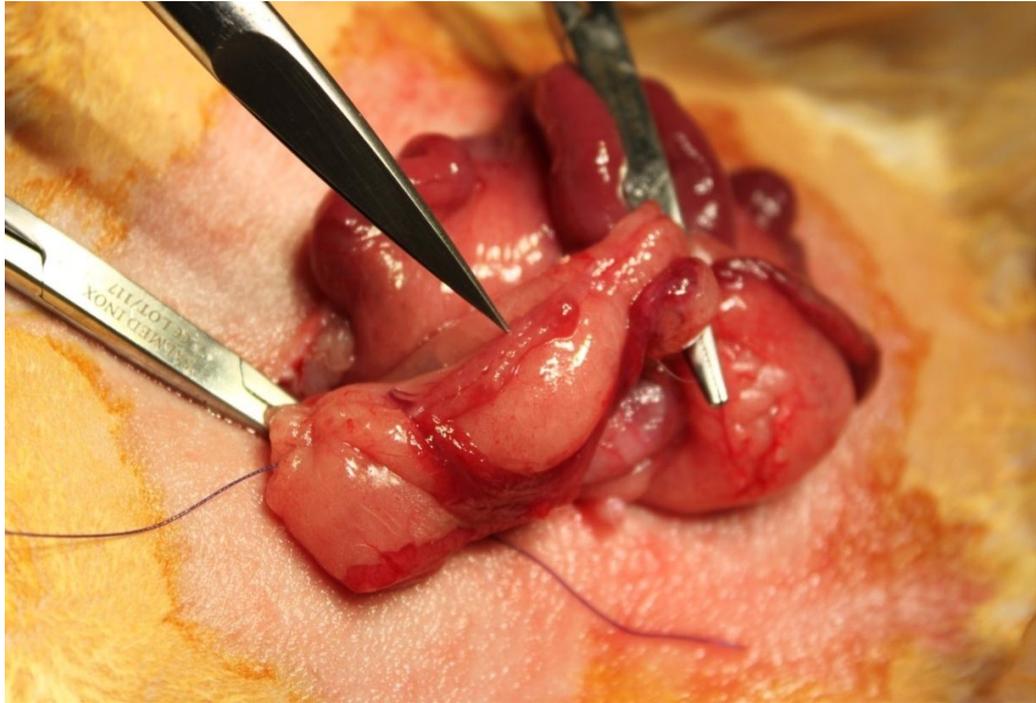


Fig. 12: Identificación del ovario



Fig. 13: Ligadura y extirpación del ovario

Estudio bioquímico

Con el objetivo de monitorizar algunos parámetros bioquímicos relacionados con la fisiología ósea, realizamos a todos los animales una extracción de sangre previa al comienzo del estudio y a continuación, esta se fue protocolarizando tras realizarles la ovariectomía a: 0, 30, 60, 150 y >240 días. Los parámetros analizados fueron: La fosfatasa alcalina (ALP) medida en U/L, el calcio iónico (Ca^{2+}) en mg/dl y el fósforo (P) en mg/dl.

Las extracciones de sangre se realizaron utilizando como vía la zona arterial de la oreja, ajustándose en todo momento a un correcto protocolo de sujeción, administrando un anestésico local (gel de lidocaína) en la zona a intervenir. Se utilizaron agujas de 20G x 2,5cm y la sangre se recogió en una jeringa acoplada de tamaño adecuado. Después, se sujetó con un apósito estéril la zona perforada, presionando durante al menos 2 minutos para evitar el sangrado continuo y la provocación de hematomas que dañarían de forma permanente la zona arterial. Las muestras se recogieron en tubos de 2,5 ml. con heparina, se depositaron en sus correspondientes rotores (Vetscan Comprehensive Diagnostic 1463AB1) y se procesaron en un equipo de análisis de bioquímica VetScan VS2®. Abaxis, Inc. Darmstadt. Alemania.

Estudio micro CT: microtomógrafo de rayos x modelo skyscan

1172

Análisis a nivel microestructural de un compartimento de hueso trabecular y un compartimento de hueso cortical en un fémur y una tibia de conejo. Para ello se realiza el escaneado de las muestras mediante microtomografía computarizada (micro-CT) obteniendo las variables histomorfométricas de hueso trabecular, las de hueso cortical, y la densidad mineral ósea volumétrica (vBMD) de ambas regiones.

Las muestras se escanearon en un microtomógrafo de rayos X de sobremesa modelo SkyScan 1172 (Bruker microCT NV, Kontich, Bélgica).

Los tomogramas obtenidos del escaneado se reconstruyeron mediante el algoritmo de Feldkamp modificado en la aplicación NRecon versión 1.6.1.7 (Bruker microCT, Kontich, Bélgica), aplicando reducción de *ring artefacts* y corrección de los artefactos causados por *beam hardening*.

Las secciones obtenidas se convirtieron en imágenes binarias mediante *thresholding* de adaptación global. Para el análisis de los parámetros microestructurales del hueso trabecular y cortical, se seleccionaron dos volúmenes de interés (VOI) distintos. En el caso del hueso trabecular, se seleccionó un VOI comenzando a 2.0 mm del plato de crecimiento de la metáfisis proximal en el caso de la tibia o distal en el caso del fémur (tomado como sección de referencia) ocupando 10.0 mm en dirección distal (tibia) o proximal (fémur), y excluyendo para el análisis el hueso cortical. Para el análisis de hueso cortical, el VOI comienza a una distancia de 22.0 mm del plato de

crecimiento y se extiende 3.5 mm, excluyendo el hueso trabecular en caso de existir. La selección de los correspondientes VOI se lleva a cabo con la aplicación comercial proporcionada con el equipo (SkyScan CT-Analyzer versión 1.10.0.2).

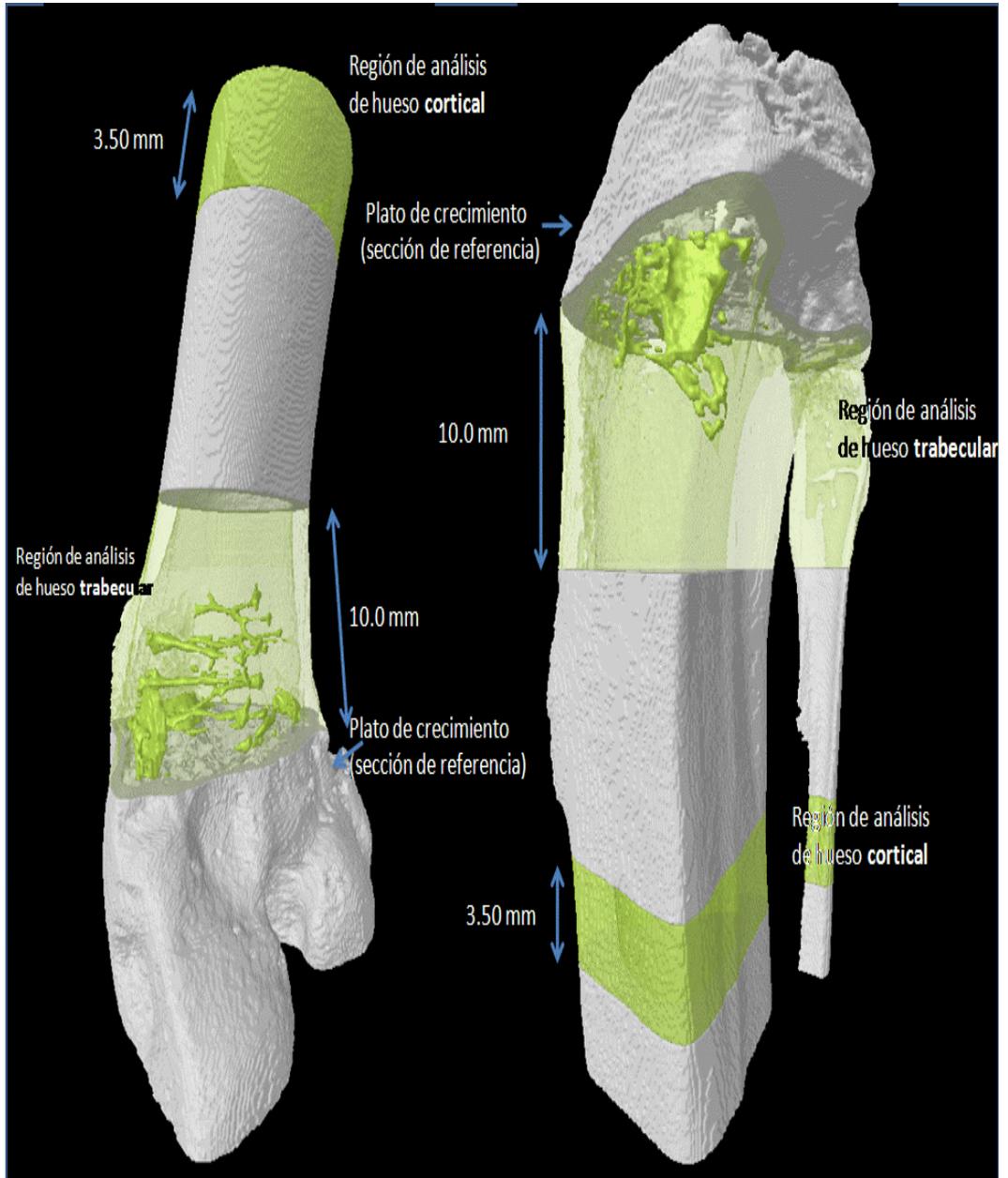


Fig.14: Representación de los compartimentos utilizados para el análisis de hueso trabecular y hueso cortical en fémur (izquierda) y tibia (derecha) de conejo.

A) Variables de la región trabecular

El análisis con μ -TC proporciona infinidad de variables microestructurales:

A.1. *BV/TV*: Es una variable muy empleada en estudios de osteoporosis u otras patologías que causen pérdida de hueso, ya que refleja perfectamente la pérdida o ganancia de hueso en los distintos grupos y es perfectamente comparable entre muestras. Es la principal variable histomorfométrica. Finalmente, resultan también útiles el Tb.Th, la Tb.Sp y el Tb.N. Adicionalmente, cada día más se están utilizando variables como el SMI (que aporta información importante sobre la morfología trabecular) y el Tb.Pf (que nos informa sobre la conectividad de las trabéculas).

A.2. *Tissue volume (TV), Bone volume (BV) y Percent bone volume (BV/TV)*: Son las medidas de volumen y la relación entre ellas en la región analizada.

El TV es el volumen de tejido o volumen total, es decir todo el volumen ocupado por la región de interés (ROI) analizada, tanto el ocupado por hueso como por los espacios intertrabeculares. Correspondería a toda el área marcada en la imagen de la Figura 1, tanto lo que se ve en azul como lo que se ve en rojo (ten en cuenta que en la Figura es una imagen 2D en la que se ve un área, pero en realidad estamos hablando de un volumen medido en 3D).

Dentro de ésta ROI, el espacio ocupado por hueso es el denominado BV, volumen de hueso o volumen trabecular (ya que el único subtipo óseo que hay en la ROI es hueso trabecular, se ha excluido el hueso cortical). Es lo que en la imagen se ve en rojo.

La relación entre ambos, BV y TV, se conoce como fracción volumétrica ósea o porcentaje de volumen de hueso (BV/TV), y como veíamos anteriormente es el principal indicador de volumen de hueso y el parámetro más utilizado en estudios de osteoporosis

A.3. Tissue surface (TS) y Bone surface (BS): De la misma manera, la TS es la superficie total de la región analizada y la BS la superficie de hueso, medidas ambas en 3D.

A.4. Bone specific surface (BS/BV), Bone surface density (BS/TV): La relación BS/BV se conoce como superficie específica de hueso y es la relación entre la superficie sólida y el volumen de hueso medido dentro del volumen de interés. Es un parámetro útil para caracterizar el grosor y la complejidad de las trabéculas. La relación BS/TV como densidad de la superficie ósea y es la relación entre la superficie sólida y el volumen total analizado.

A.5. Trabecular thickness (Tb.Th) y Trabecular spacing (Tb.Sp): El Tb.Th es el grosor medio tridimensional de las trabéculas medido en 3D. De la misma manera, la separación trabecular Tb.Sp es básicamente el grosor medio de los espacios huecos definidos por la binarización en el volumen de interés. Ambas se calculan mediante un complejo método que utiliza esferas para el análisis espacial.

A.6. Trabecular number (Tb.N): El número trabecular Tb.N implica el número de veces que se atraviesan las trabéculas por unidad de longitud por una vía arbitraria a través del volumen de interés. Esto que puede parecer una definición compleja, es una cosa muy sencilla. Se

trata de lanzar una línea que atraviese la región de interés y contar cuántas veces atraviesa trabéculas. Claro está que el cálculo del Tb.N implica el lanzamiento de infinidad de líneas en todas las direcciones, calculándose un promedio.

A.7. Trabecular pattern factor (Tb.Pf): El factor de patrón trabecular Tb.Pf es un índice de conectividad inverso. Es decir, cuanto más alto es el valor de Tb.Pf menos conectadas están las trabéculas. Es un índice cada vez más utilizado ya que aporta información muy útil sobre la calidad de la conectividad de la estructura trabecular. Se basa en el cálculo de un índice de convexidad o concavidad relativa de la superficie ósea total, basándose en el principio de que la concavidad de las superficies trabeculares implica conectividad, mientras que la convexidad indica estructuras desconectadas y aisladas.

A.8. Structural model index (SMI): Como sabréis, atendiendo a su morfología, las trabéculas se pueden dividir en trabéculas en forma de plato o placa (*plate-like trabeculae*) y trabéculas en forma de tubo o barra (*rod-like trabeculae*). El SMI o índice de modelo estructural indica la prevalencia relativa de unas u otras. El SMI se define en un intervalo de valores de 0 a 3, donde 0 es una estructura en forma de placa ideal y 3 un cilindro. Es decir que una muestra con un valor de SMI de 2.5, tendrá una gran mayoría de trabéculas en forma de tubo, mientras que en una muestra con un SMI de 0.5 prevalecen las trabéculas en forma de placa. Normalmente, las trabéculas en forma de placa se asocian a una mayor resistencia ósea.

A.9. Degree of anisotropy (DA): El grado de anisotropía DA es una medida de la simetría del objeto, o de la presencia/ausencia de

estructuras alineadas en una determinada dirección. Se define en un intervalo de 0 a 1.

Una muestra con un $DA = 0$ sería totalmente isotrópica, es decir, las trabéculas están orientadas en todas las direcciones y sus propiedades no variarían en función de la dirección escogida para realizar la medida. Una muestra con $DA = 1$ será totalmente anisotrópica, es decir tendrá todas las trabéculas orientadas en la misma dirección. Como ejemplo podéis pensar en un paquete de espagueti, que sería totalmente anisotrópico ya que todos los fideos vienen orientados en la misma dirección; por lo cual los resultados de un ensayo mecánico (p. ej.) serían totalmente distintos si aplicásemos la carga en sentido longitudinal o transversal.

B) Variables de la región cortical

El análisis de la región cortical se realiza comúnmente en 2D, analizando cada una de las secciones transversales.

B.1. Cross-sectional thickness (Cs.Th) y Cortical thickness (Ct.Th): El grosor de la sección transversal o Cs.Th es un cálculo del grosor de la región cortical calculado como promedio del grosor de cada una de las secciones transversales (excluyendo por tanto los espacios entre las secciones transversales).

El grosor cortical Ct.Th es otra manera de calcular la anchura de la pared cortical. En este caso el espacio entre las secciones se interpola y se calcula tridimensionalmente el grosor de la pared cortical en la región analizada. Ambos parámetros dan información sobre el

grosor de la pared cortical, simplemente se diferencian en el método de cálculo del mismo.

B.2. La B.Ar o área de hueso media de las secciones transversales representa el promedio de las áreas de hueso de cada una de las secciones transversales dentro de la región de interés seleccionada. En la sección de la imagen de la Figura 6 sería el área de color rojo.

B.3. Mean polar moment of inertia (MMI_{polar}): El MMI_{polar} es un índice básico de resistencia mecánica que indica la resistencia a la rotación de una sección transversal en un eje determinado (asumiendo propiedades biomecánicas materiales uniformes). Básicamente es un índice biomecánico, a mayor valor del MMI mayor resistencia a la rotación tendrá la región analizada.

B.4. Cortical endostal perimeter (Ct.En.Pm) y cortical periostal perimeter (Ct.Pe.Pm): Los perímetros endostal (Ct.En.Pm) y periostal (Ct.Pe.Pm) creo que no necesitan más explicación que la que indica su propio nombre, son los perímetros interno y externo de la pared cortical. Suelen ser útiles para comprobar que la pérdida de hueso cortical se produce por el interior de la pared cortical. En estudios de osteoporosis suele encontrarse en las muestras OP una disminución de grosor y área cortical. Al comprobar los valores de los perímetros se ve que el periostal tiene valores normales pero el endostal ha aumentado, es decir, ha habido pérdida de hueso por el interior de la pared cortical.

B.5. Eccentricity (Ecc): Finalmente, la excentricidad (Ecc). Una sección transversal de la región cortical en la zona distal del fémur se aproxima a la forma de una elipse, y la excentricidad es un parámetro

que indica la diferencia de alargamiento con respecto a una forma circular (un círculo es una elipse con excentricidad cero). La excentricidad solamente se calcula en la región cortical del fémur, ya que la de la tibia no se asemeja a una elipse. Sirve principalmente para comprobar si hay cambios de forma en el hueso.

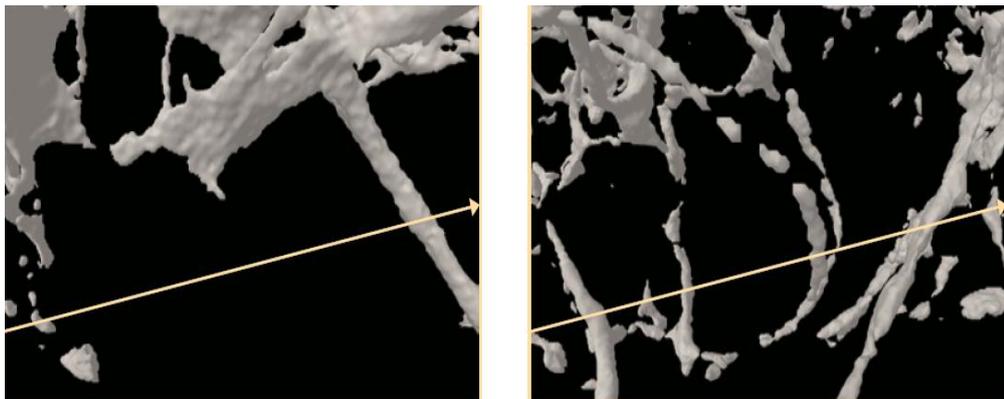


Fig. 15: Representación del cálculo del Tb.N

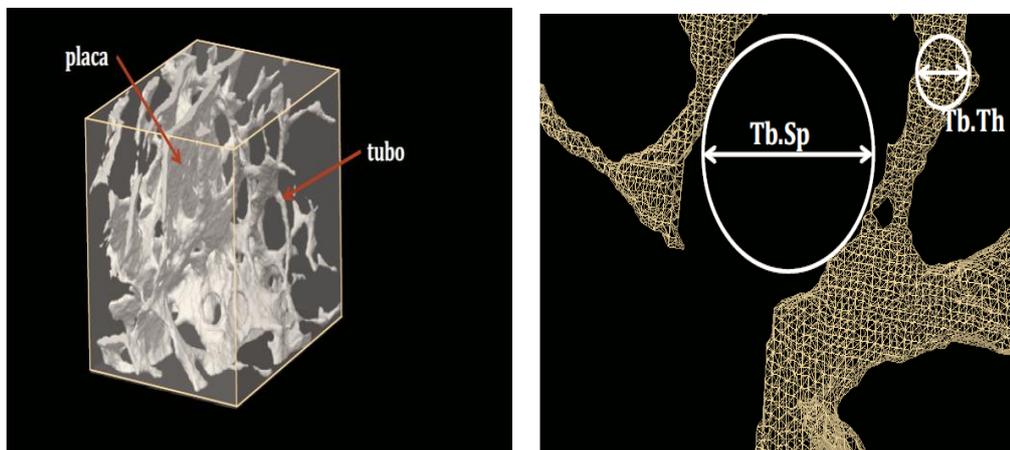


Fig. 16-17: Trabéculas en forma de placa y en forma de tubo (izq). Cálculo de la Tb Sp y del Tb. Th.(drcha)

Estudio micro CT: microtomógrafo de rayos x modelo skyscan

1076

Los extremos de Tibia y fémur se humedecen con unas gotas de solución salina tamponada con fosfato y se envuelven en papel de plástico transparente. Las muestras se digitalizan (Skyscan microtomografía de rayos X 1076, Kontich, Bélgica). Las imágenes fueron adquiridas con las siguientes condiciones: 80 kV, 100 mA, con un filtro de Al + Cu, y tamaño de imagen de 1024_1280, con una resolución de tamaño de píxel de 10,09 mm. Para cada muestra, se tomaron una serie de 419 imágenes de proyección usando un tiempo de exposición de 2000 ms con un paso de rotación de 0,458 entre cada imagen y se promediaron dos marcos.

Cada escaneo duró alrededor de 38 min. Los post-valores finales de alineación estaban dentro de un rango de -13.5 y +6.0 (sin unidades).

La reconstrucción, el reposicionamiento del conjunto de datos y el cálculo BMD método de reconstrucción de la muestra se llevó a cabo con un equipo Dell, utilizando NRecon software (versión 1,6. 2,0; Skyscan) con configuración de parámetros idénticos. Todos los datos fueron analizados sin cambiar el tamaño o la condensación. Las imágenes simples dentro de los conjuntos de datos utilizaron Viewer software (versión 1.4.3; Skyscan) de tal manera que la dirección axial (transversal equivalente a) vista se proyecta en una pila de imágenes. Todos los análisis cuantitativos 3D del hueso se llevaron a cabo utilizando el software CTAnalyser (versión 1.10.1.1; Skyscan), donde

los niveles de umbralización de valores de gris (95 a 255) se ajusta para que sea el mismo para todas las muestras. Se utilizó el software CTAnalyser, y los modelos 3D fueron creados usando CTVol (versión 2.2.0.0; Skyscan).

Estudio anatomopatológico

Una vez terminado el período experimental (9 meses), se procedió al protocolo de eutanasia mediante administración intracardiaca de pentobarbital sódico (50mg/kg) Dolethal® (lab. Vetoquinal. Cédex. Francia) previa anestesia general. Una vez sacrificados se les realizó una disección específica para la toma de muestras de fémur y tibia.

A) Procesamiento para microscopía óptica.

Las muestras fueron fijadas en formol neutro tamponado al 10% hasta su proceso de descalcificación que se llevó a cabo por medio de dos métodos:

A.1.- Método del TBD (Termo Shandon S.A., Pittsburg, USA). Se mantuvieron las muestras durante dos horas con el descalcificador TBD-I (Ácido hidroclicórico 14% y polyvinylpyrrolidone) y posteriormente utilizamos el TBD-II (Ácido fórmico 26% + Citrato sódico 8,5% + polyvinylpyrrolidone) durante 17 días, realizando un cambio de líquido cada 24 horas.

A.2.- Método del Formol Nítrico. Introduciendo las piezas en una solución compuesta por 100cc de Formaldheido 35-40%, 900cc de agua destilada y 52,6cc de ácido nítrico 60%, durante dos días; se lavaron con agua durante ½ hora para seguidamente volverlas a sumergir, esta vez, en carbonato de litio durante 4 horas, finalmente se lavaron con agua durante 24 horas y se mantuvieron en formol al 10% al menos 24 horas previas a su inclusión en parafina (Vicente, 1996; Meseguer, 2006).

A continuación, las muestras fueron lavadas con agua destilada y seguidamente fueron deshidratadas mediante alcoholes a concentraciones crecientes, continuando con los pasos habituales de este proceso hasta su inclusión en parafina.

De los bloques se realizaron secciones de 5 μm mediante un micrótopo de rotación Minot Leitz®. Las secciones histológicas fueron teñidas mediante las técnicas de tinción: Hematoxilina-eosina (H-E), Tricrómico de Masson (TM), Tricrómico de Gomori (TG) y la de Gomori para fibras de reticulina (GR) para su estudio en un fotomicroscopio Leica DM5000B con cámara digital (Leyca Microsystems, Barcelona, España)

B) Procesamiento para microscopía electrónica de barrido.

A nuestras muestras se les realizó secciones transversales de 1-2mm de espesor tanto a nivel cortical como trabecular de la tibia y fémur del conejo al mismo tiempo que eran irrigadas con líquido fijador (Glutaraldehído al 3%). Los fragmentos obtenidos se fijaron en glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,2-7,4 y a una temperatura de 4°C, durante cinco horas. Posteriormente fueron lavados en tampón cacodilato 0,1 M más sacarosa al 8%, durante 12 h a 4°C. La fijación se completó en una solución de Tetraóxido de Osmio al 1% en tampón cacodilato 0,1 M durante 2 h a 4°C y nuevo lavado durante 12 h. La deshidratación se llevó a cabo mediante el paso por soluciones de acetona en concentraciones crecientes (30%, 50%, 70%, 90% y absoluto) durante 10 minutos en cada una de ellas. El secado se realizó mediante CPDO2 Balzers Union con acetona 100% y CO₂ líquido. Posteriormente se realizó el recubrimiento con oro con un metalizador BIO-RAD POLARON DMSION (200 Amstrong) y la

observación de las muestras se realizó en Microscopio Electrónico de Barrido Jeol JSM-6.100, con una aceleración de 15 a 20 Kv. Las imágenes se obtuvieron digitalizadas mediante un programa (LINK ISIS).

La última parte de las muestras, fueron introducidas en suero fisiológico, tras ser envueltas en una gasa empapada en dicho fluido, para evitar que se fijen los tejidos y cambie la consistencia de los mismos, derivándolas a: Trabeculae®, Empresa de base tecnológica, S.L. Parque Tecnológico de Galicia, 32900 San Cibrao das Viñas, Ourense, para su análisis densitométrico y evaluar la DMO mediante micro CT.

Estudio ionómico (icp-oes)

El ICP-OES es una técnica de análisis multielemental que utiliza una fuente de plasma (gas ionizado, eléctricamente neutro y confinado en un tubo de descarga) de acoplamiento inductivo para disociar los átomos o iones que constituyen la muestra, excitándolos a un nivel donde emiten luz de una longitud de onda característica. Un detector mide la intensidad de la luz emitida y calcula la concentración de ese elemento de la muestra, en particular.

En las muestras que precisan digestión, hay que realizar un tratamiento previo para su posterior análisis por ICP-OES, para ello se realiza una digestión ácida con $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ en Ultraclave microondas Milestone. Una vez enrasadas las digestiones con agua milliQ, están listas para su análisis por ICP.

Para ello se pesan 0,1 g. de muestra sólida en el tubo de teflón del digestor y se le adicionan 4ml de HNO_3 PA-ISO 69% y 1ml de H_2O_2 33%. Se tapa el tubo de teflón y se pone en el reactor con una rampa de temperatura final de 20 minutos a 220° C. Una vez enfriado el reactor se enrasan los tubos a 25ml con agua milliQ y ya están listos para ser medidos por el equipo de ICP-OES.

En nuestro caso hemos utilizado el equipo ICAP 6500 DUO THERMO provisto de ONE FAST para introducción de muestra, acortando el tiempo de análisis.

El procesado las muestras de hueso para su posterior análisis por ICP-OES, se realizó siguiente una técnica similar a la utilizada por Shuid en su estudio sobre la concentración de calcio en un modelo de

osteoporosis en ratas (Shuid ,2011). Nuestro protocolo contempla las siguientes fases:

- a) Se pesa la muestra: 0,25g. (250mg.)
- b) Se tritura el hueso pesado
- c) Etapa de desecación: en estufa a 80°C durante 24 horas
- d) Se pesa el hueso después de desecar
- e) Predigestión: En Nítrico al 69-70% unos 4ml durante 24 horas
(no hace falta en este paso que la muestra este en la estufa.
- f) Se hace una muestra blanca (la misma cantidad de nítrico que la digestión)
- g) La muestra resultante está preparada para analizar
- h) Todo el material utilizado se limpia con nítrico y agua al 2%

Los parámetros estudiados fueron: El calcio (Ca) medido en g/100g, el fósforo (P) en g/100g y el magnesio (Mg) en g/100g, tanto en hueso cortical como en hueso medular de la tibia y el fémur de la coneja.

Método estadístico

Analizamos los datos estadísticos con el paquete de software SPSS® versión 12.0 (SPSS® Inc, Chicago, USA) para Windows, en el cual hemos efectuado los siguientes procedimientos estadísticos:

En primer lugar, para el análisis descriptivo de la distribución general de la muestra, así como para el análisis de cada una de las variables (tanto en conjunto como para cada uno de los subgrupos), se han calculado los parámetros característicos: media, desviación típica y los valores máximos y mínimos (rango).

En segundo lugar, se realizó el análisis de varianza de una vía, complementado con contrastes de igualdad de pares de medias, con el método de la mínima diferencia significativa y con la corrección de Bonferroni.

RESULTADOS

ESTUDIO “IN VITRO”

Hemos aplicado el test de proliferación-citotoxicidad sobre la línea celular Vero de cada uno de los compuestos fenotóxicos objeto de estudio. Hemos realizado dichos ensayos por duplicado durante dos periodos de tiempo (24 y 48 horas), correspondiendo los resultados presentados en los siguientes gráficos a la media ponderada de ambos ensayos (Tablas 10 y 11).

Los dos compuestos mostraron un discreto efecto sobre la viabilidad celular a la concentración 10 μM , así como a las inferiores, con un porcentaje de proliferación respecto al control superior al 72% en los dos tiempos de estudio. Las concentraciones altas (25 y 50 μM) no produjeron una inhibición de la proliferación del cultivo por debajo del 51% a las 24 y 48 horas.

La **apigenina**, en el período de 48 horas, demostró un efecto dosis-respuesta moderado ya que, a la máxima concentración ensayada, solo inhibía la proliferación celular en un 51 % respecto del control.

La **naringenina** presentó un efecto dosis-respuesta aún menos marcado, mostrando una capacidad de inhibición de la proliferación poco significativa, por encima del 70% a la concentración más alta

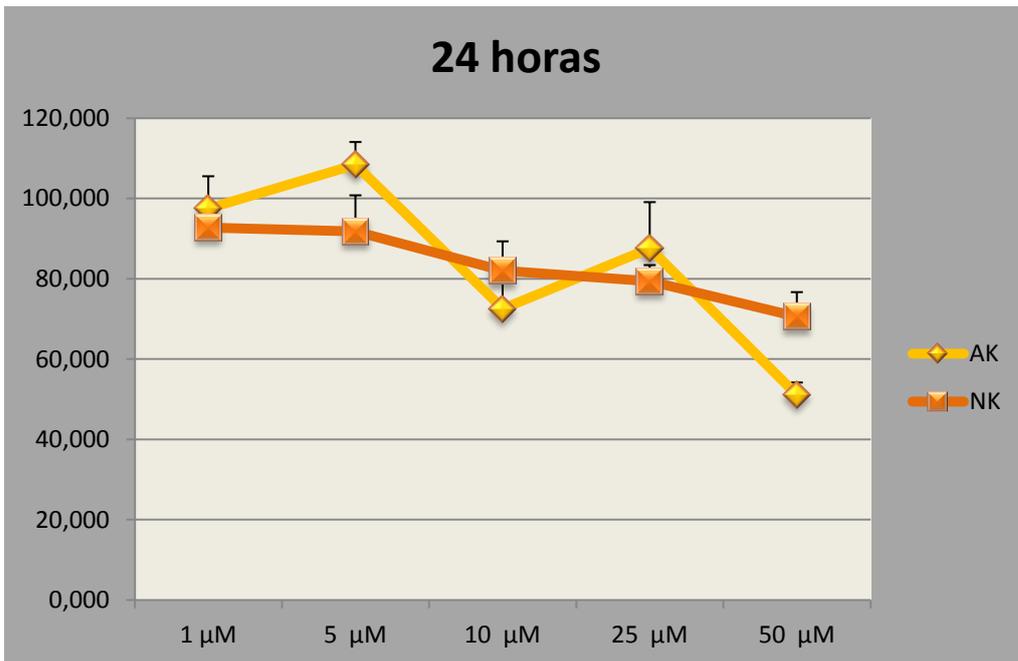


Tabla10: Efecto de los polifenoles apigenina potásica y naringenina potásica sobre la proliferación in vitro de células Vero a las 24 horas.

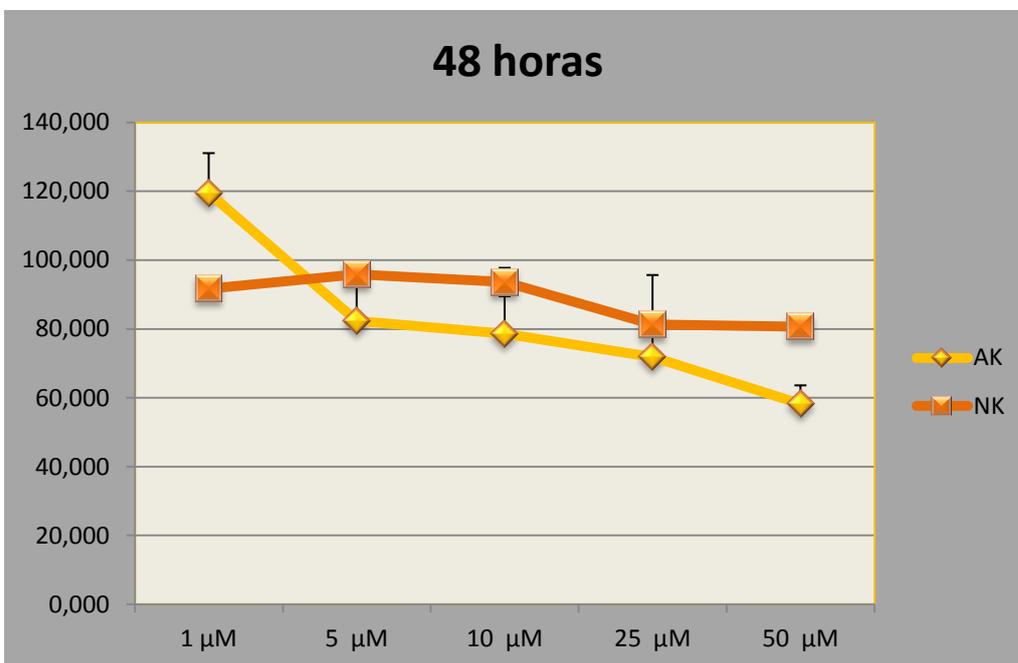


Tabla11: Efecto de los polifenoles apigenina potásica y naringenina potásica sobre la proliferación in vitro de células Vero a las 48 horas.

ESTUDIO “IN VIVO”

Estudio del peso de los animales

Los animales utilizados en nuestro estudio habían conseguido, hacia las 15 semanas aproximadamente, la madurez esquelética y presentaban un peso aproximado a los 3,2-3,5 Kg. en el momento de su recepción (tablas 12 y 14).

En el grupo I (control), la mayoría de los animales adquirió un peso medio de $6,14 \pm 0,18$ Kg al finalizar el estudio (semana 48), presentando así, bastante similitud con los valores de normalidad de crecimiento propios de esta raza (tabla 13).

En el grupo II (ovariectomizado), la media de peso al finalizar el estudio fue de $5,82 \pm 0,17$ Kg, notándose un considerable deterioro tanto en la movilidad como en el aspecto físico de los animales.

Respecto a los animales tratados con flavonoides, el grupo III (apigenina), mostró un promedio ligeramente inferior al resto de los grupos $5,76 \pm 0,25$ Kg, siendo el grupo IV (naringenina) el que presentó unos niveles de recuperación similares o ligeramente superiores a los del grupo control sin deprivación estrogénica $6,20 \pm 0,37$ Kg.

Estadísticamente sólo observamos diferencias significativas entre los grupos I (control) y II (ovx), al finalizar el experimento, hacia la semana 48, con respecto a los grupos tratados con apigenina potásica (AK) y naringenina potásica (NK).

Grupos	Semana Recepción	Semana 19	Semana 23	Semana 27	Semana 35	Semana 48
I Control	3,51±0,04	4,10±0,10	4,88±0,30	5,44±0,21	5,68±0,18	6,14±0,18
II ovariectomía	3,50±0,07	4,16±0,14	4,79±0,19	5,10±0,27	5,37±0,34	5,82±0,17
III Apigenina	3,5±0	4,13±0,29	4,75±0,61	4,92±0,52	5,18±0,47	5,76±0,25
IV Naringenina	3,51±0,02	4,42±0,22	5,01±0,19	5,32±0,29	5,71±0,39	6,20±0,37

Tabla 12: Promedio del peso en Kg de los animales de los diferentes grupos de estudio

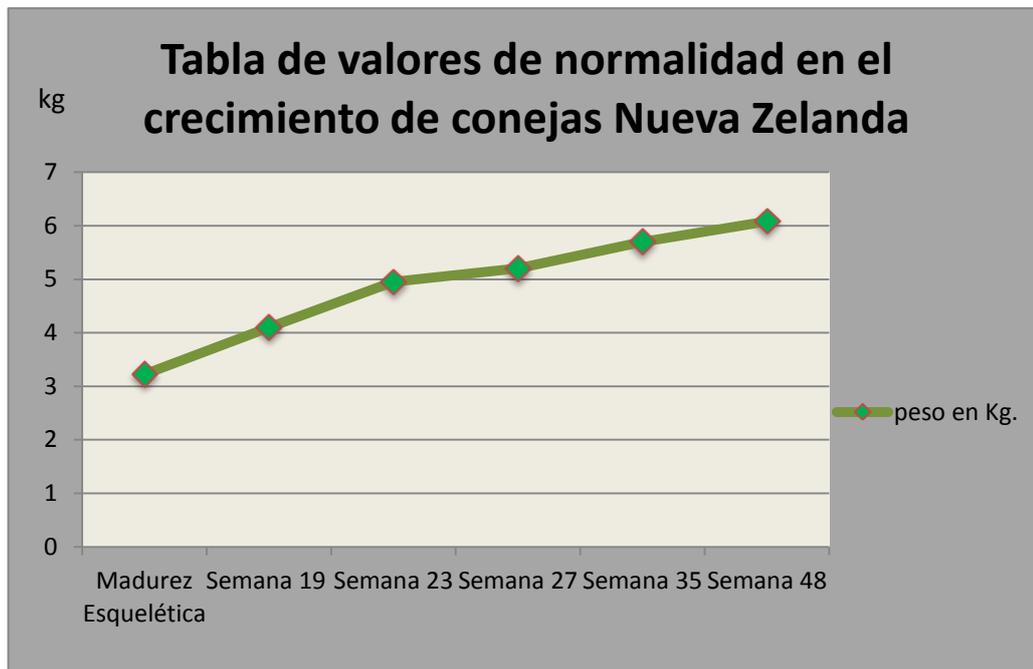


Tabla 13: Valores de normalidad según Harlan Ibérica en conejas Nueva Zelanda.

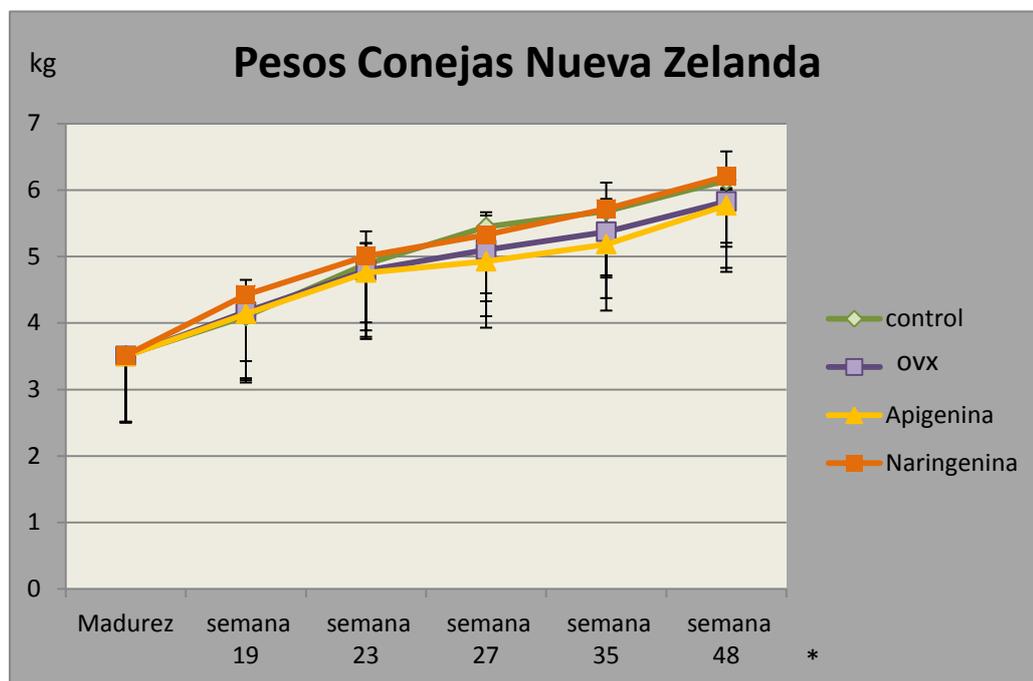


Tabla 14: Resultados obtenidos en nuestro estudio sobre pesos en conejas Nueva Zelanda.

Análisis bioquímico

El método siguiente de estudio consistió en analizar algunos parámetros bioquímicos relacionados con la fisiología ósea; para ello, realizamos a todos los animales una extracción de sangre previa al comienzo del estudio (tiempo 0) que se repitió a los: 30, 60, 150 y 240 días. Los parámetros analizados fueron: La fosfatasa alcalina (ALP) medida en U/L, el calcio iónico (Ca^{2+}) en mg/dl y el fósforo (P) en mg/dl.

Respecto a la fosfatasa alcalina (ALP), observamos que el análisis realizado a tiempo 0, a los animales del grupo I (control), mostró resultados ajustados a los rangos de normalidad que estipulaba el analizador utilizado: Vetscan (70- 145 U/L), si bien, al finalizar el estudio (240 días), los valores medios eran de $66,55 \pm 21,75$ U/L, algo inferiores a los parámetros normales de referencia. Por otra parte, los animales ovariectomizados del grupo II, presentaron valores medios inferiores; $51,4 \pm 25,20$ U/L respecto a los valores del grupo I (control), al finalizar el estudio (240 días). Los animales tratados con apigenina potásica (Grupo III) mostraron unos valores medios finales de $38,6 \pm 18,37$ U/L mientras que a los que se les suministró naringenina potásica, alcanzaron valores de $42 \pm 13,18$ U/L al finalizar el estudio, ambos, notablemente inferiores a los de los animales del grupo II aunque, por debajo del percentil de normalidad .

El estudio del calcio iónico (Ca^{2+}), mostró, en general, valores superiores al rango de normalidad (5,6 – 12,5 mg/dl) en todos los grupos. En el grupo I (control), la media de los valores de calcio fue de

13,14±0,70 mg/dl al final del estudio. El grupo II con deprivación estrogénica, mostró valores ligeramente inferiores al grupo anterior, pero por encima del percentil de normalidad 12,55±1,73 mg/dl. Los animales tratados con apigenina presentaron una media de 12,53±1,76 mg/dl, mientras que los tratados con naringenina mostraron resultados superiores a los dos grupos anteriores pero ligeramente inferiores al grupo de animales control sin tratamiento 12,73±1,22 mg/dl.

Por otra parte, al estudiar los valores de referencia del fósforo (P), (4,0 – 6,2 mg/dl) y comparándolos con la media obtenida por el grupo I (control) 4,32±1,04 mg/dl, comprobamos que estos se ajustaron al percentil de normalidad al igual que sucedió con los animales ovariectomizados del grupo II 4,44±0,87 mg/dl. En los animales tratados con apigenina, observamos valores medios de 3,99±0,81 mg/dl y de 3,92±0,71 mg/dl para la naringenina; ambos ligeramente por debajo del rango de normalidad, pero sin diferencias estadísticas significativas respecto a los grupos I y II.

Estadísticamente, el grupo II (ovx), fue el que mostró niveles más altos de fosfatasa alcalina (ALP) en sangre en todo el experimento, con diferencias estadísticas significativas a los 30 días de la ovariectomía respecto a los grupos tratados con Apigenina potásica (AK) y Naringenina potásica (NK), a los 150 días respecto al grupo II (ovx) y al final del experimento (240 días) con el (ovx) y con el grupo de NK. El grupo de animales tratados con apigenina potásica fue el que mostró niveles más altos de fosfatasa alcalina al final del experimento, no existiendo diferencias estadísticas significativas con el grupo I (control sin ovariectomía).

Grupos	(ALP)	(Ca ²⁺)	(P)
I Control	66,55±21,75	13,14±0,70	4,32±1,04
II ovx	51,4±25,20	12,55±1,73	4,44±0,87
III Apigenina	38,6±18,37	12,53±1,76	3,99±0,81
IV Naringenina	42±13,18	12,73±1,22	3,92±0,71

Tabla 15: Promedio de valores obtenidos al finalizar el estudio en ALP, Ca²⁺ y P.

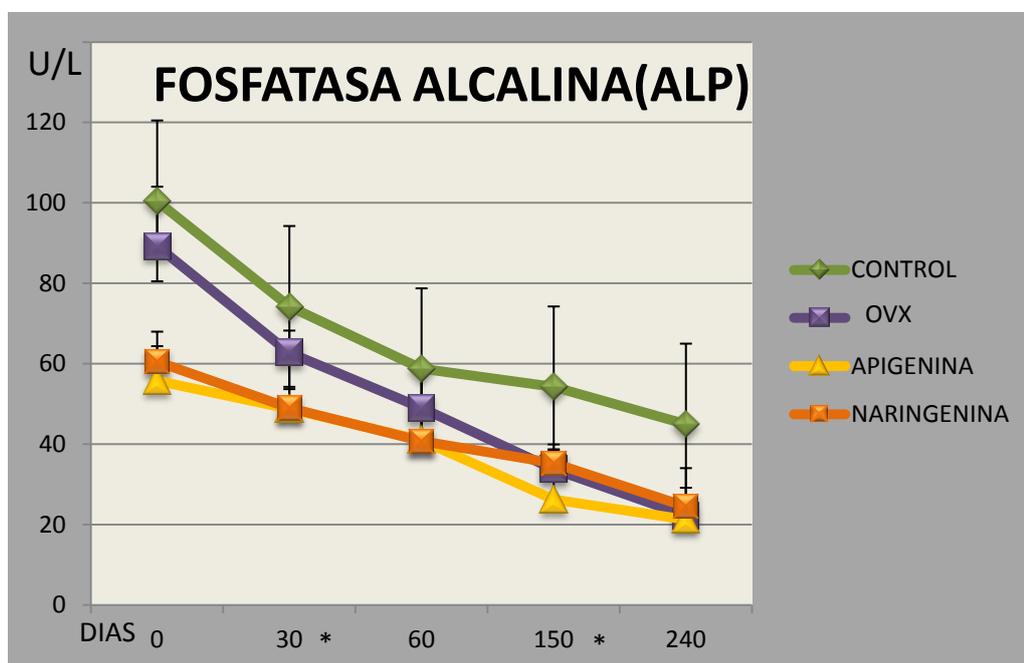


Tabla 16: Valores obtenidos al finalizar el estudio para la fosfatasa alcalina

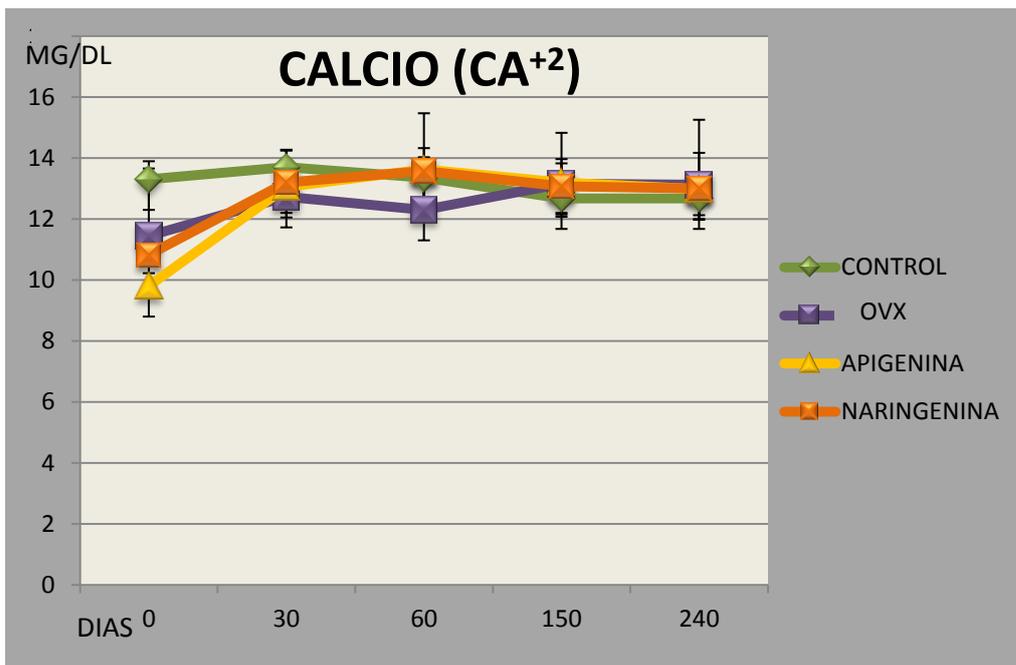


Tabla 17: Valores obtenidos al finalizar el estudio para el calcio iónico

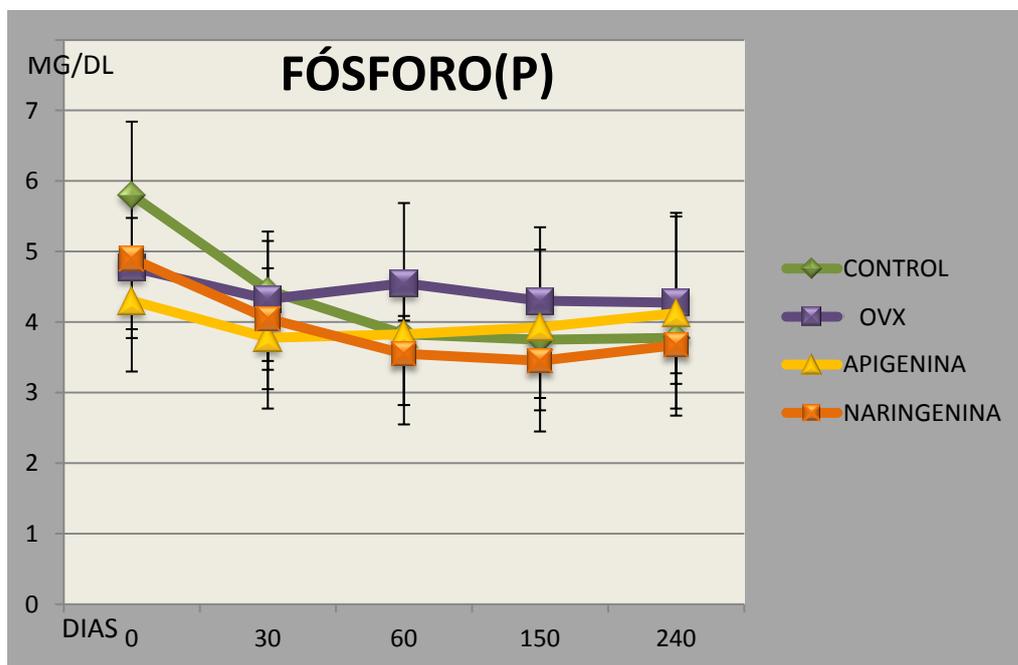


Tabla 18: Valores obtenidos al finalizar el estudio para el fósforo

**Estudio micro CT: microtomógrafos de rayos x modelos:
skyscan 1172 y 1076**

En las muestras del grupo II (ovx), observamos un descenso considerable del volumen de hueso (BV/TV) debido a la pérdida ósea, tanto en la tibia como en el fémur. Así constatamos una disminución de hasta el $1,99\pm 0,82$ % en estos animales mientras que los valores medios del grupo I (control) eran de $3,12\pm 0,53$ %. Los animales tratados con apigenina mostraron resultados superiores a los del grupo II con deprivación estrogénica $2,25\pm 0,39$ % mientras los animales del grupo de naringenina, mostraban valores inferiores a los del grupo II: $1,45\pm 0,78$ %.

En el estudio del grosor trabecular (Tb.Th), mientras que los animales del grupo I (control) mostraron un promedio de $251,60\pm 23,30$ μm ; en los animales del grupo II (ovx), este parámetro disminuyó ya que la resorción ósea provocó el adelgazamiento de las trabéculas a $205,44\pm 19,55$ μm . Los mejores resultados correspondieron a los animales de los grupos tratados, incluso por encima del control no operado. Los tratados con apigenina mostraron una media de $298,89\pm 11,30$ μm y los tratados con naringenina alcanzaron valores de $292,9\pm 28,12$ μm .

Otra de las variables estudiadas, fue la de la separación trabecular mostrando valores superiores para los grupos tratados, con una media de $4153,58\pm 367,39$ μm ., con respecto a los animales del grupo II ($3518,98\pm 657,75$ μm) debido a que al ocurrir una disminución de las trabéculas, aumentó la separación entre las que se observaban.

La siguiente variable estudiada, fue la del número trabecular (Tb.N). Los datos obtenidos para los animales tratados ($0,08 \pm 0,01 \text{ mm}^{-1}$) mostraban resultados similares a los del grupo II (ovariectomía) pero notablemente inferiores a los del grupo control: $0,13 \pm 0,03 \text{ mm}^{-1}$.

Por otro lado, la conectividad trabecular (Tb.Pf) aumentó en el grupo II (ovariectomía) $11,51 \pm 0,68 \text{ mm}^{-1}$ observando mayor presencia de trabéculas tubulares. La media para los animales del grupo I (control) fue de $8,60 \pm 1,28 \text{ mm}^{-1}$ y esta fue ligeramente inferior para los animales tratados: $5,30 \pm 0,46 \text{ mm}^{-1}$ (grupo III) y $6,51 \pm 0,60 \text{ mm}^{-1}$ (grupo IV).

Grupos	BT/TV % Volumen de hueso	Tb.Th μm Grosor trabecular	Tb.Sp μm Separación trabecular	Tb.N mm^{-1} Número trabecular	Tb.pf mm^{-1} Conectividad d trabecular
I Control	3,12 \pm 0,53	251,60 \pm 23,0	3769,99 \pm 228,3	0,13 \pm 0,03	8,60 \pm 1,28
II ovx	1,99 \pm 0,82	205,44 \pm 19,5	3518,98 \pm 657,5	0,08 \pm 0,03	11,51 \pm 0,68
III Apigenina	2,25 \pm 0,39	298,89 \pm 11,0	3628,19 \pm 132,3	0,08 \pm 0,01	5,30 \pm 0,46
IV Naringeni	1,45 \pm 0,78	292,9 \pm 28,12	4153,58 \pm 367,9	0,05 \pm 0,02	6,51 \pm 0,60

Tabla 19: Promedio de valores obtenidos en el estudio con micro CT

Imágenes del microtomógrafo de rayos x modelo skyscan 1172

ZONA TRABECULAR: GRUPO I (CONTROL)

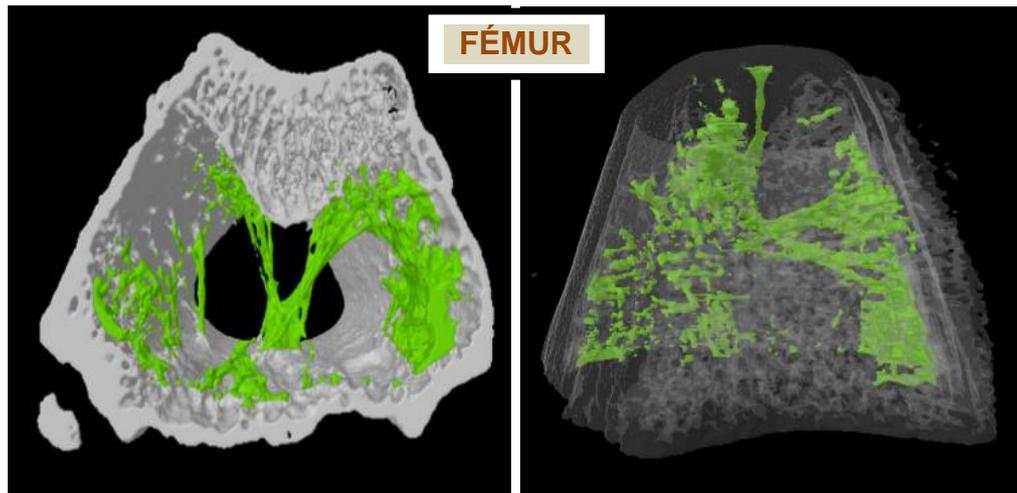


Fig. 18: Modelos tridimensionales del VOI (Volumen de interés) trabecular de fémur

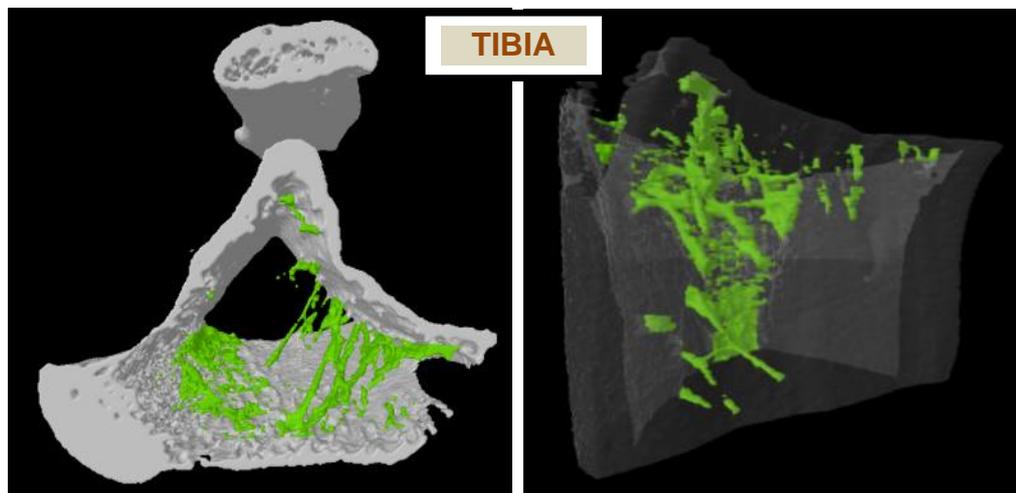


Fig. 19: Modelos tridimensionales del VOI trabecular de tibia

ZONA TRABECULAR: GRUPO II (OVX)

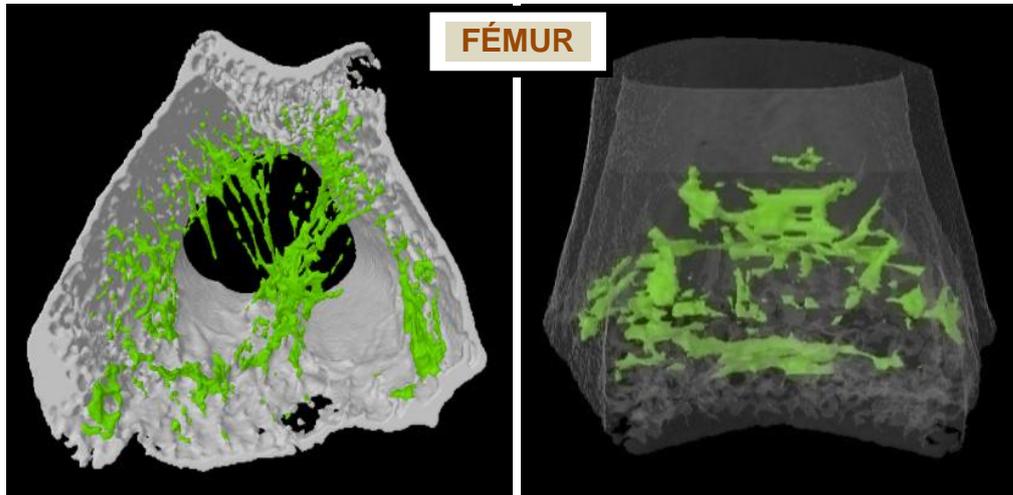


Fig. 20: Modelos tridimensionales del VOI trabecular de fémur

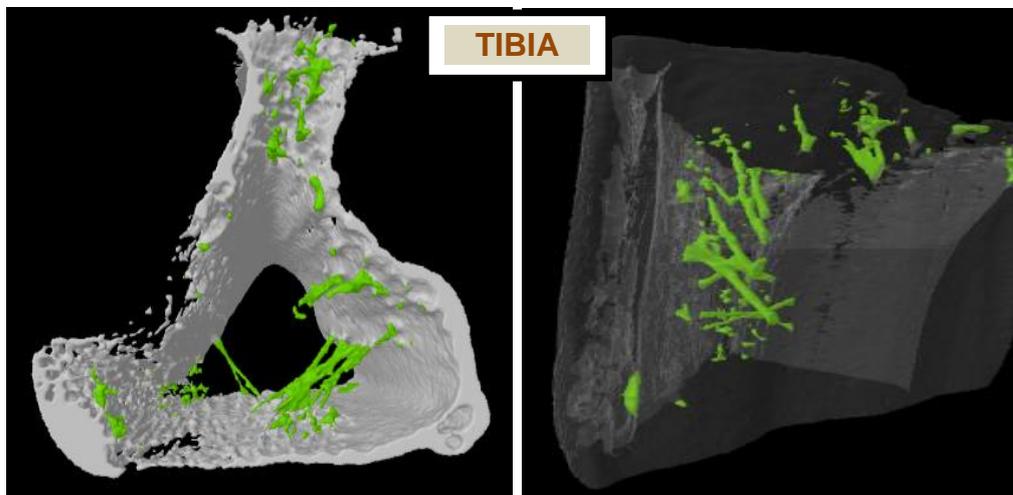


Fig. 21: Modelos tridimensionales del VOI trabecular de tibia

ZONA TRABECULAR: GRUPO III (APIGENINA)

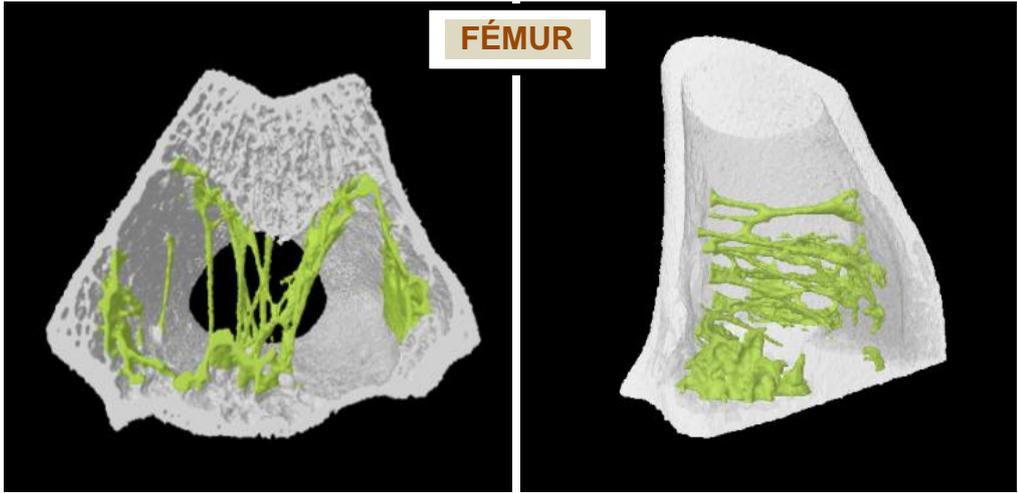


Fig. 22: Modelos tridimensionales del VOI trabecular de fémur

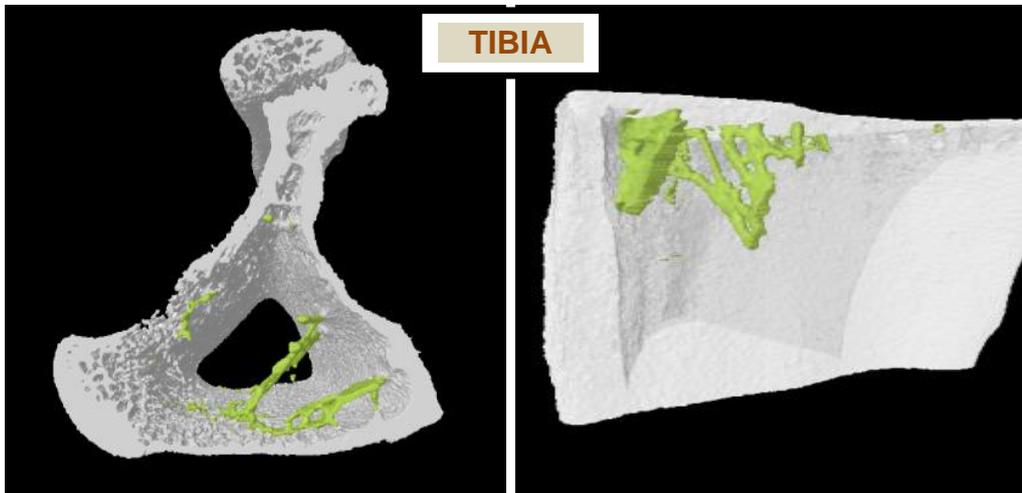


Fig. 23: Modelos tridimensionales del VOI trabecular de tibia

ZONA TRABECULAR: GRUPO IV (NARINGENINA)

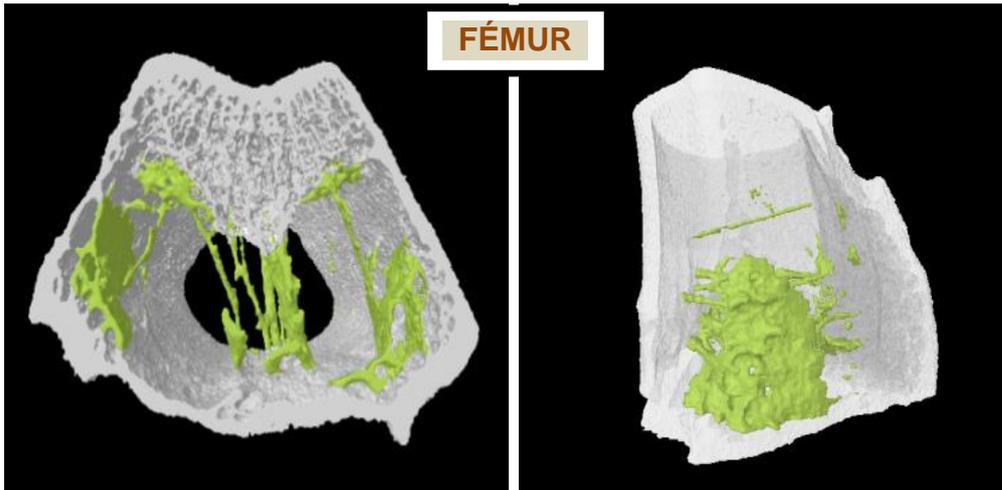


Fig. 24: Modelos tridimensionales del VOI trabecular de fémur

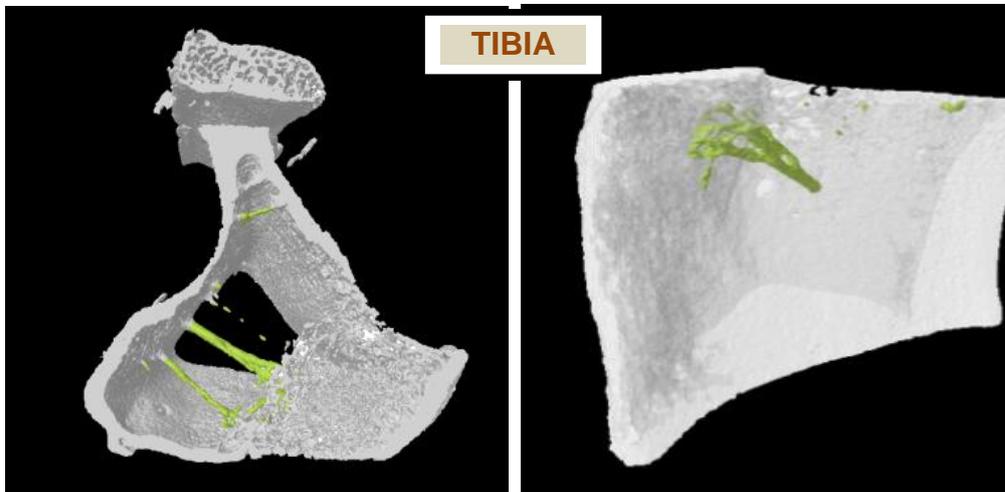


Fig. 25: Modelos tridimensionales del VOI trabecular de tibia

ZONA CORTICAL: GRUPO I (CONTROL)

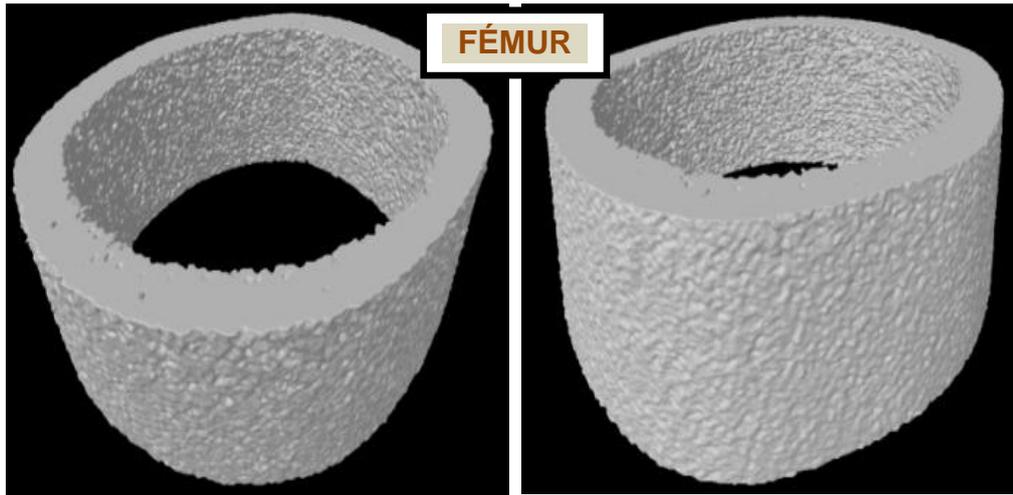


Fig. 26: Modelos tridimensionales del VOI cortical de fémur

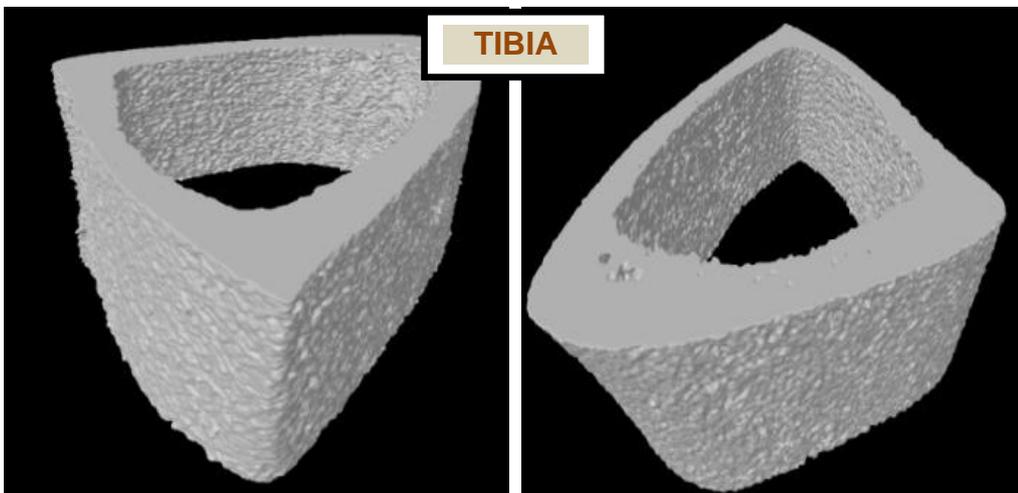


Fig. 27: Modelos tridimensionales del VOI cortical de tibia

ZONA CORTICAL: GRUPO II (OVX)

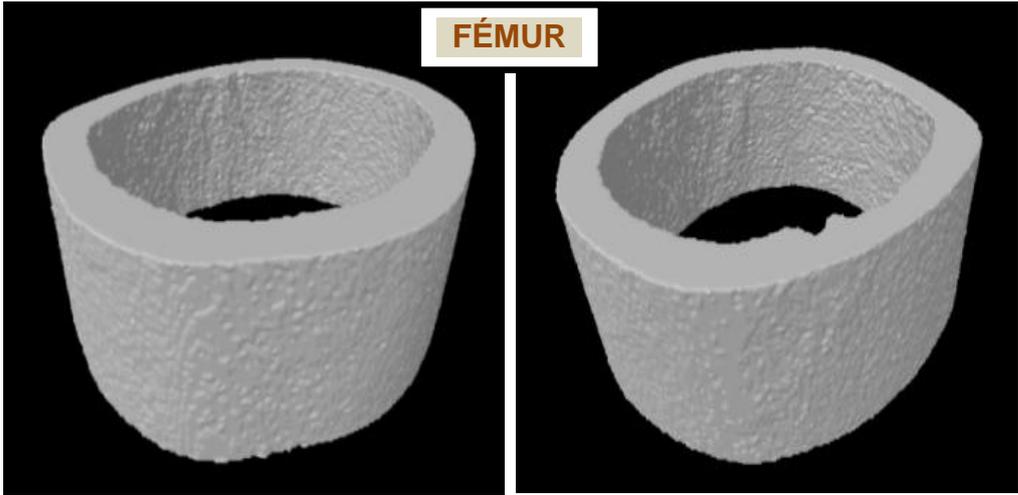


Fig. 28: Modelos tridimensionales del VOI cortical de fémur

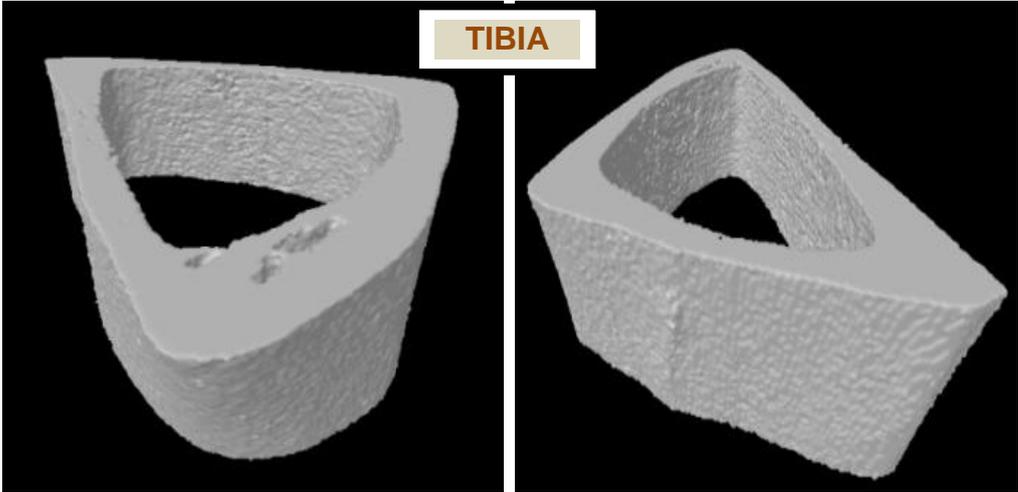


Fig. 29: Modelos tridimensionales del VOI cortical de tibia

ZONA CORTICAL: GRUPO III (APIGENINA)

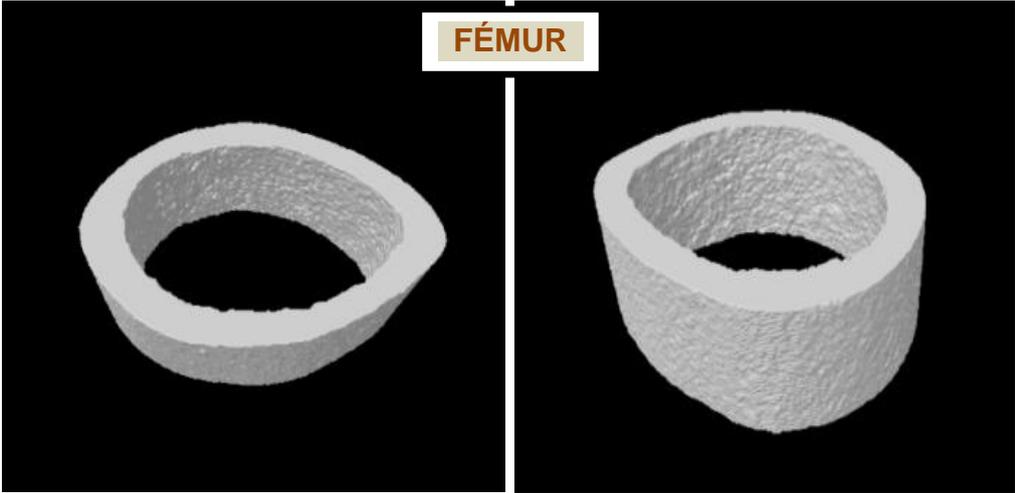


Fig. 30: Modelos tridimensionales del VOI cortical de fémur

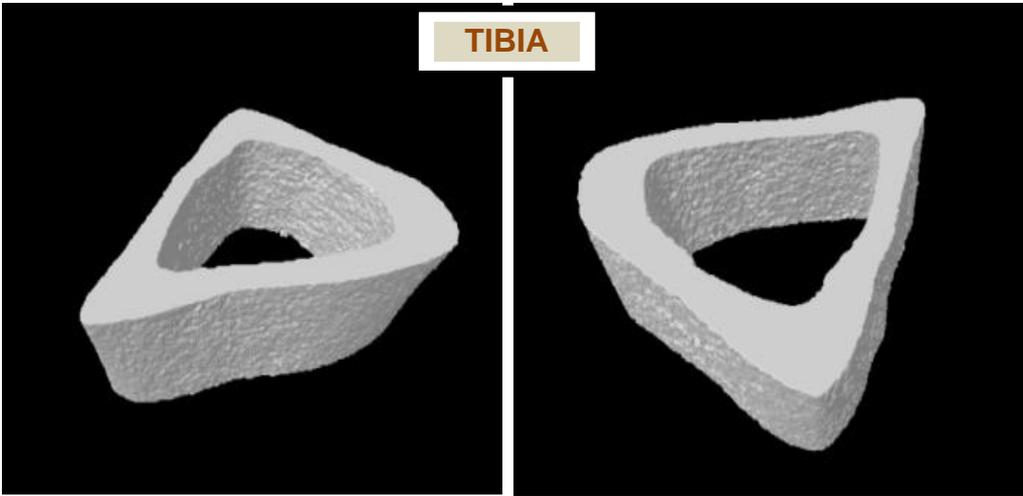


Fig. 31: Modelos tridimensionales del VOI cortical de tibia

ZONA CORTICAL: GRUPO IV (NARINGENINA)

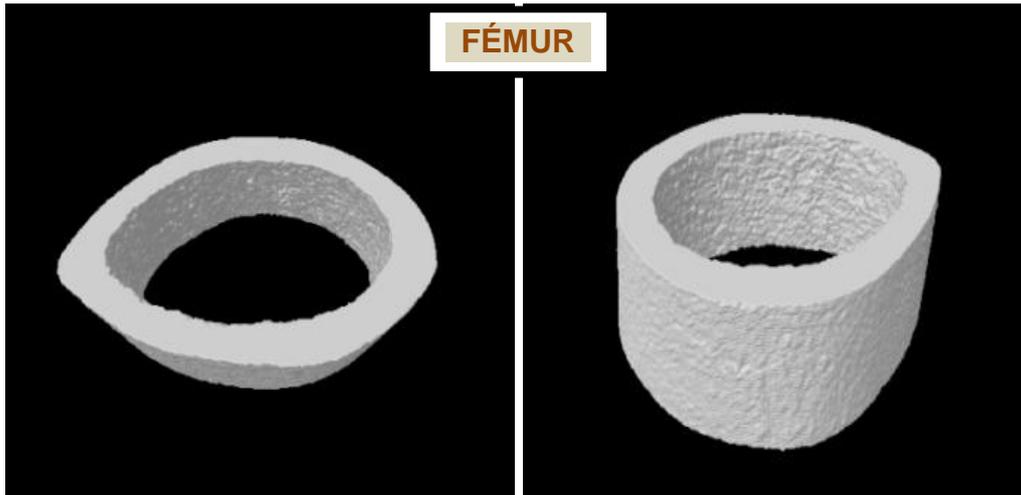


Fig. 32: Modelos tridimensionales del VOI cortical de fémur

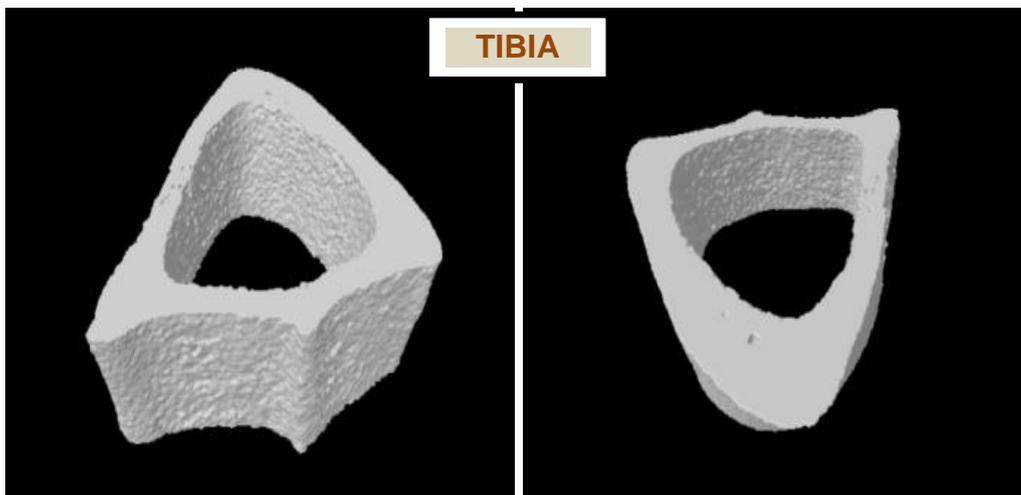


Fig. 33: Modelos tridimensionales del VOI cortical de tibia

Imágenes del microtomógrafo de rayos x modelo skyscan 1076

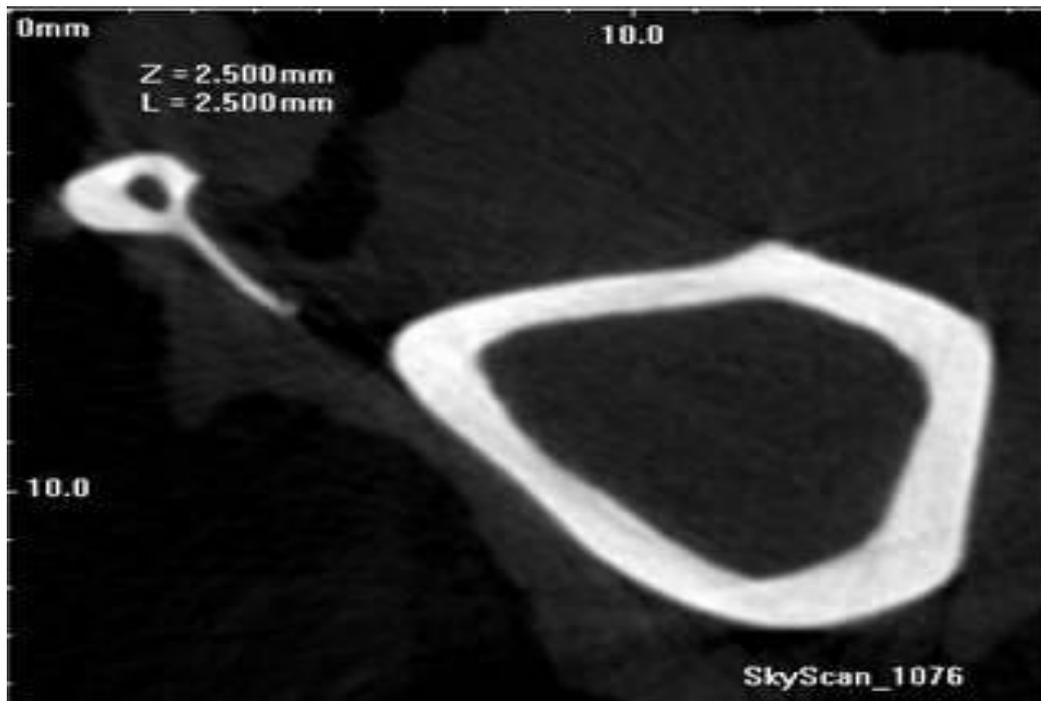


Fig.34: Estructura cortical ósea de fémur, grupo I (Control)

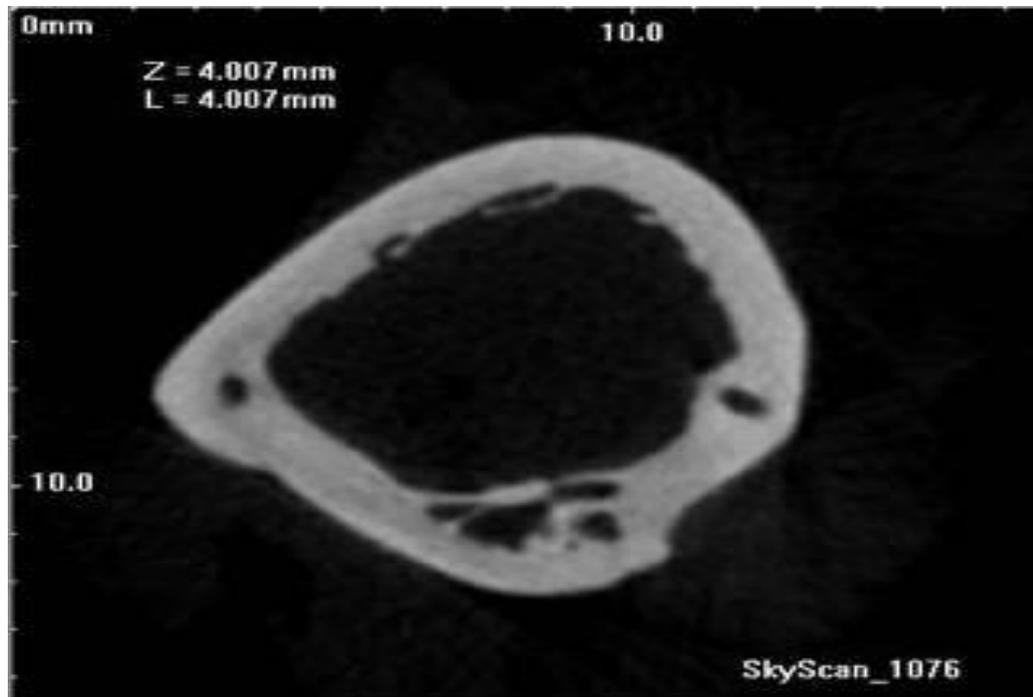


Fig.35: Estructura cortical ósea de fémur, grupo II (ovx)

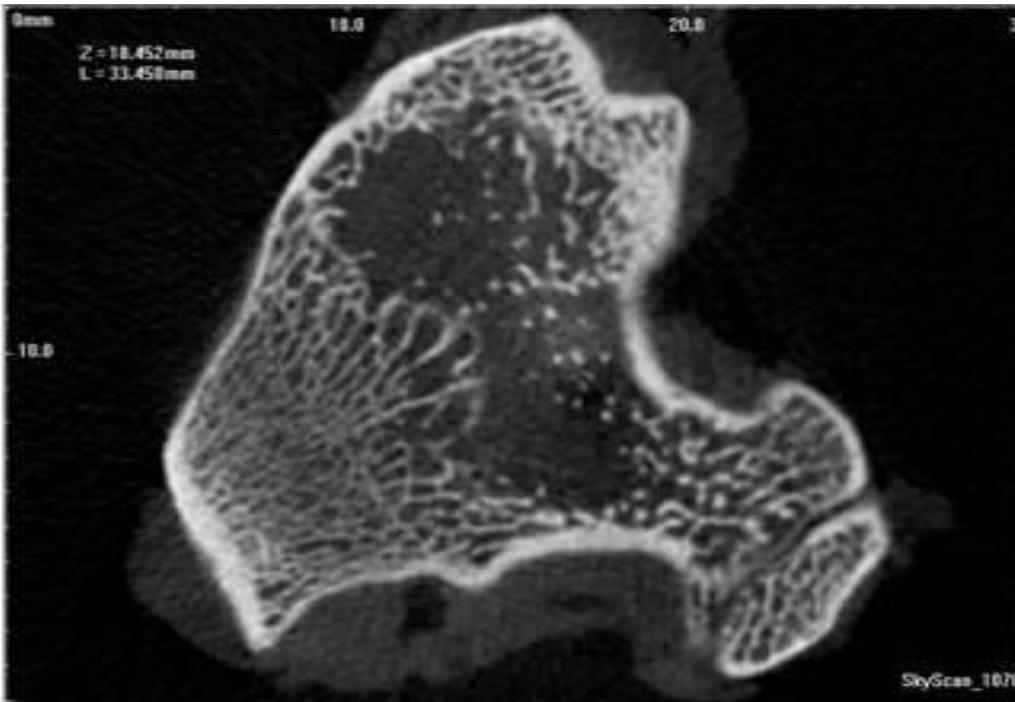


Fig.36: Tibia, grupo I (Control).

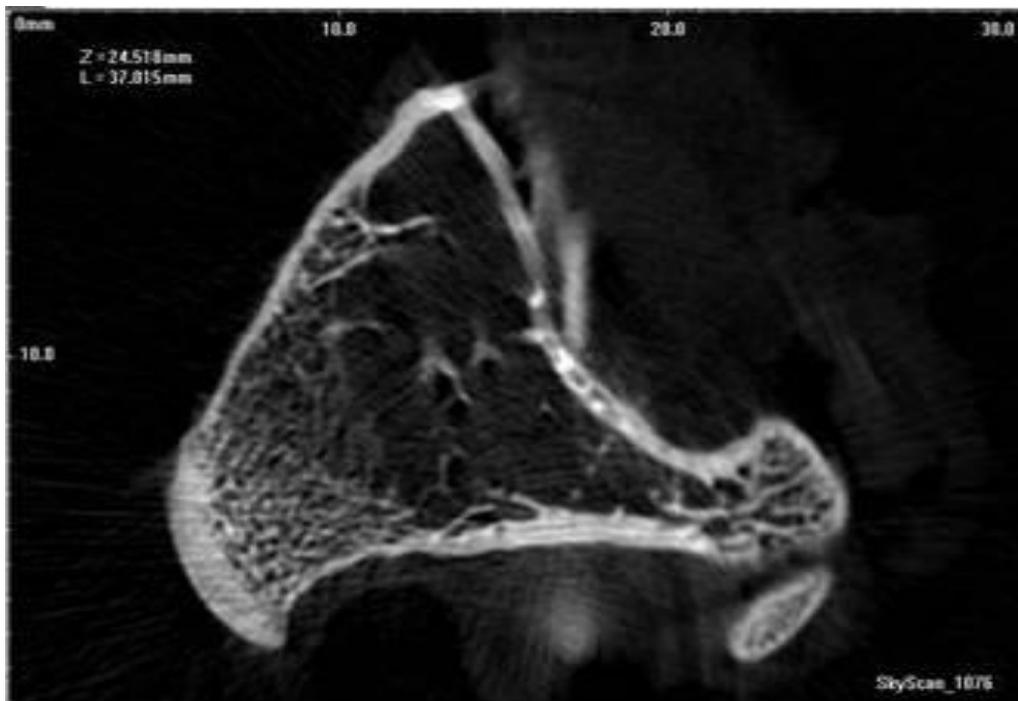


Fig.37: Tibia, grupo II (ovx).

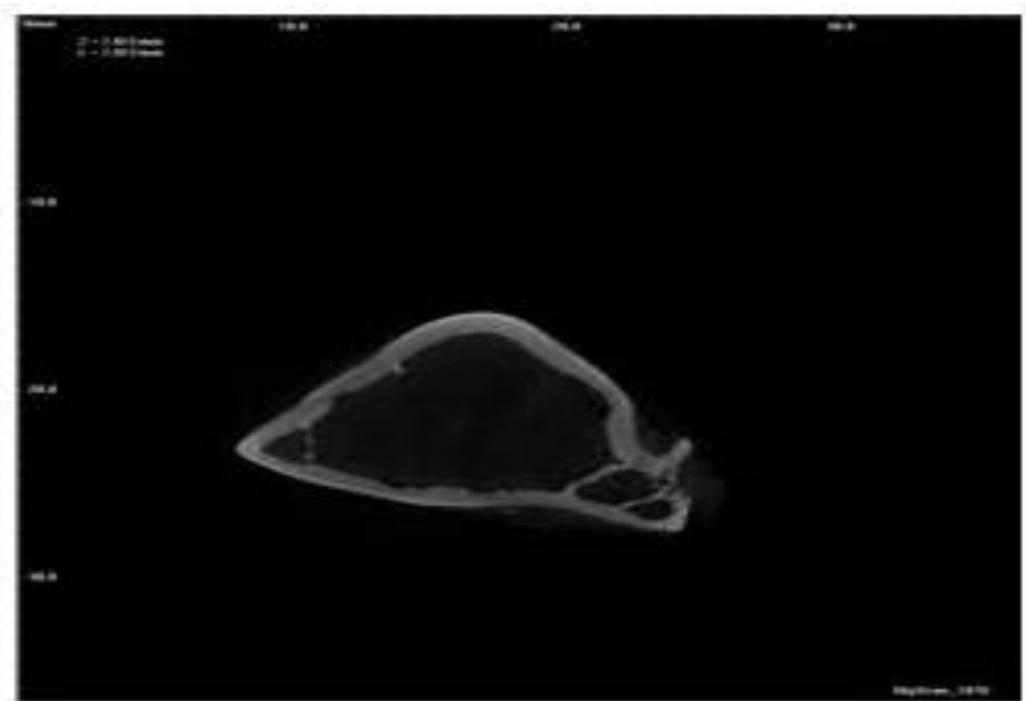


Fig.38: Tibia, grupo III (apigenina potásica). 1076

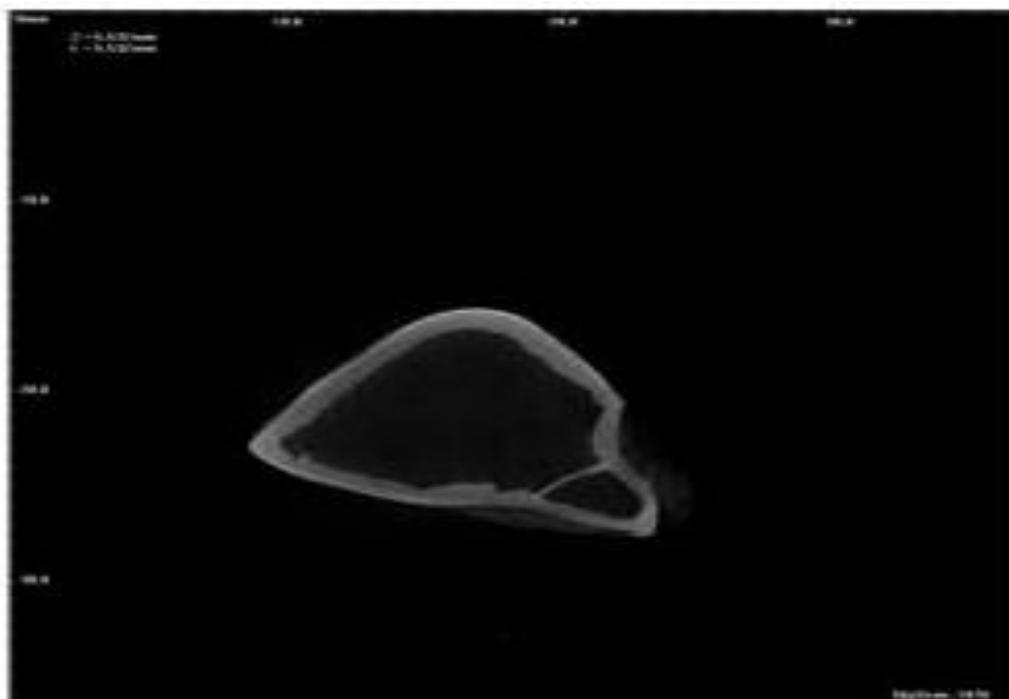


Fig.39: Tibia, grupo IV (naringenina potásica).

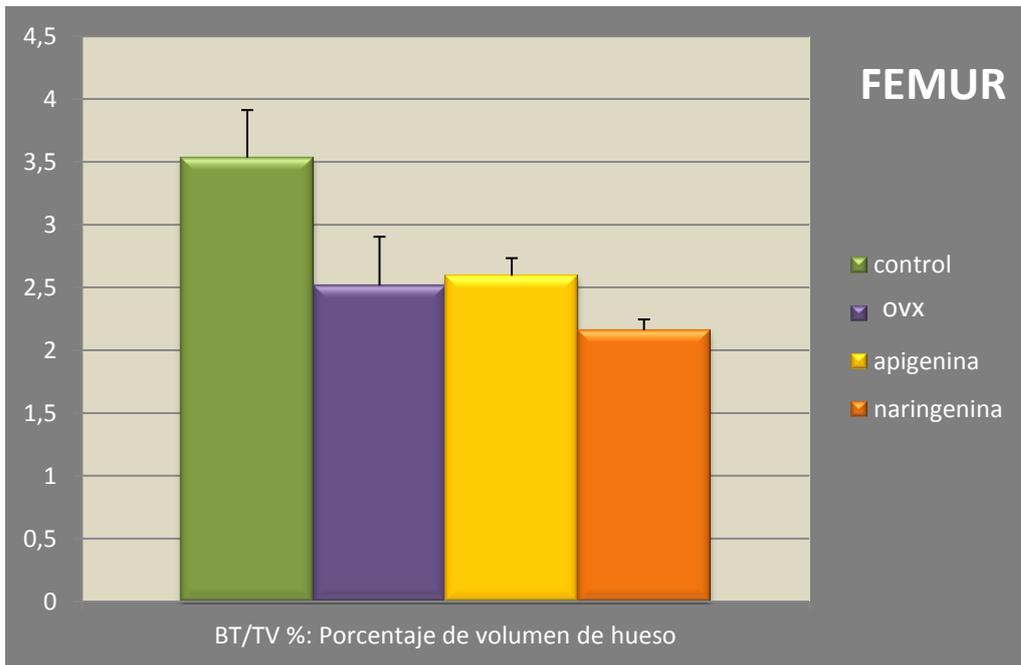


Tabla 20: Porcentaje de volumen de hueso en fémur

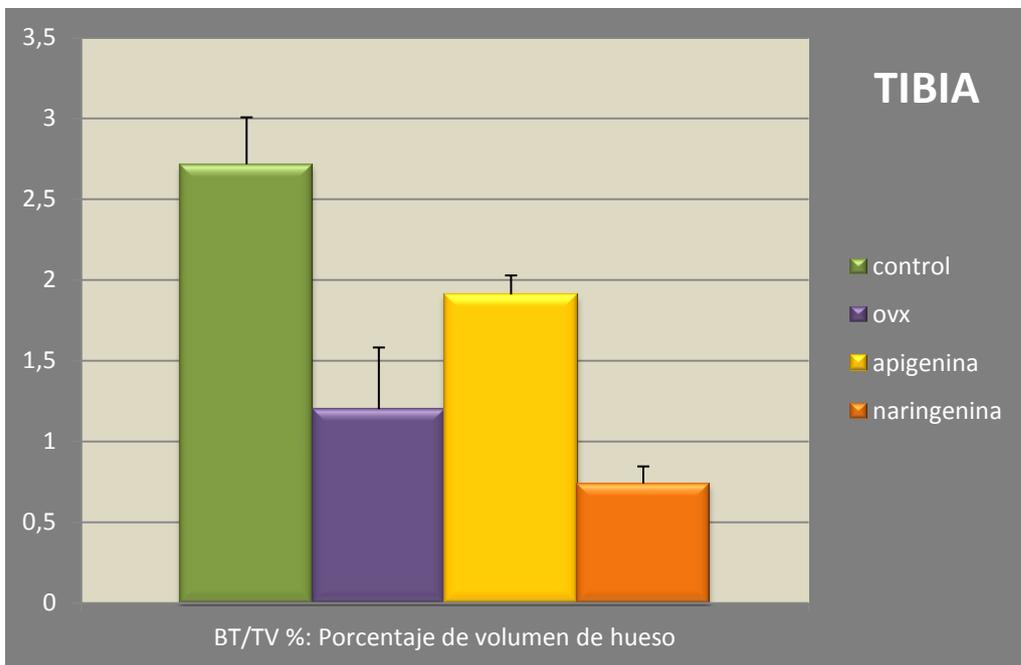


Tabla 21: Porcentaje de volumen de hueso en tibia

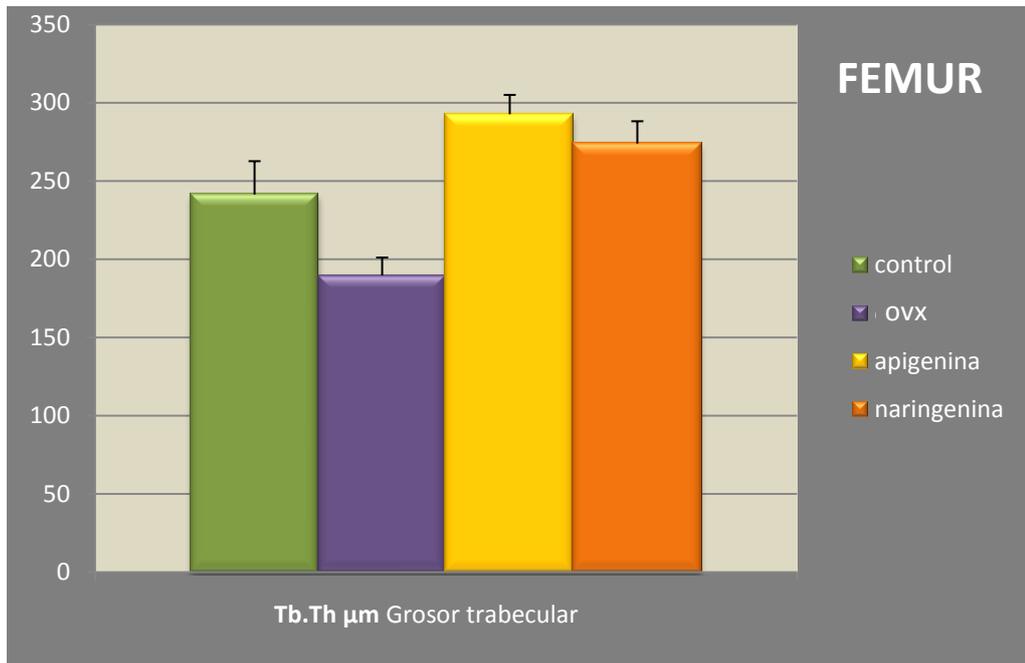


Tabla 22: Grosor trabecular en fémur

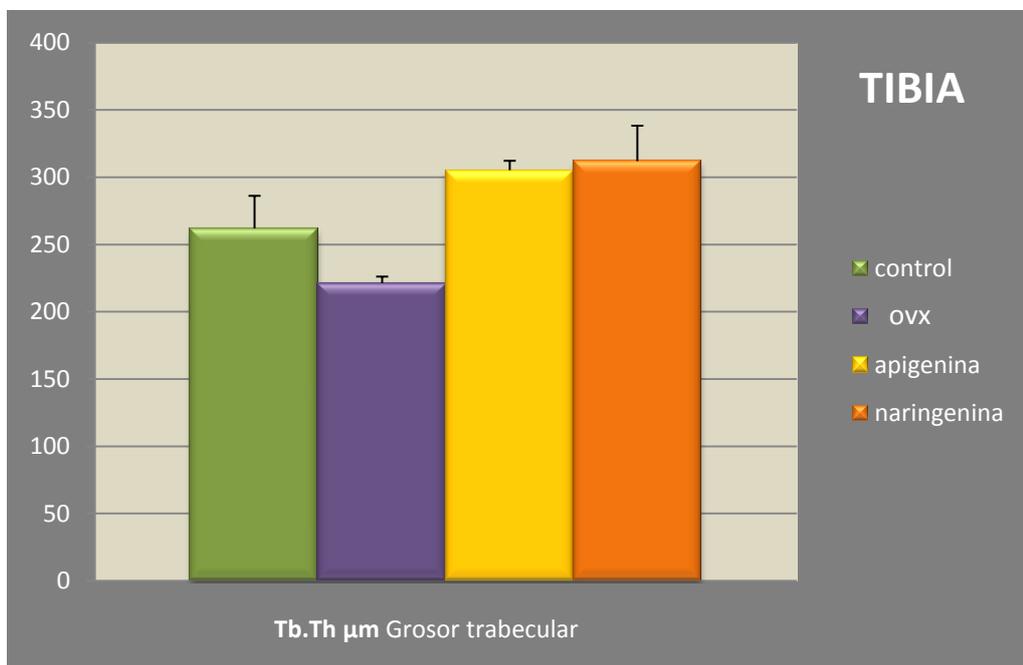


Tabla 23: Grosor trabecular en tibia

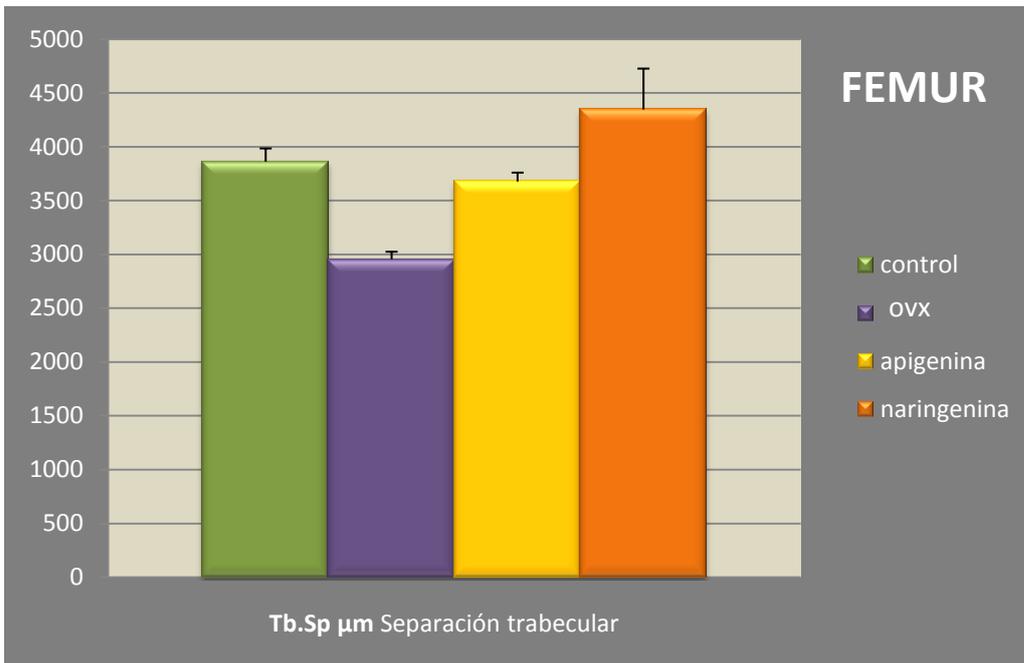


Tabla 24: Separación trabecular en fémur

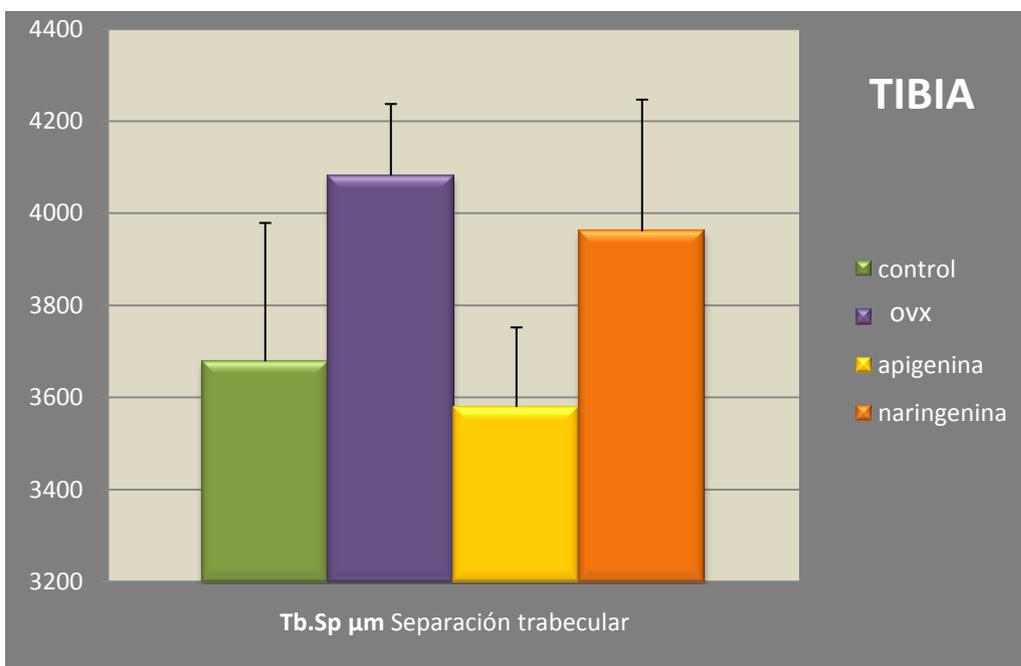


Tabla 25: Separación trabecular en tibia

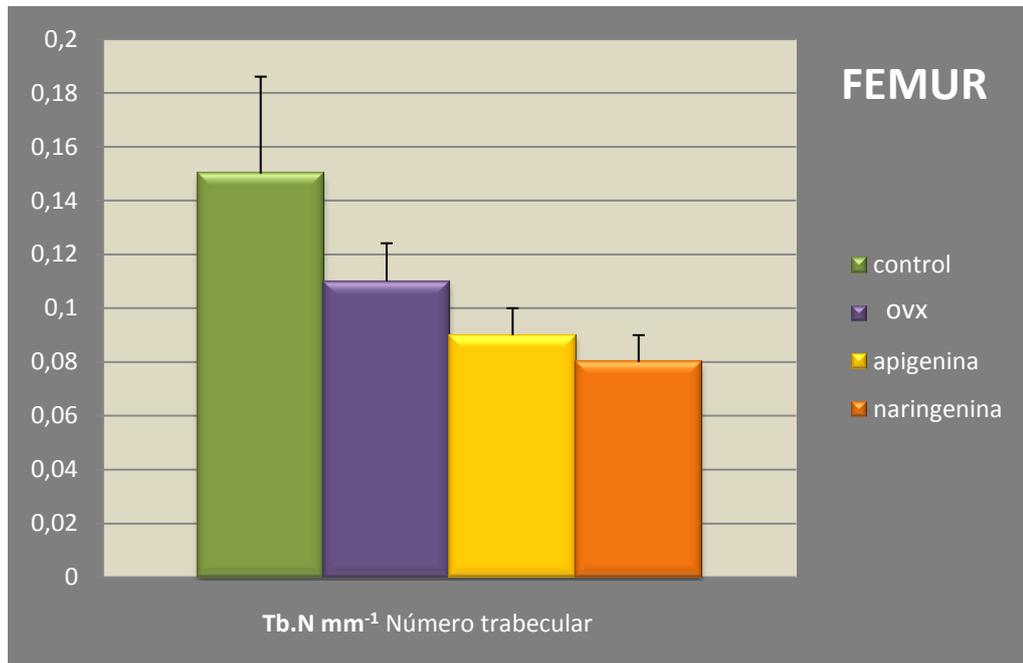


Tabla 26: Número trabecular en fémur

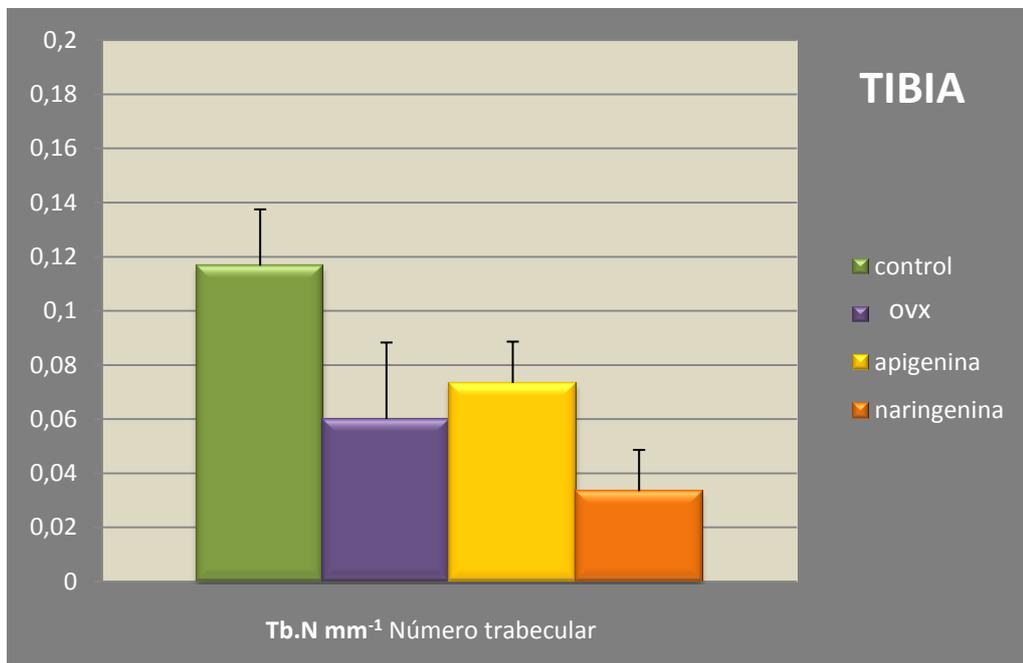


Tabla 27: Número trabecular en tibia

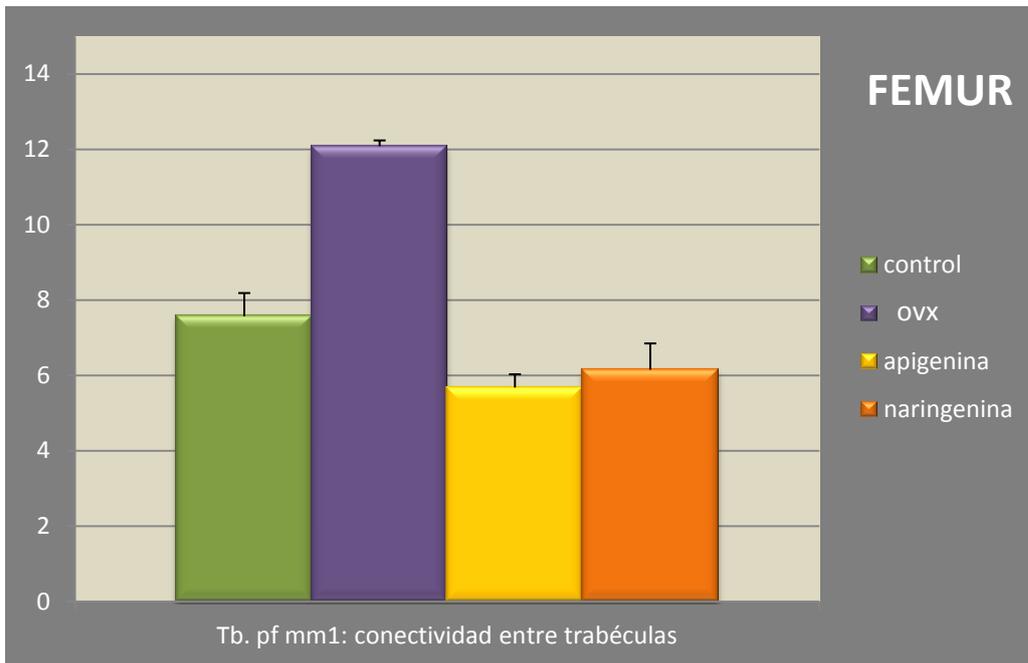


Tabla 28: Conectividad entre trabéculas en fémur

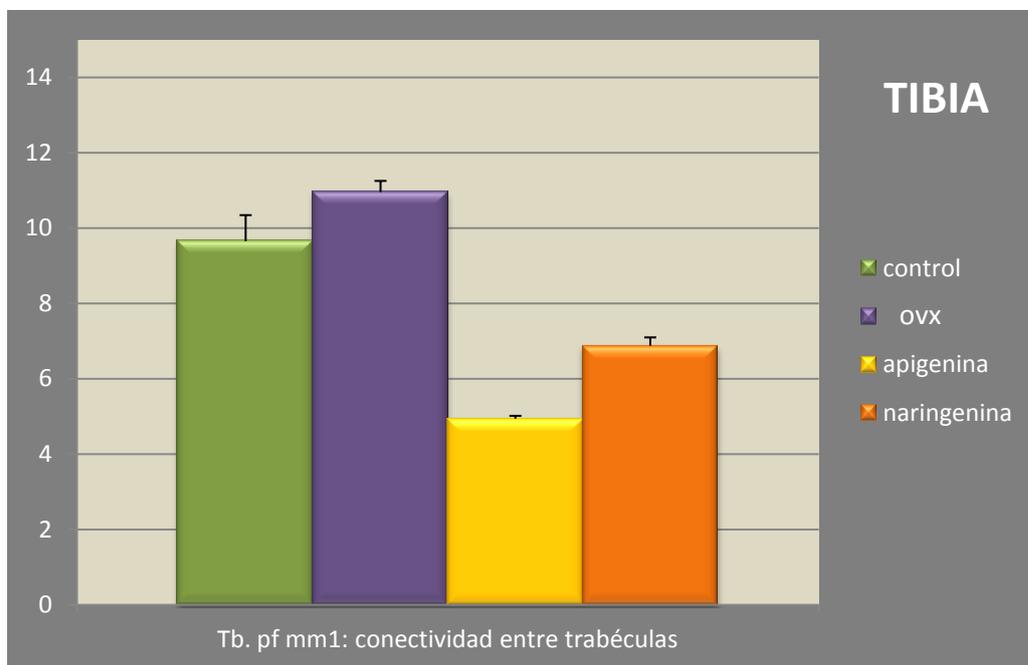


Tabla 29: Conectividad entre trabéculas en tibia

Estudio anatomopatológico: microscopio óptico

Los resultados más relevantes del estudio histopatológico realizado de los fémures y tibias de todos los animales utilizados en el experimento, a nivel de las zonas epifisarias, tanto cortical como trabecular, corresponden a:

En el grupo II (ovariectomizado), destacaba, respecto al grupo I (control), la disminución de la masa ósea caracterizada fundamentalmente por la reducción del número y tamaño de las trabéculas óseas con alteración de las conexiones entre ellas así como, la expansión de los espacios intertrabeculares que mostraban imágenes de perforación trabecular por resorción osteoclástica. Dicha falta de conexión trabecular originaba en algunas zonas una imagen de aislamiento de las trabéculas individualizadas.

En los grupos tratados con apigenina y con naringenina) potásicas, se observó menor disminución de la masa ósea así como de la desconexión entre las trabéculas; siendo muy llamativo, el aumento de grosor de las mismas y los fenómenos de regeneración ósea caracterizados por áreas laminales de depósitos de material osteoide que se disponían de forma superpuesta, de modo semejante al característico de la remodelación de las trabéculas óseas, respecto a los grupos controles.

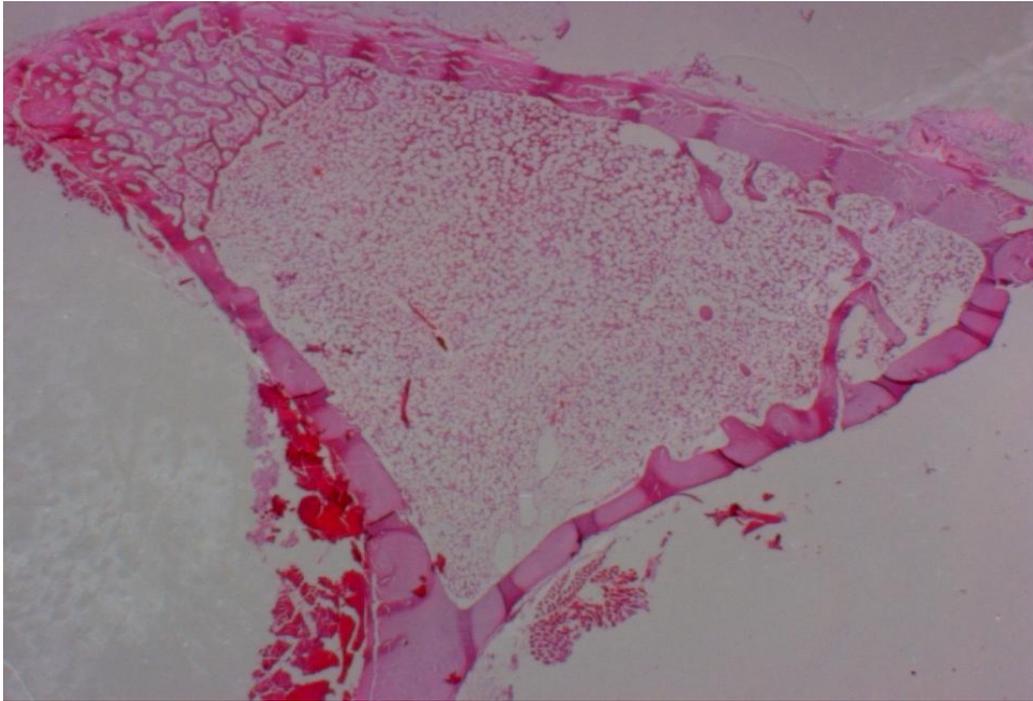


Fig. 40: Sección histológica: Tibia, grupo I (Control).Hematoxilina-eosina. 0,57x.

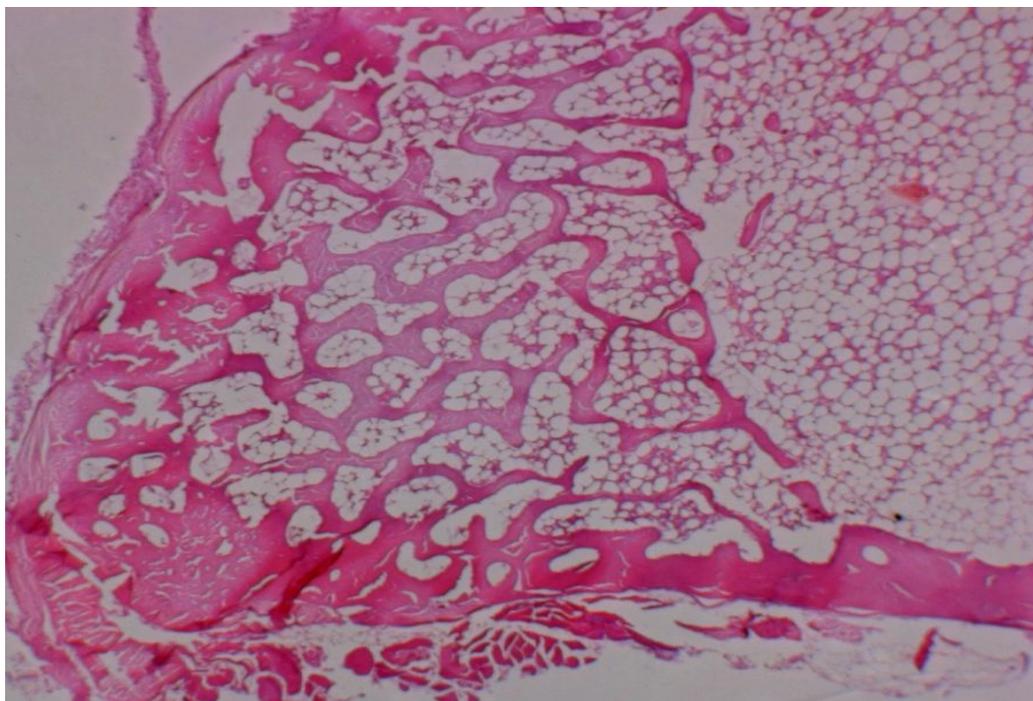


Fig.41: Detalle de la anterior.H.E.1,25 x

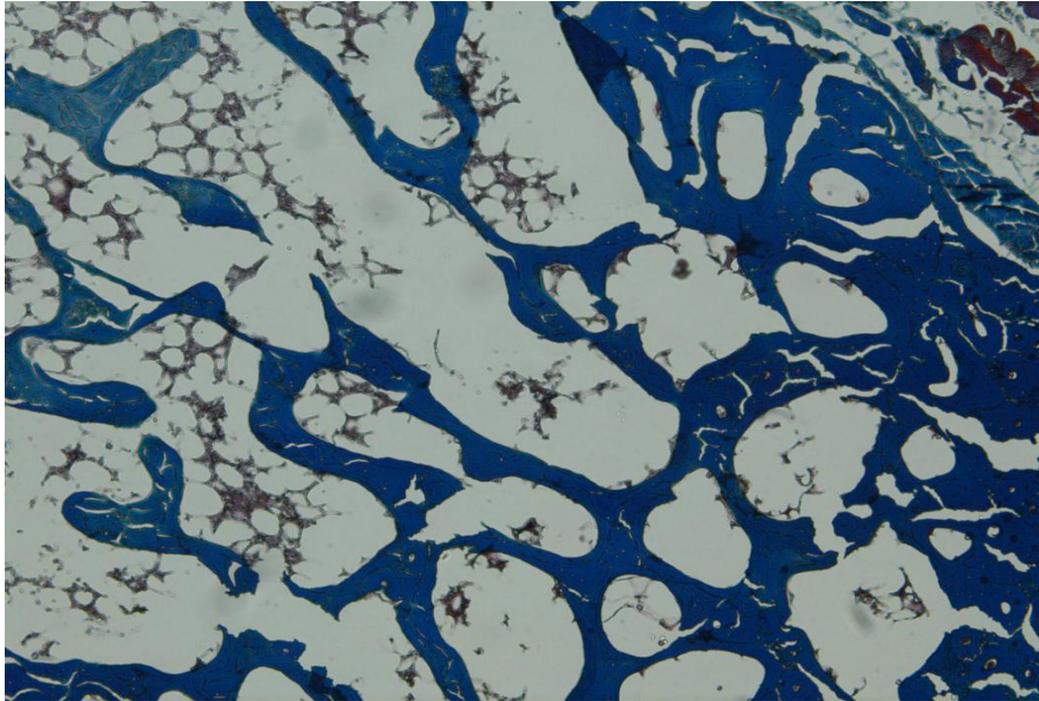


Fig. 42: Sección histológica: Fémur, grupo I (Control). Tricrómico de Masson. 5x.

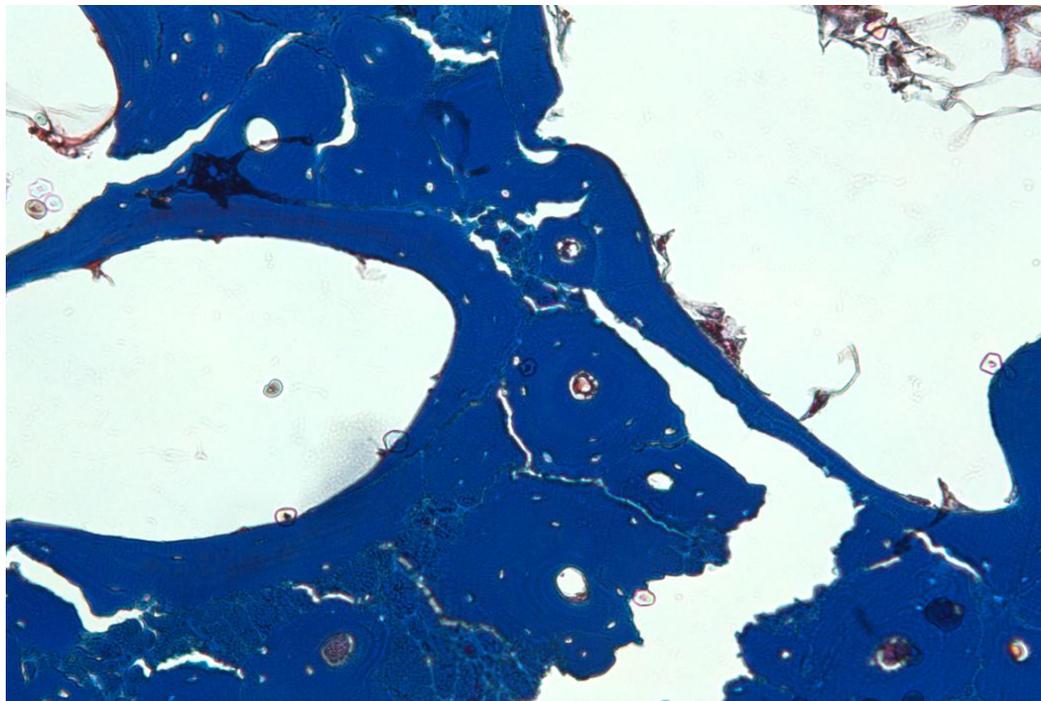


Fig. 43: Detalle de la anterior. T.M. 20x

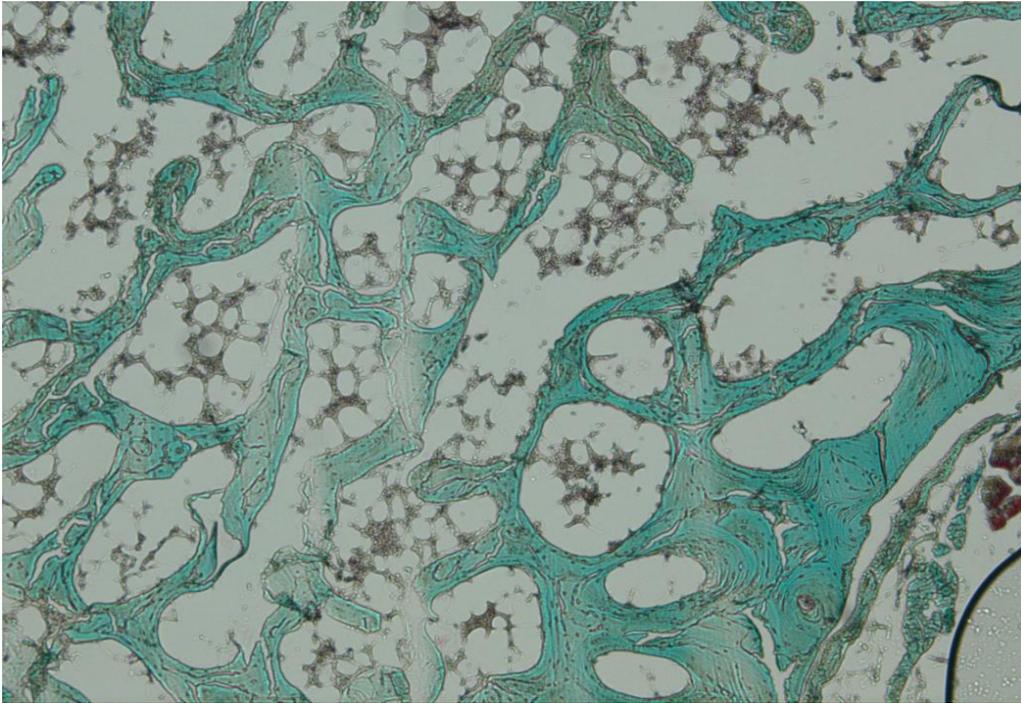


Fig. 44: Sección histológica: Fémur grupo I (Control). Tricrómico de Gomori.5x

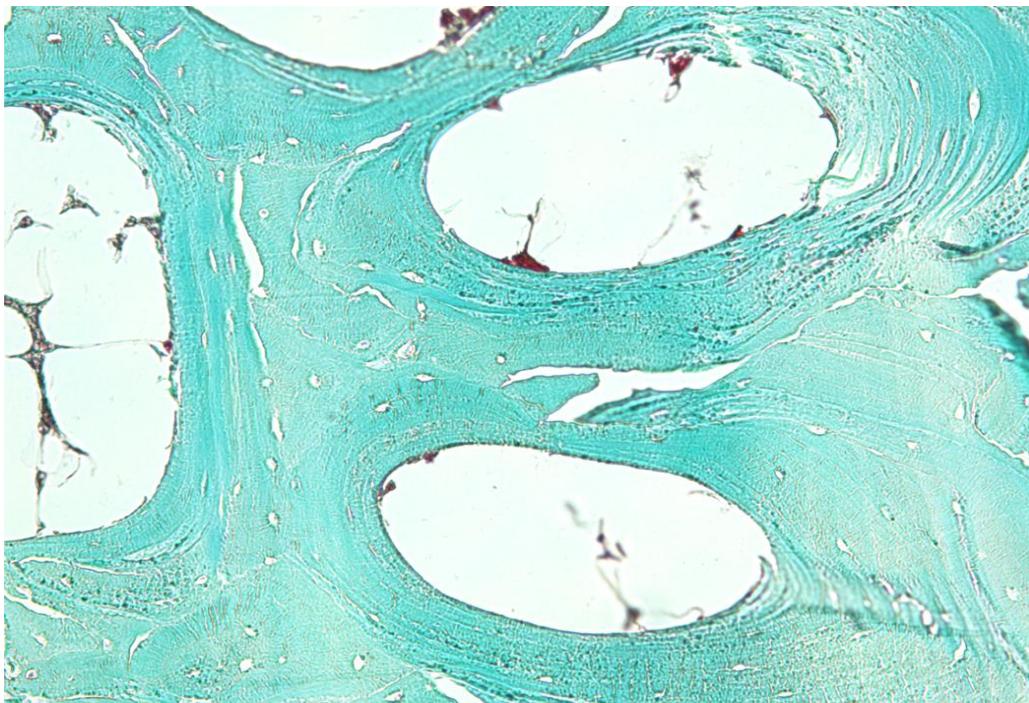


Fig. 45: Detalle de la anterior. T.G. 20x



Fig. 46: Sección histológica: Tibia, grupo I (Control). Gomori para reticulina. 5x

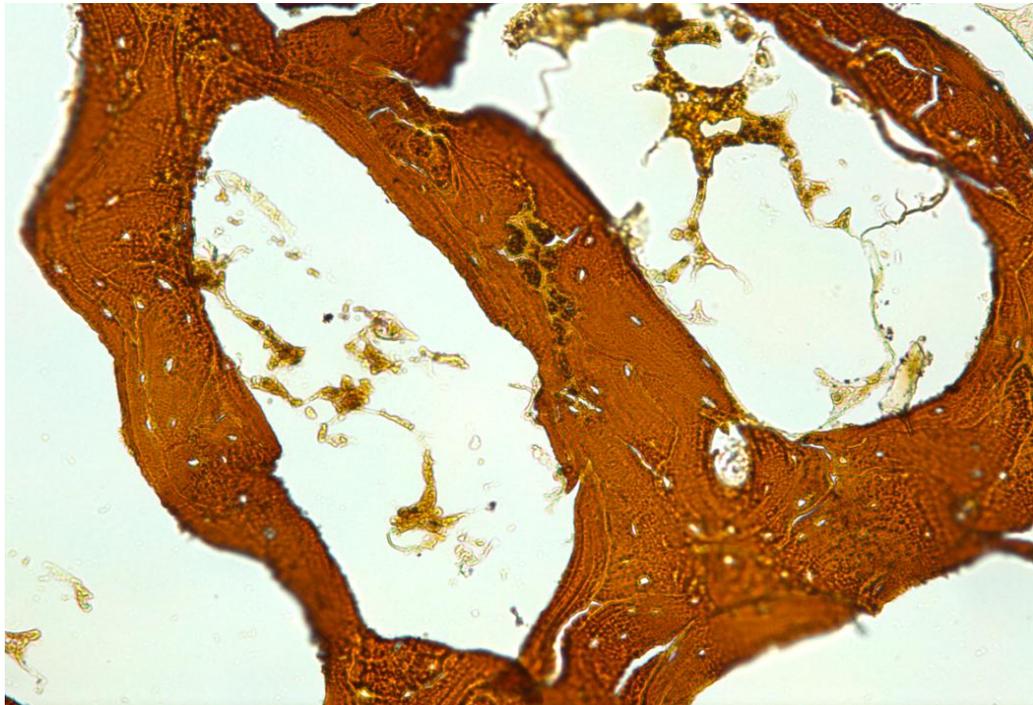


Fig. 47: Detalle de la anterior. G.R. 20x

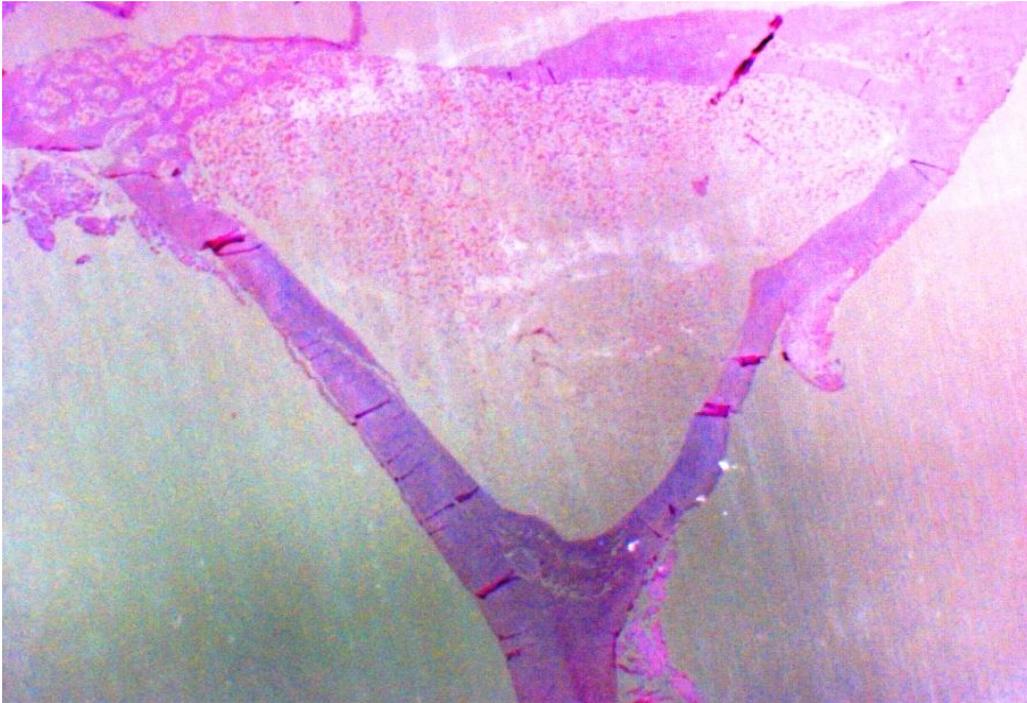


Fig. 48: Sección histológica: Tibia, grupo II (ovx). Hematoxilina-eosina. 0,57x.

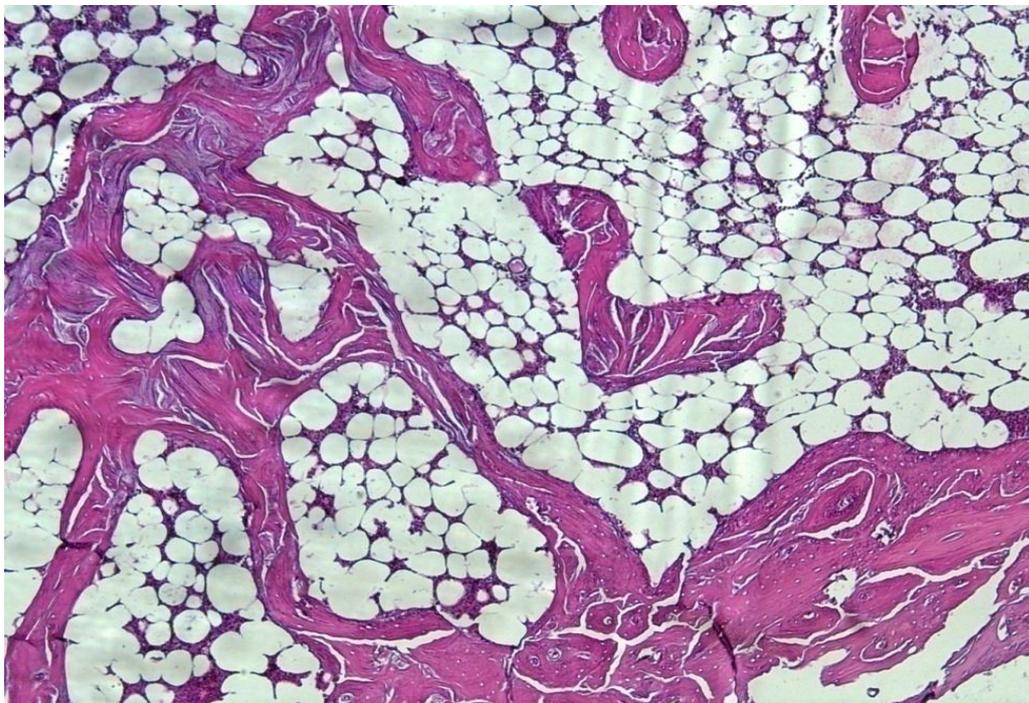


Fig.49: Detalle de la anterior.H.E.1,25x

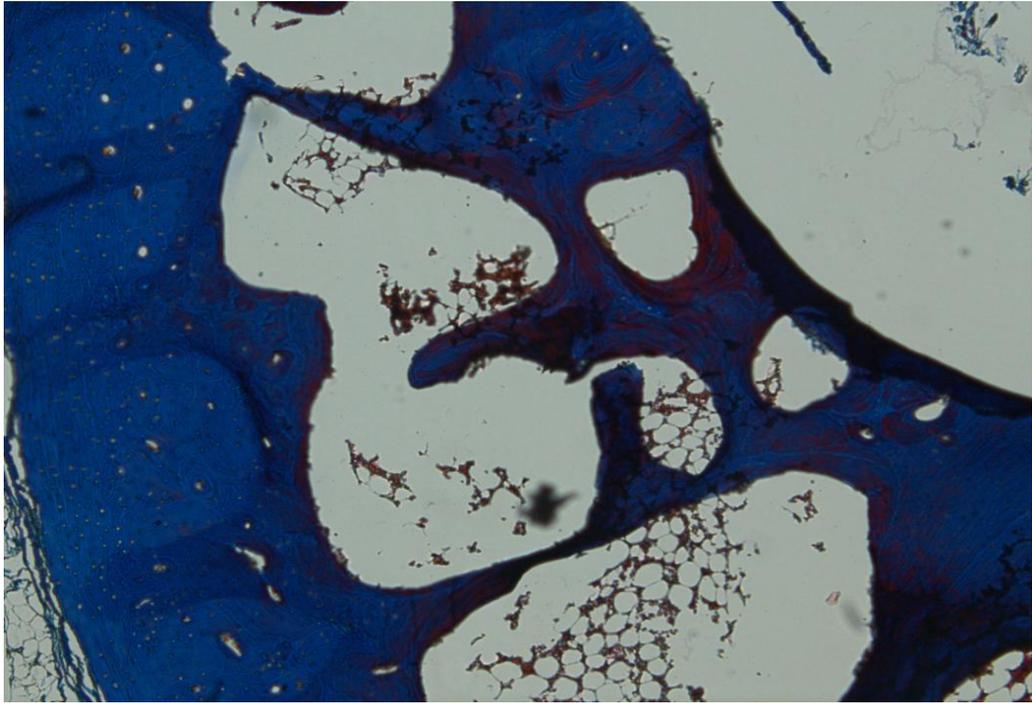


Fig. 50: Sección histológica: Fémur, grupo II (ovx). Tricrómico de Masson 5x.

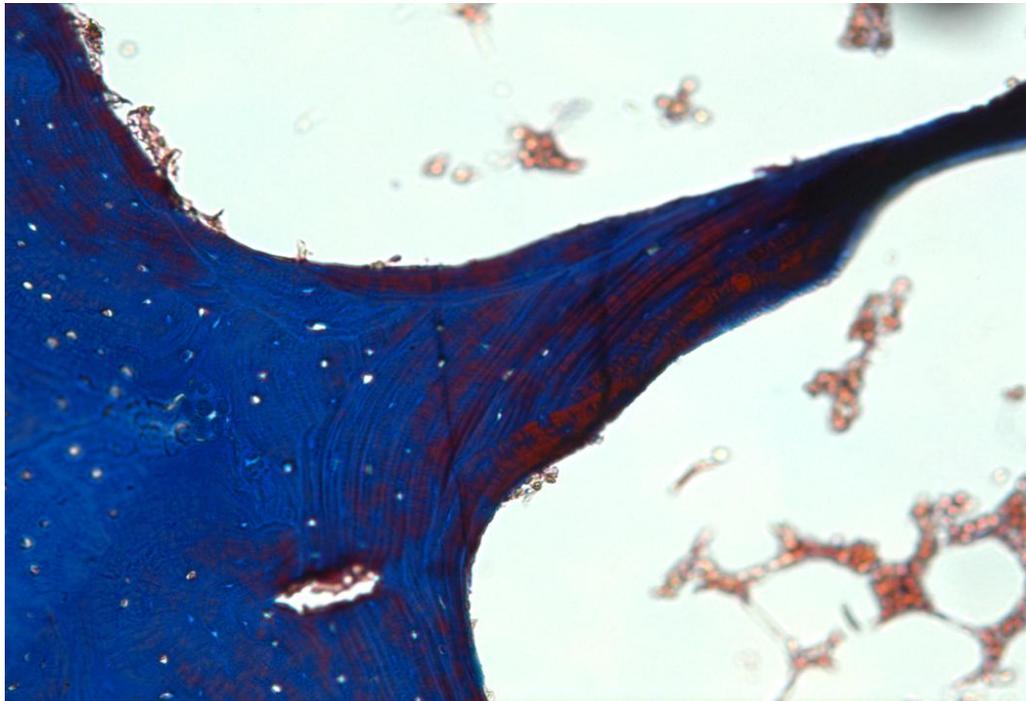


Fig. 51: Detalle de la anterior. T.M. 20x

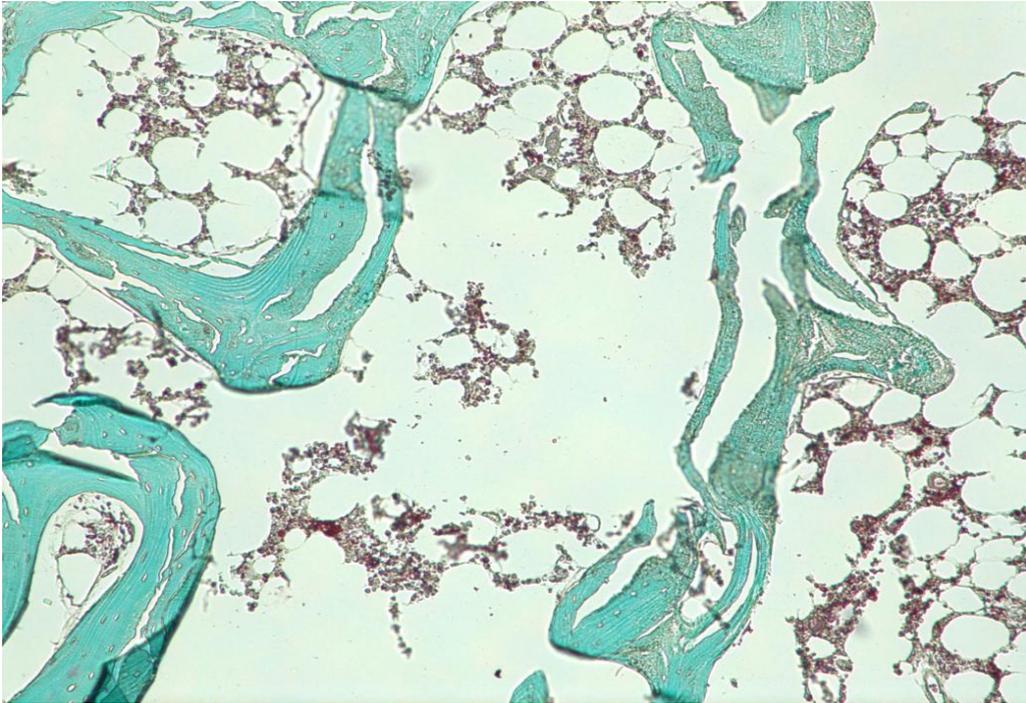


Fig. 52: Sección histológica: Tibia, grupo II (ovx). Tricrómico de Gomori. 5x.

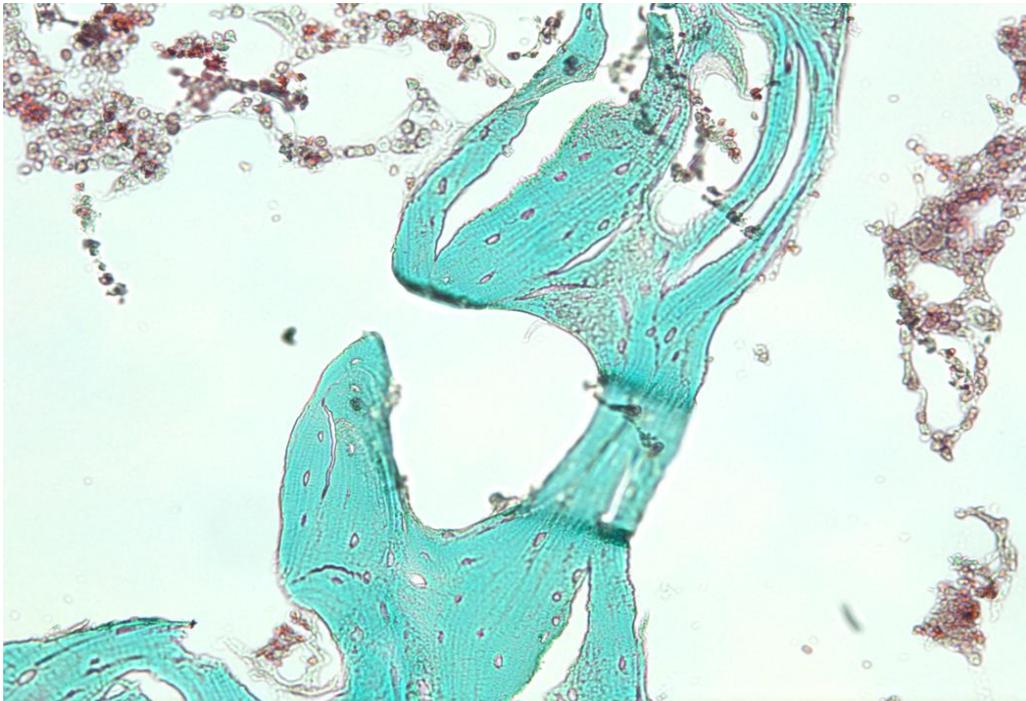


Fig. 53: Detalle de la anterior. T.G. 20x

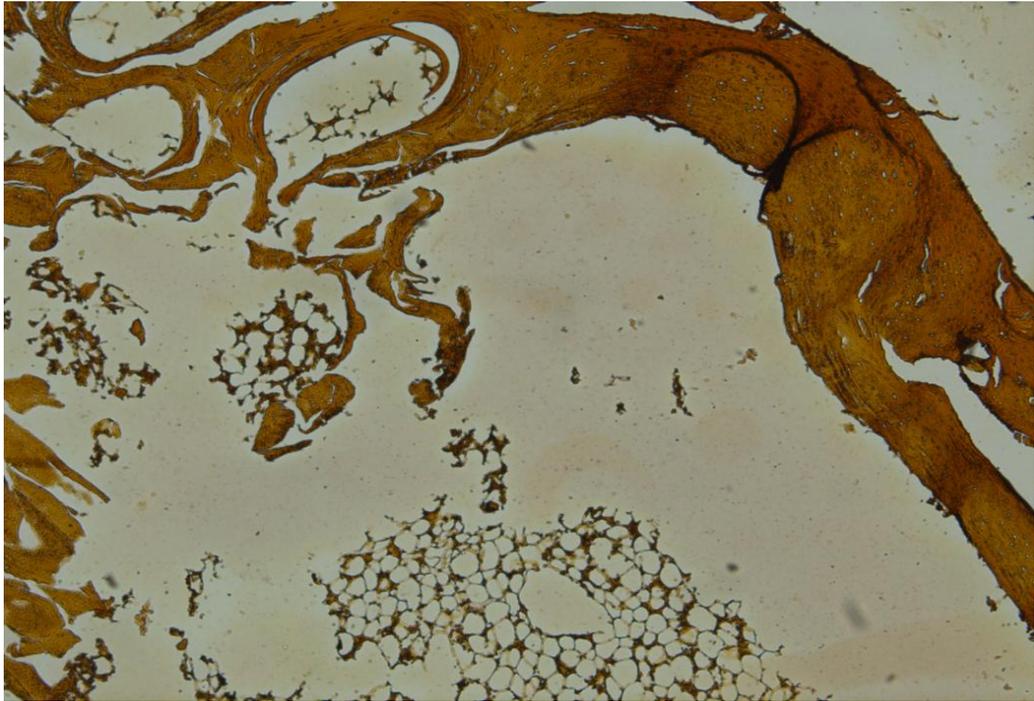


Fig. 54: Sección histológica: Fémur, grupo II (ovx). Gomori para reticulina. 5x.

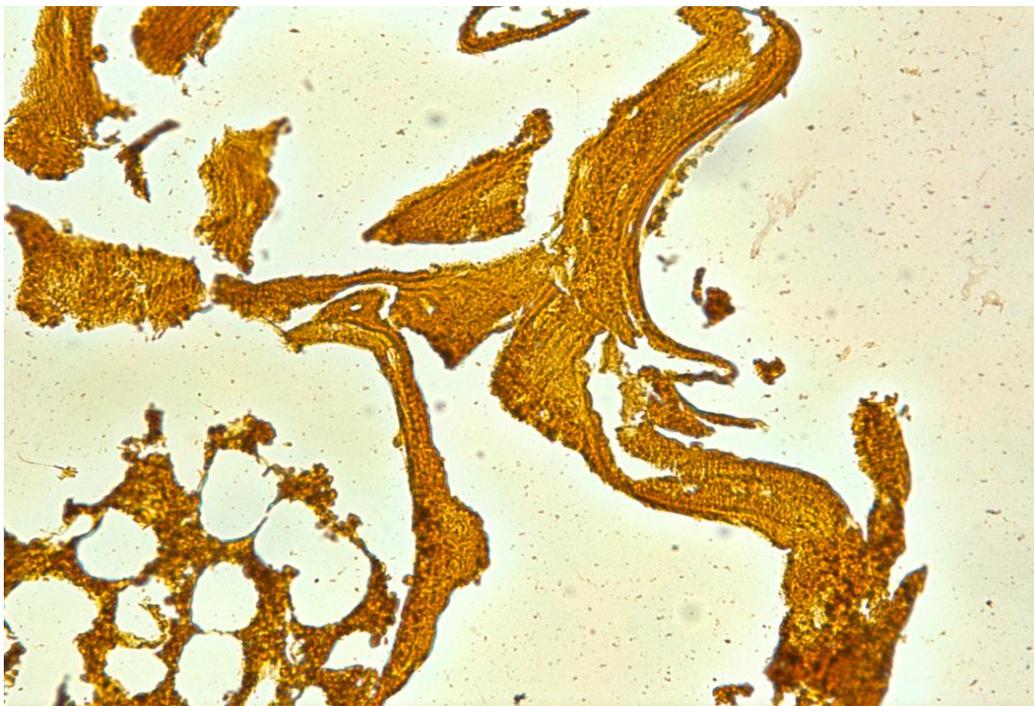


Fig. 55: Detalle de la anterior. G.R. 20x

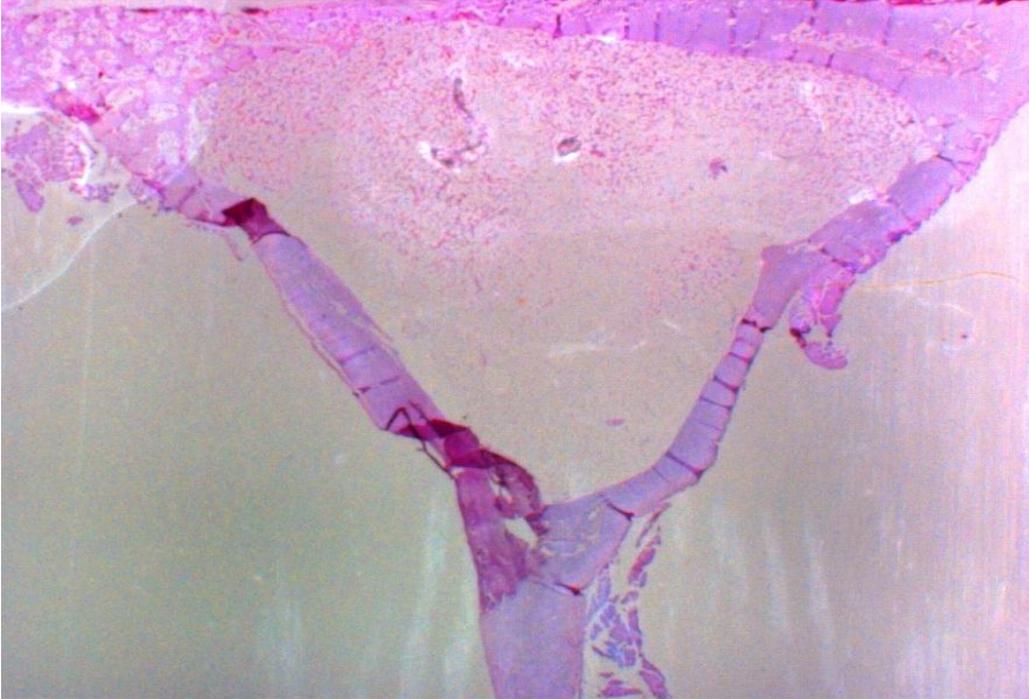


Fig. 56: Sección histológica: Tibia, grupo III (Apigenina potásica). Hematoxilina-eosina.0,57x.

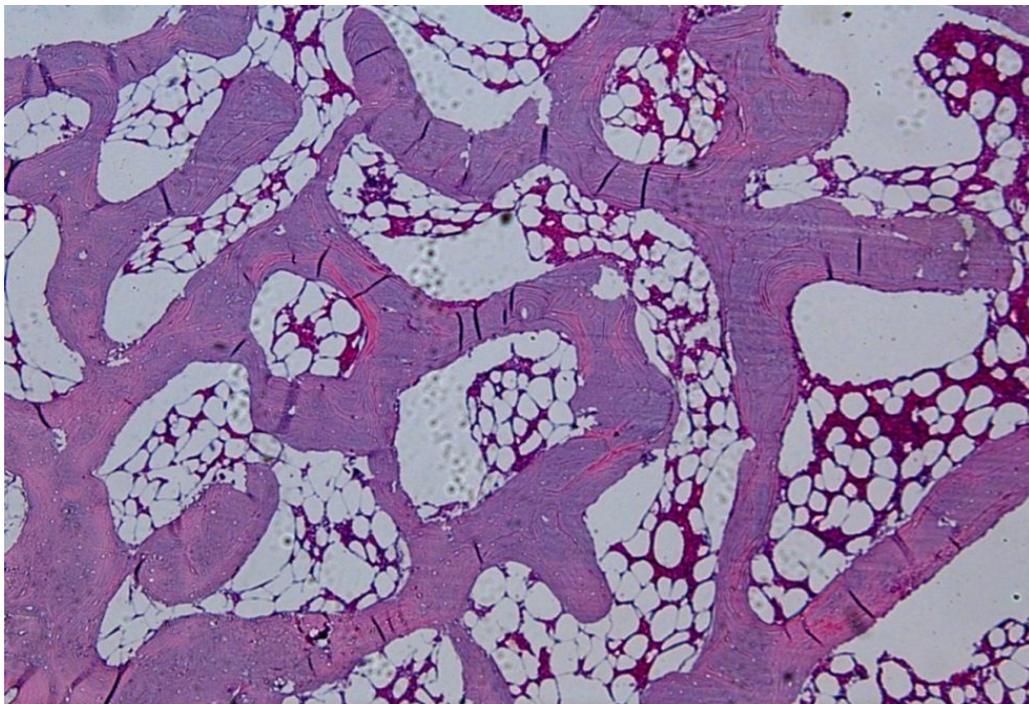


Fig.57: Detalle de la anterior. H.E. 5x

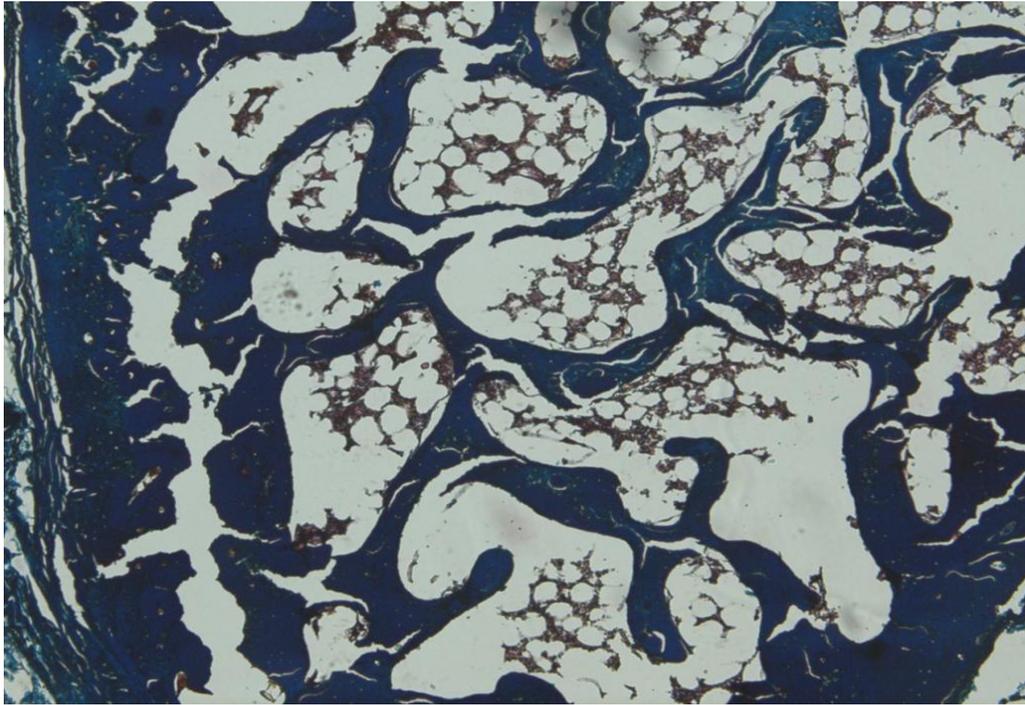


Fig. 58: Sección histológica: Fémur, grupo III (Apigenina potásica). Tricrómico de Masson 5x.



Fig. 59: Detalle de la anterior. T.M. 20x

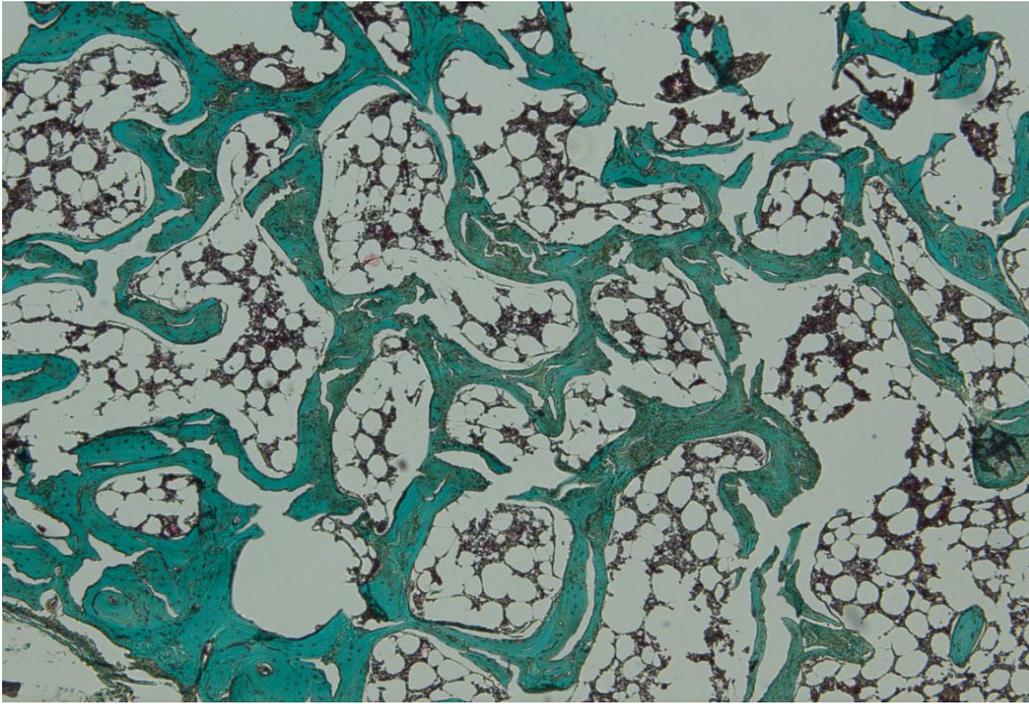


Fig. 60: Sección histológica: Tibia, grupo III (Apigenina potásica). Tricrómico de Gomori. 5x.

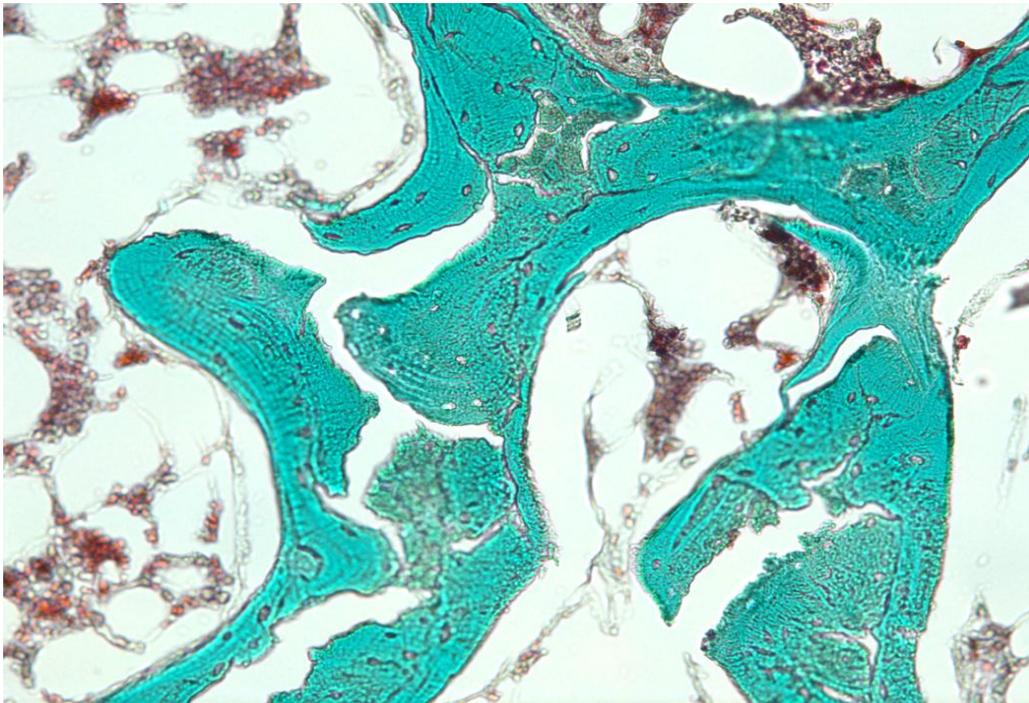


Fig. 61: Detalle de la anterior. T.G. 20x



Fig. 62: Sección histológica: Fémur, grupo III (Apigenina potásica). Gomori para reticulina 5x.



Fig. 63: Detalle de la anterior. G.R. 20x

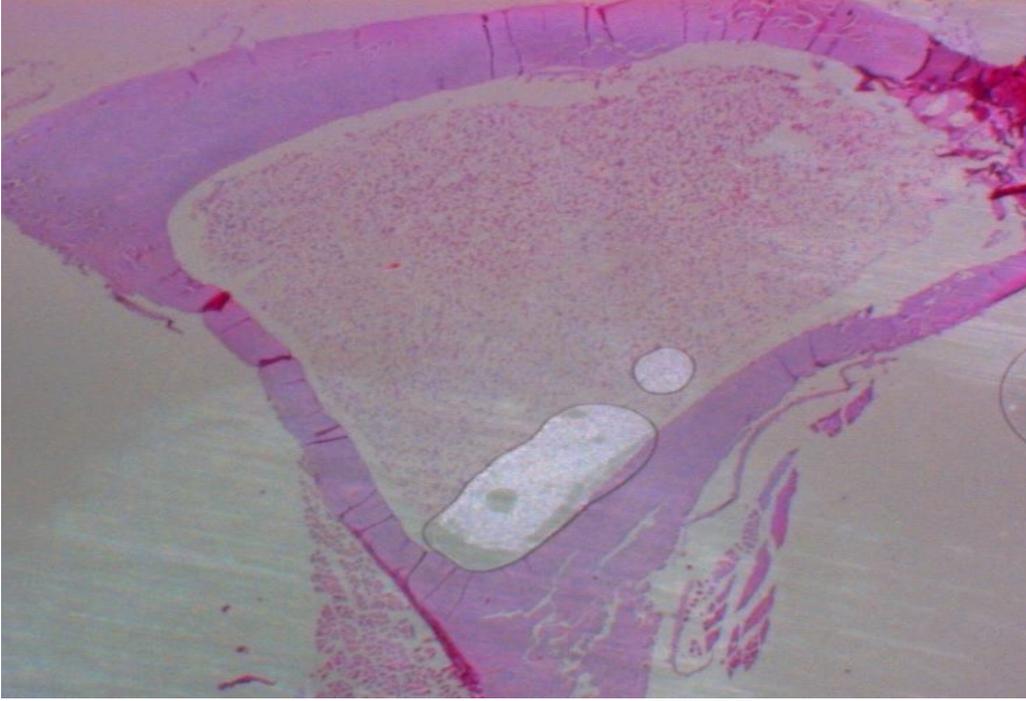


Fig. 64: Sección histológica: Tibia, grupo IV (Naringenina potásica). Hematoxilina-eosina.0,57x.

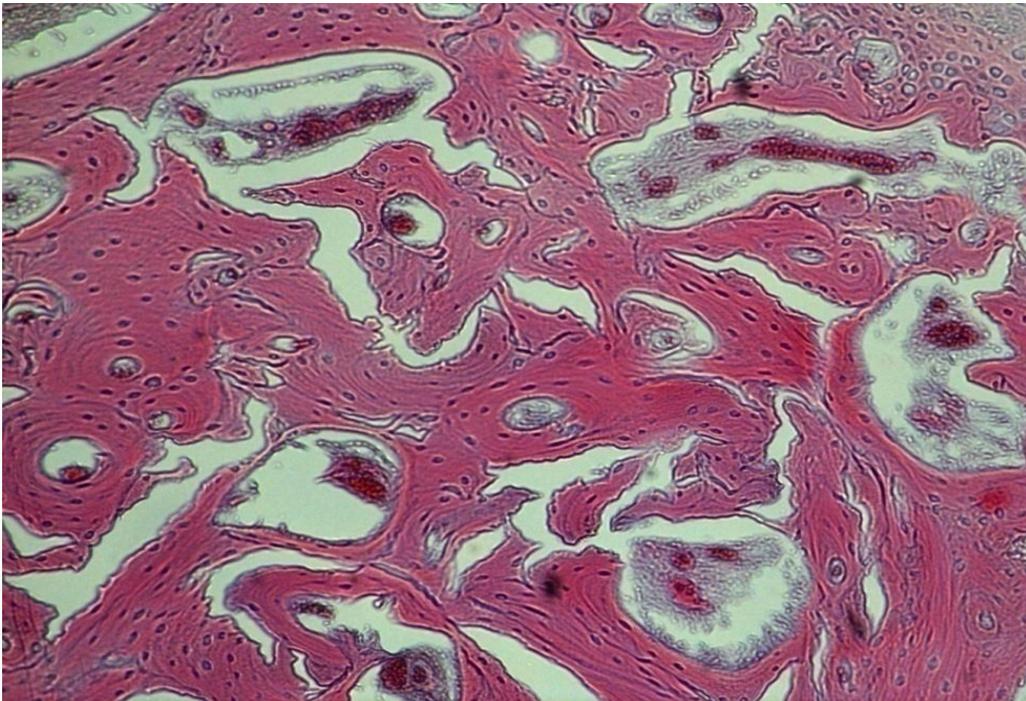


Fig.65: Detalle de la anterior. H.E. 10x

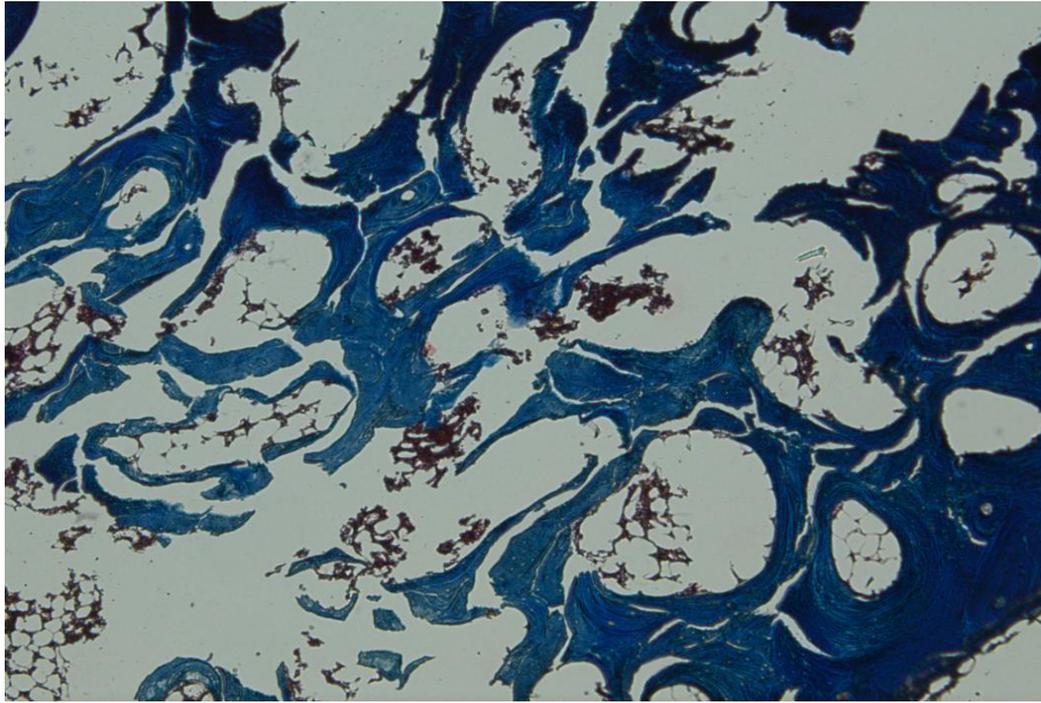


Fig. 66: Sección histológica: Fémur, grupo IV (Naringenina potásica). Tricrómico de Masson. 5x.

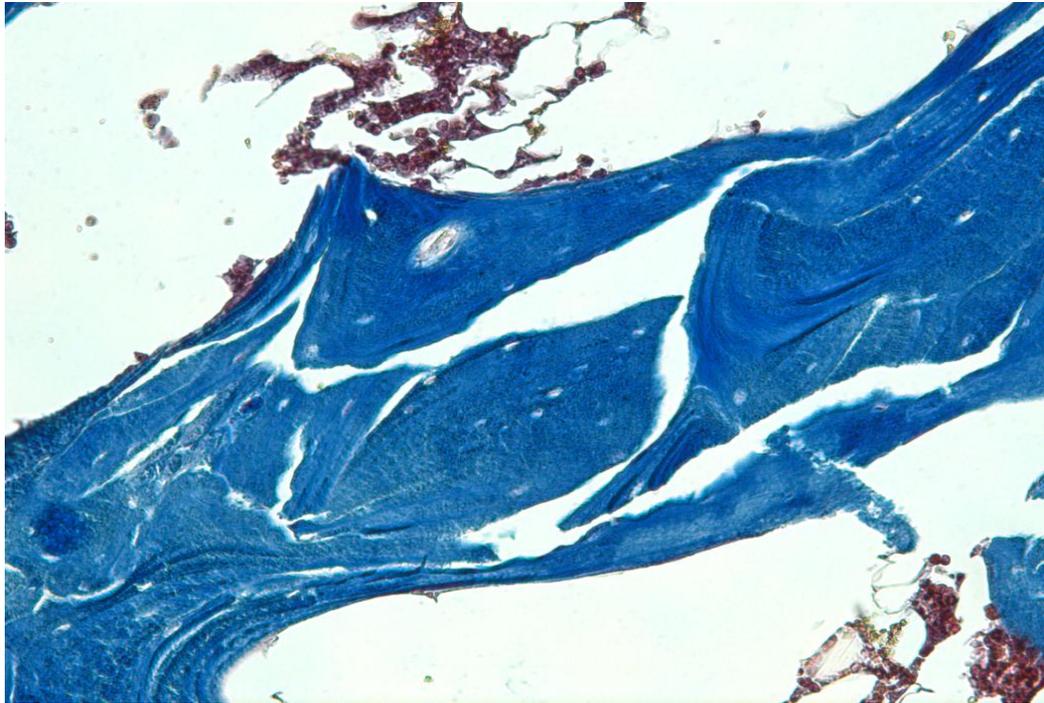


Fig. 67: Detalle de la anterior. T.M. 20x

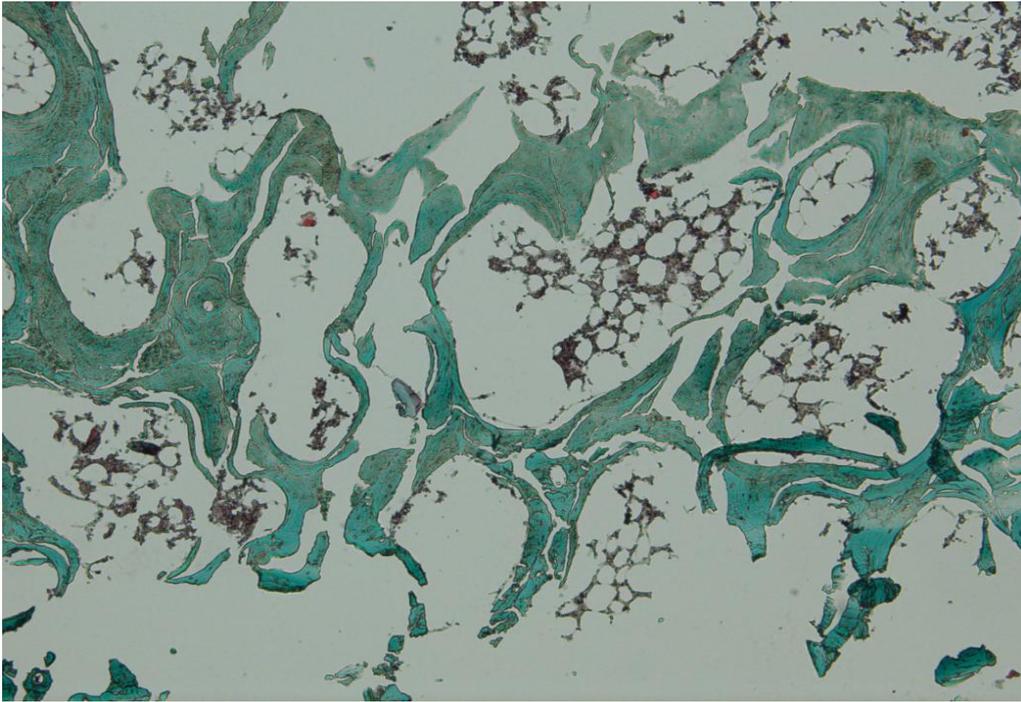


Fig. 68: Sección histológica: Tibia, grupo IV (Naringenina potásica). Tricrómico de Gomori 5x.

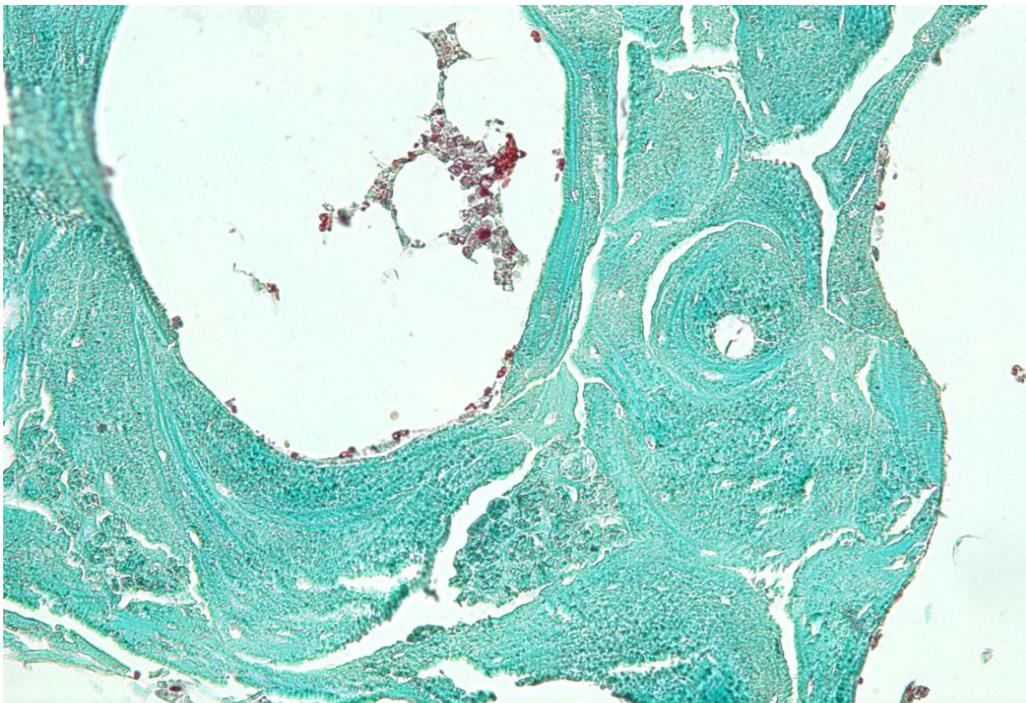


Fig. 69: Detalle de la anterior. T.G. 20x

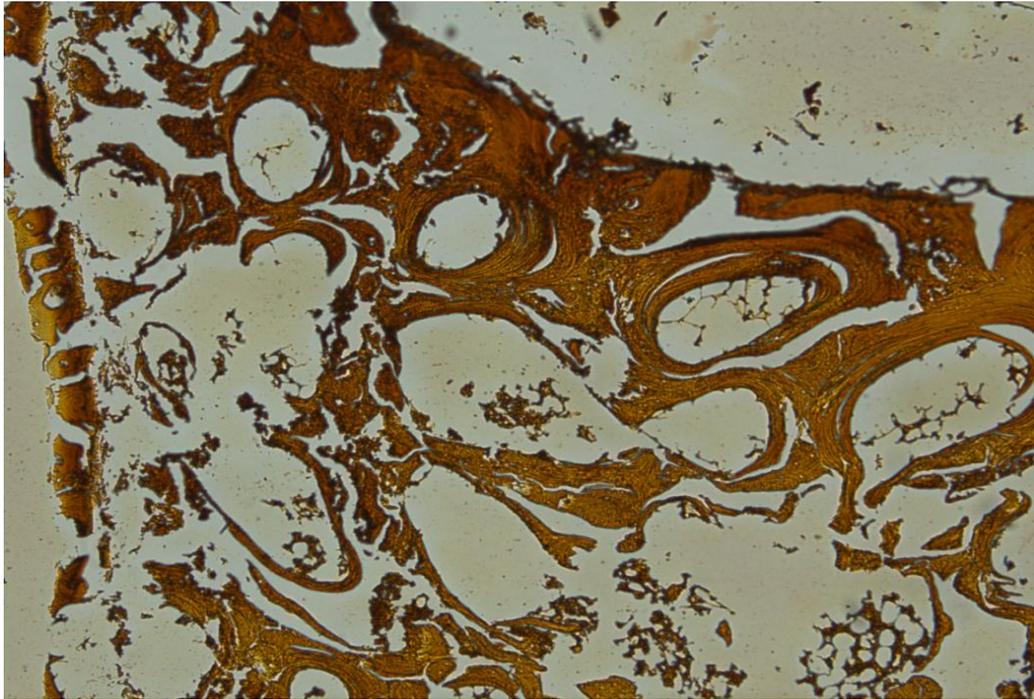


Fig. 70: Sección histológica: Fémur, grupo IV (Naringenina potásica). Gomori para reticulina 5x.

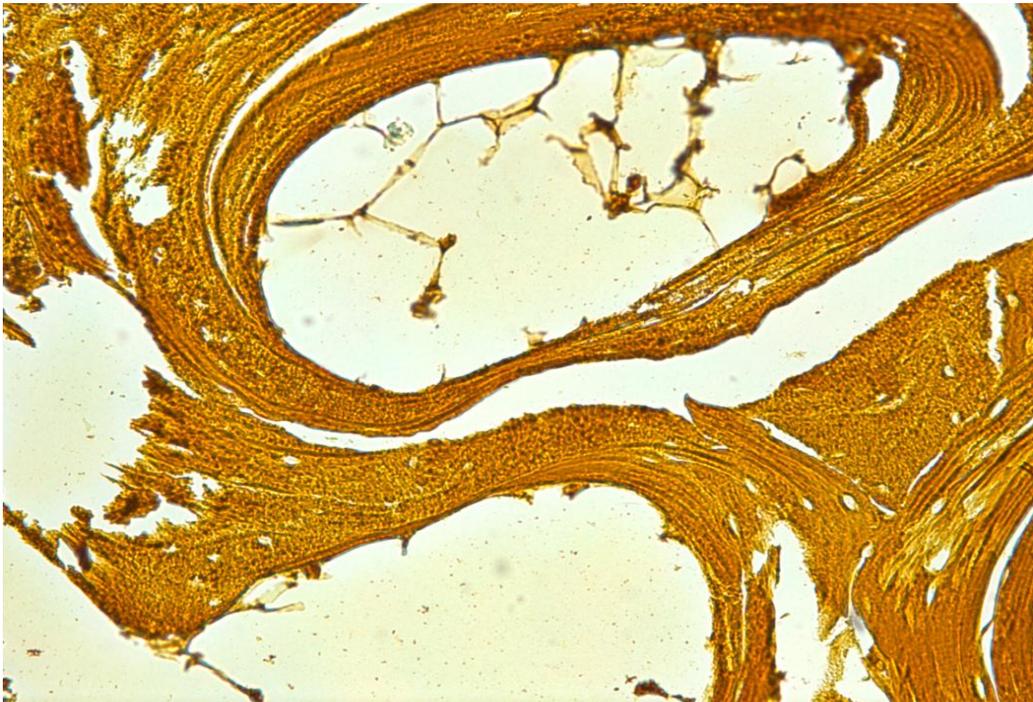


Fig.71: Detalle de la anterior.G.R. 20x

Estudio microscopio electrónico de barrido (MEB)

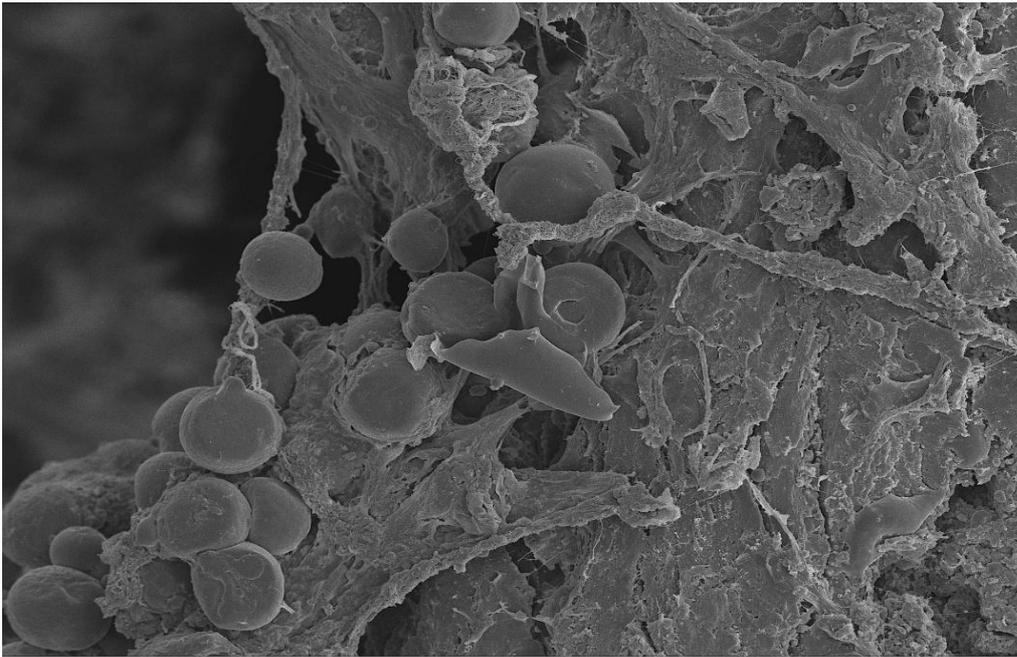
En el estudio de las imágenes mediante MEB de las muestras obtenidas correspondientes a control, ovx, tratados con apigenina y tratados con naringenina, en el período final del estudio (9 meses), destacamos lo siguiente:

En las figuras A, B y C, podemos observar que están presentes todos los elementos naturales (células, matriz extracelular, médula ósea y vasos) que constituye el tejido óseo independientemente del tipo de muestra analizada.

El tejido óseo compacto es atravesado por numerosos vasos sanguíneos los cuales se alojan en los canales de Havers (figura D).

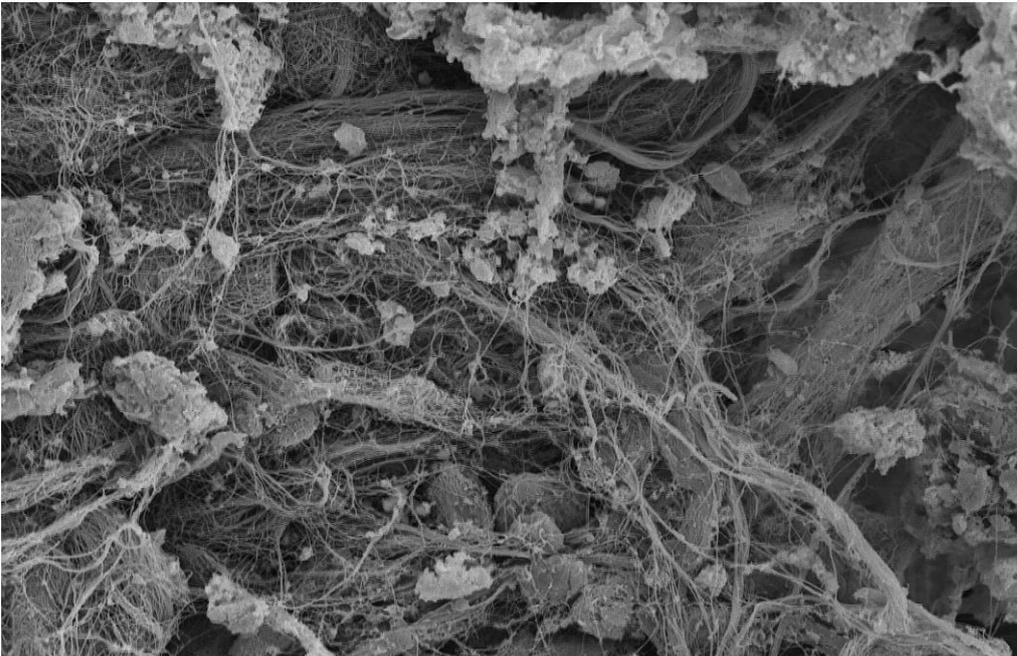
El tejido epifisario, por otro lado, está compuesto de delicadas trabéculas dispuestas irregularmente (Figura E) en las que se observa la disposición de la matriz extracelular (colágeno) (figura F), así como pequeñas áreas irregulares sobre su superficie, lo que corresponde a áreas de remodelación (figura G). Próximo a este fenómeno puede observarse lagunas de Howship vacías (figura H) frecuente en las muestras control-ovx. La médula ósea hematopoyética ocupa los espacios intertrabeculares patentes en las zonas epifisarias, así como el canal medular de la porción diafisaria.

En cuanto a los grupos tratados con apigenina y naringenina, los resultados son similares a los observados con el microscopio óptico. No obstante, este método de estudio no parece ser el más adecuado para determinar las características morfológicas consecutivas a los tratamientos.



300µm

Fig. 72: Elementos naturales del tejido óseo: células, matriz, vasos. MEB. 300 µm



50µm

Fig. 73: Elementos naturales del tejido óseo: células, matriz, vasos. MEB. 50 µm

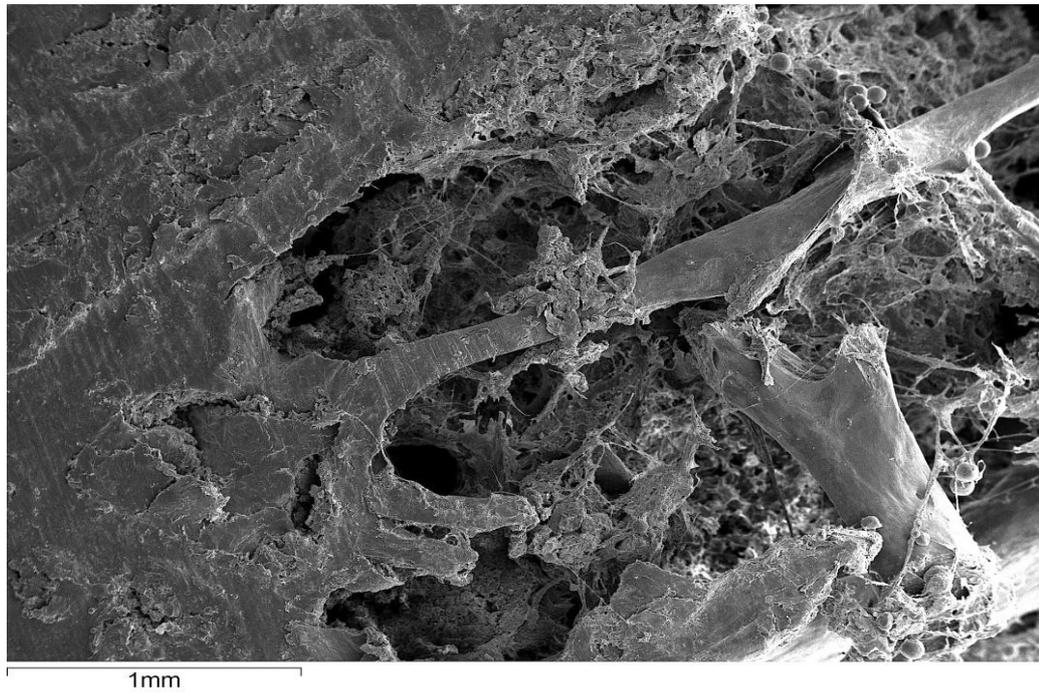


Fig. 74: Elementos naturales del tejido óseo: células, matriz, vasos. MEB. 1mm

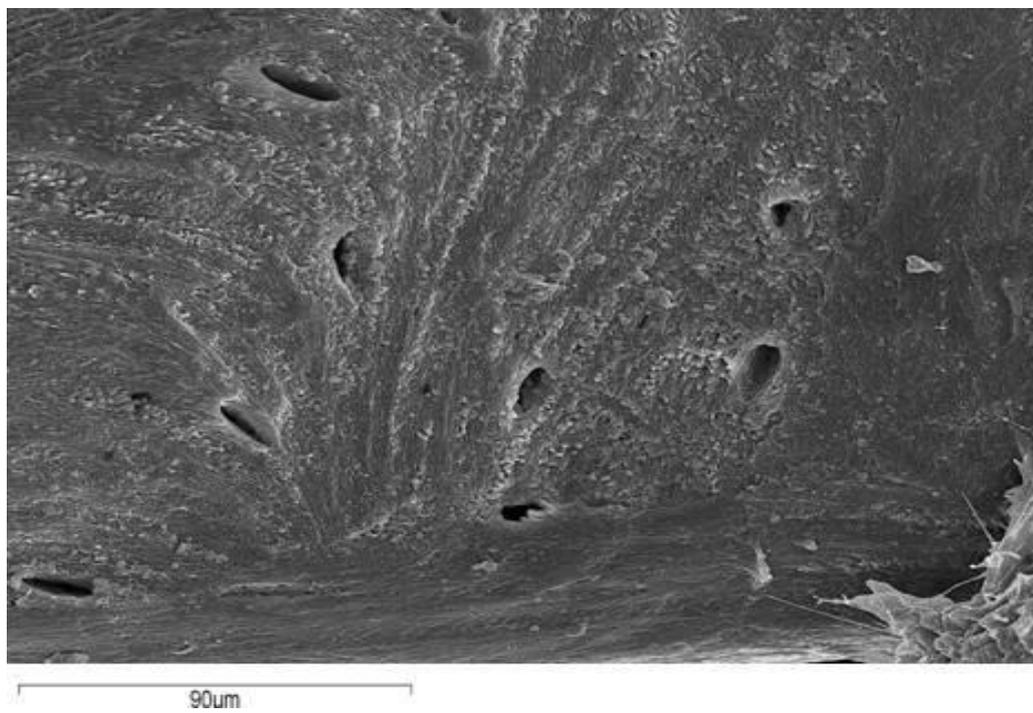


Fig.75: Tejido compacto. Vasos sanguíneos en canales de Havers. MEB. 90 µm

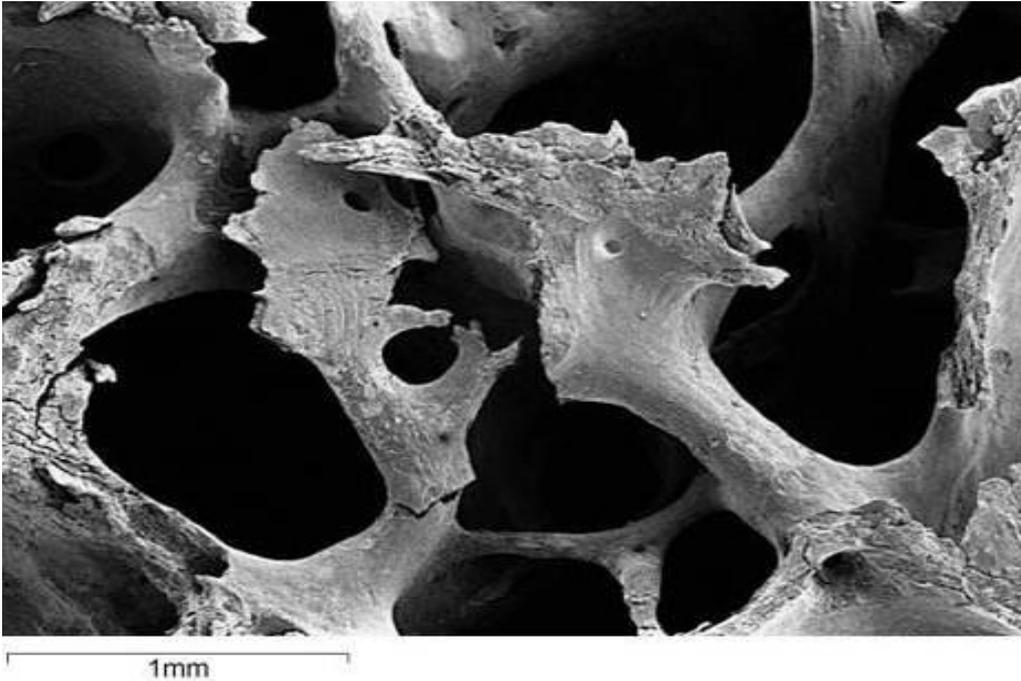


Fig. 76: Tejido epifisario. Trabéculas dispuestas irregularmente. MEB. 1mm



Fig. 77: Disposición de matriz extracelular (colágeno). MEB. 10 µm



Fig. 78: Áreas de remodelación. MEB. 90 μ m



Fig. 79: Lagunas de Howship vacías. MEB. 20 μ m

Estudio ionómico (icp-oes)

El método ionómico (icp-oes), ofrece la posibilidad de analizar hasta 28 elementos químicos distintos en el estudio del hueso. En nuestro trabajo, hemos intentado pormenorizar de una forma más detallada, aquellos que estimamos más relevantes a la hora de influir en la osteoporosis. Por otro lado, consideramos que la interrelación entre el sistema hormonal y los niveles séricos de calcio, fósforo y magnesio son tan estrechas que, con frecuencia, la interpretación de los cambios debe ser realizada en conjunto para que tenga sentido fisiopatológico. Así pues, analizamos los siguientes parámetros: El calcio (Ca) en g/100g, el fósforo (P) en g/100g y el magnesio (Mg) en g/100g.

Al estudiar la determinación de los niveles de calcio pudimos observar en el estudio de la digestión realizado en el hueso cortical que los valores medios para los animales del grupo I (control) eran de $16,19 \pm 0,39$ g/100g mientras que los animales del grupo II (ovx) sufrieron un descenso significativo $11,71 \pm 1,47$ g/100g. Los grupos tratados con flavonoides mostraron unos valores similares o superiores a los del grupo I de referencia; $16,83 \pm 1,06$ g/100g para la apigenina y $16,61 \pm 0,50$ g/100g para la naringenina.

En el hueso medular, los valores medios para los animales del grupo I (control) eran de $4,38 \pm 4,70$ g/100g mientras que los animales del grupo II (ovx) volvieron a bajar sus resultados significativamente $0,71 \pm 0,65$ g/100g.

Los grupos tratados con flavonoides mostraron valores similares o superiores a los del grupo I de animales sanos: $5,86 \pm 3,36$ g/100g para la apigenina y $2,87 \pm 1,01$ g/100g para la naringenina.

En el estudio de los niveles de fósforo, respecto al hueso cortical, otra vez la apigenina potásica presentó valores por encima del resto de los grupos con una media de $8,37 \pm 0,55$ g/100g mientras que los del grupo I de referencia sólo alcanzó los $7,92 \pm 0,26$ g/100g.

El grupo II de animales ovariectomizados mostró resultados significativamente inferiores al resto de las conejas estudiadas: $1,76 \pm 1,51$ g/100g, mientras los tratados con naringenina, mostraban resultados similares a los del grupo III de apigenina: $8,23 \pm 0,24$ g/100g. El hueso medular, mostró unos resultados semejantes a los obtenidos en el hueso cortical. El grupo de apigenina volvió a obtener la media más alta con $3,03 \pm 1,63$ g/100g, algo superior al grupo I (control) $2,13 \pm 2,36$ g/100g, mientras que los animales del grupo II, sólo alcanzaron los $0,29 \pm 0,21$ g/100g. Los tratados con naringenina obtuvieron una media de $1,41 \pm 0,58$ g/100g, superior a la de los animales ovariectomizados.

Respecto a los niveles de magnesio, el estudio de hueso cortical no reflejó resultados estadísticamente significativos, siendo los animales tratados con naringenina los que mejor porcentaje obtuvieron $0,20 \pm 0$ g/100g respecto a los del grupo control de referencia $0,18 \pm 0$ g/100g, mientras que los otros grupos restantes se mantuvieron en una media de $0,19 \pm 0$ g/100g. El estudio de hueso medular, presentó unos valores de $0,34 \pm 0,34$ g/100g para el grupo I (control). Los del grupo II ovariectomizado mostraron los resultados más bajos de todo el estudio con $0,03 \pm 0,01$ g/100g. Los animales tratados de apigenina obtuvieron

valores medios de $0,07 \pm 0,03$ g/100g, mientras que los tratados con naringenina presentaron un promedio de $0,05 \pm 0,01$ g/100g, ambos, superiores a los del grupo control ovariectomizado.

Grupos	(Ca^{2+})		(P)		(Mg)	
	Hueso Cortical	Hueso Medular	Hueso Cortical	Hueso Medular	Hueso Cortical	Hueso Medular
I Control	$16,1 \pm 0,3$	$4,3 \pm 4,7$	$7,9 \pm 0,2$	$2,1 \pm 2,3$	$0,18 \pm 0$	$0,3 \pm 0,3$
II ovx	$11,7 \pm 1,4$	$0,7 \pm 0,6$	$1,7 \pm 1,5$	$0,2 \pm 0,2$	$0,19 \pm 0$	$0,03 \pm 0$
III Apigenina	$16,8 \pm 1$	$5,8 \pm 3,3$	$8,3 \pm 0,5$	$3,03 \pm 1,6$	$0,19 \pm 0$	$0,07 \pm 0$
IV Naringenina	$16,6 \pm 0,5$	$2,8 \pm 1$	$8,2 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,5$	$0,20 \pm 0$	$0,05 \pm 0$

Tabla 30: Promedio de valores obtenidos al finalizar el estudio mediante el análisis con icp-oes.

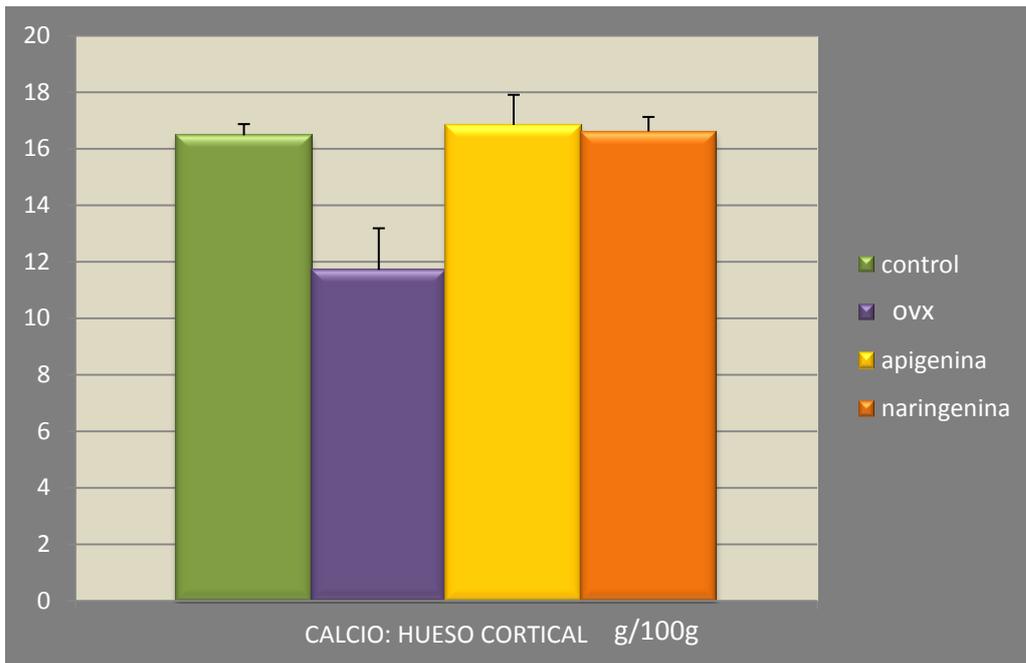


Tabla 31: Promedio de valores obtenidos en hueso cortical para el Calcio

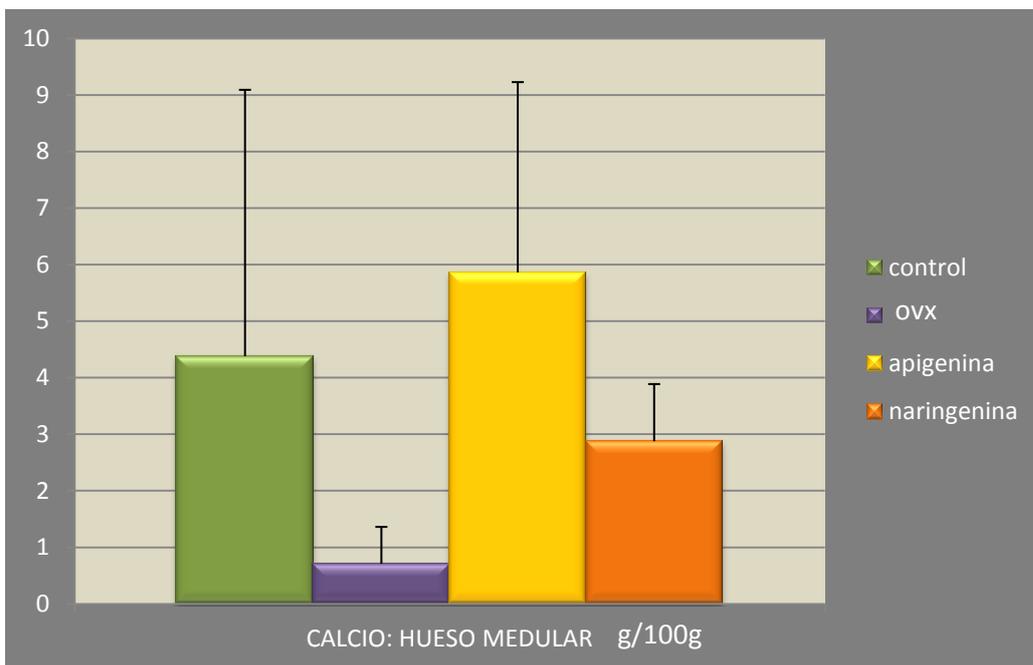


Tabla 32: Promedio de valores obtenidos en hueso medular para el Calcio

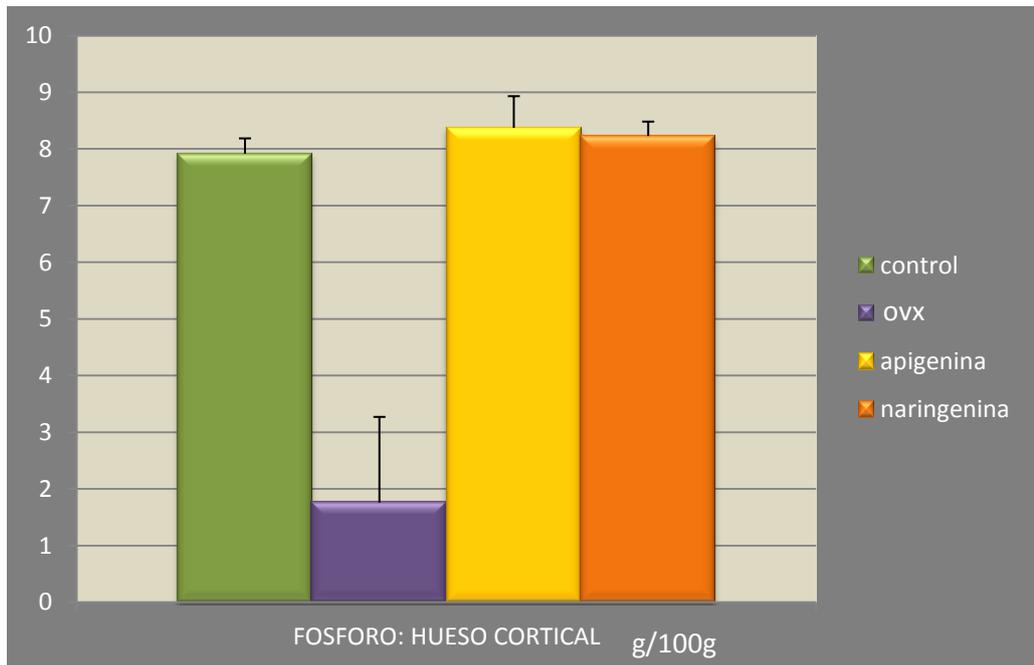


Tabla 33: Promedio de valores obtenidos en hueso cortical para el Fósforo

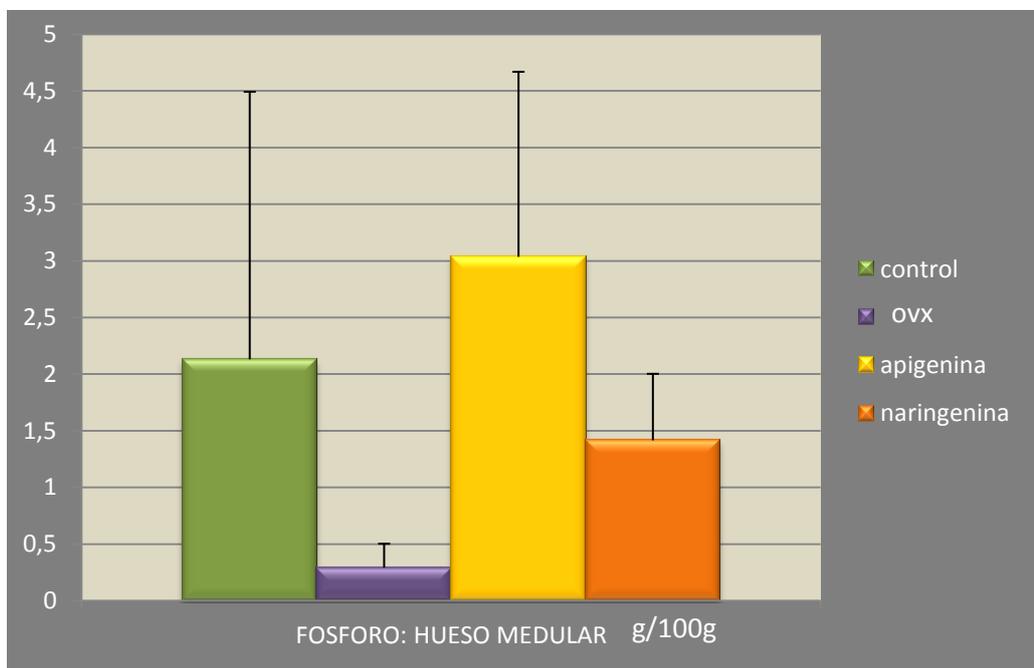


Tabla 34: Promedio de valores obtenidos en hueso medular para el Fósforo

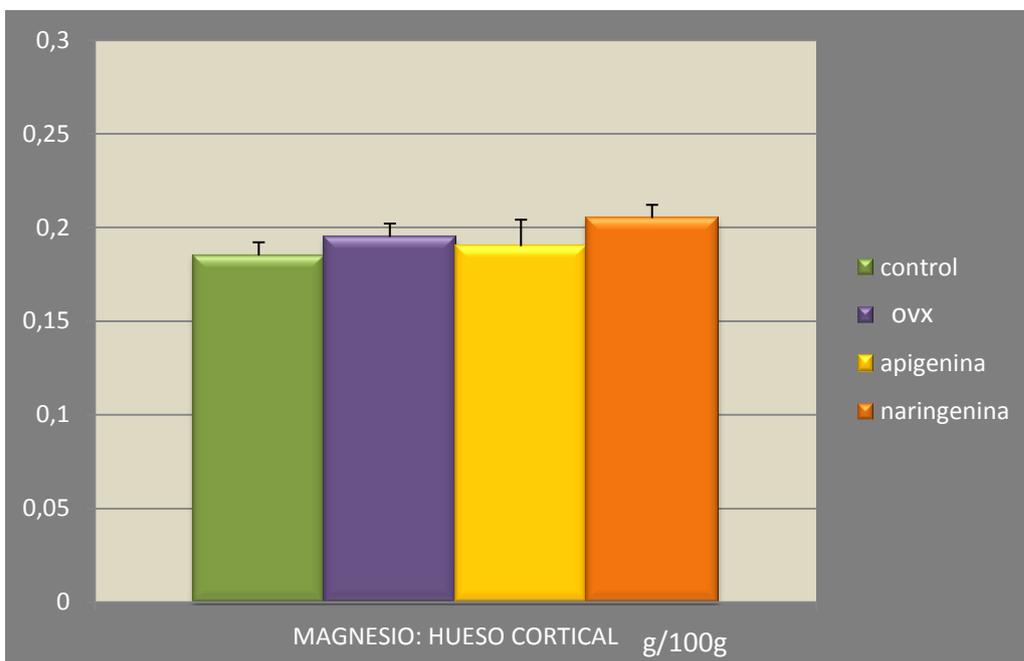


Tabla 35: Promedio de valores obtenidos en hueso cortical para el Magnesio

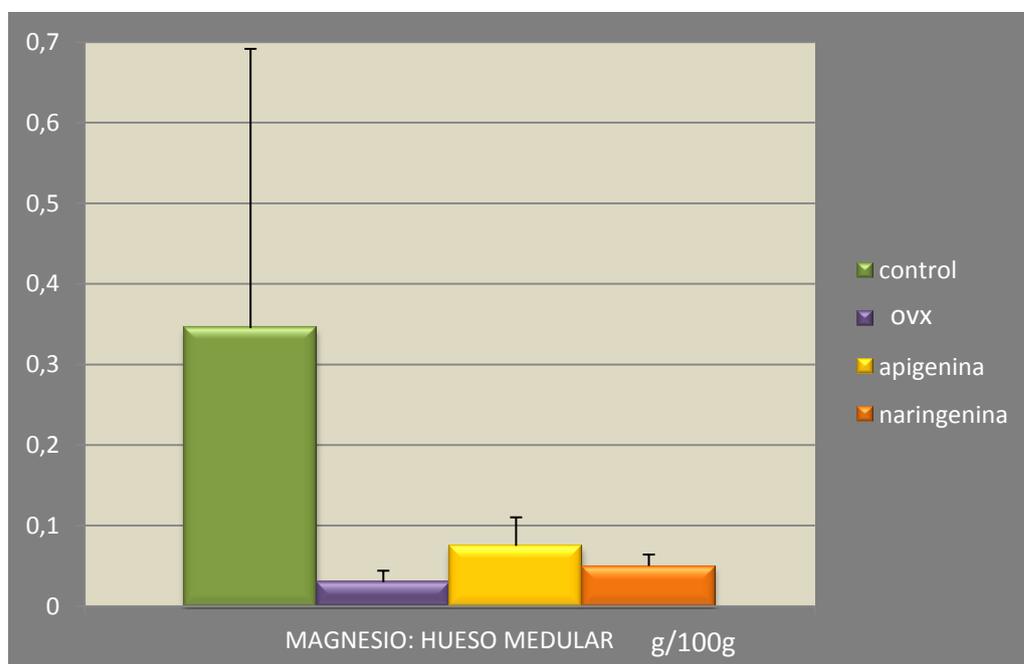


Tabla 36: Promedio de valores obtenidos en hueso medular para el Magnesio

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Una de las ventajas fundamentales de los estudios in vitro con células animales consiste en que permiten obtener datos importantes sobre el efecto biológico general que puede ejercer cualquier sustancia sobre células eucariotas en un sistema en el que las variables ambientales están muy controladas por el investigador. En este sentido y utilizando test de proliferación y citotoxicidad, perfectamente contrastados, pueden determinarse los valores de crecimiento y multiplicación celular de cultivos de diferentes líneas celulares al aplicar sobre el cultivo la sustancia a ensayar con distintos tiempos de exposición y a diferentes concentraciones. Cuantitativamente, el dato más importante que puede obtenerse corresponde al valor de la IC 50, que permite conocer la concentración a la que cualquier sustancia provoca una inhibición de funciones del cincuenta por ciento sobre un sistema u organismo biológico.

En nuestro trabajo nos planteamos estudiar los efectos de los flavonoides: apigenina potásica y naringenina potásica sobre la viabilidad de la línea celular Vero, además de , conocer su posible toxicidad puesto que ambos flavonoides los vamos a utilizar en el tratamiento de la osteoporosis inducida en conejas mediante ovariectomía, e incluso está previsto que al finalizar el proyecto del que forma parte este estudio experimental, sea posible la utilización de dichas sustancias en la dieta de personas mayores.

Para llevar a cabo dicho estudio, hemos utilizado la línea celular Vero; células no transformadas adherentes establecidas a partir de

células normales del epitelio de túbulos renales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), que es muy utilizada en investigación fundamentalmente para realizar bioensayos de nuevos fármacos, con el fin de comprobar fundamentalmente su posible citotoxicidad o bien, su efecto sobre la proliferación de células animales sanas.

Hemos elegido esta línea porque presenta características genotípicas adecuadas, puesto que no presenta variabilidad con el tiempo, lo que ocurre frecuentemente en otras líneas de células no transformadas; no posee genes tumorales naturales ni inducidos y ausencia de agentes externos o contaminantes; su cariotipo es aneuploide estable por lo que no forma tumores de manera espontánea dentro de un rango amplio de subcultivos y su crecimiento rápido y fácil permite rentabilizar los ensayos, pero sobre todo, la hemos elegido por presentar una alta sensibilidad, de modo que es usualmente utilizada en los servicios de cultivo celulares, antes de la incorporación de cualquier agente que vaya a ser utilizado con el fin de demostrar su inocuidad.

Para el estudio de los efectos de los flavonoides ensayados en nuestro estudio sobre la viabilidad celular se empleó el test del MTT, descrito por Carmichael (1987) y Alley (1988). Esta técnica está basada en la capacidad de las células viables, mediante deshidrogenasas mitocondriales, de reducir el MTT, una sal de tetrazolio amarilla, a un producto formazano que adquiere un color azulado al ser disuelto en dimetilsulfóxido. La intensidad de la coloración puede ser determinada cuantitativamente mediante espectrofotometría y puede ser relacionada directamente con la viabilidad celular.

Tanto la apigenina como la naringenina, son flavonoides con un gran efecto antioxidante. En condiciones normales el organismo mantiene un delicado equilibrio entre producción y eliminación de radicales libres, que son moléculas muy inestables por su configuración electrónica y por tanto poseen una elevada capacidad oxidante. Estas moléculas pueden derivar del oxígeno (ROS): peróxido de hidrógeno, hidroxilo, anión superóxido; o de compuestos nitrogenados (RNS): NO, NO₂.

Uno de los mecanismos antioxidantes de estos flavonoides consiste en la captura de estos radicales libres impidiendo la reacción en cadena oxidativa que desencadenan.

Para ello es fundamental la estructura molecular y los grupos funcionales (Heijnen, 2002) principalmente, la presencia de un doble enlace entre C-2 y C-3 y de dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B y otros dos en C-3 y C-5 (Rodríguez, 2002; Martínez, 2003; Yañez, 2004; Benavente, 2005; Benavente-García, 2008).

En este sentido, la naturaleza de los ensayos biológicos que hemos realizado en el estudio “in vitro”, nos ha permitido observar la posible relación entre la estructura del esqueleto molecular de cada extracto y su capacidad para inhibir la proliferación de las células “in vitro”.

De los flavonoides ensayados en nuestro trabajo, la estructura más sencilla es la de la naringenina, que utilizamos en forma de sal potásica para facilitar su solubilidad en agua. Precisamente se trata de la primera estructura básica en la cadena biosintética de las plantas, siendo un compuesto de naturaleza aglicón (sin restos azucarados en su molécula) y con un esqueleto molecular que muestra una estructura plana, lo que podría explicar el efecto muy discreto dosis-respuesta

demostrado en nuestro estudio así como la escasa inhibición de la viabilidad celular que originó a los dos tiempos ensayados (24 y 48 horas desde la aplicación de cada extracto, y a las concentraciones a 1, 5, 10, 25 y 50 μM .) ya que mostró una capacidad de inhibición de la proliferación poco significativa, por debajo del 30% a la concentración más alta.

La apigenina, el otro flavonoide estudiado, introduce un nuevo elemento estructural, puesto que la configuración espacial de su esqueleto molecular, difiere de las flavanonas debido a la presencia del doble enlace C2=C3, que genera una estructura totalmente plana y evita que la disposición del anillo B se sitúe en un plano distinto del que ocupan los anillos A y C.

Este hecho, creemos que es relevante y explicaría el menor efecto adverso sobre la proliferación celular de aquellas sustancias con una estructura tridimensional planar, como es el caso de la apigenina y, probablemente, de las flavonas en general, que alterarían en menor grado la bicapa lipídica de la membrana celular.

En nuestro estudio la apigenina demostró un efecto dosis-respuesta moderado ya que, a la máxima concentración ensayada, solo inhibía la proliferación celular en un 49 % respecto del control.

Tanto la naringenina como la apigenina mostraron un discreto efecto sobre la viabilidad celular a la concentración 10 μM , así como a las inferiores, con un porcentaje de proliferación respecto al control superior al 72% en los dos tiempos de estudio. Las concentraciones altas (25 y 50 μM) tampoco ocasionaron una marcada inhibición de la proliferación del cultivo siendo inferior al 50% tanto a las 24 como a las 48 horas.

En otros estudios, la apigenina ha demostrado ser capaz de anular especies reactivas de oxígeno (ROS); además de inhibir el estrés oxidativo (Patel, 2007) y la oxidación de LDL (Kulisic, 2007). También se ha comprobado su capacidad para restaurar la depleción de antioxidantes endógenos (glutación reducido, quinona reductasa y glutación-S-transferasa) provocada por el tratamiento *in vivo* con benzo(a) pireno (Khan, 2006).

Para algunos autores, los flavonoides contribuyen a prevenir los síntomas asociados a la menopausia (Arai, 2000) y a la osteoporosis, aumentando la densidad del hueso y mejorando los marcadores de resorción ósea (Alekel, 2000; Morabito, 2002; Yamori, 2002)

Por otro lado, sabemos que la patogenia de la osteoporosis postmenopáusica se manifiesta por el aumento del recambio óseo con un aumento del número y la actividad de los osteoclastos en el hueso que ocasiona la resorción del mismo, provocando una disminución de la masa ósea.

La disminución en los niveles de estrógenos ováricos, también se asocia con un aumento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias como la interleuquina IL-1 y la IL-6, factores de necrosis tumoral (TNF- α) y factores de crecimiento en el microambiente óseo (Kelly, 1996; Riggs, 2002).

Estas citoquinas pro-inflamatorias contribuyen a la osteoclastogénesis mediante el aumento de la resorción ósea (Pacifi, 1998; Weitzmann, 2006). En este sentido, la apigenina inhibe la producción de un gran número de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 α (Kowalski, 2005; Comalada, 2006; Yano, 2007; Shanmugan, 2008; Huang, 2010) lo que reduciría la atracción de células del sistema inmune hacia la región inflamada.

El motivo de la elección de la apigenina y la naringenina potásicas para su estudio en el modelo de osteoporosis se basa precisamente, en estos efectos descritos en la literatura científica y algunos de ellos, comprobados también por nuestro grupo de investigación (Castillo, 1997; Alvarez, 2010).

Como segundo objetivo de nuestro trabajo, nos planteamos desarrollar un modelo experimental de inducción de osteoporosis mediante la deprivación estrogénica por ovariectomía utilizando como modelo animal la coneja de Nueva Zelanda.

Aunque los estudios sobre osteoporosis con animales pequeños como la rata son correctos desde el punto de vista científico y ético, y son aceptables en las primeras fases de la investigación, el problema surge precisamente por su pequeño tamaño, además de que la calidad ósea de la rata difiere bastante de la del hombre (ausencia de sistema haversiano en los animales jóvenes y alteraciones de la función osteoblástica en las últimas etapas de la deprivación estrogénica (Turner, 2001). Por lo que parece necesario adoptar un modelo animal con un nivel filogenético superior. Pero seleccionar un modelo experimental adecuado para la investigación implica tener en cuenta diversas consideraciones (Davidson, 1987):

Analogía entre el modelo a utilizar y el sistema a investigar, de lo que se desprende que los resultados que se obtengan serán extrapolables a dicho sistema y puedan ser generalizados a sistemas afines.

Homogenidad genética del organismo animal, para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

Características biológicas del modelo experimental, para establecer las condiciones que garanticen la validez del diseño experimental, la racionalidad de su selección, así como la factibilidad de la realización del estudio respecto al objetivo de la investigación.

Aspectos de disponibilidad, costo y facilidad de manipulación experimental, que garanticen que se seleccione el modelo que mejor

permita lograr el objetivo, y resulte el de manipulación más sencilla y económica.

Aspectos ecológicos, por el uso de especies animales en investigación y su impacto sobre el medio ambiente, incluido el equilibrio ecológico.

Aspectos éticos que impliquen la utilización del mínimo número posible de animales, siempre que se pueda lograr el objetivo planteado con el nivel adecuado de certidumbre estadística y biológica, además de garantizar el mínimo sufrimiento de los animales.

Que **el modelo seleccionado** no introduzca variables que interfieran con las que serán evaluadas. Idealmente, el modelo escogido debe reproducir los aspectos de génesis, progresión y patología de la enfermedad en el humano.

Por otra parte, entre los modelos animales recogidos en la bibliografía sobre estos estudios destacan:

El cobaya, que como la mujer, tiene un ciclo de ovulación largo y espontáneo y posee un cuerpo lúteo secretor activo. No obstante, parece que la deficiencia estrogénica no tiene consecuencias sobre su masa ósea, por lo que no constituyen un modelo adecuado para el estudio de la osteoporosis (Newman, 1995). Algo parecido ocurre con **el minicerdo** que muestra: metabolismo óseo, ciclo reproductivo y función gastrointestinal similares a las del hombre, sin embargo, presenta la desventaja de su coste y la dificultad de su adquisición y mantenimiento (Newman, 1995). En **el gato**, es fácil inducir osteopenia durante el período de crecimiento mediante dieta pobre en calcio o alta en fósforo, o tras una larga inmovilización. Pero no parece existir relación entre la edad y la pérdida de hueso, ni entre la ovariectomía y las fracturas espontáneas. **Los perros**, poseen sistema haversiano del hueso cortical y remodelado del hueso cortical y trabecular similar al

humano. Pero la perra ovula sólo dos veces al año y la extirpación de los ovarios no parece suficiente para producir pérdida ósea ni causar la aparición de fracturas espontáneas. Quizás **la Oveja**, constituya el modelo experimental ideal, porque la disminución del volumen óseo en la cresta iliaca y en la mandíbula relacionada con la edad o con la ovariectomía, se asemeja bastante a la que se produce en la osteoporosis postmenopáusica de la mujer; además, los perfiles hormonales son muy similares a los humanos, aunque presenta fluctuaciones en la masa ósea relacionadas con las estaciones del año; sin embargo no poseen una etapa menopáusica donde se acelere la pérdida ósea, y además para conseguir osteoporosis tras la ovariectomía se necesita un periodo de tiempo de entre 12 y 24 meses. Otra dificultad corresponde al coste y la infraestructura necesaria para su realización, que dificulta su utilización. En los **primates no humanos**, el hueso responde de forma similar al cese de la función ovárica que en los humanos (Newman, 1995; Turner 2001). Sin embargo, la menopausia sucede pasados los veinte años, por lo que el animal experimental debe ser suficientemente mayor como para ser útil en el estudio de la osteoporosis.

Actualmente, no existe un modelo que reproduzca totalmente la fisiopatología de la enfermedad. Aunque existen diversos mecanismos para provocar la osteoporosis de forma experimental, la deficiencia de estrógenos es uno de los más importantes, sobre todo, al reproducir la osteoporosis inducida por la menopausia. Por ello, los animales ovariectomizados (ovx) son los modelos preferidos en la evaluación preclínica de sustancias que ofrezcan un interés prometedor para el manejo de esta enfermedad.

Para nuestro trabajo, elegimos como modelo animal la **coneja albina de Nueva Zelanda** porque la osteopenia que se produce tras la

extirpación ovárica es muy similar a la que sucede en la mujer (Castañeda, 2006). Posee además, un *turn over* más rápido que el de los primates, y en contra de lo que sucede en otros mamíferos de pequeño tamaño como la rata, el ratón o el cobaya, los conejos alcanzan la madurez esquelética (cierre de las placas de crecimiento) poco tiempo después de completar el desarrollo sexual aproximadamente entre los 4 y 6 meses.

El conejo es un animal idóneo por su tamaño, disponibilidad, temperamento, bajo coste y por disponer de razas genéticamente homogéneas.

Por estos motivos, los conejos también son utilizados en numerosos estudios que evalúan la osteointegración de implantes dentales en la tibia de estos animales.

El modelo en conejos corresponde a un modelo de osteoporosis en un animal adulto, donde se puede conseguir una disminución significativa de la densidad mineral ósea (DMO) en un periodo breve de tiempo a la vez que es útil para investigar los agentes anabólicos ya que tiene un *turn over* óseo rápido con predominio del remodelado sobre el proceso de modelado (Castañeda, 2006). Es la especie más pequeña de las habitualmente utilizadas con verdadero remodelado óseo animal.

Otra forma de inducir la osteoporosis de manera predecible es mediante la combinación de ovariectomía y tratamiento con glucocorticoides, ya que la pérdida de hueso trabecular y cortical es significativa y se obtiene en cortos periodos de tiempo (Castañeda, 2006). Se postula que la combinación de estos dos métodos, ovariectomía y administración de corticoides, produciría una pérdida ósea más rápida y de manera más consistente. Sin embargo, las dosis óptimas de corticoides para inducir pérdidas significativas de la masa

ósea en esta especie no están bien estandarizadas y además, la pérdida de masa ósea inducida por glucocorticoides se caracteriza por una disminución rápida de la masa ósea del hueso trabecular y cortical (Grardel, 1994; Chavassieux, 1997), por lo que al comparar los resultados obtenidos con ambos métodos, los datos son controvertidos y discordantes (Gardel, 1994).

Asimismo, los corticoides producen un incremento en la resorción osteoclástica y una disminución de la formación ósea a nivel del hueso subarticular (Eberhardt, 2001). Estos pueden, además, ocasionar una parada en la maduración del linaje osteoblástico, así como inducir su muerte celular por apoptosis en fases tempranas (Canalis, 2004). Por otro lado, las dosis elevadas producen con frecuencia necrosis del hueso subcondral e incluso una alta mortalidad en el conejo (Miyanishi, 2005).

Por todo lo anterior, en nuestro trabajo experimental decidimos establecer el mecanismo de inducción de la osteoporosis realizando exclusivamente la ovariectomía sin administración de corticoides. Aunque parece que este método de ovariectomía precisa un mayor tiempo de evolución para obtener los resultados deseados, consideramos relevante evitar la presentación de posibles efectos adversos derivados del uso de corticoides.

En nuestro modelo experimental de inducción de osteoporosis, hemos demostrado, por un lado, que la utilización aislada de la ovariectomía en conejas albinas de raza Nueva Zelanda es totalmente eficaz para provocar la osteoporosis como corroboran los resultados de los distintos métodos de estudio utilizados: Así, en el análisis bioquímico del grupo de animales con deprivación estrogénica, los

valores de la fosfatasa alcalina y el calcio, sufrieron un descenso significativo a partir de los 150 días, alcanzando los valores mínimos a los 240 días con un rango de referencia muy por debajo del percentil de normalidad. El grupo de animales tratados con apigenina potásica fue el que mostró niveles más altos de fosfatasa alcalina al final del experimento, no existiendo diferencias estadísticas significativas con el grupo I (control). Del mismo modo, el análisis de las imágenes obtenidas mediante micro CT, demostró un deterioro de la estructura ósea respecto al control, con adelgazamiento y distribución irregular de las trabéculas óseas y la existencia de amplios espacios intertrabeculares, fundamentalmente a nivel del hueso trabecular, que hace que el hueso compacto adopte una morfología semejante al tejido óseo trabecular, con una estructura menos densa y por consiguiente, un notable aumento de la fragilidad y predisposición a la fractura.

El estudio anatomopatológico de los huesos (fémur y tibia) de las conejas ovariectomizadas, demostró también la disminución de la masa ósea, que estaba caracterizada fundamentalmente por la reducción del número y tamaño de las trabéculas óseas así como la alteración de las conexiones entre ellas y la expansión de los espacios intertrabeculares, que mostraban además imágenes de perforación por resorción osteoclástica, confirmando lo descrito en los resultados del método anterior. También en este sentido, el estudio ionómico realizado tanto en la zona cortical como medular del fémur y la tibia, reflejó una notable disminución de los niveles de calcio, fósforo y magnesio del grupo II (animales con deprivación estrogénica), respecto al grupo I (control).

En el tercer objetivo de nuestro trabajo nos planteamos determinar los efectos de la apigenina y la naringenina potásicas sobre la regeneración ósea en estos animales, para lo que incluimos dos grupos de estudio, cuyos animales fueron ovariectomizados y tratados con dichos flavonoides (Grupos III y IV). Al igual que en los grupos I y II realizamos los estudios: bioquímico, de imagen mediante microCT, histopatológico a través del microscopio (óptico y electrónico de barrido) y el estudio ionómico (icp-oes).

Diversos autores han descrito algunos aspectos del mecanismo de acción de los flavonoides y su repercusión en la patogenia de la osteoporosis. Por un lado, parece que actúan como agentes de activación osteoblástica incidiendo en el incremento de la densidad mineral ósea, en grado similar al proporcionado por otras alternativas terapéuticas (Chiechi, 2002). Además, el uso de flavonoides complementa la acción estrogénica, debido a que por su similitud estructural con los estrógenos, pueden unirse a su receptor y activarlo. Tal vez todavía nos encontremos sólo en los inicios, pero todo parece indicar que la participación en la vía de los estrógenos confiere a estas sustancias también un efecto protector, como demuestran los estudios de Gennari (1998).

De igual modo, la práctica inexistencia de efectos secundarios, determina que el tratamiento con fitoestrógenos sea una herramienta beneficiosa para pacientes con síntomas postmenopáusicos; por lo que la utilización de estos agentes en los últimos años ha desarrollado un creciente interés sobre los estudios relacionados con los cambios típicos del envejecimiento.

Algunos autores (Krizt-Silverstein, 2002), no dudan en clasificar a las isoflavonas como bloqueadores o moduladores naturales selectivos del receptor estrogénico (SERMs *selective estrogen receptor*

modulators), debido a que estas realizan su acción sobre hueso, cerebro, sistema cardiovascular y ovario, lo que explica su utilidad para: mejorar los síntomas vasomotores, prevenir la osteoporosis, reducir el riesgo de cáncer de mama, inducir un patrón lipídico antiaterogénico (disminución del colesterol total, LDL y triglicéridos y ligero aumento del HDL, etc.

Las isoflavonas han demostrado tener capacidad para mantener la masa ósea tanto en animales (Yamaguchi, 2000) como en mujeres peri y posmenopáusicas (Alekel, 2000) ya que su mayor afinidad por ER- β presente en hueso impediría, de un modo similar al que lo hace el estrógeno, la activación de los osteoclastos y, por tanto, la pérdida acelerada de masa ósea (Ishimi, 1999).

Estudios recientes han demostrado que la apigenina no sólo inhibe la resorción ósea sino que también, induce a la apoptosis de los osteoclastos, demostrando así un efecto positivo sobre el recambio óseo (Jeong, 2008). De igual modo, estudios llevados a cabo con la naringenina, demostraron que el comportamiento de esta flavanona, era similar a la acción del estrógeno, actuando positivamente en la protección contra la pérdida de masa ósea inducida tras la ovariectomía en animales (Lei-Guo Ming, 2013).

Aunque normalmente los estudios realizados en roedores después de la ovariectomía quirúrgica constatan un aumento de peso (Davey, 2006), en nuestro estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las conejas sometidas a ovariectomía respecto al grupo control no ovariectomizado. Todos los animales presentaron tras la intervención quirúrgica, en general, un peso aproximado de 3,5 kg. Mientras que los animales control (grupo I)

al finalizar el estudio (semana 48) presentaban un peso medio de $6,14 \pm 0,18$ Kg dentro de los valores de crecimiento propios de esta raza, las conejas del grupo II (ovariectomía) mostraban valores inferiores ($5,82 \pm 0,17$ Kg), mostrando además signos de deterioro tanto en la movilidad como en su aspecto físico. Los animales del grupo III, tratados con apigenina, mostraron resultados ligeramente inferiores al resto de los demás grupos ($5,76 \pm 0,25$), siendo el grupo IV, el de las conejas tratadas con naringenina, el que mostró valores más elevados de peso corporal al final del experimento con $6,20 \pm 0,37$ Kg. De lo que se deduce una evolución más favorable, respecto al peso, del grupo de animales tratados con Naringenina.

El método de estudio siguiente consistió en analizar algunos parámetros bioquímicos relacionados con la fisiología ósea; para ello, realizamos a todos los animales una extracción de sangre previa al comienzo del estudio (tiempo 0) que se repitió a los: 30, 60, 150 y 240 días. Los parámetros analizados fueron: La fosfatasa alcalina (ALP), el calcio iónico (Ca^{2+}) y el fósforo (P).

En el análisis de la fosfatasa alcalina observamos que los animales tratados con apigenina potásica ($38,6 \pm 18,37$ U/L) y con naringenina potásica ($42 \pm 13,18$ U/L), mostraron valores notablemente inferiores a los mostrados por las conejas del grupo control ($66,55 \pm 21,75$ U/L) y las del grupo II (ovariectomía) ($51,4 \pm 25,20$ U/L). Estadísticamente, el grupo II (ovx), fue el que mostró niveles más altos de fosfatasa alcalina en sangre en todo el experimento, con diferencias estadísticamente significativas a los 30 días de la ovariectomía respecto a los grupos tratados con Apigenina potásica y Naringenina potásica, a los 150 días respecto al (ovx) y al final del experimento (240 días) con el (ovx) y con el grupo de naringenina potásica. El grupo de

animales tratados con apigenina potásica fue el que mostró niveles más altos de fosfatasa alcalina al final del experimento, aunque no mostraban diferencias estadísticamente significativas con el grupo I (control).

Al igual que ocurre en mujeres post-menopausicas, los valores de calcio y de fósforo no se vieron alterados en lo animales ovariectomizados (II, III y IV), respecto al grupo I (control), no existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto a los mismos, manteniéndose, en general, dentro de los rangos de normalidad de este método de estudio: (5,6-13,5 mg/dl) para el calcio y (4-6,2 mg/dl) para el fósforo.

En este sentido, en humanos, los niveles séricos del calcio y el fósforo no varían mucho en la osteoporosis respecto a la normalidad, lo que coincide con los resultados de nuestro estudio.

Si bien, en humanos, el aumento en el remodelado óseo que ocurre inmediatamente después de la menopausia o la presencia de fracturas u otras alteraciones localizadas del metabolismo óseo pueden producir incrementos ligeros en la actividad de fosfatasa alcalina, el estudio de este marcador en conejas ovariectomizadas y tratadas con flavonoides, no muestra diferencias significativas. Es posible que tanto la apigenina como la naringenina actúen sobre mecanismos de la remodelación ósea que no sean estrogénicos. Así, la ipriflavona, un derivado sintético de las isoflavonas, se está utilizando en algunos países en el tratamiento de la osteoporosis, con resultados clínicos incuestionables, a pesar de que carece de actividad estrogénica.

Tras analizar los resultados del estudio bioquímico, podemos deducir que, tanto la apigenina como la naringenina mostraron una

acción positiva sobre el recambio óseo estimulando los efectos de activación de las células osteoblásticas. Aunque este mecanismo de acción tuvo un desarrollo lento, en general, fue superior a los valores obtenidos por los animales del grupo II.

En el estudio de las imágenes obtenidas mediante microCT de los grupos tratados con apigenina potásica (AK) y naringenina potásica (NK), se observó menor disminución de la masa ósea así como de la desconexión entre las trabéculas; siendo muy relevantes los fenómenos de regeneración ósea caracterizados por áreas de depósitos laminales de material osteoide que se disponían en forma de láminas superpuestas semejando la morfología característica del proceso normal de remodelación de las trabéculas óseas, como demuestra el estudio pormenorizado de las variables consideradas:

En las muestras del grupo II (ovx), observamos un descenso considerable del volumen de hueso debido a la pérdida ósea, tanto en la tibia como en el fémur. Así constatamos una disminución de hasta el $1,99 \pm 0,82$ % en estos animales mientras que los valores medios del grupo I (control) eran de $3,12 \pm 0,53$ %.

Los animales tratados con apigenina mostraron resultados superiores a los del grupo II: $2,25 \pm 0,39$ %, mientras los tratados con naringenina, mostraban valores por debajo de los valores del grupo II: $1,45 \pm 0,78$ %. De igual modo, el estudio del grosor trabecular mostró resultados favorables para los grupos tratados con flavonoides con una media de $292,9 \pm 28,12$ μm ., por encima de los valores obtenidos por los animales sanos ($251,60 \pm 23,30$ μm).

Otra de las variables estudiadas, fue la de la separación trabecular mostrando valores superiores para los grupos tratados, con

una media de $4153,58 \pm 367,39 \mu\text{m}$., con respecto a los animales del grupo II ($3518,98 \pm 657,75 \mu\text{m}$) debido a que al ocurrir una disminución de las trabéculas, aumentó la separación entre las mismas. Por otro lado, el aumento de trabéculas tubulares en el grupo II (ovariectomía) indica la presencia de una menor resistencia ósea con respecto a los grupos tratados (III y IV).

Así pues, el estudio de las variables interpretadas a través de la utilización de este método de imagen computerizada confirma que el uso tanto de la apigenina como de la naringenina estaba asociado a un predominio claro de las trabéculas en forma de placa que caracterizan a una mayor resistencia ósea.

En el estudio histopatológico de los fémures y tibias de todos los animales utilizados en el experimento, a nivel de las zonas epifisarias, tanto cortical como trabecular, destacaba: En los grupos tratados con apigenina y con naringenina, se observó menor disminución de la masa ósea así como de la desconexión entre las trabéculas, siendo muy llamativo el aumento de grosor de las muestras y los fenómenos de regeneración ósea caracterizados por áreas laminales de depósitos de material osteoide que se disponían de forma superpuesta, de modo semejante al característico de la remodelación de las trabéculas óseas, respecto a los grupos controles.

El estudio realizado a través del microscopio electrónico de barrido mostró resultados similares a los observados con el método anterior. No obstante consideramos que este método de estudio, no parece ser el adecuado para determinar las características morfológicas consecutivas a los tratamientos.

El método ionómico (icp-oes), ofrece la posibilidad de analizar hasta 28 elementos químicos distintos en el estudio del hueso. En nuestro trabajo, hemos intentado pormenorizar de una forma más detallada, aquellos que estimamos más relevantes a la hora de influir en la osteoporosis. Por otro lado, consideramos que la interrelación entre el sistema hormonal y los niveles séricos de calcio, fósforo y magnesio son tan estrechas que, con frecuencia, la interpretación de los cambios debe ser realizada en conjunto para que tenga sentido fisiopatológico. Así pues, como hicimos en el estudio bioquímico, analizamos los siguientes parámetros: El calcio (Ca), el fósforo (P) y el magnesio (Mg).

En el estudio de los niveles de calcio realizado tanto en el hueso cortical como en el medular, el grupo de los animales tratados con flavonoides, mostró resultados similares o superiores a los del grupo I (Control) mientras que los animales del grupo II (ovariectomía) presentaban valores notablemente más bajos respecto a los animales del grupo I. De igual modo sucedió en la determinación de los niveles de fósforo y de magnesio, tanto a nivel cortical como medular, presentando los animales tratados con apigenina y naringenina resultados más elevados que los del grupo control, siendo los animales ovariectomizados sin tratamiento, los que obtuvieron los resultados más bajos durante todo el estudio. De lo que podemos deducir que, tanto la apigenina como la naringenina estimulan la acción de reforzamiento óseo tanto a nivel cortical como medular.

En resumen, en nuestro trabajo nos planteamos conocer los posibles efectos de los flavonoides apigenina potásica y naringenina potásica sobre un modelo experimental de osteoporosis inducida mediante ovariectomía en conejas albinas de Nueva Zelanda, a través de tres objetivos concretos:

Estudiar “in vitro”, los efectos de estos flavonoides sobre la viabilidad celular de la línea Vero y la posible relación estructura-actividad.

Desarrollar un modelo experimental de inducción de osteoporosis en conejas albinas Nueva Zelanda mediante deprivación estrogénica por ovariectomía.

Determinar los efectos de dichos flavonoides sobre la regeneración ósea a través de los estudios: bioquímico, de microCT, anatomopatológico (óptico y MEB) e iónico (icp-oes).

Realizamos el estudio “in vitro” utilizando la línea celular Vero (ECCC) para determinar el efecto de los flavonoides sobre la viabilidad celular mediante el test del MTT (Carmichael, 1987; Alley, 1988). Las concentraciones utilizadas fueron 1, 5, 10, 25 y 50 μM y realizamos el ensayo a dos tiempos: 24 y 48 horas desde la aplicación de cada extracto. Los flavonoides ensayados no afectaron apreciablemente a la viabilidad celular de la línea utilizada, mostrando un reducido efecto antiproliferativo, por lo que consideramos que podría ser segura su utilización a nivel clínico.

Para el desarrollo de los objetivos dos y tres, hemos utilizado 16 conejas albinas Nueva Zelanda (3,5 – 6,3 Kg) distribuidas en cuatro grupos; (grupo I, control; grupo II, ovariectomía; grupo III,

ovariectomía + apigenina potásica; grupo IV, ovariectomía + naringenina potásica), estudiando su evolución durante 9 meses para evaluar los efectos de los flavonoides sobre la regeneración ósea a través de los métodos: Bioquímico, densitométrico, de imagen mediante microCT, histopatológico a través del microscopio (óptico y electrónico de barrido) y el estudio ionómico (icp-oes).

Con el método bioquímico estudiamos tres marcadores fundamentales en la formación ósea: La fosfatasa alcalina, el calcio iónico y el fósforo. Tanto la administración de la apigenina como de la naringenina mostraron una acción positiva sobre el recambio óseo estimulando los efectos de activación de las células osteoblásticas. Si bien este mecanismo de acción tuvo un desarrollo lento, en general, fue superior a los valores obtenidos por los animales del grupo II (ovariectomía).

En el estudio mediante microCT, los animales del grupo II (ovariectomía), mostraban un progresivo adelgazamiento y una distribución irregular de las trabéculas óseas con amplios espacios intertrabeculares, fundamentalmente a nivel del hueso trabecular, respecto al grupo I (control). En los grupos tratados, se observó menor disminución de la masa ósea así como de la desconexión entre las trabéculas, destacando los fenómenos de regeneración ósea.

El estudio histopatológico a través, tanto del microscopio óptico como del microscopio electrónico de barrido, a nivel de las zonas epifisarias: cortical y trabecular, mostró unos resultados superponibles a los del método anterior caracterizados por una disminución de la masa ósea en el grupo II (ovariectomía) respecto al grupo I (control).

Así mismo, el estudio ionómico confirmó la debilidad ósea presentada por los animales del grupo II (ovariectomía) con respecto al grupo I (control), en todos los parámetros analizados: calcio, fósforo y magnesio, si bien, estos resultados, indicaron que el uso tanto de la apigenina como de la naringenina, durante todo nuestro estudio, estimuló las actividades de regeneración osteoblástica en todas las zonas y parámetros estudiados.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- El estudio “in vitro” demostró que los flavonoides ensayados (apigenina y naringenina potásicas), no afectaban de forma negativa a la viabilidad celular.

2.- La deprivación estrogénica secundaria a la ovariectomía fue suficiente, en el plazo de ocho meses para conseguir desarrollar el modelo de osteoporosis planteado, como confirman los estudios morfológicos y de icp (ionómico).

3.- Tanto la apigenina potásica como la naringenina potásica han demostrado su eficacia como agentes protectores frente a la pérdida ósea inducida por la ovariectomía como demuestran los estudios morfológico y de icp (ionómico).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Adams JB, Brown HM.: Discoloration in raw and processed fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2007; 47(3):319–333.

Aherne SA, O'Brien NM.: Dietary flavonols: Chemistry, food content and metabolism. *Nutrition.* 2002; 18: 75–81.

Albright F, Bloomberg E, Smith PH. : «Postmenopausal osteoporosis.» *Trans Assoc. Am Physicians.* 1940; 55:298-305.

Alekel, D. L., Germain, A. S., Peterson, C. T., Hanson, K. B., Stewart, J.W., Toda, T.: Isoflavone rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(3): 844-52.

Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R.: Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 1988; 48(3): 589-601.

Alvarez, N.: Efectos saludables de flavonoides. Estudio experimental in vitro e in vivo. UMU, 2010

Arai, Y., Watanabe, S., Kimura, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., Kinoshita, N.: Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration. *J Nutr.* 2000; 130(9): 2243- 50.

Benavente-García O, Lorente J, Yáñez J, Martínez C, Lozano JA.: Antiproliferative activity of several phenolic compounds against melanoma cell lines: Relationship between structure and activity. *Agro FOOD industry hi- tech.* 2005; 4: 30-4

Benavente-García, O., Castillo, J.: Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(15): 6185-205.

Birt, D. F., Mitchell, D., Gold, B., Pour, P., Pinch, H. C.: Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res.* 1997; 17(1A): 85-91.

Boyce R.W., Franks A.F., Jankowsky M.L., Orcutt C.M., Piacquadio A.M., White J.M., Bevan J.A.: Sequential histomorphometric changes in cancellous bone from ovariectomized dogs. *J. Bone Miner. Res.*, 1990; 5: 947-953,

Canalis E, Bilezikian JP, Angeli A, Giustina A.: Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone.* 2004; 34:593-598.

Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A. F., Minna, J.D. Mitchell, J. B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987; 47(4): 936-42.

Carrasco, E.: Osteoporosis: Guía para evaluación, diagnóstico y tratamiento. Murcia. SEMERGEN, SMUMFYC y Sociedad Murciana de Reumatología. 2002

Castañeda S, Largo R, Calvo E, Rodríguez F, Marcos ME, et al.: Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol* 2006; 35: 34-41.

Castañeda, S. : «Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits.» *J Bone Miner Metab*, 2007: (en prensa).

Castillo, J., et al.: Uses and properties of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem*. 1997; 45(12): 4505-1

Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F et al.: Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *N Engl J Med*, 1992; 327: 1637-1642.

Chavassieux P, Buffet A, Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ.: Short-term effects of corticosteroids on trabecular bone remodelling in old ewes. *Bone*.1997; 20:451-455.

Chavassieux P. Bone effects of fluoride in animal models in vivo. A review and a recent study. *J. Bone Miner. Res.*1990; 5: Suppl. 1, S95-S99.

Chesnut CH, Silverman S, Adriano K et al. A.: Randomized trial of nasal salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. *Am J Med*. 2000; 109: 267-276.

Chiechi LM, Secreto G, D'Amore M, Fanelli M, Venturelli E, Cantatore F, Valerio T, Laselva G, Loizzi P.: Efficacy of a soy rich diet in

preventing postmenopausal osteoporosis. The Menfis randomized trial. *Maturitas*.2002; 42: 295-300.

Chun, O. K., Chung, S. J., Song, W. O.: Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of US adults. *J Nutr*. 2007; 137(5): 1244.

Cliford MN.: Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications fo health. *Planta Med*. 2004; 70: 1103-1114.

Comalada, M., Ballester, I., Bailón, E., Sierra, S., Xaus, J., Gálvez, J., Medina, F. S., Zarzuelo, A.: Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure–activity relationship. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(8): 1010-21.

Consensus Development Conference On Osteoporosis. En: National Institute Health Consensus Development Panel on Optimal Calcium Intake. *JAMA*.1994; 272:1942-1948.

Consensus Development Conference: Diagnosis, Prophylaxis, and Treatment of Osteoporosis. *Am J Med*. 1991; 90:107.

Cooper A, Cooper BB.: A teatrise on dislocation and on fractures of he joints. Churchill.London, 1822.

Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N.: Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*. 2009; 26(8): 1001-43.

Cummings SR, Browner WS, Bauer D, Stone K, Ensrud K, Jamal S, et al.: Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. *N Engl J Med.* 1998; 339:733-738.

Davey RA, MacLean HE.: Current and future approaches using genetically modified mice in endocrine research. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism.* 2006.

Davidson M.K., Lindsey J.R., Davis J.K.: Requirements and selection of an animal model. *Isr. J. Med. Sci.* 1987; 23: 551-555.

Del Pino Montes J et Al.: Paciente con fractura por osteoporosis posmenopáusica en España: circuito de atención médica. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2011

Díaz Curiel M, Rapado Errazti A, Garcés MV.: Desarrollo de un cuestionario de factores de riesgo de baja masa ósea. *Rev Esp Enf Metabol Óseas.* 2003; 12: 4-9.

Eberhardt AW, Yeager-Jones A, Blair HC.: Regional trabecular bone matrix degeneration and osteocyte death in femora of glucocorticoid-treated rabbits. *Endocrinology.* 2001; 142:1333-1340.

Gay G, Debaud JC.: Genetic study on indole-3 acetic acid production by ectomycorrhizal *Hebeloma* species: inter- and intraspecific variability in homo- and dikaryotic mycelia. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 1987; 26: 141-146.

Gennari C, Agnusdei D, Crepaldi G, Isaia G, Mazzuoli G, Ortolani S et al.: Effect of ipriflavone, a synthetic derivative of natural isoflavones, on

bone mass loss in the early years after menopause. *Menopause*. 1998; 5: 9-15.

Gould KS, Lister C. *Flavonoid functions in plants.: Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press. 2006; 397–442.

Grardel B, Sutter B, Flautre B, Viguier E, Lavaste F, Hardouin P.: Effects of glucocorticoids on skeletal growth in rabbits evaluated by dual-photon absorptiometry, microscopic connectivity and vertebral compressive strength. *Osteoporos Int*.1994; 4: 204-10.

Havsteen, BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*. 2002; 96(2-3):67-202.

Heijnen, C. G., Haenen, G. R., Oostveen, R. M., Stalpers, E. M., Bast,A.: Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radic Res*. 2002; 36(5): 575-81.

Hodgen G.D., Goodman A.L., O'Connor A., Johnson D.: Menopause in rhesus monkeys. Model for study of disorders in the human climacteric. *Am. J. Obstet. Gynecol*.1977; 127: 58.584.

Huang, C. H., Kuo, P. L., Hsu, Y. L., Chang, T.T., T seng, H.I., Chu, Y.T., Kuo, C., Chen, H., Hung, C.: The natural flavonoid apigenin suppresses Th1- and Th2- related chemokine production by human monocyte THP-1 cells through mitogen-activated protein kinase pathways . *J Med Food*. 2010; 13(2): 391-98.

Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, et al. Selective effects of genistein a soybean isoflavone, on B- lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*.1999; 140 (4): 1893-1900.

Jeon H, Kang H, Jung H, Kang Y, Lim C, Kim Y, Park E.: Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *J Ethnopharmacol*. 2008 Jan 4;115 (1): 82-8

Johannot, L., Somerset, S. M.: Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population. *Public Health Nutr*. 2006; 9(08): 1045-54.

Kelly, P.J., Is osteoporosis a genetically determined disease? *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1996; 103: 26–27.

Khan, T. H., Jahangir, T., Prasad, L., Sultana, S.: Inhibitory effect of apigenin on benzo (a) pyrene-mediated genotoxicity in Swiss albino mice. *J Pharm Pharmacol*. 2006; 58(12): 1655-60.

Kiel DP, Myers RH, Cupples LA.: The BsmI vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (bb) influences the effect of calcium intake on bone mineral density. *J Bone Miner Res*. 1997; 12: 1049.

Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A.: Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76(3): 560.

Kowalski, J., Samojedny, A., Paul, M., Pietsz, G., Wilczok, T.: Effect of apigenin, Kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor- alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep.* 2005; 57(3): 390-94

Kritz-Silverstein, D., Goodman-Gruen, DL.: usual Dietary Isoflavone Intake, Bone Mineral Density, and Bone Metabolism in Postmenopausal Women. *Journal of Women's Health & Gender-Based Medicine.* 2002; 11 (1): 69-80.

Kulisic, T., Krisko, A., Dragovic-Uzelac, V., Milos, M., Pifat, G.: The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare L. spp. hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris L.*) and wild thyme (*Thymus serpyllum L.*) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *Int J Food Sci Nutr.* 2007; 58(2): 87-93.

Lei-Guo Ming, Xiang Lv, Xiao-Ni Ma, Bao-Feng Ge, Ping Zhen, Peng Song, Jian Zhou, Hui-Ping Ma, Cory J Xian, and Ke-Ming Chen.: The Prenyl Group Contributes to Activities of Phytoestrogen 8-Prenynaringenin in Enhancing Bone Formation and Inhibiting Bone Resorption In Vitro. *Endocrinology.* 2013; 2012-2086;

Lewiecki EM, Baim S, Bilezikian JP.: Santa Fe Bone Symposium: Update on Osteoporosis. *J Clin Densitom.* 2009; 12:135-157.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5): 727-47.

Martínez, C.: Effects of several polyhydroxylated flavonoids on the growth of B16F10 melanoma and Melan-a melanocyte cell lines: influence of the sequential state of the flavonoid skeleton. *Flavonoid. M Research.* 2003; 13:1-7.

Meseguer Olmo, L.; Muñoz Ruiz, J.; Bernabeu Esclapez, A.; Clavel-Sainz Nolla, M.; Arcos Pérez, D.; Vallet Regí, M.; López Prats, F.; Lax Pérez, A.; Meseguer Ortiz de Villajos, C.L.: Cinética de crecimiento in vitro de osteoblastos humanos sobre cerámica porosa de hidroxiapatita *Revista de Ortopedia Traumatología.* 2006; 50(3): 224-232

Miyamishi K, Yamamoto T, Irida T, Motomura G, Jingushi S, Sueishi K, et al.: Effects of different corticosteroids on the development of osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford).* 2005; 44:332-336.

Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., Lasco, A., Frisin, N., D'Anna, R., Corrado, F., Pizzoleo, M.A., Cincotta, M., Altavilla, D., Ientile, R., Squadrito, F.: Effects of genistein and hormone replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo controlled study. *J Bone Miner Res.* 2002; 17 (10): 1904-12.

Moyano, F.J., Diaz, M., Alarcon, F.J. & Sarasquete, M.C.: Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 1996; 15: 121-130.

Myhrstad, MC., Myhrstad MC., Carlsen H., Dahl LI., Ebihara K., Glemmestad L., Haffner K., Moskaug J., Blomhoff R.: Bilberry extracts

induce gene expression through the electrophile response element. *Nutr. Cancer*. 2006; 54(1): 94 – 101.

Newman E, Turner A S, Wark J D.: The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* (4 Suppl). 1995; 16: 277-84.

Pacifici, R.: Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis—the second decade. *Endocrinology*. 1998; 139 (6): 2659–2661.

Pandya, S., Iyer, P., Gaitonde, V., Parekh, T., Desai, A.: Chemotaxis of *Rhizobium* SP.S2 towards *Cajanus cajan* root exudate and its major components. *Current Microbiology*. 1999; 38: 205-209

Pastoureau P., Arlot M.E., Caulin F., J Barrier. P., Meunier P.J., Delmas P.D.: Effects of oophorectomy on biochemical and histological indices of bone turnover in ewes. *J. Bone Min. Res*. 1989; 4: 1- 477.

Patel, D., Shukla, S., Gupta, S.: Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol*. 2007; 30(1): 233-45.

Raisz, LG.: Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.*,. 2005; 115: 3318-3325.

Ralston, SH. :. The genetics of osteoporosis. *QJM*. 1997; 90: 247.

Ren, W., Z. Oiao, H. Wang, L. Zhu and L. Zhang.: Flavonoids; Promising anticancer agents. *Med. Res. Rev*. 2003; 23: 519-534.

Riggs BL, Wahner HW, Seeman E, et al.: Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging: differences between the post-menopausal and senile osteoporosis syndromes. *J Clin Invest.* 1982; 70: 716-723.

Riggs, B.L., Khosla, S., Melton, L.J.: Sex steroids and the construction and conservation of adult skeleton. *Endocrine Reviews.* 2002; 23 (3): 279–302.

Rodgers J B, Monier-Faugere M C, Malluche H.: Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone.* 1993; 14 (3): 369-7

Rodriguez, J.: Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SK-MEL-1 Melanoma cell lines: relationship between structure and activity. *Melanoma research.* 2002; 12: 99-107.

Shanmugam, K., Holmquist, L., Steele, M., Stuchbury, G., Berbaum, K., Schulz, O., Benavente García, O., Castillo, J., Burnell, J., García Rivas, V., Dobson, G., Munch, G.: Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor production in murine microglia and macrophages. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52(4): 427-38

Shuid, AN et al.: The effects of *Labisia pumila* var. *alata* on bone markers and bone calcium in a rat model of post-menopausal osteoporosis. *Journal of Ethnopharmacology.* 2011; 133: 538–542

Srivastava, S.: Reproductive biology of Plants. Narosa Publishing House. In: Johri, B.M. and Srivastava, P.S. (eds). 2001; 22-44

Stevenson, D.E., Hurst, R.D.: Polyphenolic phytochemicals just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(22): 2900-16

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ.: FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.* 1995; 17 Suppl 4:125S–33S.

Turner, AS. .: Animal models of osteoporosis-necessity and limitations. *Eur Cell Mater.* 2001; 1: 66-81.

Vicente, V., Jordana, M.: Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad in vitro de líneas de melanoma. *Patología.* 1997; 30(1):18-27.

Weitzmann, M.N., Pacifici, R.: Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *The Journal of Clinical Investigation.* 2006; 116 (5): 1186–1194.

WHO.: Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok, Thailand. 2002

World Health Organization.: Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO technical report series 843. 1994. Geneva, Switzerland

World Health Organisation. Diet.: nutrition and the prevention of chronic disease. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. Technical Report Series 619. Geneva: World Health Organization 2003.

Yamaguchi M, Gao YH.: Anabolic effect of genistein and genistin on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissue of elderly rats: the

genistein effect is enhanced by zinc. *Mol Cell Biochem.* 1998; 178:377-82

Yamori, Y., Moriguchi, E. H., Teramoto, T., Miura, A., Fukui, Y., Honda, K.I., Fukui, M., Nara, Y., Taira, K., Moriguchi, Y.: Soybean isoflavones reduce postmenopausal bone resorption in female Japanese immigrants in Brazil: a ten week study. *J Am Coll Nutr.* 2002; 21(6):560-63.

Yano, S., Umeda, D., Yamashita, T., Ninomiya, Y., Sumida, M., Fujimura, Y., Yamada, K., Tachibana, H.: Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVA-immunized BALB/c mice. *Eur J Nutr.* 2007; 46(5): 257-63.

Yañez, J.: Cytotoxicity and antiproliferative of several phenolic compounds againsts three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutrition and Cancer.* 2004; 49(2): 191-199.

Yasumura Y, Kawakita Y Studies on SV40 in tissue culture – preliminary step for cancer research “in vitro.” *Nihon Rinsho.* 1963; 21:1201–1215. article in Japanese. This is the original publication describing the isolation and initial propagation of the Vero cell line.

ANEXO

ANEXO

Tabla de Pesos

PESOS KG.	madurez	semana 19	semana 23	semana 27	semana 35	semana 48
CONTROL 1	3,55	4,05	5,25	5,75	5,9	6,34
CONTROL 2	3,45	4,25	4,9	5,25	5,48	6,05
CONTROL 3	3,55	4,01	4,5	5,33	5,6	5,94
CONTROL 4	3,5	4,1	4,9	5,45	5,75	6,25
OVX 1	3,52	4,02	4,5	4,7	4,94	5,6
OVX 2	3,39	4,35	4,89	5,15	5,3	5,9
OVX 3	3,54	4,2	4,85	5,2	5,5	5,8
OVX 4	3,56	4,1	4,92	5,35	5,75	6,01
AK 1	3,5	4,5	5,68	5,7	5,9	6,02
AK 2	3,5	3,9	4,5	4,75	5	5,46
AK 3	3,5	4,25	4,35	4,56	4,94	5,65
AK 4	3,5	3,9	4,5	4,7	4,9	5,94
NGK 1	3,55	4,5	4,93	5,15	5,51	5,95
NGK 2	3,5	4,6	4,9	5,05	5,3	5,82
NGK 3	3,5	4,5	5,3	5,7	6,2	6,5
NGK 4	3,5	4,1	4,9	5,4	5,85	6,55

Tablas Bioquímica

CONTROL	0 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	150 DIAS	< 240 DIAS
ALP 1	98	67	43	37	33
2	100	79	69	67	55
3	100	77	62	59	57
4	104	74	61	54	35
CA⁺²1	13,7	12,9	13,2	12,8	12,5
2	13,2	14	14,1	13,8	12,9
3	13,8	14,2	13,6	12	12,1
4	12,5	13,7	12,5	12,1	13,2
P 1	4,8	3,2	3,8	4,1	3,5
2	6,7	4,9	4,9	4,1	3,8
3	6,7	4,9	3,5	3,3	3,4
4	5	4,8	3,1	3,5	4,4
OVX	0 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	150 DIAS	< 240 DIAS
ALP 1	86	58	49	33	19
2	110	67	38	27	23
3	75	68	60	42	28
4	86	58	49	33	19
CA⁺²1	9,8	11,4	13,2	13,1	13,6
2	9,3	12,2	11,5	10,9	10,1
3	13,2	13,1	12,2	13,7	13,7
4	13,5	14,2	15,2	14,9	15,1
P 1	5	4,5	4,4	4,5	4,7
2	4,5	3,9	3,7	3,5	3,1
3	4,8	3,5	3,9	3,5	3,5
4	4,8	5,4	6,2	5,7	5,8

APIGENINA	0 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	150 DIAS	< 240 DIAS
ALP 1	59	51	49	43	38
2	60	58	51	26	24
3	66	61	47	23	14
4	38	25	17	13	9
CA⁺²1	9,9	14,8	14,1	13,8	14
2	9,9	12,1	14,8	13	13,8
3	10,2	12,5	14,7	13,8	11,4
4	9,2	12,8	10,9	12,2	12,7
P 1	4	3,7	3,6	5,4	6,2
2	3,8	3,7	3,7	3,3	3,3
3	4,2	3,2	4,2	2,9	3,1
4	5,2	4,5	3,8	4,1	3,9

NARINGENINA	0 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	150 DIAS	< 240 DIAS
ALP 1	65	56	47	37	28
2	62	47	34	33	21
3	59	47	45	39	20
4	56	46	37	32	29
CA⁺²1	10,3	12,3	14,7	13,5	13,2
2	12,2	13,1	13,2	12,9	13
3	10,5	14,7	13,2	13,8	12,8
4	10,3	12,7	13,2	12,1	13
P 1	5,6	5	4,2	3,8	4,2
2	4,8	3,5	3,6	3,5	3,1
3	5	4,2	3,2	3,3	3,5
4	4,2	3,5	3,2	3,2	3,9

Tabla micro CT

CONTROL		OVARIECTOMÍA		APIGENINA		NARINGENINA	
FÉMUR	TIBIA	FÉMUR	TIBIA	FÉMUR	TIBIA	FÉMUR	TIBIA
BT/TV. Volumen de Hueso %							
238,11	242,62	181,61	217,75	278,45	310,95	288,02	341,6
264,12	289,12	197,76	224,65	298,23	307,12	259,49	291,46
221,89	253,78			301,25	297,37	274,24	302,59
Tb.Th. Grosor Trabecular μm							
3,34	2,4	2,24	0,93	2,6	1,94	2,15	0,73
3,97	2,97	2,79	1,47	2,45	1,78	2,25	0,85
3,29	2,78			2,73	2,01	2,08	0,64
Tb.Sp.Separación Trabecular μm							
3807,28	3664,61	2906,74	4191,8	3669,76	3658,5	4156,57	3836,69
4002,36	3985,53	3004,66	3972,73	3599,32	3380,43	4783,87	4287,72
3775,41	3384,77			3763,22	3697,93	4098,22	3758,43
Tb. Tb.N. Número Trabecular mm^{-1}							
0,14	0,1	0,12	0,04	0,09	0,06	0,07	0,02
0,19	0,14	0,1	0,08	0,08	0,07	0,08	0,05
0,12	0,11			0,1	0,09	0,09	0,03
Tb.pf. Conectividad Trabecular mm^{-1}							
7,78	10,39	12,19	11,16	5,76	4,92	5,52	6,62
6,87	9,02	11,97	10,74	5,98	5,02	6,9	7,02
8,05	9,53			5,29	4,87	6,03	6,98

Tabla icp-oes

CALCIO				
	control	ovx	Apigenina	Naringenina
Fémur Cortical	16,47	12,75	17,59	16,25
Tibia Cortical	15,91	10,67	16,08	16,97
Tibia Medular	1,05	0,25	3,48	2,16
Fémur Medular	7,71	1,17	8,24	3,59

FOSFORO				
	control	ovx	Apigenina	Naringenina
Fémur Cortical	8,11	2,83	8,77	8,05
Tibia Cortical	7,73	0,69	7,98	8,41
Tibia Medular	0,46	0,14	1,88	1
Fémur Medular	3,8	0,44	4,19	1,83

MAGNESIO				
	control	ovx	Apigenina	Naringenina
Fémur Cortical	0,19	0,19	0,2	0,2
Tibia Cortical	0,18	0,2	0,18	0,21
Tibia Medular	0,59	0,04	0,05	0,04
Fémur Medular	0,1	0,02	0,1	0,06