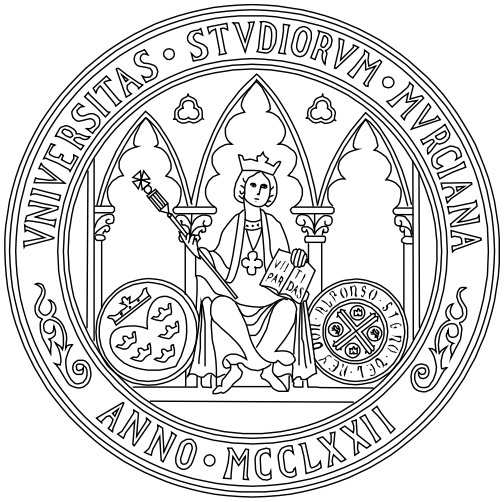


UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Estudio del efecto del extracto de Humulus Lupulus L. sobre un modelo de osteoporosis en ratas Sprague-Dawley.

Dª. Ester Mostazo Mendoza

2013

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN ENVEJECIMIENTO

Estudio del efecto del extracto de Humulus Lupulus L. sobre un modelo de osteoporosis en ratas Sprague-Dawley.

Dª. Ester Mostazo Mendoza

2013

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

“Lo importante no es lo que nos hace el destino, sino lo que nosotros hacemos de él”

Florence Nightingale

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no habría sido posible sin la ayuda y los conocimientos de toda la gente de la Universidad de Murcia, cada uno de ellos, se merecen mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar a mis directores de la tesis, al Dr. Vicente Vicente Ortega, por brindarme esta oportunidad, ayudarme a escribir esta tesis y por “empujarme” al mundo de la investigación; y a Francisco J. Gómez García, por su infinita paciencia y sobre todo por el ánimo en los momentos en los que no veía el final.

A mis compañeros del departamento: a Manolo, a Víctor, a Rocío, a Olga, pero sobre todo a Violeta y a María José, por todos los momentos compartidos. Tampoco habría sido posible sin la ayuda del personal del animalario: Nuria, Yolanda, Enrique, Fran, etc. por ello también: gracias.

A Nicolas Issaly, de la empresa *Naturex SL*, por contribuir con los compuestos flavonoides para realizar este trabajo y por aportarme nuevos conocimientos sobre el mundo de los flavonoides.

Al Dr. Manuel Canteras, por su ayuda en el estudio estadístico, su paciencia y por recibirme siempre en el despacho con una sonrisa.

A mi amiga Laura, porque fuiste, eres y serás mi enlace con esta comunidad. Que sin tu ayuda habría tardado el doble en terminar. Esta tesis, apartado por apartado, está llena de anécdotas contigo, unas mejores y otras no tan buenas, pero el conjunto de ellas es lo que siempre recordaré, tanto dentro del trabajo como fuera. También gracias a su inseparable Roque y a mi “prima Antonia de Jumilla”, me llevo unos grandes amigos de Murcia.

Pero tampoco esto sería realidad sin el apoyo y los ánimos de mi gente de Extremadura.

A mis compañeras de la carrera, Verónica, Sandra e Irene, porque formarme como enfermera, a vuestro lado, ha sido el gran acierto de mi vida, gracias chicas.

A mis amigos, sois mi *luz*, vuestros ánimos, vuestro apoyo, vuestras bromas y anécdotas, vosotros también formáis parte de este trabajo: Sandra, Beatriz, Jaime, Álvaro, Alba, Sancho, Diego.

A Jorge, juntos hemos logrado aguantar la distancia en la que, paradójicamente, siempre has estado ahí cuando lo necesitaba, has sido el que más me ha ayudado, aunque no con los conocimientos, pero sí con las palabras adecuadas que necesitaba oír, y eso es lo más importante para mí. *"Gracias por los días que vendrán".*

Y por último, a mi familia, que sois muchos para nombraros a todos, pero a cada uno de vosotros: gracias, por ser una familia de la que me encanta presumir. En especial, a mi padre y a mi madre, porque siempre estáis ayudándome a solucionar todos los *embrollos* en los que me meto; y a mi hermana, que vas a ser una gran fisioterapeuta y que tienes todo mi apoyo si decides meterte en este *tremendo jaleo* que es hacer una tesis.

A todos vosotros, muchísimas gracias. Este *"tochaco"* va por vosotros.

ÍNDICE

I) Introducción 1

II) Antecedentes 7

Tejido óseo 9

Anatomía y fisiología del hueso 9
Endocrinología y bioquímica ósea 14

Osteoporosis 21

Definición e historia 21
Fisiopatología 24
Epidemiología 25
Clasificación 27
Factores de riesgo 30
Prevención 39
Signos y síntomas 43
Diagnóstico 45
Tratamiento 54

Modelos experimentales de osteoporosis 67

Antioxidantes y flavonoides 77

Flavonoides y osteoporosis 82
Extracto de *Humulus Lupulus* L. (EHL) 84

III) Objetivos 87

IV) Material y métodos 91

Material 93

Animales 93
Aparatos 95
Agente 98
Fármacos 98

Métodos 100

Procedimiento experimental 100
Procedimiento quirúrgico 102
Estudio del peso 110
Estudio bioquímico 110
Estudio mediante microtomografía computerizada 113
Estudio anatomopatológico óseo 116
Estudio ionómico óseo 117
Estudio anatomopatológico del útero 119
Método estadístico 120

V) Resultados 121

Estudio del peso 123
Estudio bioquímico 127
Estudio mediante microtomografía computerizada 135
Estudio anatomopatológico óseo 153
Estudio ionómico óseo 173
Estudio anatomopatológico del útero 191

VI) Discusión 199

VII) Conclusiones 221

VIII) Bibliografía 225

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud define la osteoporosis como *"enfermedad sistémica del esqueleto caracterizada por una disminución de la masa ósea por alteraciones de la microestructura del tejido óseo, con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y, por lo tanto, de la susceptibilidad a la fractura*" (1993).

Este concepto describe las principales características de la osteoporosis: por un lado la pérdida de masa ósea y las alteraciones de la microestructura, y por otro el aumento de la fragilidad y las fracturas.

La pérdida progresiva de la masa ósea es debida a un desequilibrio en el remodelado óseo, que comienza por la pérdida de los minerales que otorgan las características de dureza y densidad propias de un hueso normal. Esto está estrechamente relacionado con las alteraciones de la microestructura, ya que la disminución de estos minerales provoca unas trabéculas más finas y menos conectadas. La combinación de estos dos aspectos origina microfracturas, que a largo o corto plazo, provocarán una fractura del hueso (González, 2004).

En España se calcula que más de 3,5 millones de personas la padecen, causando alrededor de 90.000 fracturas de cadera y 500.000 fracturas vertebrales al año (Del Pino Montés, 2011). El riesgo de fractura de cadera aumenta exponencialmente a partir de los 50 años, de tal forma que sobre los 80 años se produce el 50% de las fracturas de cadera, de las cuales el 95% se debe a una caída (Cummings, 2002). Otra fractura típica de la osteoporosis es la de columna, de las que se estima que el 1% de las mujeres mayores de 65 años ya han sufrido alguna, aumentando al 2% en las mayores de 75 y al 3% las mayores de 85 (Díaz Curiel, 2001).

La principal causa de la aparición de osteoporosis es la deprivación estrogénica característica de las mujeres postmenopáusicas. El estrógeno posee actividad inhibidora sobre el

osteoclasto, por lo que al disminuir, se produce el desequilibrio del remodelamiento óseo (Seeman E, 2002). Aunque también hay otras causas como el envejecimiento, carencias hormonales y nutritivas, inmovilización, fármacos, etc (Cooper, 1992).

El principal problema de la osteoporosis corresponde a que es una enfermedad silenciosa, pues no se suele diagnosticar hasta que aparece la primera fractura, por lo que los tratamientos, como los bifosfonatos, calcitonina, estrógenos, vitamina D, calcio, denosumab o el raloxifeno, suelen estar dirigidos a ralentizar la destrucción de masa ósea una vez detectado el problema. Aunque también existen fármacos promotores de la formación del hueso, como la hormona paratiroidea y el ranelato de estroncio (Lewiecki, 2009).

No obstante, la mejor opción siempre es la prevención. El objetivo consiste en que una vez alcanzado el pico máximo de masa ósea (23-25 años) (Slemenda, 1991), fortalecer el hueso para retrasar la aparición de la enfermedad. Para ello es recomendable la adquisición de hábitos de vida saludables como hacer ejercicio, evitar los tóxicos como el tabaco o el alcohol, además de mantener una buena alimentación rica en calcio y vitamina D (Bagur, 1992).

Se está considerando la inclusión de los flavonoides la ingesta como suplemento alimentario de flavonoides. Los flavonoides son un tipo de antioxidantes muy abundantes en la naturaleza, sobre todo en las frutas y verduras. Dentro de la gran variedad de formas que existen, hay una clase con una estructura química muy similar a los estrógenos, que son capaces de unirse a sus receptores, activándolos, por lo que pueden ejercer una función análoga (Milligan, 2000; Schaefer, 2003).

El flavonoide utilizado en nuestro estudio proviene del extracto de la planta *Humulus Lupulus* L. (EHL). Diversos estudios han demostrado el efecto del EHL en mujeres postmenopáusicas, describiendo que

sentían alivio de los llamados “sofocos” así como otros síntomas característicos (Heyerick, 2006; Erkkola, 2010). También se han realizado estudios sobre sus efectos en el hueso en los que se ha observado una reducción de la pérdida de hueso (Hümpel et al., 2005). Por lo que decidimos ensayar el efecto del extracto de *Humulus Lupulus* L. sobre un modelo experimental de osteoporosis por deprivación hormonal tras extirpar ambos ovarios en ratas Sprague-Dawley.

II. ANTECEDENTES

Tejido óseo

Anatomía y fisiología del hueso:

El **sistema esquelético** es órgano activo, que forma parte del sistema locomotor, formado por unidades más pequeñas: los huesos. Sus funciones se resumen en: 1) resistir cargas propias y expertas, 2) servir de palanca para la locomoción, 3) proteger órganos internos, 4) función hematopoyética y 5) almacenamiento de minerales como calcio, fósforo, magnesio y sodio.

Los huesos se pueden clasificar según su forma y dimensión en:

Tipo	**Largos**	**Cortos**	**Planos**	**Irregulares**
Ejemplo	Fémur	Piramidal	Occipital	Vértebras
Características	Se dividen en tres partes: diáfisis (parte alargada interna), epífisis (extremos) y metáfisis (unión entre la epífisis y la diáfisis).	Largo, ancho y espesor casi iguales.	Formado por dos láminas de hueso compacto y entre medias, hueso trabecular.	No tienen una forma regular y no coinciden en las clasificaciones anteriores.

Tipo:	**Neumáticos**	**Sesamoideos**	**Accesorios**
Ejemplo:	Esfenoides.	Hueso sesamoideo del pie.	Huesos suturales del cráneo.
Características:	Contienen cavidades o celdas.	Se desarrollan en algunos tendones.	Se forman cuando aparece un centro de osificación adicional.

Tabla 1. Clasificación de los huesos.

Se distinguen cuatro partes en el hueso: el periostio, tejido óseo, el endostio y la médula ósea.

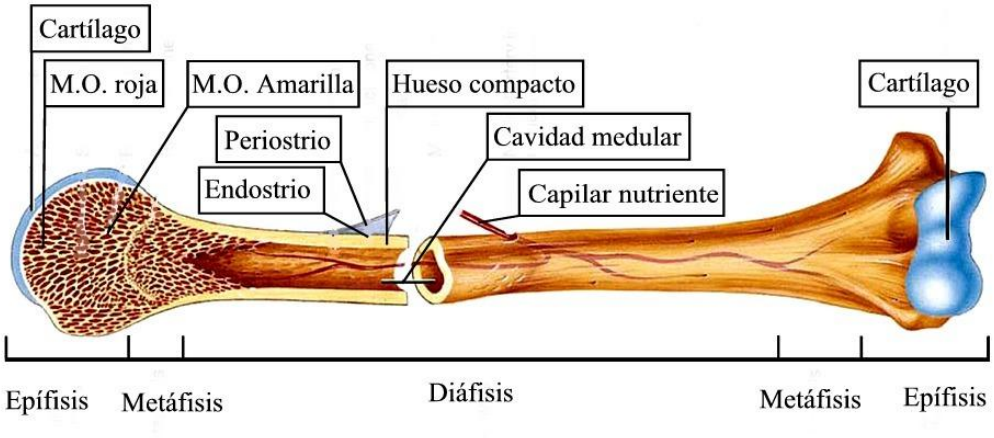


Figura 1. Estructura y divisiones del hueso.

- **Periostio:** es una membrana fibrosa y resistente que rodea todo el hueso excepto las zonas recubiertas por cartílago en las que forman articulaciones. La capa externa del periostio está en contacto con músculos, tendones y fascias que se unen al hueso a través de esta capa, y en algunos casos está en contacto con la piel. En la capa interna se encuentran las ramificaciones vasculares y nerviosas destinadas al hueso.

- **Endostio:** es una fina capa de tejido conectivo cuya función es rellenar y cubrir las cavidades vascularizadas, cavidad medular, las trabéculas óseas que forma el hueso esponjoso y los canales nutricios.

- **Médula ósea:** compuesta por la médula ósea roja, cuya función es constituir los elementos sanguíneos; y la médula ósea amarilla, que es tejido adiposo.

- **Tejido óseo:** formado por las distintas células óseas, colágeno y cristales de hidroxipatita. Las células óseas son:

    - **Osteoblastos**: son las encargadas de la osteogénesis (formación de hueso) a partir de la síntesis del osteoide (tejido no calcificado) y de controlar su calcificación.

    - **Osteocitos**: son osteoblastos maduros e inactivos rodeados de la matriz orgánica intercelular capaces de desarrollar canales de conexión (canalículos) con otros osteocitos y con vasos sanguíneos del periostio para alimentarse.

    - **Osteoclastos**: son los encargados de la reabsorción del hueso. Son capaces de eliminar tanto la matriz ósea como el calcio.

Con respecto a su estructura podemos diferenciar dos partes en el hueso, aunque a veces puede aparecer sólo uno de ellos: el **hueso cortical** y el **trabecular**. El cortical se caracteriza por ser denso y compacto, normalmente se encuentra en la diáfisis de los huesos largos y en los platillos vertebrales, constituyendo el 80% del esqueleto. El hueso trabecular está formado por una red ósea que recubre las cavidades medulares.

Remodelado óseo:

Desde la formación completa del esqueleto y hasta el final de la vida, el hueso se va renovando por ciclos de destrucción del hueso (**resorción ósea**) y creación o reemplazo de ese hueso destruido por hueso nuevo (**formación ósea**). A esto se le conoce como **remodelamiento óseo**. Es un proceso equilibrado, es decir, que al final de cada ciclo hay la misma cantidad de hueso que al inicio. Este equilibrio se mantiene gracias a un exacto y complejo control hormonal y bioquímico.

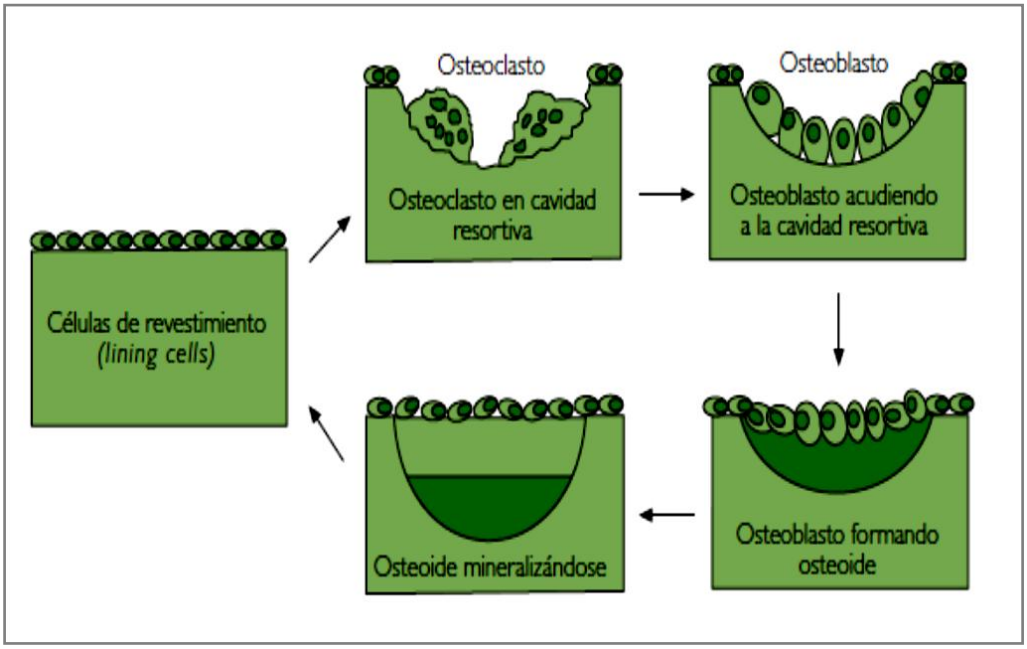


Figura 2. Ciclos de resorción y formación ósea.

Durante el proceso de formación ósea destacan dos fases: una **fase orgánica** formada en un 90% por fibras de colágeno I que se agrupan para originar la matriz ósea u osteoide, y otros componentes no proteínicos como la osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas, etc. Y una segunda **fase inorgánica** formada en un 65% por cristales de calcio y fósforo que al depositarse sobre la matriz le otorga al hueso dureza y consistencia.

Endocrinología y bioquímica ósea:

El remodelado óseo está controlado por factores hormonales y bioquímicos, que a su vez dependen de la edad y, sobre todo, de la menopausia en el caso de la mujer, y ocasionar una serie de alteraciones que afectan a la regulación del calcio, hormonas sexuales y factores de crecimiento.

1. Hormonas reguladoras del calcio:

Son importantes: la **calcitonina**, la **hormona paratiroidea** y la **vitamina D**.

La calcitonina se encarga de la inhibición de la resorción ósea y es segregada por las células parafoliculares de la glándula tiroides. La hormona paratiroidea (PTH) es segregada también por la glándula tiroides y tiene una acción de resorción. La 1,25 dihidroxi-vitamina D (precursor de la vitamina D) se encarga de la absorción a nivel intestinal del calcio y el fósforo ingeridos y mantiene una estrecha relación con la PTH, pues una disminución de la ingesta de vitamina D o de calcio pueden causar un hiperpartiroidismo secundario, por lo tanto aumentar la PTH y provocar un aumento de la actividad resortiva.

2. Hormonas sexuales:

a. Estrógenos:

Los estrógenos ejercen una acción indirecta sobre la inhibición de la resorción ósea, ya que actúan inhibiendo la síntesis de las interleucinas 1 y 6 (IL-1; IL-6) encargadas de la resorción ósea, también ejercen la acción contraria de la PTH,

aumentan la secreción de la 1,25 dihidroxi-vitamina D y calcitonina y por tanto el aumento de la absorción intestinal de calcio y fósforo.

Una disminución de la función ovárica causa una mengua de la secreción de estrógenos, propio de las mujeres mayores de 70 años. Distintos estudios han demostrado que las mujeres que segregan estrógenos aunque sea en pocas cantidades tras la menopausia, tienen menos posibilidades de padecer una fractura que los que ha dejado de segregarlos de forma definitiva (Cummings, 1998).

Existen receptores estrogénicos en osteocitos, osteoblastos y osteoclastos.

b. Andrógenos:

La deficiencia de andrógenos afecta a la resorción ósea de la misma manera que la deficiencia de estrógenos, e igualmente los andrógenos estimulan la formación ósea. Se ha observado osteoporosis en hombres con alteraciones 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 una conexión entre la disminución de estrógenos y la pérdida de masa ósea en hombres ancianos.

3. Hormonas tiroideas:

Son necesarias para el crecimiento y el desarrollo del hueso, sobre todo para el cartílago. Sin embargo, en altas concentraciones ejercen un efecto contrario: aumentan la resorción por un estímulo osteoclástico directo. Esto adquiere consecuencias negativas, por

ejemplo, en los pacientes que padecen hipertiroidismo y que están siendo tratados con antitiroideos, pues pueden causar una osteoporosis por disminución de estas hormonas, sin embargo no hay ninguna evidencia de que la hormona tiroidea esté involucrada en la osteoporosis primaria.

4. Cortisol:

El cortisol disminuye la absorción intestinal del calcio y su aumento causará un aumento de la TSH (hiperparatiroidismo secundario). Su control está determinado por los niveles de calcio en sangre. Numerosos estudios han demostrado que un exceso de glucocorticoides causa osteoporosis mediante la inhibición de la formación ósea debida a una disminución de la actividad y destrucción de los osteoblastos.

5. Citoquinas:

Las citoquinas son sustancias de naturaleza proteica que actúan como mediadoras entre células. Son un elemento importante en el remodelamiento óseo junto con los factores de crecimiento, las células óseas y elementos adyacentes. Las más destacadas son: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

6. Otros factores locales:

Otros elementos implicados en la remodelación ósea, que al igual que los descritos anteriormente, es importante que se mantengan en equilibrio para evitar un desajuste en la remodelación ósea. Son: insulina, hormona del crecimiento, factores de crecimiento insulínico

(IGF), amilina, factores de crecimiento y transformación (TGF-α, TGF-β), factores de crecimiento fribroblástico (FGFa, FGFb), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).

Marcadores del remodelado óseo:

Estos marcadores son componentes celulares y extracelulares del tejido óseo que indican el estado del remodelado óseo, si hay una mayor resorción o formación. Estas sustancias son fáciles de obtener y su análisis da información útil y precisa. Se clasifican en: marcadores de formación ósea y marcadores de resorción ósea.

1. Marcadores de formación ósea:

Son aquellos que tras su análisis muestran el estado de formación ósea:

- *Fosfatasa alcalina total (ALPt) y ósea (ALPo):* es la actividad enzimática del osteoblasto. Se obtiene del suero hasta un 90% de la ALPt del que un 50% procede del hueso y el otro 50% del hígado, existiendo pruebas específicas capaces de diferenciar un tipo del otro.

- *Osteocalcina:* es un marcador sensible y específico de la actividad osteoblástica, de la que entre un 15 y un 20% se queda fijado al hueso y el resto pasa al organismo, del que se obtiene a través de las extracción de suero. Es una proteína sintetizada por el osteoblasto presente en la matriz ósea, en la dentina y en otros tejidos minerales y aunque su función no se conozca exactamente, se sabe que interviene en el mantenimiento del equilibrio del remodelado óseo.

- *Propéptidos aminoterminal y carboxiterminal del procolágeno tipo 1:* el colágeno se sintetiza a partir de su molécula precursora el procolágeno con dos secuencias adicionales en los extremos y que es secretado por el osteoblasto. Una vez secretado, las enzimas específicas separan la molécula de procolágeno en colágeno y las dos terminaciones amino (PINP) y carboxilo (PICP) que pasan a la sangre donde podrán ser medidas. Indican la acción de la fase colágena durante la formación ósea.

2. Marcadores de resorción ósea:

Reflejan tanto la cantidad como la actividad de los osteoclastos.

- *Fosfatasa ácida resistente al tartrato:* se encuentran en el osteoclasto y además en la próstata, las plaquetas, los eritrocitos y el bazo. Tiene dos formas: FART 5a y FART 5b, siendo la segunda la que procede de los osteoclastos durante la resorción activa del hueso.

- *Hidroxiprolina, pirilodinas y osteonectina:* son aminoácidos presentes en el colágeno. Su medición se hace través de la orina. Su falta de especificidad, la necesidad de medirlo en orina de 24 horas pues los resultados se ven influenciados por la ingesta de colágeno durante el día anterior y que sólo se elimina un 10%, ha hecho que el análisis de estos marcadores sean sustituidos por otros.

- *Sialoproteína ósea:* es una fosfoproteína no colágena sintetizada tanto por los osteoblastos como por los osteoclastos, pero se ha demostrado que está más asociada a las acciones de resorción ósea.

- *Telopéptidos aminoterminal y carboxiterminal del colágeno 1:* es un producto del colágeno y tiene dos formas NTx y CTx que se pueden determinar tanto en orina como en suero, aunque estas pruebas no están disponibles en España. Determinan la resorción de la masa ósea en casos clínicos.

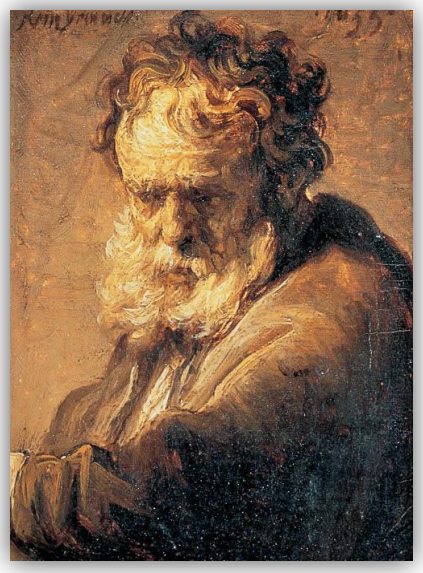
3. Otros marcadores bioquímicos del remodelado óseo:

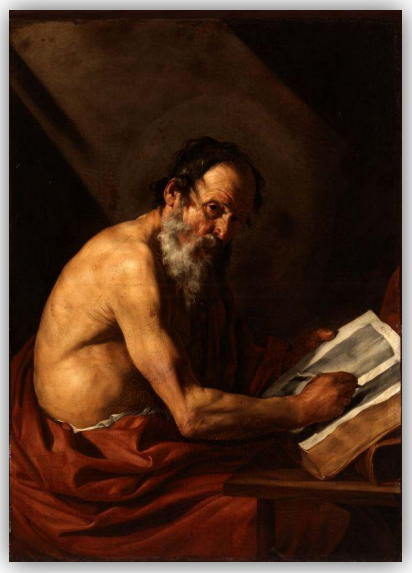
Son determinantes de la calidad ósea: catepsina K (valores en suero de esta proteína indican el número de osteoclastos), fragmentos urinarios de osteocalcina (se considera que estos fragmentos son productos de la resorción ósea), osteocalcina infracarboxilada (su aumento en el suero se asocia con un aumento del riesgo de fractura en mujeres postmenopáusicas), Alfa-CTx y beta CTx y pentosidina (se asocia aumento de esta molécula con una mayor masa ósea) (Sociedad Española de Reumatología, 2010).

Osteoporosis

Definición e historia:

Se tienen pocas referencias históricas de que la población de la antigüedad padeciera osteoporosis, hecho comprensible teniendo en cuenta que la esperanza de vida era de 30-40 años y que la osteoporosis es una enfermedad estrechamente ligada a la vejez. Sin embargo, hay estudios realizados sobre antiguas momias egipcias con defectos en la columna vertebral (jorobas) que recuerdan mucho a las características espaldas encorvadas de la osteoporosis. Siglos más tarde, antes de que se descubriera la enfermedad, se puede observar esa misma característica de la espalda encorvada en representaciones de hombres y mujeres ancianos sobre lienzos del siglo XV al XVIII (Hoffmann, 2008).





Figuras 3 y 4. Izquierda: Rembrandt. “Retrato de un viejo con barba”. Derecha: José de Ribera. “San Jerónimo”.

Fue en 1770 cuando, en Inglaterra, el cirujano *Jonh Hunter* estudió los cambios de crecimiento y destrucción que sucedían en el hueso de animales, y por lo tanto en describir por primera vez el remodelamiento óseo. Aún así, no se reconoció la osteoporosis como una patología hasta 100 años más tarde cuando *Jean Georges Lobstein*, médico francés, en 1830 constató unos "agujeros mayores" en los huesos de algunos de sus pacientes, a lo que denominó osteoporosis (Hoffmann, 2008).

Osteoporosis significa literalmente "hueso poroso" (*osteon* = hueso, *poros* = poro, *sis* = proceso) que se consolidó como un término clínico gracias a Dr. Albright en 1940, refiriéndose a la osteoporosis como "poco hueso en el hueso" dándole más importancia a la cantidad del hueso que a la porosidad del mismo (Kanis, 1996). También relacionó la pérdida de masa ósea con la disminución de los estrógenos en la mujer, definiendo la osteoporosis 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). A partir de entonces, la osteoporosis pasa de ser una curiosidad científica a tratarse como un problema real de salud pública.

Esta definición se mantuvo hasta que en 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el Congreso mundial de la osteoporosis en Hong Kong, teniendo en cuenta los nuevos métodos de diagnóstico por imagen (densitometría ósea) y la relación directa de la enfermedad con la fracturas, actualizó la definición de osteoporosis como: *"enfermedad sistémica del esqueleto caracterizada por una disminución de la masa ósea por alteraciones de la microestructura del tejido óseo, con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y, por lo tanto, de la susceptibilidad a la fractura".*

En esta evolución de la definición la osteoporosis pasa de ser un problema relacionado solamente con la pérdida de minerales a nivel

óseo a verse como un desequilibrio del remodelamiento óseo, en el que la actividad de los osteoclastos (destructores del hueso) es más elevada que la de los osteoblastos (regeneradores de hueso) y de ahí la mayor porosidad del hueso y por lo tanto la fragilidad y mayor riesgo de fractura del hueso (Castelo-Branco, 2009).

Finalmente, la última definición completa que la osteoporosis es una *"enfermedad esquelética diseminada y caracterizada por una resistencia ósea disminuida que incrementa el riesgo de padecer fracturas"* (NIH, 2001).

Fisiopatología:

La debilidad del hueso se mide tanto en calidad (deterioro de la microarquitectura) como en cantidad (masa ósea disminuida). Teniendo en cuenta esto y el proceso de remodelamiento del hueso con sus fases de resorción y formación, se entiende por **osteopenia** como la consecuencia del desequilibrio entre la fase de resorción y la de formación del hueso, y por lo tanto la pérdida de minerales que otorgan las características de dureza y densidad propias de un hueso normal y se considera **osteoporosis** cuando hay una pérdida de masa ósea importante y además un alto riesgo de fractura, osteoporosis de alto recambio cuando hay un incremento de la resorción ósea y osteoporosis de bajo recambio cuando lo que disminuye es la formación de hueso.

La alteración de la microarquitectura se ve afectada por el aumento de la remodelación ósea, por la presencia de microfracturas, perforaciones y trabéculas discontinuas. La disminución de la masa ósea se debe, sin embargo, a un pico de masa ósea bajo, a una mayor resorción y a una disminución de la formación de hueso.

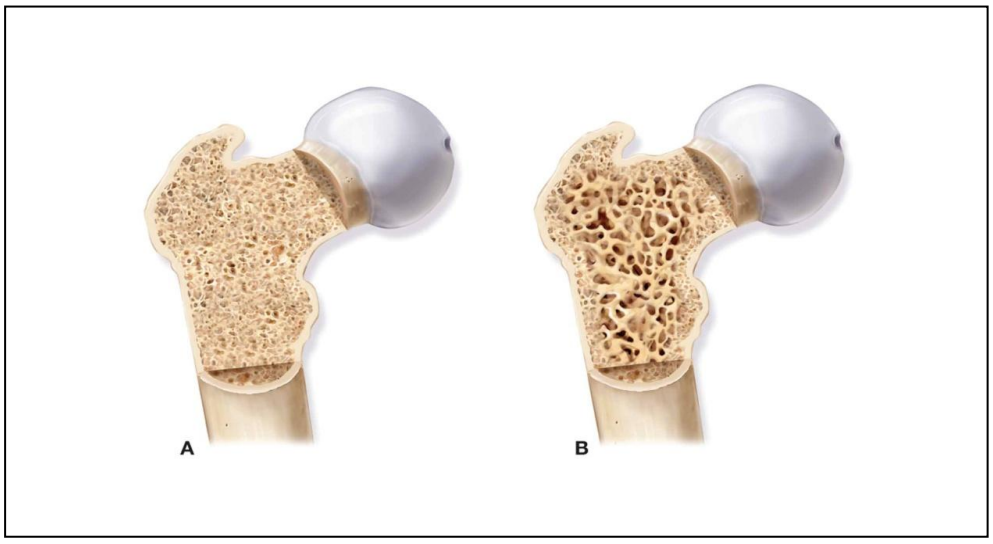


Figura 5. Estructura ósea normal (A) y estructura ósea con osteoporosis (B).

Epidemiología:

Al ser una enfermedad difícil de diagnosticar por no manifestarse hasta que aparecen las complicaciones, su prevalencia exacta es desconocida y varía según se tenga en cuenta los pacientes con fracturas o los diagnosticados por densitometría ósea. Aún así, según criterios de la OMS, la prevalencia se estima en un 35% de las mujeres mayores de 50 años, elevándose a un 52% en las mayores de 70. La incidencia anual de fractura de fémur en mujeres de edad superior a 50 años es de 3 por 1000 y la incidencia de fractura de antebrazo distal es de casi el doble en todo el mundo.

En España, un estudio realizado en 2001 (Díaz Curiel, 2001) llegó a la conclusión que el pico de masa ósea en mujeres estaba en un rango de edad de 30-39 años y que la prevalencia de osteoporosis bien en la columna lumbar o en el cuello femoral era de un 26,07% en mujeres mayores de 50 años. De la población de mujeres españolas, un 12,73% presenta osteoporosis o en la columna lumbar o en el cuello del fémur, y un 2,68% lo presenta en ambas zonas.

En resumen, actualmente en España más de 3,5 millones de personas padecen osteoporosis, lo que equivaldría en número de fracturas a 90.000 fracturas de cadera y 500.000 en la columna lumbar al año (Del Pino Montes, 2011).

Además, numerosos estudios y análisis de sociedad han llegado a la conclusión de que debido al envejecimiento de la población se ha previsto que una de cada tres mujeres y uno de cada cinco hombres padecerá osteoporosis y que si no se toman medidas de prevención, como el desarrollo de nuevos canales de información que ayuden a los pacientes a comprender la enfermedad y a cumplir con el tratamiento para reducir el riesgo de las fracturas y por lo tanto mejorar su calidad

de vida, se elevará el gasto sanitario a niveles millonarios (Díaz Curiel, 2003).

Clasificación:

Existen numerosas clasificaciones de la osteoporosis:

1. Según la extensión de la enfermedad: generalizada o localizada (osteoporosis por desuso, como es el caso de las inmovilizaciones por fractura).

2. Según la edad de comienzo: juvenil, del adulto joven, presenil o senil.

3. Según los criterios clínicos: activa o pasiva.

Pero la más aceptada y extendida es la clasificación según su etiología (Riggs y Melton, 1998):

1. Osteoporosis primaria o de causa idiopática:

Este grupo incluye los distintos casos de osteoporosis de causa desconocida y que tampoco identifica ninguna enfermedad que lo justifique. Son:

a. Osteoporosis idiopática juvenil:

Es un raro trastorno que afecta desde niños a adultos jóvenes (8-14 años) de ambos sexos con función gonadal normal. Se caracteriza por un fuerte dolor óseo y fracturas ante pequeños traumatismos. La remisión es espontánea al cabo de 4-5 años.

Dentro de este tipo de osteoporosis también se encuentra la **osteoporosis del adulto joven** que afecta tanto a hombres como a mujeres sin que se observe ningún factor etiológico. En las

mujeres suele darse tras el embarazo que presentan una disminución de su DMO, sobre todo en el hueso trabecular, que permanece baja durante varios años.

b. Osteoporosis tipo I o postmenopáusica:

Es la llamada osteoporosis posmenopáusica en la mujer, por su relación con el déficit de estrógenos. Se manifiesta entre los 51 y los 75 años y se caracteriza por la pérdida acelerada del hueso trabecular. Son características las fracturas de la parte distal del radio y el aplastamiento vertebral.

Se sabe que la función del factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OPG) está inducida por los estrógenos, por eso con la menopausia y con el declive de las hormonas sexuales se alteran los reguladores naturales de la masa ósea y aumenta de la pérdida del tejido óseo. En el caso de los hombres está vinculado al descenso de andrógenos. En ambos sexos se observa una disminución de la PTH.

c. Osteoporosis tipo II o senil:

Es el resultado de una disminución de la actividad de los osteoblastos relacionada con la edad y las consecuencias del envejecimiento (menor absorción de calcio en el intestino, sedentarismo, disminución de la absorción renal del calcio, malnutrición, etc.). Se da en mayor proporción en y en mayores de 70 años. Afecta tanto al hueso cortical como al trabecular y las fracturas más frecuentes son las del cuello del fémur, parte proximal de la tibia, parte distal del húmero y pelvis.

2. Osteoporosis secundaria:

Está determinada por agentes etiológicos conocidos, como por ejemplo por causas endocrino-metabólicas, nutricionales, digestivas, por agentes físicos y tóxicos (radioterapia, ultrasonidos, intoxicación metálica, alcoholismo, etc.), por fármacos, enfermedades del tejido conectivo, enfermedades hematológicas y por el desuso como en caso de inmovilizaciones prolongadas, la falta de ejercicio y las caídas.

Factores de riesgo:

A pesar de los avances en los métodos de diagnóstico de la osteoporosis, actualmente sigue sin existir un método fidedigno que permita conocer con total seguridad si una persona va a padecer osteoporosis. Sin embargo, gracias a los diferentes estudios a lo largo de la historia se han descubierto una serie de factores que condicionan si una persona tiene más o menos probabilidades de padecer osteoporosis. Estos factores de riesgo se clasifican en "no modificables", que son una característica o condición propia de la persona que la predispone a padecer osteoporosis. Por otra parte los otros factores de riesgo se clasifican en "modificables", esto es, se puede influir sobre ellos y modificarlos para evitar en la medida que sea posible la aparición de la enfermedad.

No modificables	**Modificables**
Sexo Raza Clima Envejecimiento Antecedentes personales Antecedentes familiares Déficit de hormonas sexuales Enfermedades	Sedentarismo Peso Ingesta de calcio Estatus de la vitamina D Tabaco Alcohol Café y té Otros factores de riesgo nutricionales: Dieta alta en proteínas Dieta alta en sodio Deficiencia de vitaminas C y B12 Baja ingesta de flúor, zinc, boro y vitamina K Glucocorticoides Otros fármacos

Tabla 2. Factores de riesgo de la osteoporosis.

A. No modificables:

Las células poseen el material genético que determina la forma de actuar respecto a la creación, resorción y mantenimiento del hueso, lo cual es un factor muy importante a la hora de entender la aparición de la enfermedad. Pero estos factores no modificables pueden estar influidos por otros factores exógenos que agravan la probabilidad de padecer la enfermedad. Algunos de estos factores no modificables son:

1. Sexo:

La mayoría de los individuos de la población que padecen osteoporosis son mujeres, con una prevalencia de 15-20:1 respecto al hombre. Esto se debe a que las mujeres alcanzan un pico de masa inferior al tener un esqueleto más pequeño y viven más tiempo para perderla. También hay que tener en cuenta que los cambios hormonales debidos a la menopausia contribuyen a una pérdida más rápida de la masa ósea. Respecto a los hombres, hay estudios que señalan que la prevalencia es mayor por un estilo de vida en el que predomina la actividad física hasta los 60 años, a partir de esta edad la prevalencia es mayor en mujeres (Cooper, 1992).

2. Etnias:

La etnia caucásica y oriental tienen mayor riesgo que la negra y lo latinoamericana.

3. Clima:

En lugares con poco sol se ve reducida la síntesis y la actividad de la vitamina D.

4. Envejecimiento:

El riesgo aumenta por cada 10 años más de edad, afectando por igual a hombres y a mujeres. La pérdida de masa ósea comienza una vez alcanzado el pico máximo de masa ósea a los 25-30 años, por el cambio de comportamiento en las células del hueso, sobre todo en mujeres postmenopáusicas que ven incrementado la pérdida de hueso.

5. Antecedentes personales:

A partir de la primera fractura debida a una densidad baja de masa ósea (DMO) el riesgo de padecer más se incrementa entre 1,5 y 9,5 veces, que comparado con una persona que no tenga fracturas previas, el riesgo es 2,2 veces mayor. Estos valores dependen en gran medida de la edad del paciente y de la localización de la fractura.

6. Antecedentes familiares:

El riesgo aumenta a mayor número de familiares con una historia de fractura por baja densidad ósea.

7. Déficit de hormonas sexuales:

Una baja densidad ósea también se asocia con situaciones que causan déficit de hormonas sexuales como:

- Menarquía tardía
- Amenorrea durante más de un año
- Nuliparidad por causas hormonales. Si la causa es otra, no se ha demostrado la relación.
- Lactancia durante más de 6 meses, aunque tras la lactancia los valores de DMO vuelven a ser normales.
- Embarazo: se ha descrito un tipo de osteoporosis durante el embarazo, que no causa problemas si el aporte de calcio se adapta a las necesidades de la madre y del feto. Aunque algunos estudios defienden que es un factor protector (Glerean, 2000).
- Déficit de estrógenos antes de la menopausia causado por anorexia nerviosa, ejercicio excesivo, estrés mental, etc.

8. Enfermedades:

Algunas enfermedades, sobre todo de tipo hormonal, también pueden provocar una osteoporosis secundaria, como: hipogonadismo, hipercortisolismo, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, Cusing, malnutrición, insuficiencia renal, hepatopatía severa, etc.

B. Modificables:

1. Sedentarismo:

Los individuos que no hacen ejercicio regular tienen más riesgo de perder masa ósea. Para evitar esto, se recomienda un ejercicio ligero de media hora o una hora al día como por ejemplo andar, correr, ejercicios de rodilla, deportes de raqueta, etc. Dentro de este factor de riesgo, cabe destacar aquellos ancianos inmovilizados total o parcialmente que presentan una pérdida de masa ósea más acelerada.

2. Peso:

La extrema delgadez es un factor de riesgo importante, esto se explica en que existe una mejor correlación entre el tejido adiposo y la masa ósea porque, además de ofrecer un colchón frente a los traumatismos, el tejido adiposo es una fuente de estrógenos en las mujeres postmenopáusicas. Las personas con un índice de masa corporal (IMC) inferior a 19 kg/m^2 pierden el doble de masa ósea que las personas con un IMC normal o superior.

3. Ingesta de calcio:

El consumo adecuado de calcio durante la infancia y la adolescencia se asocia positivamente con una mayor DMO. Una vez alcanzada la vejez estos alimentos deben seguir siendo ingeridos, además de complementos de calcio para minimizar la pérdida de masa ósea.

4. Estatus de la vitamina D:

La vitamina D (calciferol) es necesaria para que el calcio se absorba en el intestino delgado. Su déficit provoca un aumento de la hormona paratiroidea y una alteración de la masa ósea sin afectar a su mineralización, además el bajo consumo de vitamina D durante la etapa de crecimiento disminuye la estatura y el pico de masa ósea.

5. Tabaco:

Existe una relación inversa entre el número de cigarrillos consumidos por una mujer menopáusica y el riesgo de fractura de cadera. Las mujeres menopáusicas fumadoras sufrirán una pérdida de masa ósea un 2% mayor que en mujeres que no fumen, lo que se verá incrementado hasta un 6% pasado los 80 años.

6. Alcohol:

El abuso en el consumo de alcohol está asociado con una supresión de la actividad del colágeno y los osteoblastos, además también influye en la absorción del calcio por el intestino delgado y suele ir acompañado de malnutrición de la persona. Contrariamente la ingestión de pequeñas cantidades de alcohol ha demostrado ejercer un efecto protector sobre la osteoporosis siendo la cantidad recomendada de 200 ml en mujeres y 400 ml en hombre, semanales.

7. Café y té:

En diversos estudios se ha observado que las personas que padecen osteoporosis suelen consumir grandes cantidades de café, cuya relación con la pérdida de masa ósea consiste en que la cafeína causa una mayor excreción urinaria de calcio.

El té, al igual que el café, contiene cafeína, por lo que también se le considera un factor de riesgo. Sin embargo, también se considera que es un factor protector por la presencia de flavonoides estrogénicos en sus componentes.

8. Otros factores de riesgo nutricionales:

a. **Dieta alta en proteínas**: un exceso de consumo de proteínas se asocia con un aumento de la excreción de calcio a través de la orina, y por lo tanto aumenta la pérdida ósea. Sin embargo, la baja ingesta proteica lleva a una disminución de la absorción del calcio y causa también un hiperparatiroidismo secundario (Kerstetter, 2002).

b. **Dieta alta en sodio:** también se ha demostrado que las personas que consumen una dieta alta en sodio excretan más calcio a través de la orina. Por lo tanto las recomendaciones de calcio en mujeres postmenopáusicas son de 2000 mg al día (lo que equivale a unos 5 g. de sal) (Oria, 2003).

c. **Deficiencia de vitaminas C y B12:** estas vitaminas son cofactores para el metabolismo normal del colágeno.

d. **Flúor:** el fluoruro a dosis bajas se asocia con un aumento de la actividad osteoblástica y a altas dosis se relaciona con fragilidad ósea.

e. **Vitamina K:** es fundamental para la composición de la osteocalcina, una de las principales proteínas del hueso.

f. **Vitamina C y cobre:** compuestos fundamentales del colágeno, necesario para la estabilidad del esqueleto.

g. **Cinc, magnesio, boro y molibdeno:** son necesarios para formar la matriz proteica aunque su deficiencia se ha asociado también a bajas densidades óseas. Se desconoce una ingesta recomendada que aumente la calidad ósea.

h. El abuso por parte de los jóvenes de **bebidas gaseosas** parece relacionarse también con baja densidad ósea, aunque algunos estudios indican que esto se debe a la sustitución de los productos lácteos por este tipo de bebidas.

9. Glucocorticoides:

Es el tratamiento principal para enfermedades como el asma bronquial o la artritis reumatoide y cuyos efectos adversos afectan sobre todo al esqueleto provocando lo que se conoce como *osteoporosis inducida por corticoides*. El riesgo de pérdida de masa ósea está relacionado con la duración y la dosis del tratamiento y disminuye progresivamente cuanto más tiempo pasa desde la interrupción del glucocorticoide (Schurman, 2007).

10. Otros fármacos:

Algunos fármacos que causan disminución de la masa ósea son: análogos de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH), antiandrógenos, sobredosis de tiroxina, anticonvulsivantes, anticoagulantes, quimioterapia, tamoxifeno (cáncer de mama), antiácidos con fosfato o aluminio (ranitidina, omeprazol), litio, inhibidores de la aromatasa, furosemidda, tiazolidindionas, etc.

Prevención:

La osteoporosis presenta una serie de características que la incluye dentro de las enfermedades que se consideran un problema de salud mundial: frecuencia e importancia elevada a nivel individual y comunitario, conocimiento de la historia natural de la enfermedad, criterios diagnósticos claramente establecidos y tratamiento y control de la enfermedad de fácil acceso. Por ello es importante la actuación del personal sanitario en los tres niveles de prevención:

La finalidad de la prevención primaria es conseguir el máximo pico de masa ósea que pueda el individuo, para ello hay que tener en cuenta los factores de riesgo modificables citados y explicados en el apartado anterior. Una vez alcanzado el pico de masa ósea, la prevención primaria se centra en ralentizar la pérdida de hueso que se ve acelerada tras la menopausia. Las principales medidas de prevención primaria van a consistir en:

a) **Ejercicio físico:** son los ejercicios de peso y de gran impacto los que mejoran la masa ósea como por ejemplo levantar peso, correr, deportes de raqueta, etc. Es importante diferenciarlos de los ejercicios de bajo impacto como la natación o el ciclismo, ya que esos ejercicios son saludables para el sistema circulatorio y muscular, pero no afectan al hueso.

b) **Peso:** como ya se vio anteriormente, un IMC por debajo de 19 kg/m^2 se considera un factor de riesgo de fracturas importante. Por ello desde la prevención se insiste en mantener una dieta equilibrada para mantener un peso adecuado a nuestro sistema esquelético, ni bajo por ser un factor de riesgo, ni alto porque aunque la obesidad sí es factor de riesgo de muchas más enfermedades (cardiopatías, diabetes, etc.).

c) **Nutrición:** hay que mantener durante toda la vida una dieta mediterránea equilibrada, pero para prevenir la osteoporosis hay que tener en cuenta sobre todo la ingesta de calcio y vitamina D:

- *Calcio:* Las recomendaciones sobre la ingesta de calcio (*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. Los alimentos ricos en calcio son: leche, queso y yogurt, algunas verduras como el brócoli, el repollo o la acelga, pescados con espinas enlatados (sardinas), algunos frutos secos como nueces o almendras y derivados de la soja como el queso de soja o el tofu.

	Calcio (mg/día)
Bebés y niños:	
0-6 meses	300-400
7-12 meses	400
1-3 años	500
4-6 años	600
7-9 años	700
Adolescentes:	
10-18 años	1200
Mujeres:	
19 años-menopausia	1000
Postmenopausia	1500
Durante el embarazo (último trimestre)	1200
Lactancia	1000
Hombres:	
19-65 años	1000
Más de 65 años	1500

Tabla 3. Recomendaciones de calcio. Las cifras se basan en datos de Europa Occidental y América.

- *Vitamina D:* la recomendación actual es de 1000 u.i. para adultos y de 400 u.i. en niños al día en ausencia de exposición solar, ya que un porcentaje de esta vitamina se sintetiza a través de la piel (Daisy Miranda, 2009). Las dosis se reducen a la mitad (200 u.i. en niños y 400-600 u.i. en adultos) en caso de exposición solar (FAO/WHO, 2002).

	Vitamina D (IU/d)
0-9 años	200
10-18 años	200
19-50 años	200
51-65 años	400
65 + años	600
Embarazo	200
Lactancia	200

Tabla 4. Recomendaciones de Vitamina D.

d) **Hábitos nocivos:** evitar el consumo excesivo de tabaco y alcohol, por su efecto nocivo general y en hueso en particular. La cafeína también se considera un hábito nocivo para el hueso, pero estos efectos se asocian a partir de tres tazas diarias.

La **prevención secundaria** (una vez detectada la enfermedad) se centra en disminuir el riesgo de fracturas y en ralentizar la pérdida de masa ósea. Para ello las recomendaciones que se dan son: ejercicio de bajo impacto, ya que hay que evitar en la medida que sea posible una fractura y que mejoren la movilidad como el Tai Chi o el baile. También habría que plantearse la posibilidad de utilizar aparatos auxiliares como

el bastón o el andador. Otras medidas para evitar las fracturas son: identificar los factores de riesgo de las caídas, que pueden ser intrínsecos (propios del paciente) o extrínsecos (ajenos al paciente); tratar las enfermedades que fomenten las caídas; y para prevenir las caídas algunas actividades como adaptar el hogar para evitar tropiezos y accidentes, revisión del tratamiento en caso de ancianos polimedicados y asistir a revisiones de audición y visión.

La prevención terciaria va enfocada a tratar las incapacidades físicas y psicológicas que provoca la enfermedad y a la rehabilitación en caso de fracturas. La prioridad de este nivel es enseñar a la persona que se ha caído a levantarse, entrenar el equilibrio y la estabilidad, reeducar en la marcha e impedir el miedo a futuras caídas.

Signos y síntomas:

La osteoporosis se considera una enfermedad silenciosa, es decir, que no presenta síntomas clínicos que avisen de la enfermedad, ya que la disminución de la masa ósea por sí sola no causa síntomas. Es a partir de la primera fractura, normalmente por un traumatismo leve, cuando se sospecha de fragilidad ósea y mediante el diagnóstico por imagen (densitometría ósea) en las zonas lumbar, femoral y radio del paciente, se confirma la presencia de la enfermedad. Las fracturas más frecuentes suelen ser en el antebrazo distal (fractura de Colles), en la cadera y en la columna vertebral.

Una de las características físicas de las personas con osteoporosis es el aplastamiento vertebral y la presencia de cifosis (Figura 5) y según avanza la enfermedad aparece un encorvamiento progresivo en el que se disminuye la altura hasta dos centímetros y se pueden llegar a tocar las costillas con la pelvis y por lo tanto se reduce la cavidad torácica provocando una disminución de la capacidad pulmonar y dolor.

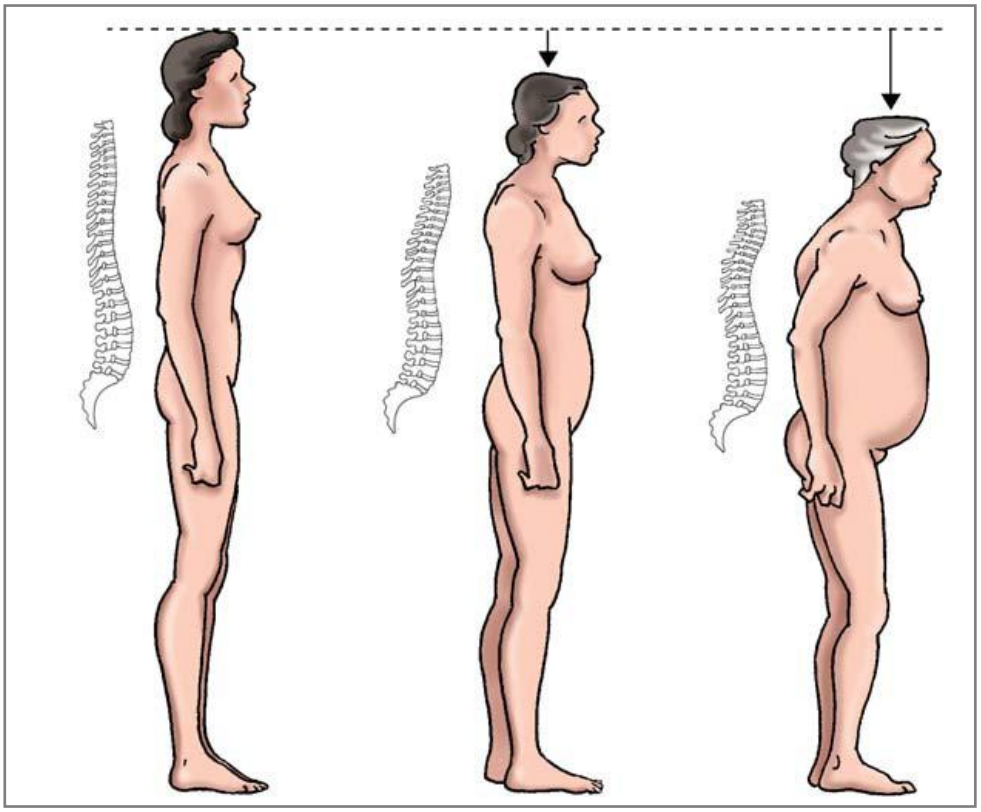


Figura 6. Cifosis provocada por osteoporosis.

Otro de los síntomas de la osteoporosis es el dolor crónico provocado por las numerosas fracturas. También este dolor es causa del aplastamiento de las vértebras y el encorvamiento, que provoca que los músculos torácicos estén en continua tensión.

Diagnóstico:

Ya que la osteoporosis es una enfermedad silenciosa, la manera de diagnosticarlo es cuando ya se han producido las primeras consecuencias, es decir, las fracturas. Para confirmar si la fractura es de origen osteoporótico será de gran ayuda conocer si la persona presenta varios factores de riesgo de la osteoporosis (que determina entre un 20 y un 40% de la variabilidad de las fracturas) para determinar el riesgo de que padezca una fractura. Sin embargo, para una confirmación definitiva de la enfermedad es necesario que cumpla los siguientes criterios:

1. Criterio clínico:

La OMS define una fractura osteoporótica como: *aquella causada por una injuria y que resulta de una fuerza o torsión que se ejerce sobre el hueso, que sería insuficiente para fracturar hueso normal*. Por ello se diferencia de una fractura normal en las siguientes características:

a) Que la fractura haya sido ocasionada por un traumatismo que en un hueso sano no habría causado daños. O por las conocidas “fracturas por fragilidad” originadas normalmente por la caída al suelo desde la postura de bipedestación o sedestación, con los pies apoyados sobre el suelo.

b) Que no haya sido causa de otra enfermedad que provoque una fragilidad ósea (enfermedad de Paget, metástasis, osteogénesis imperfecta, etc.).

c) También da pistas sobre el diagnóstico que la fractura sea en una zona típica de las fracturas osteoporóticas como en la cabeza del fémur o la fractura de Colles.

2. Criterio densitométrico:

La densidad mineral ósea (DMO) es el indicador principal de riesgo de fracturas, por el cual se puede diagnosticar la osteoporosis antes de producirse la primera fractura y cuya medición será recomendada a aquellas personas que posean varios factores de riesgo. Se expresa en gramos de mineral por área o por volumen y está determinada por el pico de masa ósea alcanzado y por el balance entre ganancia y pérdida producida posteriormente.

La OMS consensuó una clasificación basada en la comparación de los valores de la DMO de la población joven normal de EE.UU., y estableció unos valores a partir de los cuales se consideraba la presencia o no de enfermedad o riesgo de padecerla. Para que el diagnóstico de la enfermedad fuera más fiable, la OMS estableció el término de **osteopenia**, definido como una pérdida de masa ósea precursora de la osteoporosis con una DMO entre -1 y -2,5 desviaciones estándar (DE) y que valores superiores a estos se considera un índice de masa ósea **normal** (entre +1 y -1 DE).

Según va disminuyendo los valores de DMO se clasifican dos tipos de osteoporosis, siendo una última categoría la de **osteoporosis establecida** (< -2,5 DE) en la que ya se ha producido la primera fractura y **osteoporosis** en la que la DMO es superior a -2,5 DE pero aún no se han producido fracturas.

En resumen, son cuatro las categorías de osteoporosis definidas por la OMS:

Normal:	+1 y -1 DE.
Osteopenia:	-1 y -2,5 DE.
Osteoporosis:	< -2,5 DE.
Osteoporosis establecida:	< -2,5 DE y fractura/s de causa osteoporótica.

Tabla 5. Clasificación de los valores de Densidad Mineral Ósea.

El establecimiento de unos puntos para diferenciar el grado de osteoporosis no es exacto a la hora de marcar unos límites de riesgo de fractura. El riesgo relativo (RR) de fractura se incrementa en un 2,0 – 2,4 por cada DE de disminución de la masa ósea y según el lugar de medición. Esto quiere decir que no por estar en unos valores más altos no se tiene ningún riesgo de fractura, igualmente no por tener unos valores muy bajos el riesgo es total.

Otro medida de fortaleza del hueso, además de la densidad, es la calidad. La calidad del hueso la determinan su arquitectura, su eficacia en la remodelación ósea, la acumulación de daños (microfracturas) y la mineralización. Los métodos para medir todos estos determinantes (porosidad, tamaño, arquitectura y geometría) están muy avanzados, sin embargo, son utilizados sólo para la investigación clínica.

Estudios complementarios:

Tanto el paciente sin fracturas y que presente varios factores de riesgo de osteoporosis como el paciente con factores de riesgo y fracturas que se sospechen que sea por causa osteoporótica se recomienda que se realice un estudio completo que ayude no sólo a confirmar el diagnóstico si no a especificar el grado y el tipo de osteoporosis, calcular el riesgo de fractura y asignar un tratamiento adecuado. Este estudio debe constar de anamnesis, exploración física, análisis clínicos y análisis de imagen.

- *Anamnesis:*

Lo primero a tener en cuenta en la anamnesis son los **factores de riesgo** para la pérdida de masa ósea del paciente, tanto los modificables (consumo de alcohol, de tabaco, la alimentación que sigue, etc.) para actuar sobre ellos directamente; como los no modificables (antecedentes personales, antecedentes familiares, etc.) que ayudarán a la confirmación del diagnóstico.

Lo siguiente a valorar en la anamnesis es la **historia clínica** del paciente: edad de menopausia, amenorrea prolongada, ovariectomía/histerectomía completa, consumo de fármacos (corticoides, anticoagulantes, anticonvulsivantes, litio…), antecedentes personales de fractura por fragilidad después de los 40 años, enfermedades cuyo tratamiento pueden causar interacción con el tratamiento de la osteoporosis o que se relacionan con la pérdida de masa ósea (insuficiencia venosa crónica, neoplasias de mama o útero, problemas digestivos, hepatopatías, nefropatía crónica, hipercalcemia, litiasis renal, hipercalciuria, etc.).

- *Exploración física:*

La exploración física en una paciente sobre el que sospecha osteoporosis se centra en el aparato locomotor: detectar anomalías en la espalda mediante la **inspección** (escoliosis, hipercifosis dorsal, lordosis lumbar, disminución de la talla); **palpación** para determinar dolor; callos en los lugares de fractura.

En la exploración física también es importante valorar los reflejos del paciente, la agilidad, el equilibrio y la fuerza muscular.

- *Análisis clínicos:*

El análisis de sangre y orina no da ningún resultado directo que asegure la presencia de osteoporosis. Su utilidad es, sobre todo, para dar información sobre el estado de salud del paciente, si presenta alguna enfermedad que pueda causar una osteoporosis secundaria (hiperparatiroidismo, hipercalcemia, etc.) o para el descarte de otras enfermedades que causen una DMO baja.

Algunos valores a tener en cuenta para el diagnóstico de la osteoporosis son:

- **Calcio**: los niveles de calcio plasmático no suelen verse muy alterados tras la menopausia, suelen mantenerse estables o ligeramente elevados. La posible alteración de los niveles de calcio en sangre se puede deber a que al disminuir los niveles de **estrógenos**, disminuyan también los niveles de hormonas reguladoras del calcio como la **calcitonina** y el **calcitriol** (vitamina D).

- **Fósforo**: niveles elevados de fósforo causan que se forme fosfato de calcio que al ser insoluble y no reabsorbible, se elimina del organismo, disminuyendo también los niveles de calcio en sangre. Por el contrario, niveles bajos de fósforo provocan que el calcio no se asimile y por lo tanto también sea eliminado por la orina (hipercalciuria).

- **Fosfatasa alcalina**: es un factor regulador de la actividad metabólica ósea, por lo tanto unos niveles altos señalan un remodelamiento óseo alto (como por ejemplo tras una fractura). Es un perfecto indicador de la evolución de la enfermedad.

Formación:	**Resorción:**
Fosfatasas alcalinas óseas	Calcio
Osteocalcina	Hidroxiprolina
Péptidos terminales del procolágeno	Piridinolinas
	Fosfatasas ácidas

Tabla 6. Indicadores bioquímicos de formación y resorción del hueso.

- *Técnicas diagnósticas mediante imagen:*

  - **Densitometría ósea:**

Es el método diagnóstico más utilizado en la osteoporosis porque mide la cantidad de mineral óseo (g/cm^2) y explica hasta un 70% de la resistencia ósea utilizando mediciones seriadas a una dosis baja de radiación. Los resultados obtenidos los expresa en unidades de DE (desviación estándar) denominadas *T-Score*. Este valor se calcula midiendo la diferencia entre los valores de la DMO del paciente y la media de DMO en adultos jóvenes del mismo sexo y etnia. Otra forma de expresar los resultados es mediante la *Z-Scrore*, que se realiza igual que la *T-Score* con la diferencia de que la comparación se realiza con una media de la DMO para un sujeto sano de la misma edad, sexo y etnia.

El aparato de densitometría ósea consiste en una fuente emisora de radiación que mediante la emisión de fotones atraviesan la zona a explorar. La medida de la masa ósea se fundamenta en la ley general de absorción de la energía de un rayo cuando pasa a través de un tejido o de otro. Según esta ley, la absorción de la energía depende de la densidad del tejido que el rayo atraviesa, siendo prácticamente nulo en el aire, superior en las partes blandas y muy superior en el tejido óseo.

Normalmente la radiación utilizada son los rayos X y los distintos tipos de densitometrías son: la densitometría radiológica simple (XDA) o la denominada "*Dual X ray absorptiometry*" (DXA).

Se puede analizar el esqueleto completo, aunque lo normal es observar sólo las zonas de mayor riesgo de fractura como la cadera, la columna vertebral y la muñeca; y procurar analizarlo

siempre con el mismo equipo, ya que puede haber variaciones de unos aparatos a otros de distinto fabricante.

Figura 7. Aparato DXA.

- **Radiología:**

Al contrario que la densitometría, el análisis del hueso por radiología no es tan fiable, pues sólo muestra una pérdida de masa ósea de más del 30% del hueso y las fracturas, pero aún así son de gran ayuda como complemento de las densitometrías óseas. Las manifestaciones radiológicas más características de la osteoporosis son: disminución de la masa ósea (aumento de la radiotransparencia), pérdida de altura del cuerpo vertebral, resalte de la estriación vertical, adelgazamiento del hueso cortical con ensanchamiento del hueso medular.

- **Tomografía axial computerizada (TAC):**

Permite observar el interior del cuerpo humano a través de cortes milimétricos transversales al eje céfalo-caudal, mediante la utilización de los rayos X. Para aumentar la definición de por sí alta, se puede recurrir a distintos medios de contraste.

Una evolución de la TAC es la **microtomografía computerizada (µTC)** que al igual que la TAC es un método no destructivo, que permite el análisis microestructural del hueso trabecular y cortical. Entre las principales ventajas se encuentran: la adquisición de imágenes en dos y tres dimensiones, gran resolución y la posibilidad de calcular medidas en tres dimensiones sin necesidad de asumir ningún modelo.

El principal inconveniente de ambos métodos es la radiación que absorbe el paciente, mayor cuanto más cortes se hagan y que no está lo suficientemente desarrollado para ponerlo en práctica para el diagnóstico de osteoporosis en personas, pero sí se utiliza para investigación.

- **Ultrasonido:**

Se desconoce si el ultrasonido *(QUS, quantitative ultrasound)* puede evaluar la calidad ósea, o si mide sólo la mineralización del hueso o también evalúa la microarquitectura y demás propiedades del hueso.

Tratamiento:

No existe un tratamiento que cure la osteoporosis, pero sí una serie de medidas que pueden evitar su aparición temprana y ralentizar la pérdida de masa ósea. Estas medidas son tanto farmacológicas como preventivas. Las preventivas, de las que ya se ha hablado anteriormente, consisten en una serie de hábitos saludables encaminados a conseguir el mayor pico de masa ósea. Antes de establecer el tratamiento hay que establecer los riesgos y beneficios de la osteoporosis de cada tipo de paciente, para ello existen distintas medidas (Carrasco, 2002):

Tratamiento no farmacológico:

Este tipo de medida en contra de la osteoporosis suelen ser las mismas medidas que para la prevención terciaria de la osteoporosis, ya que lo que se pretende en este punto es reducir la velocidad con la que se pierde masa ósea y disminuir el riesgo de fractura. Son:

a) **Dieta:** numerosos estudios en animales y humanos, sugieren que una dieta rica en frutas y verduras puede ejercer un efecto positivo sobre la remodelación ósea (Alekel, 2010). Además se deben incrementar y es recomendable que tras la menopausia la mujer incremente el consumo de calcio.

b) **Ejercicio físico:** realizar ejercicios de bajo impacto de forma contínua está recomendado una vez está establecida la osteoporosis pues fortalecen los músculos y mejoran los sentidos y los reflejos.

c) **Hábitos tóxicos:** evitar el exceso de cafeína, alcohol y tabaco.

d) **Fisioterapia:** pretende aliviar el dolor y las contracturas, evitar que aparezcan deformidades, mejorar la musculatura y la capacidad respiratoria y mantener una correcta estática.

e) **Cuidados tras una fractura** como el reposo en decúbito hasta el descenso del dolor por medio de ejercicios isométricos, masajes para prevenir la atrofia muscular, edemas y tromboflebitis en los miembros afectados. Además se deben extremar las medidas posturales y comenzar de manera precoz con ejercicios activos y pasivos.

Tratamiento farmacológico:

Los fármacos para el tratamiento de la osteoporosis necesitan ser consumidos durante un largo periodo de tiempo para que resulten eficaces. Para ello es necesaria una gran adherencia terapéutica por parte del paciente.

Los pacientes susceptibles a ser tratados de osteoporosis son los que cumplen al menos una de las siguientes características:

- Mujeres premenopáusicas con osteoporosis.
- Mujeres posmenopáusicas con al menos una fractura por fragilidad.
- Mujeres posmenopáusicas sin fractura previa, pero con uno o más factores de riesgo con una DMO menor o igual a -2,0 DE.
- Mujeres posmenopáusicas sin fractura previa ni factores de riesgo detectables, pero con una DMO menor o igual a -2,5 DE.
- Varones con osteoporosis.

- Mujeres y varones mayores de 80 años con una DMO menor a -1,5 DE.

- Pacientes tratados con dosis mayores a 5 mg. diarios de prednisona durante más de 3 meses y que además presentan una DMO menor o igual a -1 DE.

- Pacientes tratados con quimioterápicos que afecten negativamente a la DMO.

Una vez que se ha decidido si el paciente posee las características para ser tratado se tiene que ajustar el tipo de tratamiento al tipo de osteoporosis que padece y según su avance. Para ello hay dos tipos de tratamientos: los antirresortivos o anticatabólicos y los osteoformadores o anabólicos (Riggs y Parfit, 2005). Hay fuentes que señalan una tercera categoría que son los fármacos de mecanismo complejo (Lewiecki, 2009).

1. Antirresortivos o anticatabólicos:

Es un conjunto de fármacos destinados a regularizar en forma directa o indirecta el desequilibrio de la remodelación ósea, inhibiendo la actividad resortiva de los osteoclastos y produciendo un balance positivo, incrementando la formación de hueso con relleno de cavidades y preservando la microarquitectura.

Dentro de los fármacos antiresortivos o anticatabólicos encontramos: bifosfonatos, calcitonina, estrógenos, raloxifeno, calcio y vitamina D, denosumab, etc.

A. Bifosfonatos

Es el fármaco más extendido en el tratamiento de la osteoporosis. Actúan principalmente sobre los osteoclastos, inhibiendo su acción destructora sobre el hueso basando su acción en cuatro mecanismos directos: 1) evitando su formación (por un mecanismo que impide la diferenciación), 2) disminuyendo la adhesión de los osteoclastos a la matriz ósea, 3) reduciendo la vida media por aumento de la apoptosis y 4) inhibición de la actividad ostoclástica por acción de los bifosfonatos a nivel intracelular que causan alteraciones del citoesqueleto, alteraciones morfológicas, inhibición de la secreción de ácido o disminución de la actividad enzimática.

Pero también ejercen un efecto indirecto sobre los osteoclastos. Numerosos estudios señalan que los bifosfonatos actúan sobre los macrófagos bien inhibiendo la liberación de interleucina-6 (IL-6) proteína que estimula la resorción ósea; o bien inhibiendo la proliferación y función de los propios macrófagos.

Absorción: la absorción por vía oral (alendronato, risedronato, ibandronato) suele ser baja, aproximadamente de un 1-10% y disminuye con la ingesta de ciertos alimentos como el hierro o el calcio. Una pequeña parte se absorbe en el estómago y el resto en el intestino delgado. Cuando los bifosfonatos orales no funcionan se opta por la vía intravenosa (ibandronato, zoledronato, pamidronato).

Distribución y metabolismo: entre un 50-80% se fija al hueso y queda retenido hasta 10 años e incluso toda la vida en una forma inactiva que se libera poco a poco durante la remodelación ósea (Fleish, 1997).

Excreción: el porcentaje que no se absorbe resiste a la hidrólisis y se elimina sin alterar por la orina

Según su metabolismo podemos clasificar los bifosfonatos por su permanencia en el tejido óseo, por su acción rápida y por los de acción prolongada.

- *Alendronato:* en la actualidad es el bifosfonato más utilizado, desplazando a su predecesor el etildronato por ser más efectivo y menos tóxico. Logra prevenir la pérdida y aumenta la DMO entre un 5-10%, sobre todo en la cadera y vértebras lumbares. La dosis idónea son 10 mg. diarios, aunque en mujeres premenopáusicas es de 35 mg. y 70 mg. semanales en postmenopáusicas. Una adherencia terapéutica al tratamiento de 10 años ha demostrado un incremento de la DMO de: un 13,7% en la columna lumbar, 10,3% en la parte distal del fémur y de un 6,7% en su parte distal.

- *Risedronato:* tiene una potencia 10 veces mayor que la del alendronato y al contener menos cantidad de fosfato provoca menos efectos secundarios gastrointestinales. Su administración es por vía oral. En dosis de 5 mg. al día logró aumentar la DMO en un 5,7% en la columna lumbar y un 5,4% en la cadera. Su ingesta continua durante 7 años ha reducido el riesgo de fracturas en la columna lumbar en un 40-50%.

- *Ibandronato:* respecto a la reducción de los marcadores óseos de resorción y en el aumento de la DMO tiene la misma eficacia que el risedronato. La dosis oral es de 2 mg. diarios o de 20 mg. mensuales (en días alternos hasta completar 12 dosis y repetición del ciclo cada 3 meses) que ingeridos durante tres años reduce el riesgo de fractura

hasta un 62%; incluso en mujeres postmenopáusicas con un *Z-Score* muy bajo redujo el riesgo hasta un 69%.

- *Zolendronato:* es el bifosfonato con más potencia. Tiene una fuerte adherencia a la hidroxiapatita que permanece unida al hueso durante años, por ello la dosis es de 5 mg. anuales por vía venosa. Ha demostrado reducir las fracturas en un 40% en la cadera y un 70%.

- *Pamidronato:* es un nuevo bifosfonato sobre el que no está probada al 100% su eficacia, aunque se ha demostrado que tiene una acción similar al resto de fármacos del mismo grupo.

Efectos adversos: no suelen presentar efectos secundarios muy graves. Los más destacados son:

- *Problemas gastrointestinales:* relacionados con los bifosfonatos que se consumen por vía oral, son: dolor abdominal, estreñimiento, diarrea, flautilencia, náuseas, esofagitis (característico del alendronato, se da en un 1,5%), gastritis y úlceras en el tracto digestivo superior. También pueden alterarl enfermedades como la hepatitis crónica o la enfermedad de Crohn.

- *Síndrome pseudogripal:* es propio de la administración intravenosa. Se caracteriza por fiebre, mialgias y linfopenia. También es recomendable que se administre a un ritmo lento para evitar daño renal (caída del filtrado glomerular y tubulopatías).

- En pacientes con tratamientos prolongados con algunos bifosfonatos (sobre todo alendronato), que padezcan

fracturas por estrés o fracturas de las diáfisis de los huesos femorales de pacientes que consuman corticoides o sean diabéticos pueden presentar el síndrome del *"hueso congelado"* en el que los marcadores de remodelación ósea están casi inhibidos.

- En pacientes oncológicos y con dosis muy altas de bifosfonatos también pueden presentar *osteonecrosis mandibular*, debido a la hipovascularización causada por las altas dosis de bifosfonatos en infecciones locales y/o problemas odontológicos.

B. Calcitonina

Es una hormona peptídica sintetizada por las células parafoliculares C del tiroides que tiene un equilibrio con la parathormona por su efecto hipocalcemiante inhibiendo de forma directa la acción de los osteoclastos. También ejerce un efecto analgésico, lo que la convierte en una opción segura en los casos de fractura aguda. Este tratamiento se ha convertido en la segunda opción después de los bifosfonatos. Las vías de administración son: oral, nasal e intravenosa.

Un estudio de la PROOF demostró que calcitonina del salmón administrada por vía nasal en dosis de 200 u.i. durante 2 años, reduce las fracturas vertebrales en un 36% y hasta un 50% en mujeres mayores de 75 años y también incrementa la DMO lumbar en un 2%.

C. Estrógenos

La terapia hormonal sustitutiva ha sido la primera elección a la hora de tratar todos los desequilibrios provocados por la ausencia de hormonas sexuales. Diversos estudios a lo largo de la historia han probado el efecto positivo de la administración de estrógenos en mujeres postmenopáusicas en los que observaron que no perdían altura y mantenía estable la DMO, además que el riesgo de sufrir fracturas vertebrales y de cadera se reducía hasta un 34%. Pero los estudios mostraron las grandes desventajas de esta terapia: en 2002 la *Women's Health Initiative (WHI)* publicó un estudio en el que demostraba que esta terapia incitaba más efectos secundarios que beneficios como un alto riesgo coronario, tromboembolismo, embolia de pulmón, accidentes cerebrovasculares y aumento del riesgo de padecer tumores mamarios.

Por lo tanto actualmente es recomendable el tratamiento con fármacos moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (raloxifeno) a utilizar la terapia sustitutiva hormonal.

D. Raloxifeno

El raloxifeno junto con el tamoxifeno, tomerifeno, droloxifeno, miproxifeno e idoxifeno pertenecen a un grupo de fármacos denominados moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (MRSE) y actúan uniéndose a los receptores de los estrógenos actuando según el órgano diana como agonista (hueso y metabolismo lipídico) o como antagonista (útero y mama). Se administra en dosis de 60 mg. diarios por vía oral.

Fue diseñada para tratar la osteoporosis y el cáncer de mama, obteniendo los beneficios de la terapia hormonal sustitutiva con estrógenos pero sin sufrir los efectos secundarios. Así lo demostró el ensayo *MORE (Multiple Outcome of Raloxifene Evaluation)*, en el que observaron un incremento de la DMO del 2,6% en la columna y del 2,1% en el cuello del fémur. También se observó una disminución del riesgo de fractura vertebral del 30% en pacientes con fractura previa, y del 50% sin fractura previa.

Con el raloxifeno no se disminuye el riesgo coronario, de trombosis y el riesgo de accidente cerebro vascular, sin embargo sí el de cáncer mamario. Otros efectos secundarios son: sofocos, calambres, edemas e incremento del riesgo de trombosis venosa profunda (que presenta el mismo riesgo que las mujeres tratadas con terapia hormonal sustitutiva).

E. Calcio y vitamina D

Durante el envejecimiento la absorción intestinal del calcio ingerido en la dieta disminuye, lo que se asocia con una pérdida o una mayor resistencia a los receptores de vitamina D. Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, una ingesta adecuada de calcio y vitamina D durante toda la vida es un factor protector de la osteoporosis, pero también es recomendable aumentar la dosis en pacientes ancianos con o sin osteoporosis (hasta 1500 mg/día de calcio y 600 u.i./día de vitamina D).

Una deficiencia de estos elementos favorece la debilidad muscular, pérdida de masa ósea y por lo tanto aumenta el riesgo de caídas y fracturas; y en el caso de deficiencia de vitamina D, además, una baja absorción de calcio y una insuficiente formación

de calcitriol, que desencadena un hiperparatiroidismo secundario que provoca una mayor resorción en el remodelado óseo.

F. Denosumab

Los nuevos fármacos para el tratamiento de la osteoporosis van enfocados en este sentido. El Denosumab es un anticuerpo monoclonal humano, que disminuye la resorción en el hueso. Se administra por vía subcutánea, ejerce su acción entre 12-72 horas (según la dosis) y se mantiene durante durante 6 meses ejerciendo su acción antiresortiva. En los estudios realizados con mujeres postmenopáusicas tratadas con denosumab durante 12 meses, se observó un aumento de la DMO en la columna lumbar de un 3,0-6,7% (según dosis y pauta de dosificación), en el fémur de un 1,9-3,6% y en el radio distal de 0,4-1,3%.

Respecto a los efectos secundarios analizados se ha observado un incremento de las infecciones urinarias bajas, infecciones urinarias, dolor de garganta, defectos de la piel (eczemas, erisipela, celulitis), estreñimiento, dolor en brazos, piernas y espalda, cataratas (sobre todo los pacientes que han sido tratados con denosumab para el cáncer de próstata). También, al igual que los bifosfonatos, a dosis elevadas el denosumab puede producir ostenecrosis mandibular en pacientes con tratamientos contra el cáncer.

2. Osteoformadores o anabólicos:

Hasta ahora, las medidas de prevención y los fármacos que se han mencionado para tratar la osteoporosis sólo evitaban o ralentizaban la pérdida de la masa ósea. Pero los fármacos osteoformadores o anabólicos se caracterizan en que realizan su

función sobre los osteoblastos promoviendo la formación de masa ósea y aumentando, por tanto, la resistencia del hueso.

Dentro de este grupo se encuentran: hormona paratiroidea (PTH_{1-34}, PTH_{1-84}) y ranelato de estroncio.

A. Hormona paratiroidea

La hormona paratiroidea (PTH) es secretada por las glándulas paratiroides en función de los niveles de calcio en sangre. Un exceso de PTH sérica provoca un que haya una mayor resorción ósea. Por ello, paradójicamente la PTH consumida no debería ser una opción apropiada para el tratamiento de la osteoporosis, pero se ha demostrado que una administración intermitente (tanto PTH_{1-34} (teripatida) que es un fragmento de la molécula como la molécula completa PTH_{1-84}) incrementa el número y la actividad de los osteoblastos, de tal forma que favorece la formación y modelación del hueso.

Algunos estudios han demostrado que consumiendo una dosis diaria de 20 mcg aumentan la DMO en la columna lumbar en un 9,7% y en el cuello del fémur en un 3%. También se redujo el riesgo de fracturas en un 53%. Estudios posteriores con 40 mcg mejoraron estos porcentajes, pero se observaron efectos no deseados como: cefalea, náuseas, dolor articular, cansancio, calambres, hipercalcemia y somnolencia.

B. Ranelato de estroncio

La característica de esta molécula de acción dual: por un lado ejerce un efecto antiresortivo (como los bifosfonatos) que evita la resorción ósea, y por otro lado también posee

propiedades osteoformadoras, estimulando la acción de los osteoblastos para la regeneración del hueso (al igual que la teripatida). La dosis utilizada es de 2 gr diarios por vía oral diluidos en agua. Su efecto disminuye con la presencia de otros alimentos como lácteos o suplementos de calcio. Como efectos adversos destacan son náuseas y diarrea que suelen desaparecer a los posteriores meses de tratamiento.

En un estudio realizado en Europa *(SOTI, Spinal Osteoporotic Therapeutic Intervention)* observó una reducción del 49% en las fracturas vertebrales durante el primer año de estudio, y de un 41% durante los 3 años siguientes. Así mismo, el estudio *TROPOS (The Treatment of Peripherical Osteoporosis)* evidenció una reducción del riesgo de fractura del cuello del fémur del 36%.

Modelos experimentales de osteoporosis

La ventaja de los estudios experimentales sobre osteoporosis frente a los clínicos es que permiten valorar un campo más amplio de datos como posibles cambios en la calidad y cantidad del hueso, en su estructura, arquitectura, fortaleza, etc. Por ello, los modelos experimentales sobre animales son los de primera elección a la hora de probar nuevos fármacos, ya que haciendo un uso apropiado de los animales e interpretando correctamente los resultados se pueden extrapolar a condiciones humanas similares.

A la hora de investigar sobre nuevos tratamientos en osteoporosis hay que tener en cuenta que para probar su efecto hay que actuar a niveles de prevención y de tratamiento, que poseen cada una métodos distintos de estudio: en la prevención se valora la capacidad del fármaco para prevenir la pérdida de masa ósea causada por la activación de una remodelación desequilibrada; y cuando se evalúa un tratamiento sobre la osteoporosis ya instaurada se observa la capacidad de reparar la masa ósea. Además, la Agencia Reguladora de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (*Food and Drugs Administration* o *FDA*) recomienda que se experimente sobre dos clases de animales distintas siendo una de ellas no roedora, para así poder reproducir el mayor número de características de la osteoporosis comunes con los humanos (Thompson, 1995).

A la hora de elegir un modelo adecuado para una investigación hay que tener en cuenta las siguientes deferencias (Davidson, 1987):

- **Analogía:** el modelo que se utilice para la investigación y el sistema, los resultados deben poder ser extrapolados y generalizados a sistemas afines.

- **Homogeneidad genética**, para que los resultados sean reproducibles.

- **Características biológicas**: debe poseer unas características que garanticen la validez del diseño, la racionalidad, la factibilidad a la hora de realizar el experimento al objetivo de la investigación.

- **Aspectos de disponibilidad**: el costo, la facilidad, manipulación sencilla, económico y diversos aspectos que avalen que se elija un modelo antes que otro.

- **Aspectos ecológicos**: valorar el impacto sobre el medio ambiente y mantener un equilibrio ecológico.

- **Aspectos éticos**: utilizar la mínima cantidad de animales necesarios para cumplir los objetivos y además garantizar que los animales no sufran o que el sufrimiento sea mínimo.

El modelo seleccionado debe cumplir los objetivos y que no introduzca variables que interfieran con las que se van a evaluar. Este modelo debe reproducir la historia natural de la enfermedad lo más parecido a como lo haría en un ser humano. Aún así, ningún modelo animal por muy fiel que sea va a dar resultados 100% iguales y aplicables en el ser humano, hay que valorar entre todos los modelos se deben analizar todas las posibilidades y elegir el que cumpla los criterios ya explicados más fielmente y además sea los más parecido al organismo humano.

En el caso de la osteoporosis el modelo más adecuado es aquel en el que se induce una osteoporosis secundaria por diversos agentes. La *FDA* obliga a que para realizar un estudio clínico preventivo de osteoporosis en humanos deben existir estudios previos del agente aplicado de manera preventiva en animales, e igualmente a la hora de investigar sobre el tratamiento de la osteoporosis también deben existir estudios preclínicos del efecto de ese mismo agente en animales. La principal diferencia entre los estudios de **prevención** y **tratamiento** está en el inicio del experimento: en el caso de las investigaciones de prevención debe comenzarse a administrar el tratamiento inmediatamente después de realizar la ovariectomía; en el otro caso debe empezar a aplicar el agente una vez que se compruebe una pérdida considerable de hueso trabecular.

La **duración de los tratamientos** depende del número de ciclos completos de resorción y formación de hueso por año que varía según la especie, siendo en humanos de 2 a 4 ciclos por año. El tratamiento con el agente debe durar hasta garantizar que el número de ciclos que ocurren en el animal sea equivalente al que se produciría en 4 años en una persona, aproximadamente en animales 12 ciclos antes de concluir el tratamiento.

La **dosimetría** también depende del uso que se le vaya a dar al agente en humanos. La recomendaciones dictan usar dos niveles de dosis: una efectiva máxima (determinada en estudios previos dosis-respuesta) en la especie utilizada y otra dosis cinco veces mayor. La dosis efectiva máxima nos dará información sobre la relación entre los indicadores y la fortaleza del hueso y la dosis 5 veces mayor da información para evaluar un margen de seguridad.

El **tipo de animal** que se escogerá dependiendo del proceso que se quiera analizar, según la modelación o la remodelación ósea; o también en función del método de inducción de la osteoporosis

(resorción ósea acelerada o de formación ósea disminuida). Se puede inducir la osteoporosis utilizando diversos factores de riesgo, pero el más eficaz y seguro es mediante la ovariectomía bilateral, por la supresión de estrógenos. Aún así, es fundamental tener en cuenta las características de cada especie animal:

- **Crecimiento y madurez esquelética definidos:** al igual que los humanos, todos los animales vertebrados tienen una fase de crecimiento y maduración ósea, pero no todas las especies alcanzan una plena madurez o lo hacen sólo de una forma parcial y tardía, como es el caso de ratas y ratones. El modelo ideal de osteoporosis en animales debería contener las fases de crecimiento y madurez esquelética diferenciadas entre ellas en que en la fase de crecimiento hay un mayor modelado y durante la madurez un mayor remodelado.

- **Menstruación:** las hembras humanas son la única especie con menarquía y ciclos ovulatorios periódicos, que tras finalizar muestran una disminución de la masa ósea notable.

- **Menopausia natural:** en la mayoría de los modelos animales hay que inducir una menopausia a través de una ovariectomía, excepto los primates, que presentan un proceso similar a la menopausia humana.

- **Fracturas:** aunque se haya logrado inducir osteoporosis exitosamente en la mayoría de los modelos de animales, éstos no presentan fracturas espontáneas.

- **Remodelado óseo:** hay especies de animales que no presentan un remodelado cortical y trabecular, como por ejemplo las ratas, que carecen que remodelado cortical. Por ello se recomienda un

segundo estudio con un animal no roedor para tener resultados sobre los dos tipos de hueso.

- **Modelos de animales:** a continuación revisamos las ventajas y desventajas de cada uno de los modelos de osteoporosis experimental en animales más utilizados para el estudio de la osteoporosis humana (Rodgers, 1993).

  - **Primates no humanos:** es un modelo ideal para estudiar la osteoporosis humana por su gran similitud en el sistema digestivo, metabolismo óseo y sistema endocrino y los únicos que presentan una menopausia natural con pérdida espontánea de masa ósea. Pero a pesar de ser un modelo idea tiene numerosos inconvenientes: elevado coste, media de vida larga, agresividad, difícil manejo, pueden transmitir enfermedades a los humanos y ser reservorio de agentes peligrosos, además suelen conllevar a problemas éticos y legislativos (Hodgen, 1977).

  - **Cerdos:** las ventajas de este modelo es que su aparato reproductor es continuo y similar al ser humano en duración (18-21 días), al igual que su remodelado óseo. Sus inconvenientes son: elevado coste, agresividad y el tamaño (Turner, 2001).

  - **Ovejas:** su perfil hormonal es similar al de la mujer. Es un animal de fácil manejo y con un coste no muy elevado. Es un modelo útil para biopsias e implantes. Sus desventajas son básicamente que al tener una alimentación herbívora hay una gran variación en los niveles de los minerales necesarios para estudiar la osteoporosis (fósforo) (Pastoureau, 1989).

- **Perros:** no es un modelo muy útil para el estudio de la osteoporosis, ya que sólo tienen dos ovulaciones al año y la supresión estrogénica no afecta demasiado al sistema esquelético (Boyce, 1990).

- **Gatos:** puede ser útil para el estudio de la osteporosis si se le induce por técnicas como la inmovilización o mediante la ingestión de dietas bajas en calcio o elevadas en fósforo en gatos jóvenes.

- **Conejos:** se les induce la osteoporosis por ovariectomía bilateral o por el tratamiento de glucocorticoides. Se caracterizan por un rápido remodelado óseo en comparación con otras especies de animales. Además presenta numerosas ventajas como su fácil uso por su tamaño, bajo coste y por el gran número de razas genéticamente homogéneas.

- **Ratones:** es uno de los animales principales a la hora del estudio de la osteoporosis por su pérdida de masa ósea relacionada con la edad. Se suele inducir osteoporosis por ovariectomía bilateral. También existen razas modificadas genéticamente para que envejezcan con más rapidez y que presentan fracturas espontáneas por fragilidad.

- **Ratas:** es el modelo favorito para el estudio de la osteoporosis menopáusica por tener una excelente respuesta al tratamiento estrogénico sustitutorio. También es útil para estudiar los factores nutricionales, endocrinos y ambientales y existen numerosos estudios de marcadores bioquímicos, histomorfometría, metodología densitométrica y evaluación biomecánica. Entre estas ventajas también se encuentran su pequeño tamaño, fácil manipulación y su bajo

coste. Pero presenta grandes inconvenientes como que sobre ellas no se pueden tomar muestras de biopsias repetidas (para estudios longitudinales) y su esqueleto no llega a alcanzar una verdadera madurez esquelética.

En ratas se han descrito distintas técnicas para inducir la osteoporosis (Lelovas, 2008):

Osteoporosis secundaria:

El modelo más común de supresión de estrógenos es el modelo de rata **ovariectomizada bilateral** que se utiliza comúnmente para estudiar la osteoporosis postmenopáusica. La supresión de estrógenos afecta a la osteoclastogénesis, con lo que al tiempo de la intervención hay una mayor resorción del hueso que de formación, provocando una pérdida ósea. Los cambios más significativos para evaluar el grado de pérdida ósea en la médula de la tibia y el fémur se producen entre 90 y 120 días, mientras que el hueso cortical requiere hasta 180 días.

Otra forma de suprimir los estrógenos es utilizando **fármacos supresores de los estrógenos**. Hay dos modelos, según el método que se emplee: usando la gonadotropina liberadora de un antagonista del estrógeno y la utilización de antagonistas de los receptores de los estrógenos e inhibidor de la aromatasa. Estos fármacos se utilizan en humanos para tatar enfermedades como la endometriosis o el cáncer de mama asociados con la pérdida acelerada de hueso.

Otro modelo de rata osteporótica es el de inducción mediante **glucocorticoides.** Se ha demostrado que el 25%

de los casos de osteoporosis es causada por dichos agentes (Reid, 1990) ya que el principal efecto adverso de los glucocorticoides es una supresión de la actividad formadora del osteoblasto combinado con un aumento de la actividad resortiva del osteoclasto (Saag, 1994). Numerosos estudios han demostrado la presencia de osteoporosis en ratas tras seis meses de administración de glucocorticoides (Ahmed, 2012; Takayanagi, 2009; King, 1996).

Osteoporosis por inmovilización:

Hay varios métodos de inducir osteoporosis mediante la inmovilización. El quirúrgico consiste en seccionar un nervio, un tendón o parte de la médula; el otro método es mediante vendajes 16 inmovilizadores o suspensión de las extremidades. Se obtienen los resultados más rápidos utilizando la técnica quirúrgica.

Los resultados más tempranos se obtienen en la metáfisis de la tibia distal a los 14 a 30 días después del inicio de la inmovilización.

Otros métodos:

Se han realizado varios estudios de la disminución de la masa ósea tras la ingesta de grandes cantidades de alcohol en ratas. Y también la osteopenia producida por una dieta baja en calcio en ratas inmaduras.

Tras valorar los diferentes modelos animales y los métodos de inducción de osteoporosis, decidimos utilizar ratas Sprague-Dawley como modelo animal por la facilidad y rapidez para inducir la enfermedad mediante ovariectomía, y de forma secundaria: su bajo

coste económico y la facilidad de manejo del animal tanto en el mantenimiento como a la hora de realizar pruebas analíticas.

Antioxidantes y flavonoides

Para explicar el concepto de antioxidante hay que tener en cuenta que en el metabolismo del organismo humano, igual que en el resto de los organismos vivos, se producen constantemente reacciones de oxidación y reducción de los que se obtienen metabolitos y radicales libres: los metabolitos (transportadores, enzimas, etc.) colaboran en las funciones del organismo; y los radicales libres son subproductos altamente reactivos que en concentraciones normales actúan como mediadores y reguladores, y que sin embargo, a concentraciones elevadas son tóxicos para las células por su acción como potentes oxidantes.

El organismo mantiene un equilibrio entre la producción y eliminación de los radicales libres derivados del oxígeno (ROS: peróxido de hidrógeno, hidroxilo, anión superóxido), o bien derivados de moléculas nitrogenadas (RNS: NO, NO_2).

Los ROS proceden de la **cadena de transporte de electrones** de la membrana interna mitocondrial que tras una serie de reacciones en la cadena de electrones se genera como producto final ATP (adenosín trifosfato), molécula fundamental para la mayoría de las reacciones metabólicas. En esta cadena de transporte de electrones se reduce un átomo de oxígeno hasta formar una molécula de agua. Para que esto suceda durante el proceso se liberan moléculas con electrones desapareados como el anión de superóxido (O_2^-). Esta molécula es un radical libre muy inestable y por tanto muy reactivo, que actúa como un potente oxidante en sustancias orgánicas e inorgánicas. O también pueden proceder del **sistema inmunitario**, donde son empleados por los macrófagos y los neutrófilos en primera línea de defensa de la

respuesta primaria y los mecanismos de inflamación para preservar el organismo frente a bacterias, virus y otras amenazas externas.

Las fuentes de los RNS son las distintas **respuestas celulares** y, sobre todo, las **radiaciones ionizantes** cuyos radicales libres son muy agresivos contra los ácidos grasos.

Pero el organismo ha ideado sus propios mecanismos para inactivar los radicales libres, antioxidantes propios del organismo (ubiquinol, tocoferol, ácido ascórbico, glutatión y ácido úrico) y enzimas y sistemas enzimáticos (peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, glucatión reductasa). Por tanto, los antioxidantes son moléculas con capacidad de evitar las reacciones de oxidación en las células, bien inhibiendo esa oxidación o bien quitando intermedios del radical libre durante su metabolización. Por ello, los antioxidantes se consideran agentes reductores.

Pero el uso de los antioxidantes no es una práctica moderna, pues ya los egipcios aprovechaban sus propiedades en el empleo de plantas para conservar los cadáveres de las momias. Sin embargo, hace escasas décadas se le está dando una importancia mayor a estas sustancias, probablemente por los resultados satisfactorios en los numerosos estudios con distintas patologías humanas.

Dentro de la inmensa variedad de antioxidantes hay que destacar los flavonoides.

Los flavonoides son un grupo de polifenoles muy heterogéneos y muy abundantes en la naturaleza, habiéndose localizado hasta el momento más de 8000 especies diferentes en frutas, verduras, semillas, tallos, cereales y cebada, siendo, por lo tanto, unos integrantes significativos de la dieta humana (Martínez Álvarez, 2007).

Se encuentran principalmente en el reino vegetal. Algunas plantas, tras evolucionar han adquirido la capacidad de sintetizar sustancias que las ayudan a protegerse frente a amenazas externas, como ser devoradas por sus depredadores, adquiriendo la planta un sabor amargo o dificultando su digestión mediante la precipitación de proteínas; los flavonoides también pueden proporcionar propiedades atrayentes para su alimentación (en el caso de las plantas carnívoras mediante su olor y su color) o reproducción (Havsteen, 2002); o para regenerar zonas dañadas y evitar la entrada de patógenos y parásitos (Adams, 2007). Otra función que ejercen es la de inhibidores e inductores de enzimas y genes, en este caso tanto en animales como en vegetales.

Desde siempre se han utilizado las propiedades de las plantas para tratar dolencias, trastornos o desequilibrios de la salud en general, preparadas y administradas como brebajes, ungüentos y bálsamos. A lo largo del tiempo estos conocimientos colectivos de civilizaciones más antiguas han incluido en sus terapias un determinado grupo de sustancias y cada una específica para un problema de salud. Pero no ha sido hasta recientes décadas cuando se ha empezado a investigar sobre la estructura química, la biología molecular, la medicina de los flavonoides y su efecto exacto sobre la salud humana.

Como ya hemos comentado, son también un grupo muy heterogéneo por su estructura molecular y por tanto, por sus características químicas. En su estructura molecular poseen una forma básica benzo-y-pirona formada por 15 carbonos con dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos, es decir, C_6-C_3-C_6, a los que se unen uno o más grupos hidroxilo, cetona y/o metilo lo que le permite formar un gran número de configuraciones estructurales. Sin embargo, gracias a la glicosilación de la estructura permite que haya una inmensa cantidad de formas estructurales en la familia de los flavonoides.

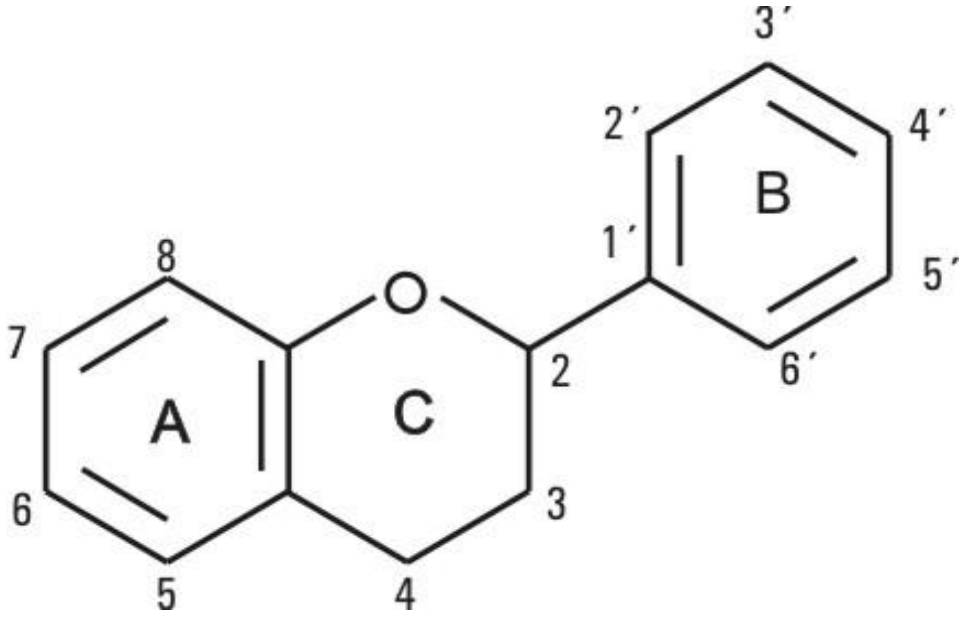


Figura 8. Estructura básica de los flavonoides.

Se observó que el efecto antioxidante de los flavonoides desde el plasma sanguíneo (Gay, 1987) era similar en investigaciones *in vitro* que en investigaciones *in vivo*, en ambos ejercían un efecto protector sobre los radicales libres mediante la diferentes rutas antioxidantes, como por ejemplo a través de la captación de los radicales libres impidiendo la reacción en cadena oxidativa que desencadenan.

Diversos estudios sobre su estructura química y la biodisponibilidad, la absorción y el metabolismo han hecho que las investigaciones se enfoquen en otras finalidades para los flavonoides además de su capacidad antioxidante directa sobre los radicales libres, como su acción antioxidante indirecta, muy importantes por regular la actividad y expresión de enzimas endógenas encargadas de la reducción de los ROS (Leung, 2006; Myhrstad, 2006). Pero además de su acción antioxidante, se han obtenido numerosos resultados en otros ámbitos, destacando sus efectos como antiinflamatorios, antialérgicos, anticancerígenos o antivirales (Aherne, 2002; Ren, 2003), lo que ha llevado a las industrias a crear productos para los sectores alimentarios o médicos (Moyano, 1996).

Los flavonoides se clasifican según su estructura en: flavonoles, flavonas, flavan-3-ols, antocianidas, dihidroflavonoides, flavan-3,4-dioles, chalcones, dihidrochalcones, taninos concentrados, aurones y por último las flavanonas e isoflavonas que son las más estudiadas en relación con la osteoporosis (Crozier, 2009).

Las **isoflavonas** son un tipo de flavonoides que se encuentra presente en los alimentos leguminosos, como la soja u otros como el lúpulo, presente en la cerveza, que tienen una estructura similar a los fitoestrógenos y que ha demostrado un efecto protector en los cánceres de próstata y mama, además de una disminución de la resorción ósea. Las **flavononas** las podemos encontrar en cantidades considerables en el tomate, en las aceitunas, en los cítricos y ciertas plantas aromáticas, tales como la menta.

Más alimentos en los que se encuentran los flavonoides son los cítricos, las uvas, las manzanas, las legumbres, el cacao (manufacturado, como el chocolate negro), el café, el té negro y verde o bebidas como el vino y la cerveza (Manach, 2004; Crozier, 2009).

La ingestión recomendada diaria de flavonoides es de 100-150 mg, aunque esta cantidad varía de unos países a otros. En los países orientales (como China, Japón o Finlandia), donde los flavonoides se consumen sobre todo en forma de té (Aherne, 2002), la cantidad ingerida ronda los 24-63 mg/día (Knekt, 2002; Arai, 2000) mientras que en países de los EE.UU. en los que los flavonoides se consumen a través de los cítricos y el té verde la cantidad de flavonoides asciende a 190 mg/día (Chun, 2007) y hasta 454 mg/día en países como Australia (Johannot, 2006). También se sospecha que el clima, la herencia y las distintas sociedades donde se ingieren los flavonoides pueden determinar el efecto de éste, como por ejemplo en Japón donde el consumo es bastante bajo en comparación con el resto de países.

Flavonoides y osteoporosis:

La estructura de algunos flavonoides es muy similar a la estructura de los estrógenos, esto significa que los **fitoestrógenos** pueden unirse a sus receptores y activarlos, ejerciendo una función igual o similar. Por ello estos productos se están empleando y estudiando para ver la posibilidad de ser utilizados como tratamiento sustitutivo o complementario a los fármacos en pacientes con osteoporosis, pero con la ventaja de no presentar efectos adversos (Kawakita, 2009).

Aunque la unión de los fitoestrógenos con el receptor de los estrógenos no es exactamente igual, se ha observado que tienen más afinidad por los receptores beta que por los receptores alfa, esto permite que el campo de estudio se centre más en estos receptores y en el porqué de esa afinidad. Aún así, los estudios tanto clínicos como experimentales cada vez dan mejores resultados sobre el efecto de los fitoestrógenos sobre la osteoporosis. Como por ejemplo un estudio realizado en Italia durante 24 meses ha puso de manifiesto que la ipriflavona (fitoestrógeno) ralentiza la pérdida de masa ósea (Gennari, 1998). Incluso, hay autores que clasifican los fitoestrógenos como **moduladores naturales del efecto estrogénico** (Krizt-Silverstein, 2002). Aunque este tipo de flavonoides se emplea más para el tratamiento de las molestias clásicas de la menopausia que para tratar o prevenir la osteoporosis, y a pesar de la seguridad y los beneficios que ofrecen siguen siendo necesarias más investigaciones que confirmen sus efectos y garanticen que no suponen ningún riesgo para el consumo humano.

Por otro lado, otros estudios han demostrado que ejercen un efecto sobre el hueso, como estimulador osteoblástico y por lo tanto, un incremento de la masa ósea. Un ejemplo son la genisteína y la

daidzeína, que al proteger contra la oxidación de radicales libres, ejercen un efecto preventivo ante la hipercolesterolemia y la ateroesclerosis. Esto convierte a este tipo de flavonoides en un tratamiento perfecto para la osteoporosis en pacientes con problemas para ser tratados con terapia hormonal sustitutiva y, además, sin los efectos adversos de éstos como el sangrado o los trombos.

Resumiendo, los fitoestrógenos:

1. Mejoran los síntomas vasomotores.
2. Ayudan a prevenir la osteoporosis.
3. Aparentemente, reducen el riesgo de cáncer de mama.
4. Tienen una acción anti-lipídica/anti-aterogénico (disminuyen el colesterol total, el LDL, los triglicéridos y aumentan ligeramente el HDL).

En nuestro estudio hemos elegido el flavonoide contenido en la planta *Humulus Lupulus* L. por sus propiedades estrogénicas.

Extracto de *Humulus Lupulus* L. (EHL):

Esta planta ha sido consumida a lo largo de la historia tanto de forma natural como suplemento de la dieta. Se cree que es originaria de China y que ha ido migrando hacia Japón, América y Europa (Zanoli, 2008), pero aún así existe una clara diferencia entre las diferentes clases.

El *Humulus lupulus* L. es una planta enredadera perenne, con rizomas subterráneos y un tallo delgado que crece de manera anual, en primavera, delgado y de 6-9 m de longitud. A menudo también posee unos ganchos con aspecto de “pelos” pero con una consistencia bastante robusta. Es de un color verde oscuro, con hojas en forma de corazón con 3-5 lóbulos y sus flores pueden ser masculinas y femeninas (en plantas separadas). Pero lo que hace característica a esta planta es que es rica en fitoestrógenos.

Figura 9. *Humulus Lupulus* L.

La parte realmente útil de la planta es el lúpulo de las especies hembras. Desde la Edad Media, se ha utilizado el lúpulo procedente de las plantaciones de los monasterios que la añadían durante el proceso de elaboración de la cerveza porque mantiene la cerveza estable; práctica que se mantiene actualmente.

Respecto a su uso medicinal, el lúpulo está muy extendido por su gran variedad de efectos: afrodisiaco, analgésico, antiséptico, diurético, hipnótico, relajante, sedante, sudorífico y tonificante. También es usado para tratar forúnculos, cardenales, cálculos, calambres, tos, cistitis, debilidad, delirium diarrea, dispepsia, fiebre, cansancio, histeria, inflamación, insomnio, ictericia, neuralgia, reumatismo, también “ablandan el útero” y estimulan la menstruación (Duke, 2000).

El lúpulo del *Humulus lupus* L. posee propiedades estrogénicas porque contiene componentes como el 8-prenylnaringenina (8-PN) caracterizado por ser un importante fitoestrógeno. Pero el 8-PN no sólo tiene una fuerte afinidad por los receptores β de los estrógenos si no que también por los receptores α, con lo que tiene un efecto muy similar a la hormona 17β-estradiol (E2) (Milligan, 2000; Schaefer, 2003).

En 2006, se realizó el primer estudio doble ciego aleatorio con 67 mujeres menopáusicas para probar la eficacia del EHL sobre los síntomas de la menopausia. El estudio duró 12 semanas y para la evaluación se utilizaron cuestionarios tanto al grupo control como al tratado. Como resultados obtuvieron que en las mujeres tratadas con EHL disminuyeron los síntomas de la menopausia (Heyerick, 2006).

En 2010 se realizó otro estudio para evaluar la eficacia del EHL. Fue un estudio de doble ciego en el que participaron 36 mujeres menopáusicas divididas de forma aleatoria en dos grupos: un control y un tratado. Fueron tratadas durante 16 días, pero al octavo día se

intercambiaron los grupos. Los resultados fueron satisfactorios, puesto que las mujeres que comenzaron siendo tratadas con EHL al dejar de tomarlo empeoraron, y las que pasaron a tomarlo mejoraron los síntomas de la menopausia. (Erkkola, 2010).

Así mismo, además de probar su eficacia también se han realizado estudios para probar la seguridad y la farmacocinética del producto. En 2006, a 24 mujeres menopáusicas se les administró 8-PN de forma directa por vía oral en dosis de 50, 250 y 750 mg que fueron perfectamente toleradas y con una baja incidencia de efectos adversos (Rad, 2006). Además se destacan aspectos como su rápida absorción enteral, una alta estabilidad metabólica y una disminución significativa de la hormona luteneizante (LH) tras la administración de la dosis más alta, demostrando la actividad biológica prevista y necesaria para el éxito del tratamiento sobre los síntomas de la menopausia.

III. OBJETIVOS

El objetivo general de nuestro estudio consistió en el análisis de los efectos del tratamiento con extracto de *Humulus Lupulus* L. sobre un modelo de osteoporosis, secundaria a ovariectomía en ratas Sprague-Dawley, a través del estudio:

1. Del peso de los animales, bioquímico general y de la fosfatasa alcalina ósea.

2. De la distribución de la masa ósea y cuantificación de la densidad mineral mediante microtomografía computerizada.

3. Anatomo-patológico: análisis del grosor de las trabéculas óseas; y del espesor del epitelio luminal del endometrio uterino.

4. Ionómico: componentes químicos del hueso mediante espectrofotometría.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

a) Animales:

Hemos utilizado 40 ratas Sprague–Dawley hembras, de 12 semanas de edad y 250 gramos de peso al inicio del experimento, que fueron alojadas en jaulas de 48x27x20 cm, en grupos de 3 ó 4 animales por jaula, situadas en un sistema estéril de *rack* ventilado. Se mantuvieron en condiciones ambientales constantes de 12 horas de luz/oscuridad, temperatura de 22-24ºC, humedad de 55% ±10% y con libre acceso a agua y comida comercial (Panlab S.L.U. Barcelona, España) para ratas en el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia (SAI; nº REGAES 300305440012).

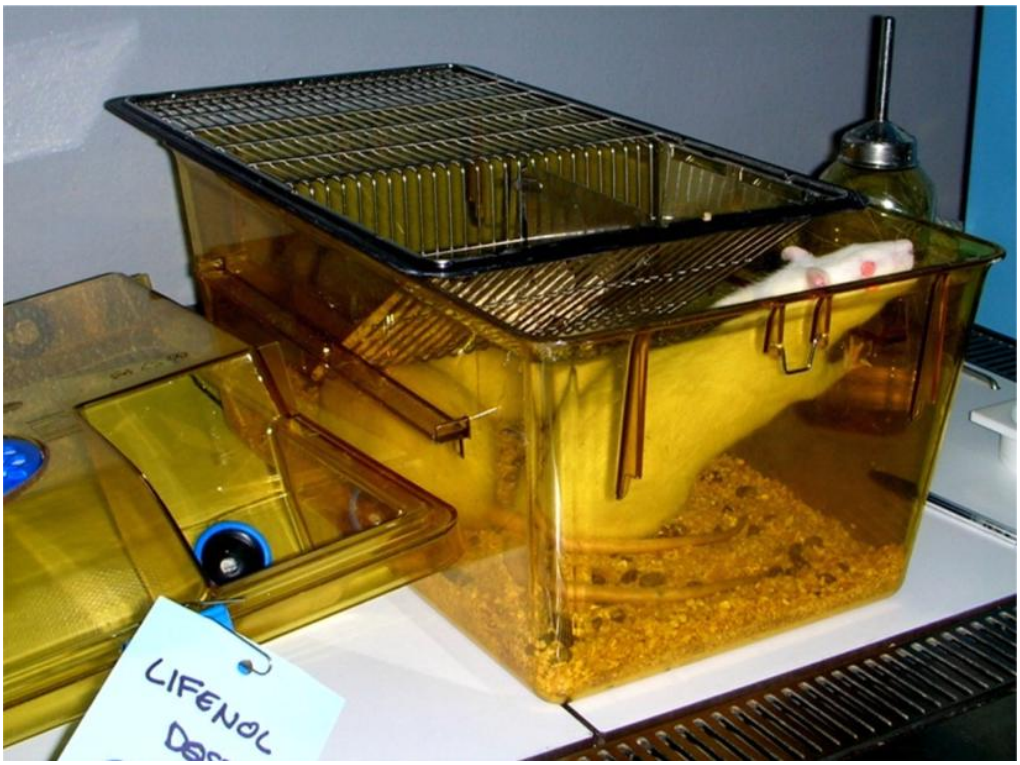


Figura 10. Jaula de 48x27x20 cm.

Todos los animales utilizados durante el estudio fueron mantenidos y tratados según la guía establecida por la Unión Europea sobre la protección de los animales utilizados en experimentación (86/609/CEE). Los experimentos fueron aprobados por el comité ético local y en todos los procedimientos se respetó la normativa sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (R.D. 1201/2005).

Figura 11. Sistema de rack ventilado.

b) Aparatos:

- **Analizador de bioquímica.** VetScan Practice. Abaxis, Inc. Darmstadt (Alemania).

Figura 12. Analizador de bioquímicas.

- **Microtomógrafo computerizado.** SkyScan 1172 High resolution µ-CT. Microphotonics Inc. Kontich (Bélgica). Software: ImageJ 1.46r.

Figura 13. Microtomógrafo computerizado

- **Ultraclave-Microondas:** High Performance Microwave reactor MLS GmbH. Milestone System Spain SL. Barcelona (España).

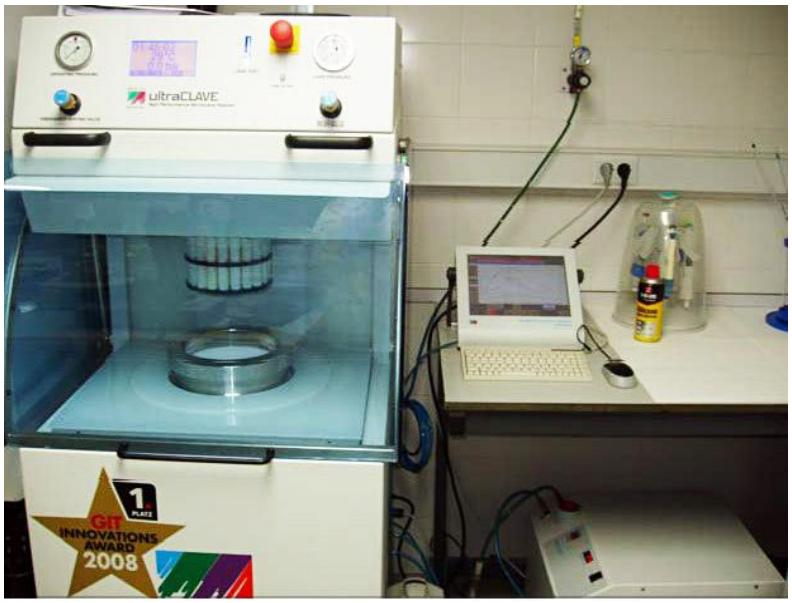


Figura 14. Microondas-ultraclave.

- **Espectrofotómetro** (ICP-OES): iCAP 6500 Duo/Iris Intrepid II XDL Thermo. Fisher Scientific SL. Madrid (España).

Figura 15. Espectrofotómetro.

- **Microscopios:**

  - Microscopio óptico Leica DM5000B con cámara digital (Leica Microsystems, Barcelona, España).

Figura 16. Microscopio óptico.

  - Escáner de portas microscópicos SCN400F Leica (Servicio universitario de Análisis de imagen, SAI, Universidad de Murcia); Leica Microsystems AG, Solms (Alemania).

Figura 17. Escáner de portas microscópicos.

c) Agente:

Extracto de *Humulus lupulus L.* (EHL):

Compuesto fenólico natural extraído de la planta *Humulus lupulus L*. Administrado en dosis de 0,32 y 0,032 g del agente por kg de pienso preparado en pienso para ratas (Panlab S.L.U. Barcelona (España).

Para este estudio se ha utilizado la siguiente fórmula química del producto: 8-prenylnaringenina (0,12-0,2%), 6-prenylnaringenina (>0,1%), xanthohumol (>0,3%), isoxanthohumol (>1%) proteínas (10-11%), lípidos (4-6%) e hidratos de carbono (64-52%).

d) Fármacos:

- **Analgésico: Buprecare®** 0,5 mg/ml (solución inyectable). Divasa-Farmavic, S.A. (DFV®). Barcelona (España).

- **Antibiótico: Alsir®** 2,5% (solución inyectable). Laboratorios Dr. Esteve, S.A. Leverkusen (Alemania).

- **Anestésicos:**

    - **Isoba®** vet 100% p/p de isoflurano. Schering-Plough, S.A. Madrid (España).

    - **Imalgène®** 1000 (solución inyectable). Merial Laboratorios, S.A. Lyon (Francia).

- **Sedante: Xilagesic®** 2% (solución inyectable). Laboratorio Calier, S.A. Barcelona (España).

2. MÉTODOS

a) Procedimiento experimental:

Los 40 animales fueron divididos en cuatro grupos:

- **Grupo I** (Control): Ratas sanas, no OVX y sin tratamiento (n=8).
- **Grupo II** (Control OVX): Ratas OVX, sin tratamiento (n=11)
- **Grupo III** (EHL D1): Ratas OVX tratadas con 0,032 g/kg de EHL (n=10).
- **Grupo IV** (EHL D2): Ratas OVX tratadas con 0,32 g/kg de EHL (n=11).

Los animales del grupo I no fueron ovariectomizados ni tratados (grupo control). En los grupos II, III y IV realizamos la ovariectomía bilateral cuando los animales alcanzaron los 250 g de peso (aproximadamente 12 semanas de vida). Además, los animales de los grupos III y IV recibieron tratamiento con EHL, que fue incorporado al pienso por la empresa Panlab, S.L.U. (Cornellá, Barcelona) en dos dosis diferentes: 0,032 g/kg (grupo III) y 0,32 g/kg (grupo IV). El tratamiento se administró desde 10 días antes de la ovariectomía y los animales lo consumían *ad libitum* durante todo el experimento (4 meses).

Durante el estudio, se midió el peso de cada animal hasta cinco veces, incluyendo el peso inicial y final. También se les extrajo sangre en tres ocasiones para su análisis bioquímico. Después de cuatro

meses de tratamiento, los animales fueron sacrificados mediante cámara de CO_2. Tras el protocolo de eutanasia procedimos a la recogida de muestras:

- **Sangre**: análisis bioquímico.
- **Úteros**: para estudio histomorfométrico.
- Los **huesos fémur** y **tibia** de ambas patas. Para realizar los siguientes estudios:
    - Estudio de imagen por microtomografía computerizada.
    - Estudio histomorfométrico.
    - Estudio ionómico de la composición química mediante espectrofotometría.

b) Procedimiento quirúrgico:

Tras 10 días de aclimatación en sus respectivas jaulas, realizamos la ovariectomía bilateral a todos los animales de los grupos II, III y IV de la siguiente forma:

Preoperatorio:

1. Antes de la intervención se le administró analgésico *Buprecare*® en dosis de 0,01-0,02 mg por kg de peso y antibiótico *Alsir*® en dosis de 0,2 mL por kg de peso por vía intramuscular (fig. 18). Se mantuvo la antibioterapia y la analgesia durante tres días después de la intervención.

2. Tras preparar el campo estéril sobre el que realizar la intervención, se colocó al animal en la cámara cerrada para inducirle el sueño utilizando isoflurano inhalado *(Isoba®)* al 5% durante 2 minutos. Para mantener el estado de anestesia durante la intervención se mantuvo al animal inhalando isoflurano a concentración 2,5-3%.

3. Se colocó al animal en decúbito supino, se le rasuró el abdomen (fig. 19) y se le vació la vejiga mediante comprensión manual para evitar que estuviera distendida y que pudiera ser dañada accidentalmente durante la primera incisión por cercanía al útero.

4. Por último, se le desinfectó la zona a operar con povidona yodada *(Betadine®)* (fig. 20).

Intraoperatorio:

5. Se realizó una incisión en la zona inferior de la pared abdominal, entre las mamas más caudales, a la altura de la vejiga con cuidado de no seccionarla (fig. 21).

6. Realizada la primera incisión se procedió a explorar la cavidad abdominal en busca el útero, caracterizado por un color más rosáceo. A partir de él se extrajeron las trompas de Falopio hasta llegar a ambos ovarios (figs. 22 y 23).

7. Se pasaba una hebra de sutura con aguja atraumática por la sección más caudal de las trompas de Falopio pegado al útero, se ligaban (fig. 24), se anudaban (fig. 25) y por último se cortaban ambas trompas con los ovarios, dejando un muñón uterino (fig. 26).

8. Por último se procedió al cierre de la pared abdominal en dos planos: el interno mediante una sutura tradicional con hilos de sutura sintética absorbible (fig. 27) y el plano externo se cerró con grapas (fig. 28).

Postoperatorio:

9. Se desinfectó de nuevo la herida con povidona yodada, se retiró al animal del aparato de anestesia y se dejó en reposo para que se reanimara a los pocos minutos.

10. A los 15 días de la intervención se procedió a la retirada de las grapas, administrando previamente *Imalgène*® en dosis de 0,1-0,2 mL. por kg de peso junto con *Xilagesic*® 3 mg. por kg. por vía intramuscular para sedar al animal.

Figura 18. Administración intramuscular del antibiótico y analgésico.

Figura 19. Rasurado del abdomen.

Figura 20. Desinfección del abdomen con povidona yodada.

Figura 21. Incisión en la zona inferior de la pared abdominal.

Figura 22. Identificación de los cuernos uterinos.

Figura 23. Identificación del útero, los cuellos uterinos y los ovarios.

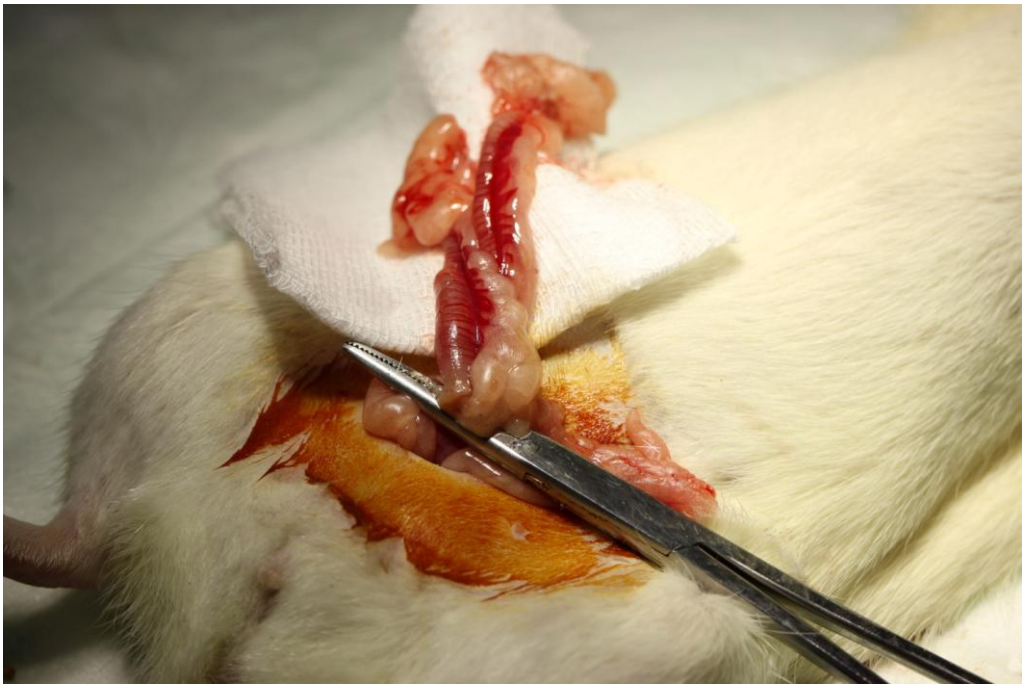


Figura 24. Ligadura de las trompas uterinas.

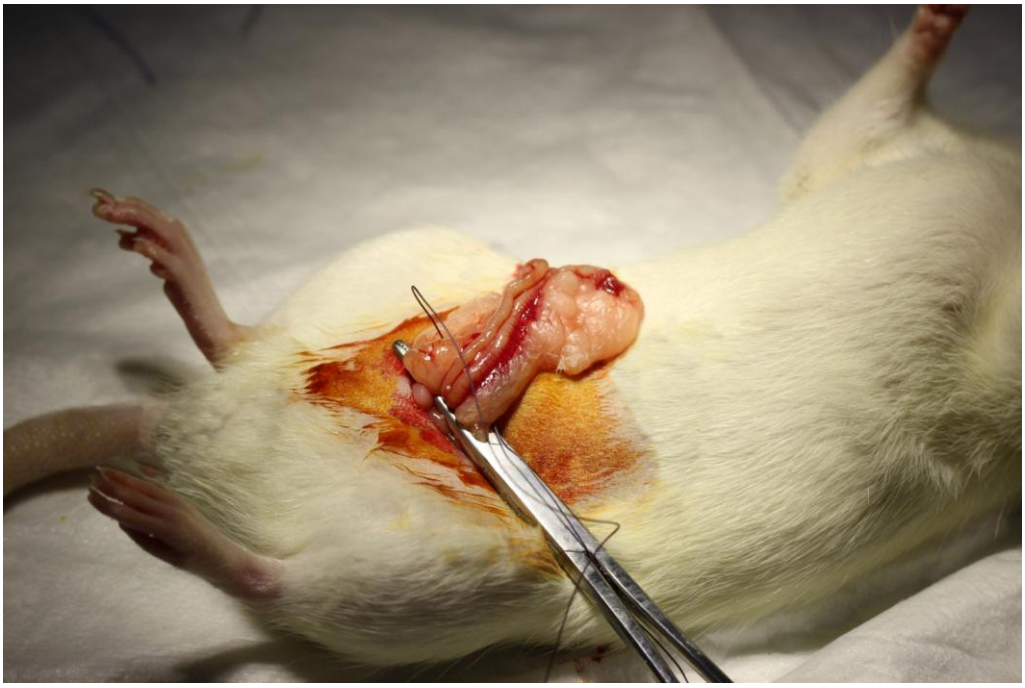


Figura 25. Ligadura y extirpación de las trompas uterinas.

Figura 26. Muñón uterino.

Figura 27. Sutura interna de la pared abdominal.

Figura 28. Cierre de la herida quirúrgica con grapas.

Figura 29. Aspecto de la herida quirúrgica 15 días tras la intervención.

c) Estudio del peso:

Hemos realizado un seguimiento del peso de los animales de todos los grupos, hasta un total de cinco determinaciones: al inicio del experimento, al primer, segundo y tercer mes tras la ovariectomía y la quinta toma al final del experimento.

d) Estudio bioquímico:

Realizamos tres extracciones de sangre a lo largo del estudio. La primera tuvo lugar cuando las ratas alcanzaron el peso y la edad adecuados en las que el hueso ha alcanzado un pico de masa ósea elevado aproximadamente con 250 g de peso y 12 semanas de edad) antes de administrar el pretratamiento y de realizarles la ovariectomía. La segunda y la tercera muestra se tomaron a los dos y a los cuatro meses tras la intervención respectivamente.

La extracción de sangre se realizó seccionando superficialmente con un bisturí la zona más proximal de la cola, siendo el corte de las extracciones del primer mes más distales que las del segundo. Una vez realizada la pequeña incisión, se absorbió la sangre con tubos capilares *(Microvette® CB 300µl)*. Posteriormente detuvimos la hemorragia ejerciendo presión con una gasa impregnada de *Betadine®*. La última extracción de sangre se realizó el día de la eutanasia de los animales, pinchando directamente en el ventrículo de forma perpendicular a través de las costillas, lo que nos permitió extraer un volumen de sangre mayor.

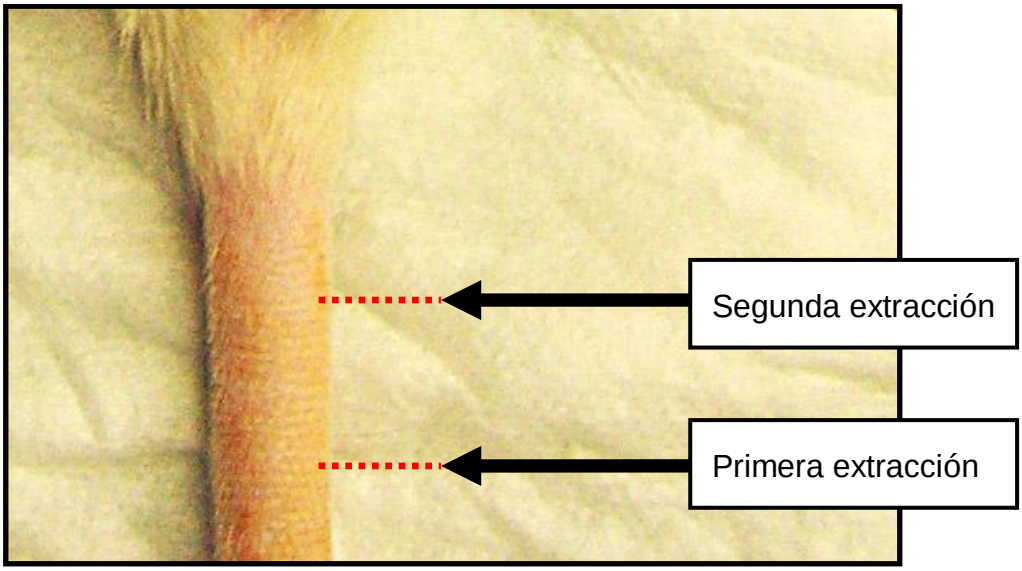


Figura 30. Esquema de los cortes de la primera y segunda extracción de sangre.

Los parámetros analizados fueron:

- Albúmina (ALB),
- Fosfatasa alcalina (ALP),
- Alanina aminotransferasa (ALT),
- Amilasa (AMY),
- Bilirrubina total (TBIL),
- Urea nitrógeno (BUN),
- Calcio (Ca++),
- Fósforo (FOS),
- Creatinina (CRE),
- Glucosa (GLU),
- Sodio (NA+),
- Potasio (K+),
- Proteína total (TP)
- Globulina (GLOB).

Estudio de la ALP ósea:

De la última muestra de sangre extraída, separamos una alícuota de 0,5 ml de suero sanguíneo de cada animal en tubos *Eppendorf* que, se mantuvieron congelados a -30ºC hasta el momento de su análisis para determinar el porcentaje específico de ALP ósea y ALP hepática. Estos análisis han sido realizados en colaboración con el laboratorio de análisis clínicos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

El análisis consiste en detectar las isoenzimas específicas de cada isoforma de la fosfatasa alcalina (de hígado, hueso e intestino) utilizando un gel fabricado a partir de la lectina del germen de trigo *(wheat germ lectin, WGL)* que tiene afinidad por las isoformas residuales ácidas de la ALP. Una vez mezclado, los distintos tipos de ALP decantan y son medidos por electroforesis dando los resultados del ALP L1+B *(Liver 1 + Bone)* sin separar, L2 *(Liver 2)*, I1, I2 e I3 *(Intestinal 1, 2 and 3)*. Para cuantificar la fracción del ALP-B se calcula restando los resultados del valor L1 al total de ALP L1+B y el resultado, expresado en porcentaje, se multiplica por el total del ALP sanguíneo (Le Bricon, 2010).

e) Estudio mediante microtomografía computerizada (µTC):

El fémur izquierdo de cada animal fueron incluidos en suero fisiológico para su posterior análisis de imagen mediante microtomografía computerizada. Antes del análisis, a cada hueso se le retiró el exceso de suero y se envolvió en papel de plástico *ParafilmM*® para prevenir su secado durante el escaneado. Posteriormente, cada muestra envuelta en plástico fue introducida en un tubo de espuma situado verticalmente en el escáner.

El escaneo consiste en el análisis a nivel microestructural obteniendo las variables morfométricas del hueso trabecular y hueso cortical de cada muestra. Los tomogramas obtenidos del escaneado se reconstruyeron mediante la utilización del programa *NRecon versión 1.6.1.7 (Bruker microCT, Kontich, Bélgica).*

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 1,0 mm del plato de crecimiento de la metáfisis distal del fémur, ocupando 3,6 mm en dirección proximal y excluyendo para el análisis el hueso cortical.

Para el análisis de hueso cortical, el VOI comienza a una distancia de 6,0 mm del plato de crecimiento y se extiende 1,2 mm, excluyendo el hueso trabecular (Figura). La selección de los correspondientes VOI se lleva a cabo con la aplicación comercial proporcionada con el equipo *(SkyScan CT-Analizer versión 1.10.0.2).*

Figura 31. Esquema de los volúmenes de interés a analizar en fémur.

Parámetros analizados:

1. *Parámetros morfométricos del hueso trabecular:*

Relaciones de superficie/volumen: el TV es el volumen total de la región de interés analizada. Dentro de ésta región, el espacio ocupado por hueso es el denominado BV. La relación entre ambos se conoce como fracción volumétrica ósea o porcentaje de volumen de hueso (**BV/TV,** *bone volumetric fraction*). De la misma manera la BS es la superficie de hueso, por lo que la relación

BS/TV *(bone surface density)* se conoce como densidad de la superficie ósea.

Índices métricos directos. El **Tb.Th** *(trabecular thickness)* es el grosor medio tridimensional de las trabéculas medido de forma independiente del modelo. De la misma manera, la **Tb.Sp** *(trabecular spacing)* es básicamente el grosor de los espacios huecos. El **Tb.N** *(trabecular number)* implica el número de veces que se atraviesan las trabéculas por unidad de longitud por una vía arbitraria a través del volumen de interés.

Índices métricos no directos. El **Tb.Pf** *(trabecular pattern factor)* es un índice de conectividad inverso (cuanto más alto es el valor de Tb.Pf menos conectadas están las trabéculas).

2. *Variables microestructurales corticales:*

El grosor de la sección transversal (**Cs.Th,** *cross-sectional thickness*) indica el grosor medio de la pared cortical determinado en 2D en cada una de las secciones transversales que conforman la región de interés. Por otro lado, el grosor cortical (**Ct.Th**, *cortical thickness*) ofrece una información similar al indicar el grosor de la pared cortical medido de forma tridimensional.

El parámetro **B.Ar** *(mean total cross-sectional bone area)* mide el área de hueso media de las secciones transversales y representa la media de las áreas de hueso de cada una de las secciones transversales dentro de la región de interés seleccionada.

f) Estudio anatomopatológico óseo:

Tras el análisis en el µTC, las muestras óseas se mantuvieron durante un mínimo 48 horas en formol neutro tamponado al 10% para posteriormente ser descalcificadas con ácido hidrocolhídrico *(Osteomoll®, Merck Chemicals, Darmstadt, Alemania)* durante 24 horas y por último fueron incluidas en parafina. Los bloques fueron seccionados a 5µ a nivel de las epífisis de cada fémur y cada tibia. Las secciones histológicas fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina y con el tricrómico de Masson por el método habitual empleado por la Cátedra de Anatomía Patológica de la Universidad de Murcia.

Todas las preparaciones histológicas fueron escaneadas (Microscopio óptico Leica SNC400F, Servicio universitario de Análisis de imagen, SAI, Universidad de Murcia) para la obtención de imágenes digitales.

Análisis histomorfométrico del hueso:

Sobre estas imágenes, utilizando una aplicación del programa *Digital Image Hub (v. 3.1),* trazamos 8 medidas para la obtención de una media de grosor trabecular de cada imagen.

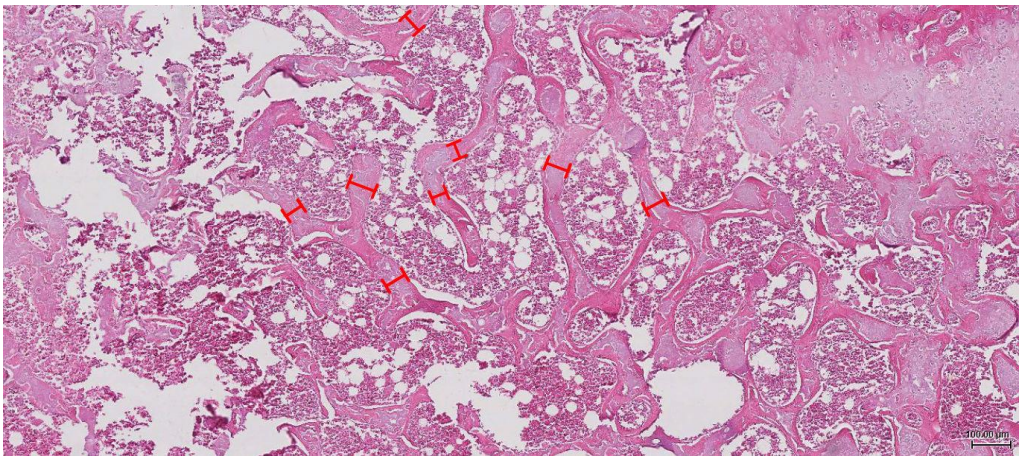


Figura 32. Medida de las trabéculas de la tibia. H.E. 5,23x.

g) Estudio ionómico del hueso:

Este método analiza los distintos elementos minerales presentes en cada hueso, diferenciando el hueso trabecular del hueso cortical. Los distintos elementos a analizar fueron: calcio (Ca), magnesio (Mg), zinc (Zn), boro (B), fósforo (P). De todos los elementos analizados, centramos el estudio en los valores de calcio y fósforo, elementos fundamentales en la composición del hueso; y también el boro, magnesio y zinc por ser componentes importantes de la matriz proteica.

El proceso a seguir consistió en: se extrajeron las patas derechas de todos los animales para posteriormente separar y limpiar el fémur y la tibia. Es necesario que para hacer el análisis por espectrofotometría las muestras sólidas se muelan y se sequen. Para ello los huesos se machacaron hasta reducirlos a polvo y se secaron en la estufa a 80ºC durante 24h.

Las muestras fueron pesadas para obtener el peso en seco, ya que este valor se utilizó al final del análisis para calcular los resultados. Después de obtener el peso en seco, cada muestra (mínimo 0,1 g) fue llevada a un volumen conocido de 4 mL de ácido nítrico (HNO_3 PA-ISO 69 %) en un tubo de teflón que tras taparlo se colocaba en el microondas a una temperatura de 220ºC durante 20 minutos.

Por último, una vez que los tubos se enfriaban, la digestión obtenida se volvía a llevar a un volumen conocido de 10 mL con agua milliQ (agua purificada de laboratorio) y se hicieron dos diluciones más de 1/10 y 1/100 para ser medidas por el equipo de espectrofotomería ICP-OES. Los resultados de la espectrofotometría son expresados en mg/kg, que multiplicados por 10 y divididos por el peso seco nos dio el resultado deseado.

Este estudio fue realizado en colaboración con el CEBAS-CESIC de la Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, Murcia (España).

h) Estudio anatomopatológico del útero:

Los úteros también fueron extraídos de cada animal para su estudio histológico. Tras la extracción, se eliminó todo el tejido adiposo que los rodeaba y se mantuvieron en formol neutro tamponado al 10% para posteriormente ser incluidos en parafina por el método habitual, seccionados a 5µ y teñidos con Hematoxilina-Eosina para su estudio al microscopio óptico.

Análisis histomorfométrico del útero:

Se realizó el estudio histomorfométrico de las secciones uterinas midiendo el grosor del epitelio luminal del endometrio de forma manual utilizando el programa programa *Digital Image Hub (v. 3.1)* y tomándose 8 medidas por corte desde la membrana basal del epitelio hasta la superficie celular.

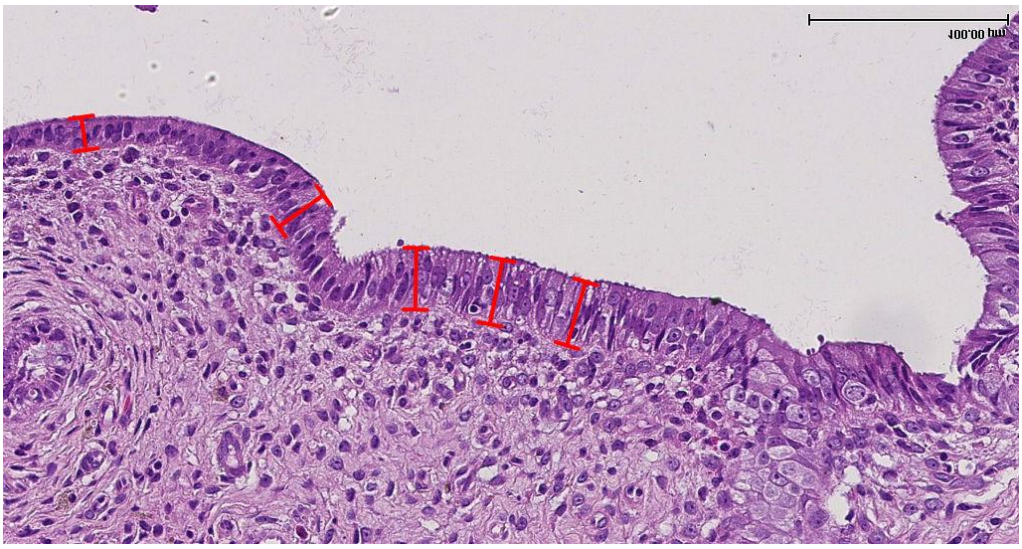


Figura 33. Medidas del epitelio luminal del endometrio. H.E. 16,30x.

i) Método estadístico:

Se realizó en colaboración con la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia a través del software *ANOVA SPSS® v12.0 (SPSS® Inc, Chicago, USA)* mediante el que efectuamos los siguientes procedimientos estadísticos:

Primero, para el análisis descriptivo de las variables observadas para medir la distribución de las frecuencias entre los grupos, se han calculado los parámetros característicos: media, desviación típica y los valores máximos y mínimos.

En segundo lugar, para determinar el grado de asociación estadística entre las variables en estudio, se realizó el análisis de varianza de una vía complementando con el contraste de igualdad de pares de medias, con el método de la mínima diferencia significativa y con la corrección de Bonferroni.

V. RESULTADOS

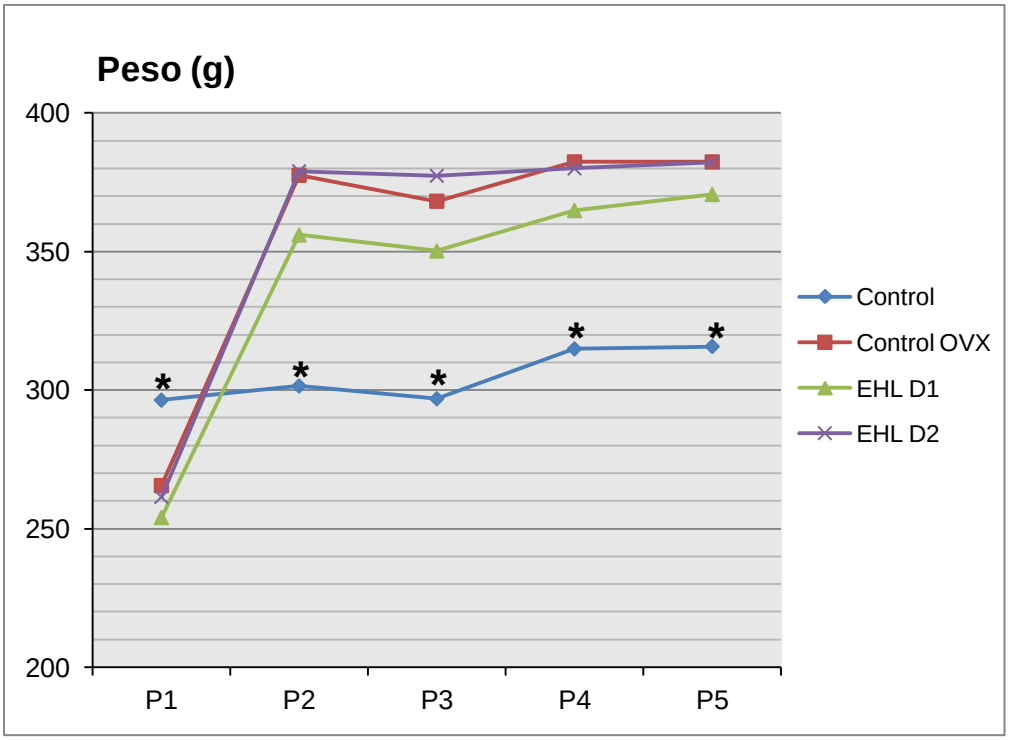
Estudio del peso:

En el estudio del peso, observamos que el grupo control mantuvo su peso más o menos estable durante el experimento, con un incremento final medio de 19,37±12,1 g respecto al peso inicial, que fueron adquiriendo los animales de forma gradual. Sin embargo, todos los animales de los grupos ovariectomizados, experimentaron un gran incremento de peso durante el estudio, con valores superiores a los 100 gramos. El grupo tratado con EHL D2 fue el que más aumentó su peso (120,73±0,98 g), mientras que el grupo OVX y el grupo tratado EHL D1 obtuvieron cifras similares (116,81±19,32 g y 116,60±23,45 g respectivamente). Existían diferencias estadísticamente significativas entre el control y los grupos ovariectomizados ($p<0,05$).

El grupo con mayor peso al final del experimento fue el Control OVX (382,36±32,14 g), muy similar al peso del grupo EHL D2 (382,18±30,09 g) y seguidos por el grupo tratado con EHL D1 (370,60±47,01 g). El que menor peso presentaba era el grupo Control (315,75±30,26 g). Existían diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$) entre el control y el resto de los grupos en todas las mediciones realizadas.

Grupo:	Media					
	P1	P2	P3	P4	P5	P5-P1
Control	296,38	301,50	296,87	314,88	315,75	19,37
Control OVX	265,55	377,55	368,18	382,36	382,36	116,81
EHL D1	254,00	356,00	350,20	364,80	370,60	116,60
EHL D2	261,45	379,00	377,36	380,00	382,18	120,73
	Desviación típica					
Control	18,16	27,65	31,45	22,29	30,26	12,1
Control OVX	12,82	31,08	27,15	30,95	32,14	19,32
EHL D1	23,56	38,13	28,25	28,24	47,01	23,45
EHL D2	31,07	23,55	28,79	22,19	30,09	0,98

Tabla 7. Peso inicial (P1), un mes tras la ovariectomía (P2), a los dos meses (P3), a los tres (P4) y al final del experimento, antes de la eutanasia (P5). Incremento de peso durante el experimento (P5-P1).



Gráfica 1. Representación de las medias de los pesos por tiempo. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX ($p< 0,05$).

(I)Grupo	(J)Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Sig.[a]
Control OVX	EHL D1	16,080	0,089
	EHL D2	-0,800	0,930
	Control	50,125	0,000
EHL D1	Control OVX	-16,080	0,089
	EHL D2	-16,880	0,075
	Control	34,045	0,001
EHL D2	Control OVX	0,800	0,930
	EHL D1	16,880	0,075
	Control	50,925	0,000
Control	Control OVX	-50,125	0,000
	EHL D1	-34,045	0,001
	EHL D2	-50,925	0,000

Tabla 8. Medias marginales estimadas. Ajuste para comparaciones múltiples.
La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Estudio bioquímico:

A continuación se muestran los valores medios de parámetros bioquímicos que nos han ido mostrando el estado general del animal, dentro del rango de referencia de normalidad. Estos parámetros son: albúmina (ALB), alanina aminotransferasa (ALT), amilasa (AMY), bilirrubina total (TBIL) nitrógeno ureico sanguíneo (BUN), creatinina (CRE), glucosa (GLU), sodio (NA+), potasio (K+), proteína total (TP) y globulina (GLOB).

Parámetros	Tiempo					
	Mes 0	Mes 2	Mes 4	Mes 0	Mes 2	Mes 4
	Control			EHL D1		
ALB	5,67	5,87	5,10	4,30	4,30	4,50
ALT	59,32	57,00	63,50	31,00	55,00	42,40
AMY	735,67	743,33	738,17	594,00	368,00	572,60
TBIL	0,27	0,27	0,28	0,20	0,23	0,28
BUN	14,65	13,83	13,17	11,00	18,25	15,40
CRE	0,32	0,37	0,35	0,20	0,15	0,38
GLU	150,38	154,17	171,33	99,50	93,75	171,80
NA^+	138,14	138,00	137,33	142,00	114,50	139,80
K^+	5,83	5,95	5,77	6,00	5,30	4,62
TP	8,45	7,43	6,58	5,85	8,28	6,14
GLOB	1,66	1,57	1,47	1,55	1,60	1,70
	Control OVX			EHL D2		
ALB	6,54	5,43	4,12	4,81	4,52	4,40
ALT	55,73	53,67	47,67	45,44	105,33	34,67
AMY	876,10	837,67	1048,00	768,90	749,33	719,83
TBIL	0,16	0,20	0,24	0,47	0,33	0,28
BUN	19,76	18,00	13,50	12,09	16,83	20,50
CRE	0,35	0,33	0,32	0,56	0,37	0,33
GLU	113,33	100,00	128,00	203,57	202,67	168,83
NA+	137,81	139,67	135,67	145,66	137,50	135,17
K+	6,83	6,07	5,80	8,63	5,88	4,62
TP	7,61	7,43	6,12	6,14	6,48	6,62
GLOB	2,80	2,03	1,98	2,72	1,93	2,20

Tabla 9. Media de los parámetros bioquímicos generales.

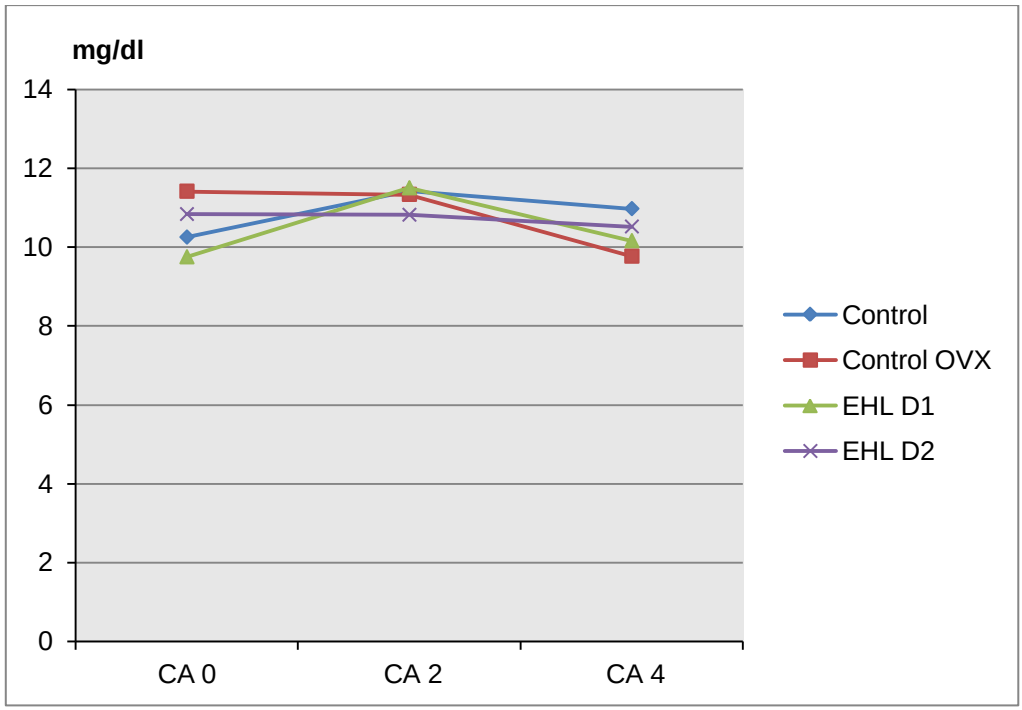
A continuación se detallan los parámetros bioquímicos sanguíneos relacionados con el metabolismo del hueso: calcio (Ca^{2+}), fósforo (P), fosfatasa alcalina total (ALP total) y fosfatasa alcalina ósea (ALP Bone).

Calcio (Ca^{2+}):

Los valores finales de Ca^{2+} en sangre en el grupo control fueron de 10,95±0,20 mg/dl, de 10,20±0,95 mg/dl en el grupo OVX, de 10,40±0,40 mg/dl en el grupo EHL D1 y de 10,67±0,25 mg/dl en el grupo EHL D2. No existían diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre grupos ni en las distintas determinaciones realizadas a cada grupo en los diferentes tiempos de estudio.

	Media Ca^{2+}		
Grupo:	**Ca^{2+} 0**	**Ca^{2+} 2**	**Ca^{2+} 4**
Control	10,25	11,52	10,95
Control OVX	11,28	11,33	10,20
EHL D1	9,40	11,70	10,40
EHL D2	10,83	10,81	10,67
	Desviación típica Ca^{2+}		
	Ca^{2+} 0	**Ca^{2+} 2**	**Ca^{2+} 4**
Control	0,64	0,56	0,20
Control OVX	0,03	0,11	0,95
EHL D1	0,30	0,19	0,40
EHL D2	0,16	0,74	0,25

Tabla 10. Media y desviación típica del calcio.



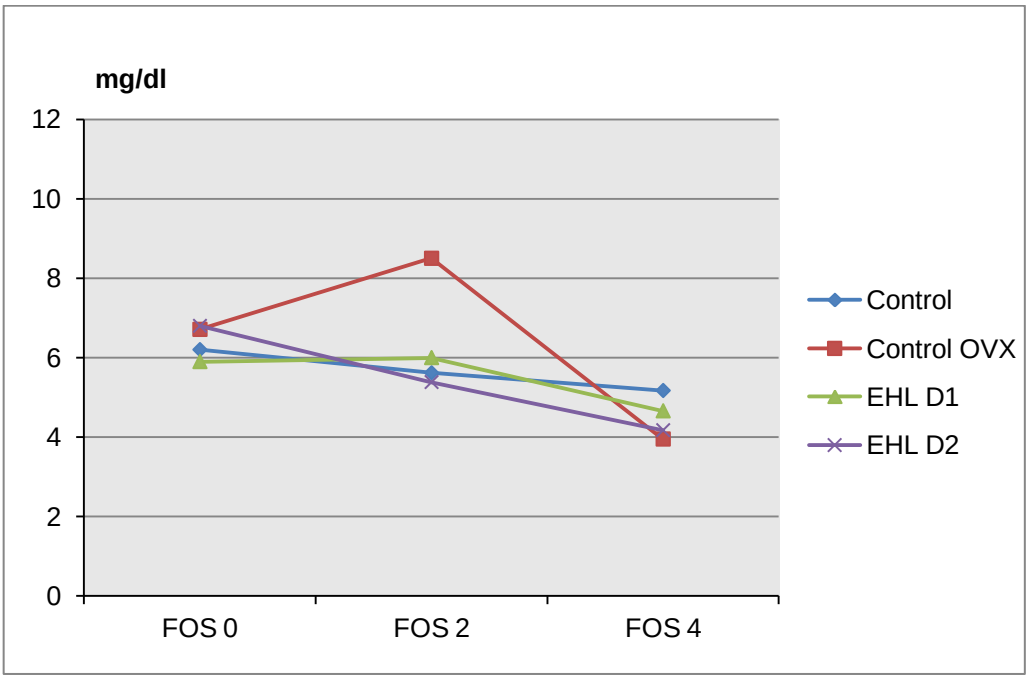
Gráfica 2. Representación de las medias de Ca^{2+} (mg/dl) en tiempo.

Fósforo (FOS):

Los valores finales de fósforo fueron de 5,80±0,35 mg/dl en el grupo control, de 4,20±0,78 mg/dl en el grupo OVX, y de 4,26±0,15 y 5,00±0,86 mg/dl en los grupos tratados (EHL D1 y D2 respectivamente). No existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

	Media FOS		
Grupo:	**Fos 0**	**Fos 2**	**Fos 4**
Control	6,20	5,60	5,80
Control OVX	6,48	8,50	4,26
EHL D1	6,30	6,00	5,00
EHL D2	6,80	5,83	4,20
	Desviación típica FOS		
	Fos 0	**Fos 2**	**Fos 4**
Control	0,38	0,43	0,35
Control OVX	1,48	0,00	0,15
EHL D1	0,69	0,68	0,86
EHL D2	1,10	1,27	0,78

Tabla 11. Media y desviación típica del fósforo.



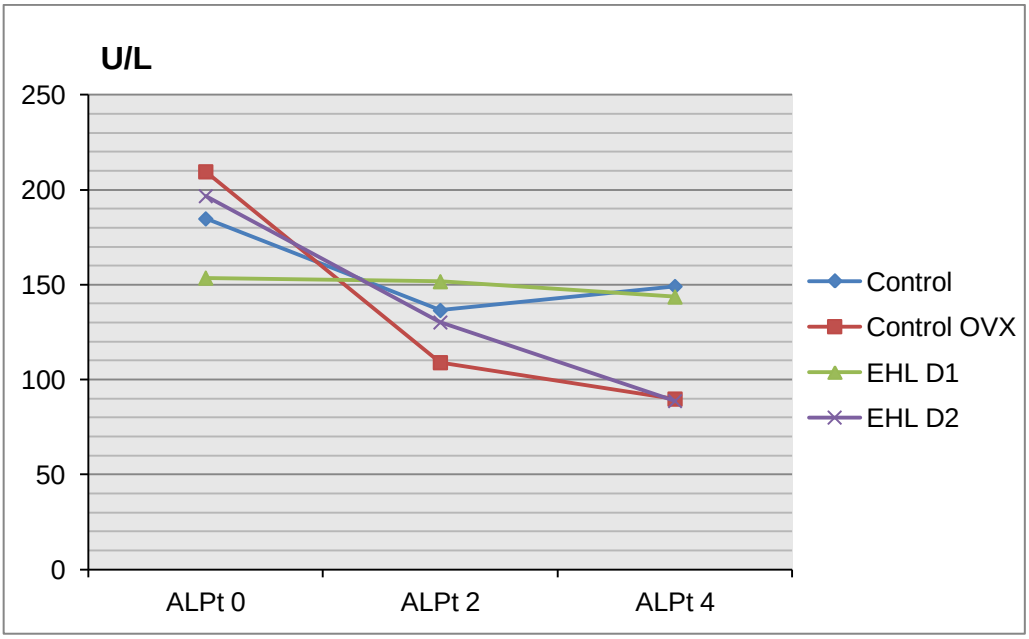
Gráfica 3. Representación de las medias de FOS (mg/dl) en tiempo.

Fosfatasa alcalina total (ALP total):

La ALP total disminuyó en todos los grupos de estudio, siendo el grupo control el que presentaba los valores más estables, pues al principio del experimento la media de este grupo fue de 184,75±17,17 U/L y los valores medios finales fueron de 141,50±39,53 U/L. El grupo control OVX sufrió una importante caída de los valores séricos de esta enzima, ya que partiendo de una media de 221,93±38,79, los valores finales se redujeron hasta los 97,67±46,54 U/L. Los animales tratados con EHL D1 comenzaron el experimento con 171±38,89 U/L y los valores finales fueron de 110±20,31 U/L. El grupo EHL D2, sufrió una mayor caída, con una media al comienzo del estudio 196,66±34,57 U/L y de valores finales de 91,67±45,40 U/L. No existían diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre los grupos.

	Media ALP total		
Grupo:	**ALPt 0**	**ALPt 2**	**ALPt 4**
Control	184,75	136,50	141,50
Control OVX	221,93	109,00	97,67
EHL D1	171,00	134,00	110,00
EHL D2	196,66	130,17	91,67
	Desviación típica ALP total		
	ALPt 0	**ALPt 2**	**ALPt 4**
Control	17,17	34,99	39,53
Control OVX	38,79	15,10	46,54
EHL D1	38,89	25,90	20,31
EHL D2	34,57	29,15	45,40

Tabla 12. Resultados estadísticos descriptivos.



Gráfica 4. Representación de las medias de ALP total (U/L) en tiempo.

(I)Grupo	(J)Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Sig.[a]
Control OVX	EHL D1	4,533	0,873
	EHL D2	3,366	0,846
	Control	-11,384	0,545
EHL D1	Control OVX	-4,533	0,873
	EHL D2	-1,167	0,965
	Control	-15,917	0,563
EHL D2	Control OVX	-3,366	0,846
	EHL D1	1,167	0,965
	Control	-14,750	0,356
Control	Control OVX	11,384	0,545
	EHL D1	15,917	0,563
	EHL D2	14,750	0,356

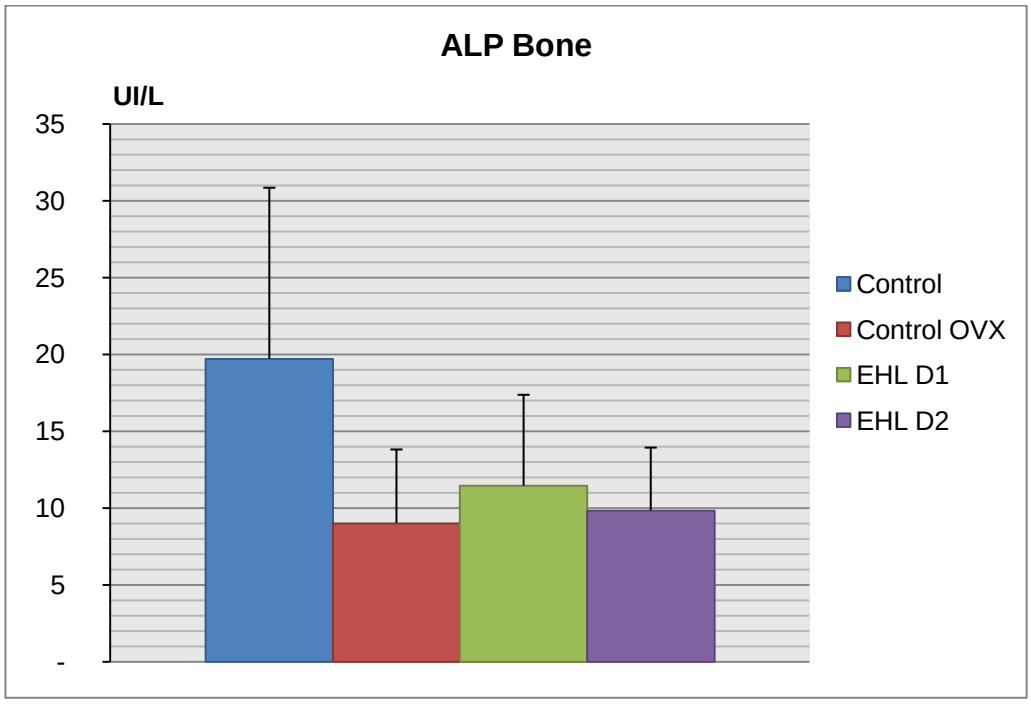
Tabla 13. Basadas en las medias marginales estimadas. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Fosfatasa alcalina ósea (ALP Bone):

Observamos que los niveles más altos de la isoenzima específica de hueso, se daban en el grupo control con 19,69±11,14 U/L. En los grupos de animales operados observamos valores sensiblemente inferiores: 11,45±5,91 U/L (EHL D1), 9,84±4,08 U/L (EHL D2) y 9,02±4,78 U/L (OVX). Existían diferencias estadísticamente significativas (p<0,013) entre el grupo Control y el resto de los grupos.

	ALP-B	
Grupos:	**Media**	**Desv. típica**
Control	19,69	11,14
Control OVX	9,02	4,78
EHL D1	11,45	5,91
EHL D2	9,84	4,08

Tabla 14. Resultados estadísticos descriptivos.



Gráfica 5. Representación de las medias ±DE de ALP ósea (U/L).

(I)Grupo	(J)Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Sig.[a]
Control	Control OVX	10,673	0,001
	EHL D1	8,246	0,013
	EHL D2	9,851	0,003
Control OVX	Control	-10,673	0,001
	EHL D1	-2,427	0,407
	EHL D2	-0,822	0,773
EHL D1	Control	-8,246	0,013
	Control OVX	2,427	0,407
	EHL D2	1,605	0,582
EHL D2	Control	-9,851	0,003
	Control OVX	0,821	0,773
	EHL D1	-1,605	0,582

Tabla 15. Basadas en las medias marginales estimadas. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Estudio mediante microtomografía computerizada (µTC):

1. Fémur: trabecular

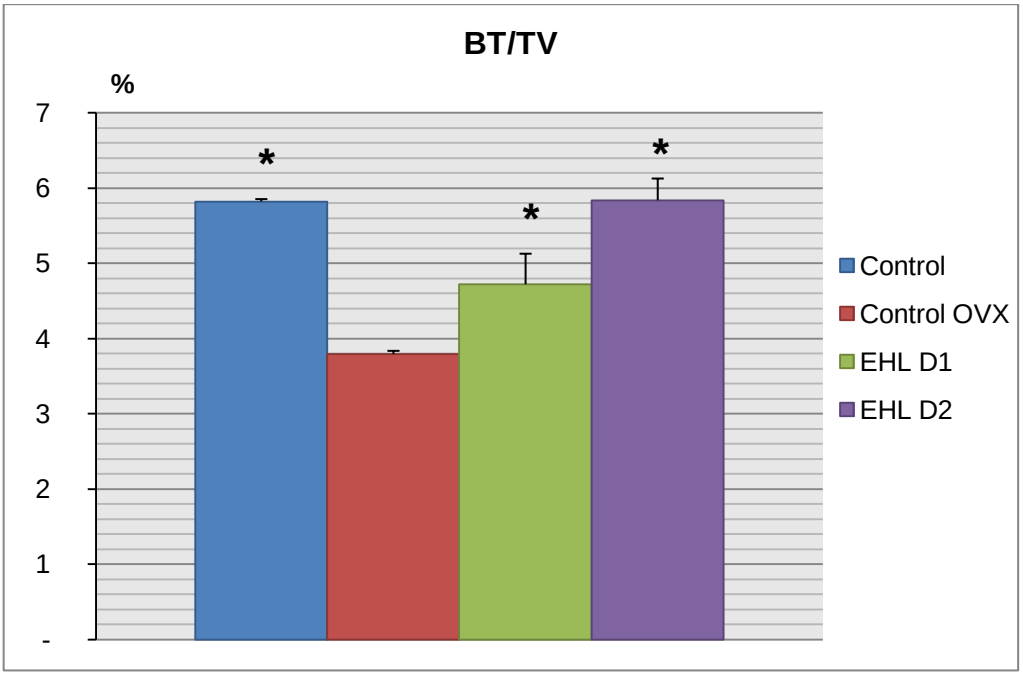
En la región trabecular del fémur, el µTC da información sobre el porcentaje del volumen del hueso, la densidad de la superficie ósea (mm^{-1}), el grosor de las trabéculas (mm^{-1}), el grosor del espacio entre trabéculas (mm^{-1}), el número de trabéculas que atraviesan el espacio (µm) y un índice de conectividad de las trabéculas (mm^{-1}). Los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

	BV/TV %	**BS/TV** mm-^{1}	**Tb.Th** mm^{-1}	**Tb.Sp** mm^{-1}	**Tb.N** µm	**Tb.Pf** mm^{-1}
	Porcentaje volumen del hueso	Densidad superficie ósea	Grosor de las trabéculas	Grosor del espacio entre trabéculas	Nº de trabéculas que atraviesan el espacio	Índice de conectividad de las trabéculas
	Media					
Control	5,823	2,746	87,645	92,7883	0,673	15,221
Control OVX	3,793	2,566	67,460	1079,37	0,556	25,636
EHL D1	4,721	2,798	73,165	1064,44	0,635	20,061
EHL D2	5,840	2,868	80,733	1116,78	0,723	15,620
	Desviación típica					
Control	0,031	0,112	1,250	1,093	0,023	0,670
Control OVX	0,044	0,246	2,215	5,866	0,022	1,218
EHL D1	0,407	0,065	2,561	24,133	0,022	2,155
EHL D2	0,288	0,149	4,846	106,799	0,015	1,414

Tabla 16. Resultados estadísticos descriptivos.

- **BV/TV:**

Observamos que los grupos I y IV presentaban un volumen muy similar entre ellos, de 5,82±0,03% y 5,84±0,29% respectivamente, y ambos superiores a los grupos II (3,79±0,04%) y III (4,72±0,41%) con diferencias estadísticamente significativas (p<0,000).



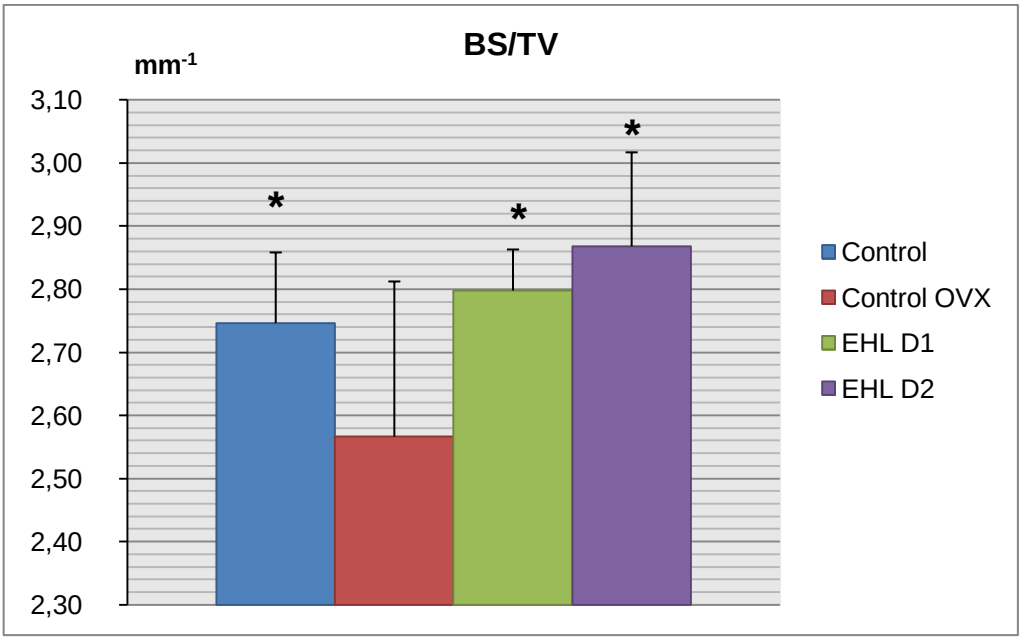
Gráfica 6. Representación de las medias ±DE de BV/TV del fémur. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo II: Control OVX (p<0,05).

BV/TV			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	2,030	0,000
	EHL D1	1,101	0,000
	EHL D2	-0,016	0,910
Control OVX	Control	-2,030	0,000
	EHL D1	-0,928	0,000
	EHL D2	-2,046	0,000
EHL D1	Control	-1,101	0,000
	Control OVX	0,928	0,000
	EHL D2	-1,118	0,000
EHL D2	Control	0,016	0,910
	Control OVX	2,046	0,000
	EHL D1	1,118	0,000

Tabla 17. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

- **BS/TV**:

Los valores de densidad trabecular fueron mayores en los grupos tratados (EHL D1: 2,8±0,06 mm^{-1}; EHL D2: 2,87±0,15 mm^{-1}) y control no operado (2,75±0,11 mm^{-1}) que en el control OVX (2,57±0,25 mm^{-1}) con diferencias estadísticamente significativas ($p<0,02$), como puede observarse en la tabla y gráfica mostradas a continuación:



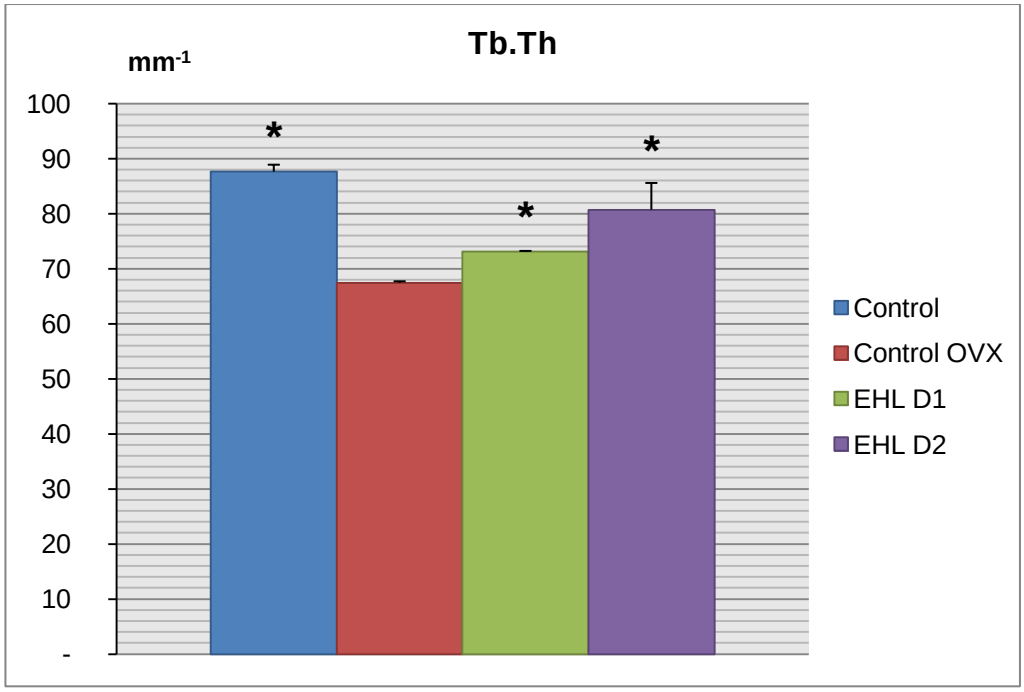
Gráfica 7. Representación de las medias ±DE de BS/TV del fémur. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo II: Control OVX (p<0,05).

BS/TV			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	0,180	0,063
	EHL D1	-0,051	0,578
	EHL D2	-0,121	0,198
Control OVX	Control	-0,180	0,063
	EHL D1	-0,231	0,020
	EHL D2	-0,301	0,004
EHL D1	Control	0,051	0,578
	Control OVX	0,231	0,020
	EHL D2	-0,070	0,453
EHL D2	Control	0,121	0,198
	Control OVX	0,301	0,004
	EHL D1	0,070	0,453

Tabla 18. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

- **Tb.Th**:

El grupo I (Control) fue el que presentaba mayor grosor trabecular (87,65±1,25 mm^{-1}). Los dos grupos tratados mostraron valores superiores al control OVX (73,17±2,56 mm^{-1} y 80,73±4,85 mm^{-1} vs 67,46±2,21 mm^{-1}), siendo los obtenidos por el grupo IV muy similares a los observados en el control sano. Existían diferencias estadísticamente significativas (p<0,004) entre los grupos I, III y IV y el grupo II.



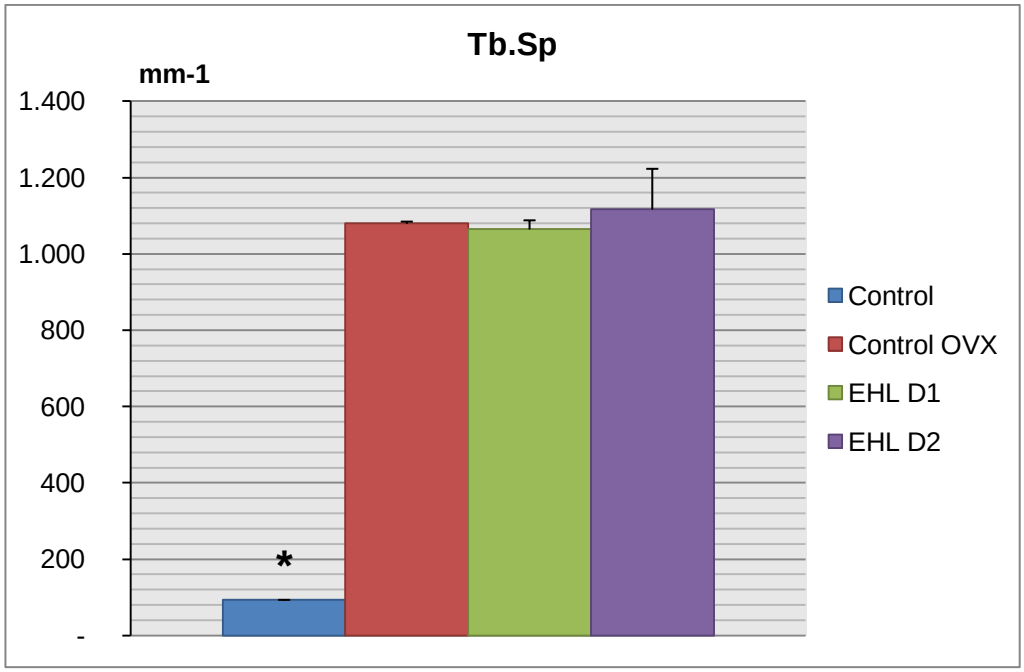
Gráfica 8. Representación de las medias ±DE de Tb.Th del fémur. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo II: Control OVX (p<0,05).

Tb.Th			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	20,185	0,000
	EHL D1	14,480	0,000
	EHL D2	6,911	0,001
Control OVX	Control	-20,185	0,000
	EHL D1	-5,705	0,004
	EHL D2	-13,273	0,000
EHL D1	Control	-14,480	0,000
	Control OVX	5,705	0,004
	EHL D2	-7,568	0,000
EHL D2	Control	-6,911	0,001
	Control OVX	13,273	0,000
	EHL D1	7,568	0,000

Tabla 19. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

- **Tb.Sp**:

En cuanto al espacio entertrabecular, existían diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control sano (I) y el resto de grupos operados (p<0,000). Así, mientras el grupo I obtuvo un valor de 92,78±1,2 mm^{-1}, en los animales operados, existía mayor espacio entre trabéculas con 1079,37±5,87 mm^{-1} del grupo OVX, 1064,45±24,14 mm^{-1} del grupo EHL D1 y 1116,78±106,78 mm^{-1} del grupo EHL D2.



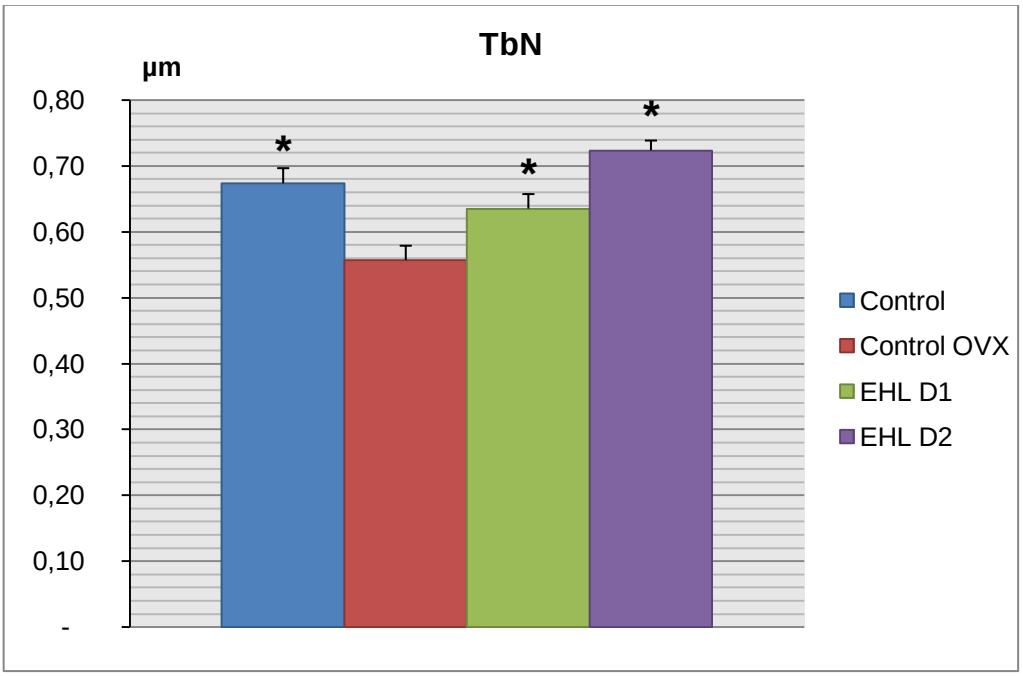
Gráfica 9. Representación de las medias ±DE de Tb.Sp del fémur. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX (p<0,05).

Tb.Sp			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	-986,581	0,000
	EHL D1	-971,656	0,000
	EHL D2	-1023,990	0,000
Control OVX	Control	986,581	0,000
	EHL D1	14,925	0,642
	EHL D2	-37,408	0,251
EHL D1	Control	971,656	0,000
	Control OVX	-14,925	0,642
	EHL D2	-52,333	0,114
EHL D2	Control	1023,990	0,000
	Control OVX	37,408	0,251
	EHL D1	52,333	0,114

Tabla 20. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

- **Tb.N**:

Respecto al número de trabéculas que atraviesan el espacio analizado, el grupo IV fue el que obtuvo valores más elevados (0,72±0,02 µm), seguido por el grupo I Control (0,67±0,02 µm) y por el grupo III (0,64±0,02 µm). Todos ellos eran superiores con diferencias estadísticamente significativas ($p<0,005$) respecto al grupo II Control OVX, que obtuvo un valor de 0,56±0,02 µm.



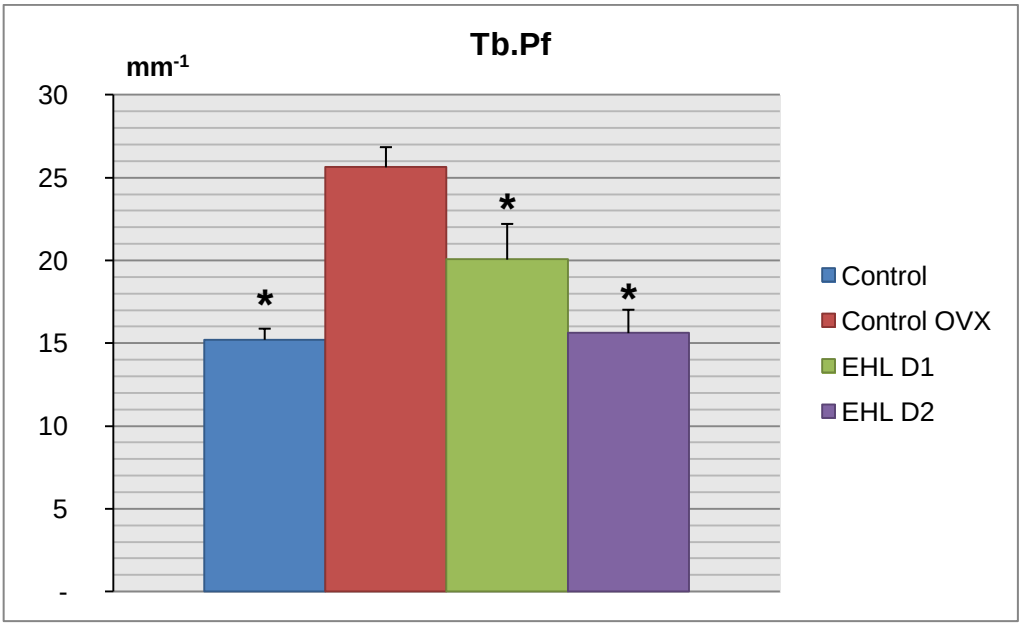
Gráfica 10. Representación de las medias ±DE de Tb.N del fémur. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX ($p<0,05$).

Tb.N			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	0,116	0,000
	EHL D1	0,038	0,005
	EHL D2	-0,050	0,001
Control OVX	Control	-0,116	0,000
	EHL D1	-0,078	0,000
	EHL D2	-0,166	0,000
EHL D1	Control	-0,038	0,005
	Control OVX	0,078	0,000
	EHL D2	-0,088	0,000
EHL D2	Control	0,116	0,001
	Control OVX	0,038	0,000
	EHL D1	-0,050	0,000

Tabla 21. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

- **Tb.Pf**

Se trata de un índice inverso, por lo que cuanto mayor es el valor, menor conectividad intertrabecular existe. Los grupos I (Control) y IV (EHL D2) obtuvieron valores muy similares (15,22±0,67 mm^{-1} y 15,62±1,41 mm^{-1} respectivamente), con diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos II y III. El grupo III (EHL D1) obtuvo un valor medio de 20,06±2,16 mm^{-1}, superior al del grupo II (control OVX: 25,64±1,22 mm^{-1}) con diferencias estadísticamente significativas ($p<0,000$).



Gráfica 11. Representación de las medias ±DE de Tb.Pf del fémur. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX (p<0,05).

Tb.Pf			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	-10,415	0,000
	EHL D1	-4,840	0,000
	EHL D2	-0,398	0,643
Control OVX	Control	10,415	0,000
	EHL D1	5,575	0,000
	EHL D2	10,016	0,000
EHL D1	Control	4,840	0,000
	Control OVX	-5,575	0,000
	EHL D2	4,441	0,000
EHL D2	Control	0,398	0,643
	Control OVX	-10,016	0,000
	EHL D1	-4,441	0,000

Tabla 22. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

2. Fémur: cortical

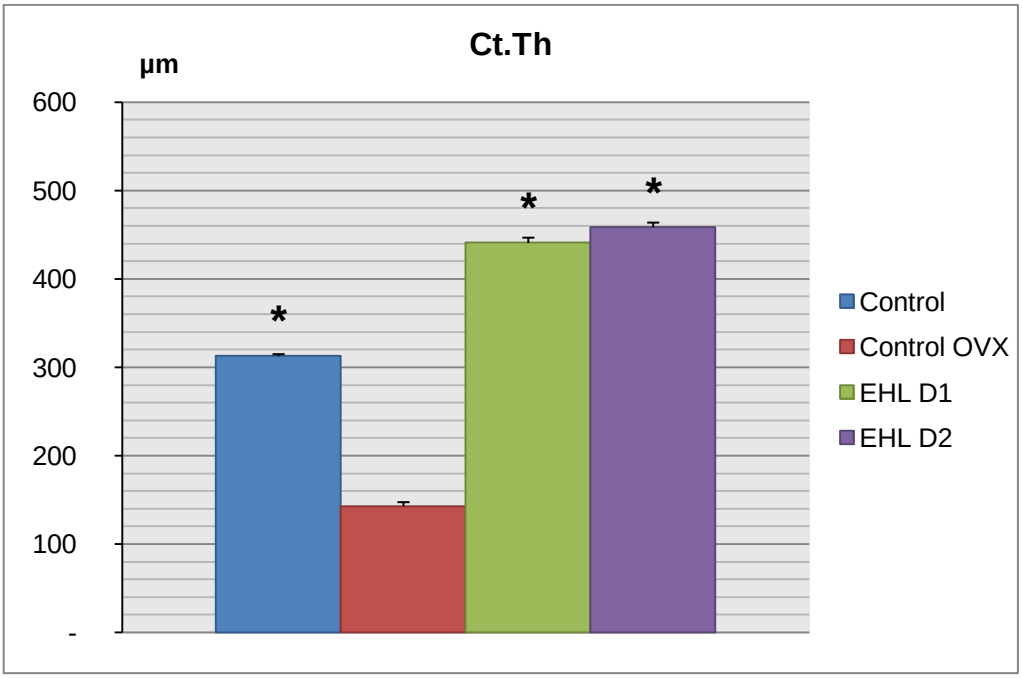
En la región cortical del fémur, el µCT da información sobre el grosor medio de la pared en 2D y 3D (µm) y el área media del hueso (mm^2). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo fueron los siguientes:

	Ct.Th µm	**Cs.Th** µm	**B.Ar** mm^2
	Grosor medio de la pared cortical en 2D	Grosor medio de la pared cortical en 3D	Área media del hueso
	Media		
Control	312,933	423,948	6,152
Control OVX	142,757	142,033	5,513
EHL D1	440,970	415,623	5,472
EHL D2	458,578	486,712	5,675
	Desviación típica		
Control	2,157	1,443	0,127
Control OVX	4,892	4,131	0,119
EHL D1	5,957	9,806	0,068
EHL D2	5,378	5,518	0,025

Tabla 23. Resultados estadísticos descriptivos.

- **Ct.Th**:

La pared cortical era más gruesa en los grupos tratados (D1: 440,97±5,96 µm, D2: 458,58±5,38 µm) que en ambos grupos controles en las mediaciones obtenidas en el estudio en 2D. El grupo Control OVX fue el que mostró una cortical más fina, con 142,757±4,89 µm solamente. Existían diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($p<0,000$).



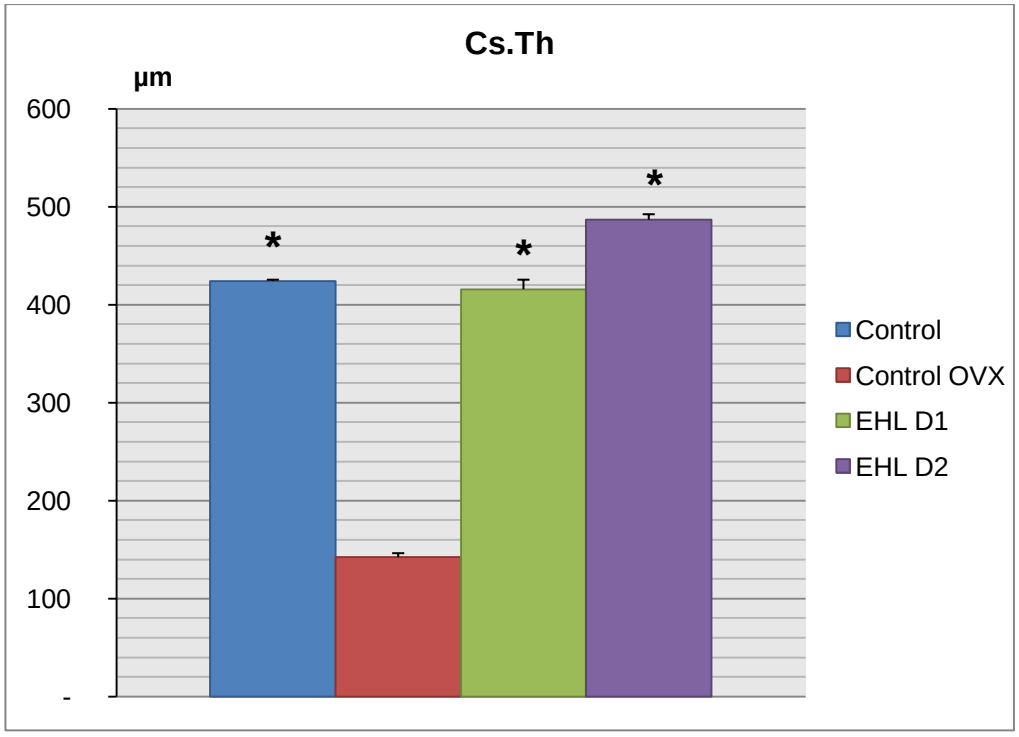
Gráfica 12. Representación de las medias ±DE de Ct.Th del fémur. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX (p<0,05).

Ct.Th			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	170,176	0,000
	EHL D1	-128,036	0,000
	EHL D2	-145,645	0,000
Control OVX	Control	-170,176	0,000
	EHL D1	-298,213	0,000
	EHL D2	-315,821	0,000
EHL D1	Control	128,036	0,000
	Control OVX	298,213	0,000
	EHL D2	-17,608	0,000
EHL D2	Control	145,645	0,000
	Control OVX	315,821	0,000
	EHL D1	17,608	0,000

Tabla 24. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

- **Cs.Th**:

En el estudio tridimensional del a cortical ósea, los dos grupos tratados así como el grupo control sano estaban por encima de 400 µm de espesor, mientras que el grupo control OVX se encontraba muy por debajo de estos valores (142,03±4,13 µm). El grupo que mostraba una cortical más gruesa según este parámetro de estudio fue el grupo IV (486,71±5,52 µm). Nuevamente, existían diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos (p<0,027).



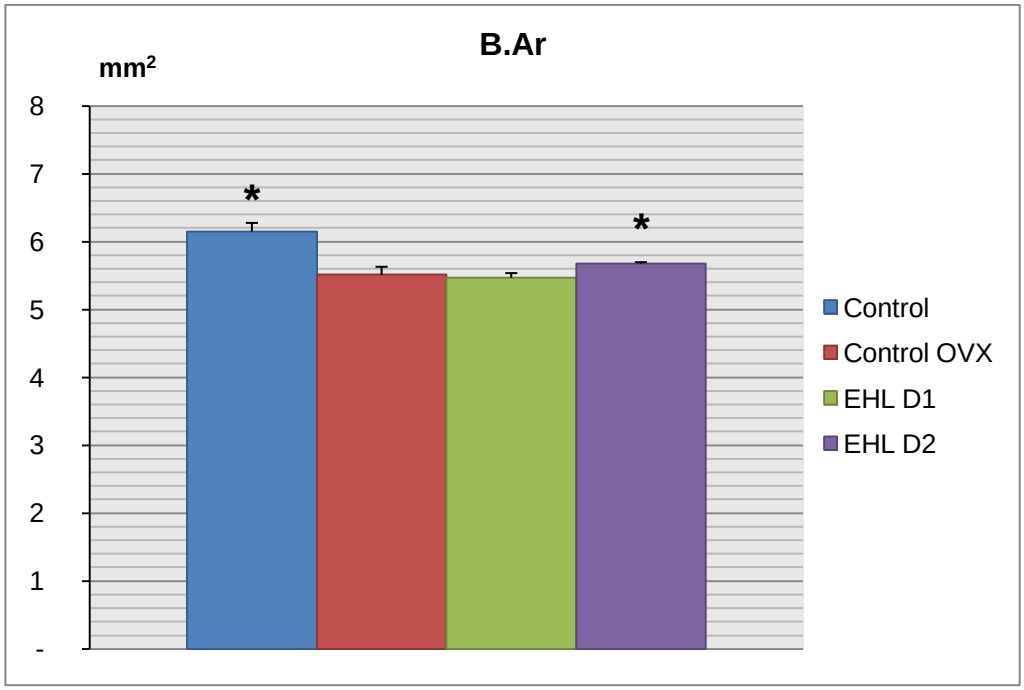
Gráfica 13. Representación de las medias ±DE de Cs.Th del fémur. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX (p<0,05).

Cs.Th			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	281,915	0,000
	EHL D1	8,325	0,027
	EHL D2	-62,763	0,000
Control OVX	Control	-281,915	0,000
	EHL D1	-273,590	0,000
	EHL D2	-344,678	0,000
EHL D1	Control	-8,325	0,027
	Control OVX	273,590	0,000
	EHL D2	-71,088	0,000
EHL D2	Control	62,763	0,000
	Control OVX	344,678	0,000
	EHL D1	71,088	0,000

Tabla 25. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

- **B.Ar** (área media de hueso cortical):

En el estudio del área media del hueso cortical, observamos el valor más alto en el grupo Control, con 6,15±0,13 mm^2 seguido por el grupo IV con 5,68±0,03 mm^2. Los grupos II y III con los valores más bajos, aunque cercanos a los otros dos grupos: 5,51±0,12 mm^2 y 5,47±0,07 mm^2 respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas. Sí existía significación ($p<0,001$) entre el resto de los grupos entre sí.



Gráfica 14. Representación de las medias ±DE de B.Ar del fémur. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX (p<0,05).

B.Ar			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	0,638	0,000
	EHL D1	0,680	0,000
	EHL D2	0,476	0,000
Control OVX	Control	-0,638	0,000
	EHL D1	0,041	0,454
	EHL D2	-0,161	0,008
EHL D1	Control	-0,680	0,000
	Control OVX	-0,041	0,454
	EHL D2	-0,020	0,001
EHL D2	Control	-0,476	0,000
	Control OVX	0,161	0,008
	EHL D1	0,203	0,001

Tabla 26. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

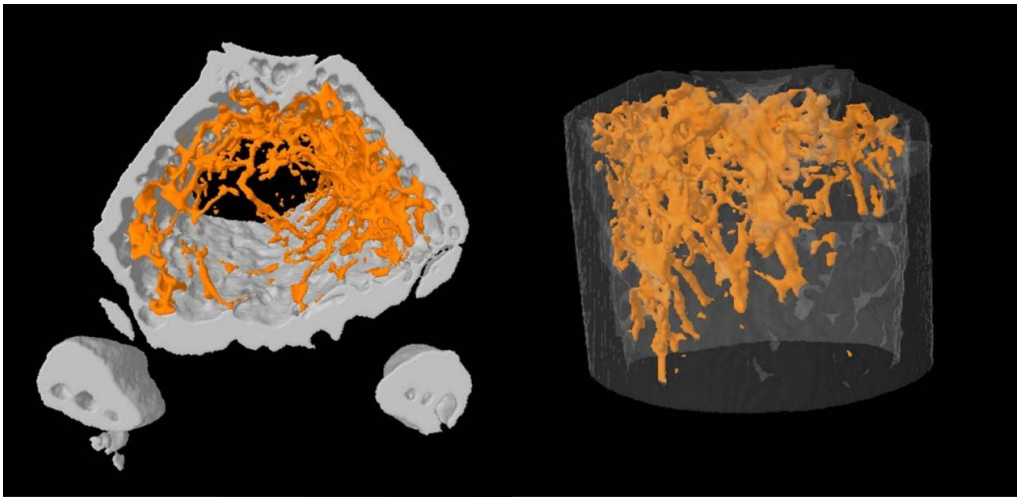


Figura 34. Fémur, hueso trabecular. Grupo I, Control.

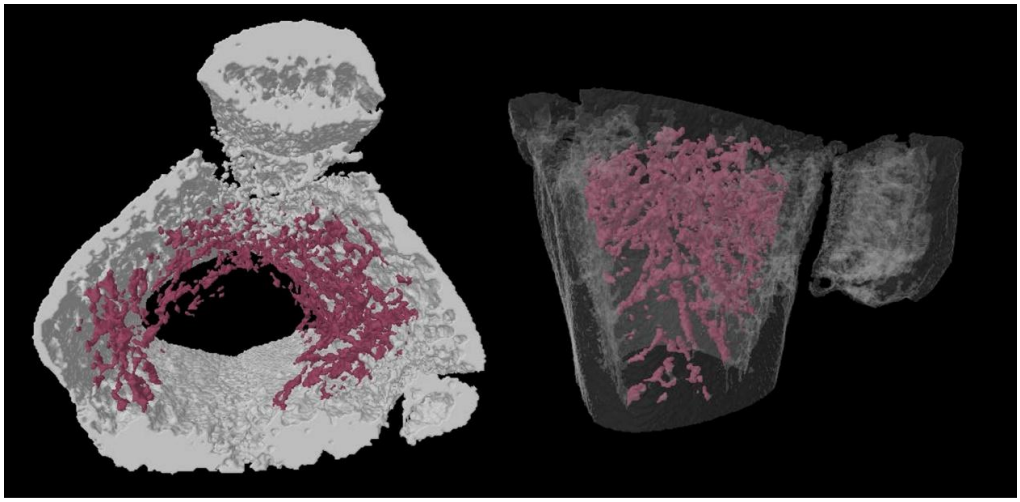


Figura 35. Fémur, hueso trabecular. Grupo II, Control OVX.

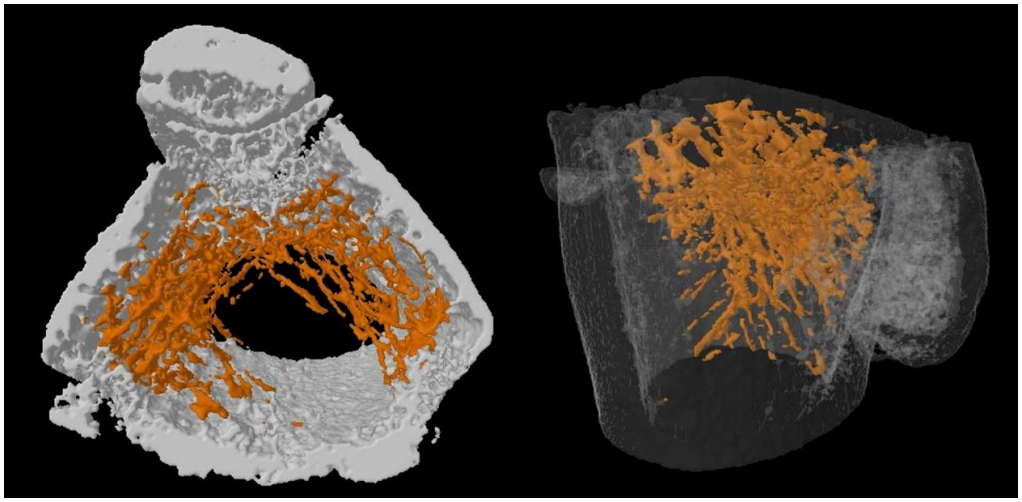


Figura 36. Fémur, hueso trabecular. Grupo III, EHL D1.

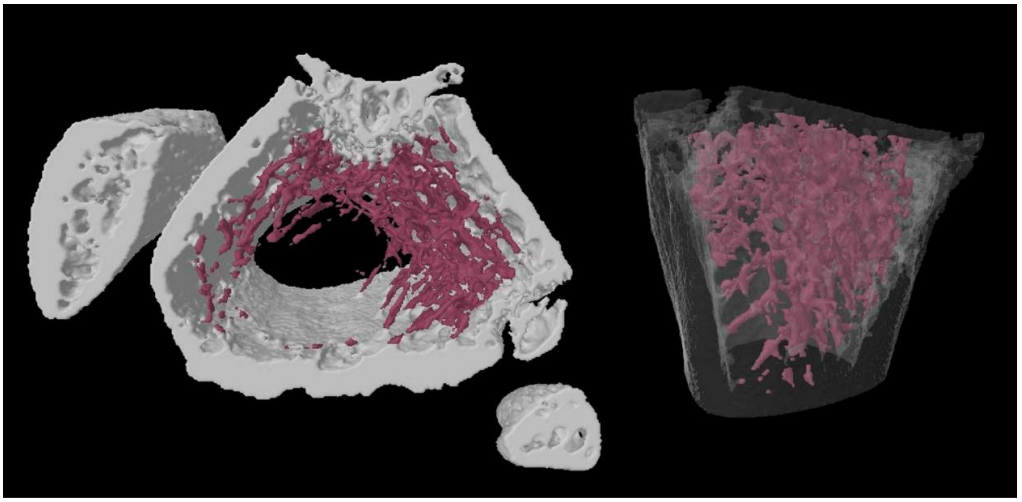
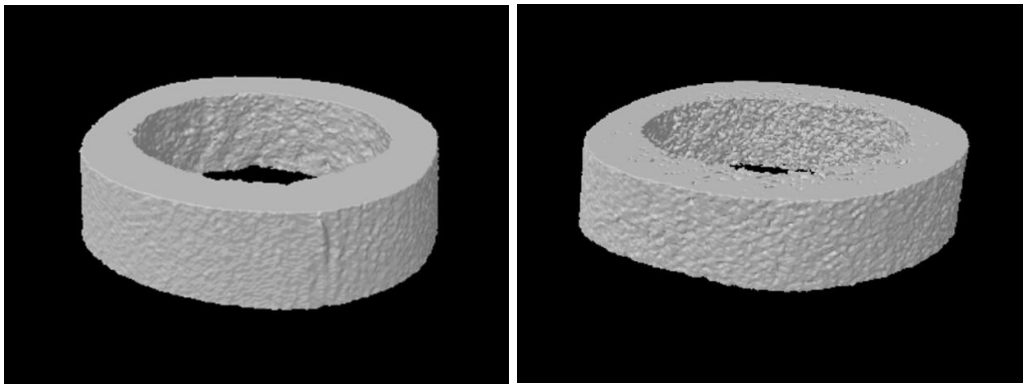
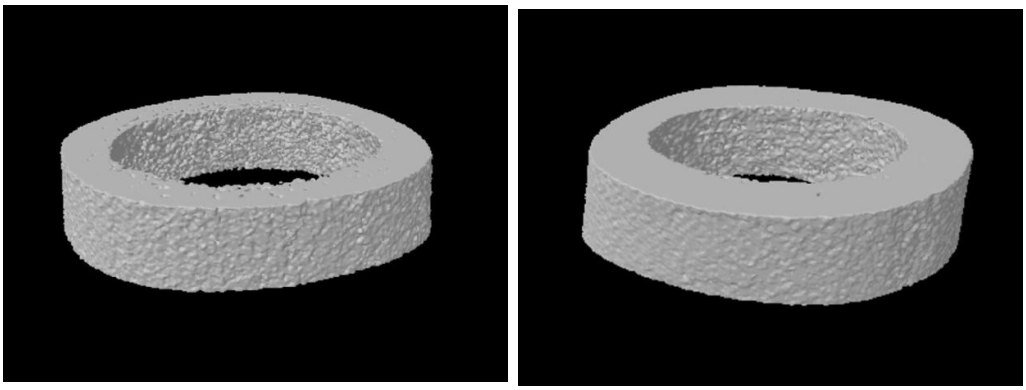


Figura 37. Fémur, hueso trabecular. Grupo IV, EHL D2.



Figuras 38 y 39. Fémur, hueso cortical.
Izquierda: Grupo I, Control.
Derecha: Grupo II, Control OVX.



Figuras 40 y 41. Fémur, hueso cortical.
Izquierda: Grupo III, EHL D1.
Derecha: Grupo IV EHL D2.

Estudio anatomopatológico óseo:

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 epifisiarias, 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 y el ensanchamiento de los canales de Havers. Dicha falta de conexión trabecular originaba en algunas zonas una imagen de aislamiento de las trabéculas individualizadas.

En los tratados con ambas dosis de EHL, se observó menor disminución de la masa ósea así como de desconexión entre las trabéculas que en el control OVX; siendo muy llamativo, el aumento del 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.

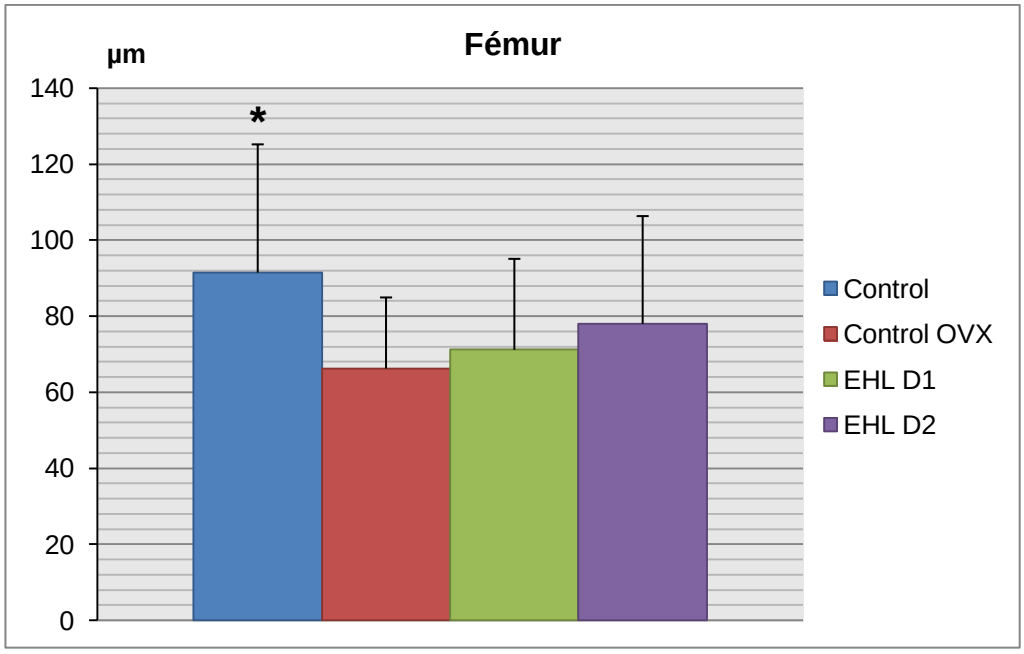
Las medidas histomorfométricas del grosor trabecular en fémur y tibia arrojaron los siguientes resultados expresados en µm.

	FÉMUR		TIBIA	
Grupos:	**Media**	**Desviación típica**	**Media**	**Desviación típica**
Control	91,55	33,72	72,40	22,50
Control OVX	66,28	18,71	47,27	8,89
EHL D1	71,21	23,94	73,58	22,97
EHL D2	78,05	28,35	64,49	15,17

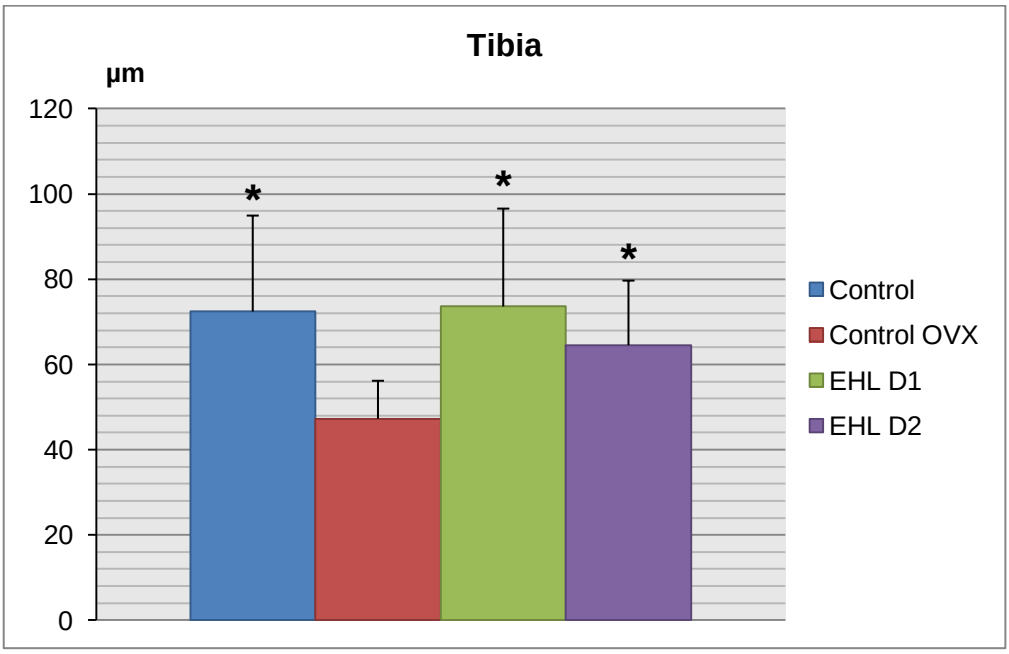
Tabla 27. Resultados estadísticos descriptivos.

Observamos que en el fémur, el grosor de las trabéculas era superior en el grupo Control sano con una media de 91,55±33,72 µm, frente a los 66,28±18,71 µm que obtuvo el grupo Control OVX. Con valores intermedios entre los grupos I y II están ambos grupos tratados, superando el EHL D2 con 78,05±28,35 µm a los 71,21±23,94 µm del grupo tratado con la dosis 1. Observamos diferencias estadísticamente significativa entre el grupo I y los grupos II y III ($P<0,035$).

Sin embargo, en la tibia fue la dosis baja de EHL (73,58±22,97 µm) la que mostró un grosor trabecular mayor, muy similar al observado en el grupo I (72,40±22,50 µm). El grupo EHL D2 presentaba un valor de 64,49±15,17 µm, que aunque inferior a los anteriores, era superior al Control OVX (47,27±8,89 µm). Los grupos II, III y IV fueron superiores al control OVX con diferencias estadísticamente significativa ($p<0,003$).



Gráfica 15. Media ±DE del grosor (µm) de las trabéculas en fémur. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX ($p<0,05$).



Gráfica 16. Media ±DE del grosor (µm) de las trabéculas en tibia. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX ($p<0,05$).

Medidas histomorfométricas fémur			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	25,264	0,005
	EHL D1	20,333	0,035
	EHL D2	13,503	0,097
Control OVX	Control	-25,264	0,005
	EHL D1	-4,930	0,566
	EHL D2	-11,760	0,090
EHL D1	Control	-20,333	0,035
	Control OVX	4,930	0,566
	EHL D2	-6,830	0,387
EHL D2	Control	-13,503	0,097
	Control OVX	11,760	0,090
	EHL D1	6,830	0,387
Medidas histomorfométricas tibia			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	25,138	0,000
	EHL D1	-1,172	0,843
	EHL D2	7,917	0,161
Control OVX	Control	-25,138	0,000
	EHL D1	-26,310	0,000
	EHL D2	-17,220	0,003
EHL D1	Control	1,172	0,843
	Control OVX	26,310	0,000
	EHL D2	9,090	0,069
EHL D2	Control	-7,917	0,161
	Control OVX	17,220	0,003
	EHL D1	-9,090	0,069

Tabla 28. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Grupo I, Control:

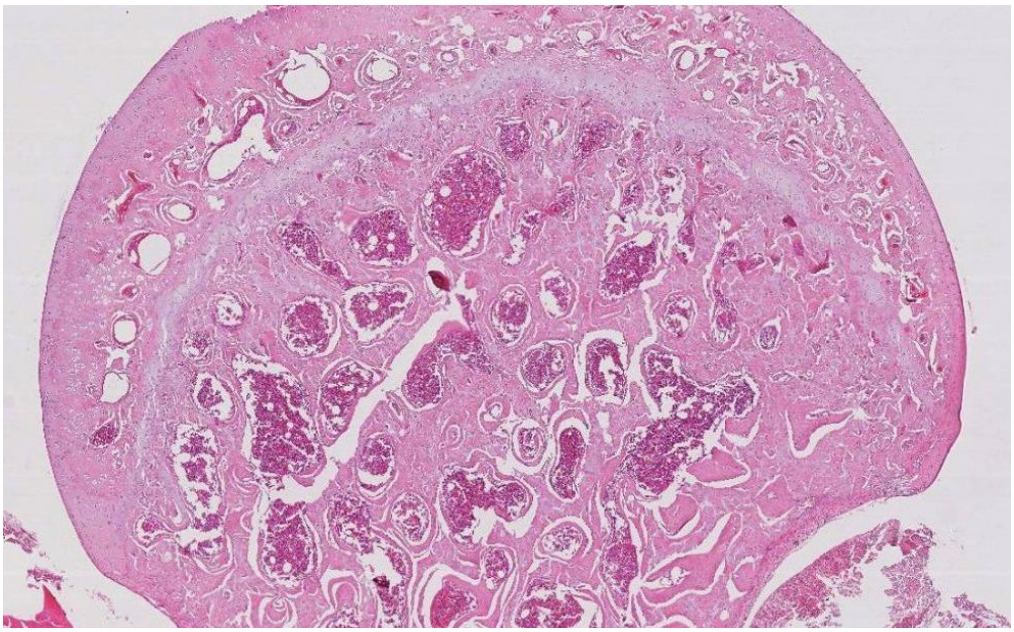


Figura 42. Sección histológica: fémur, grupo I (Control). Hematoxilina-eosina. 2,27x

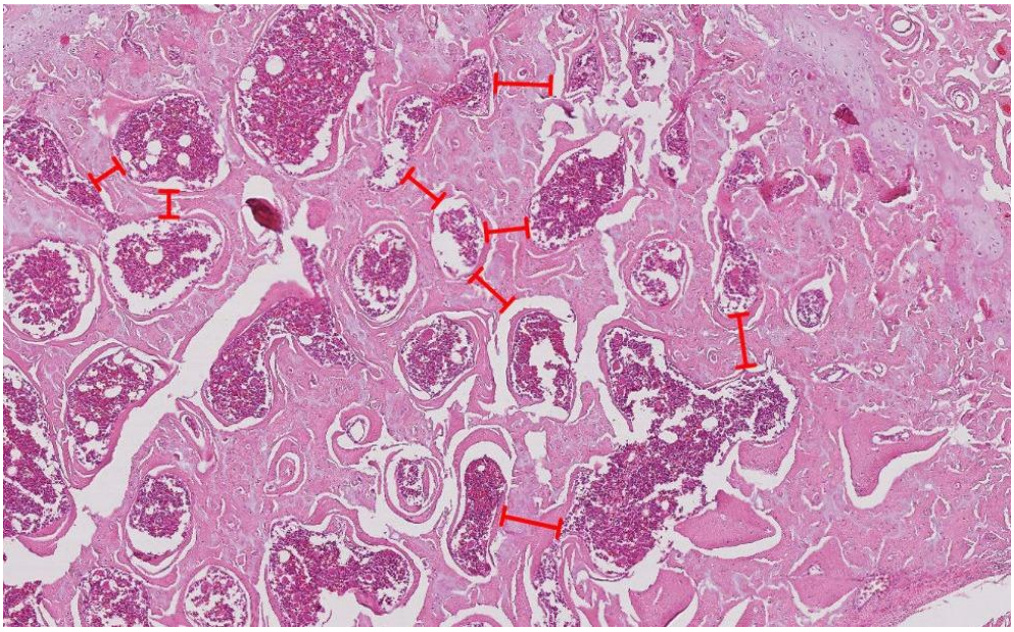


Figura 43. Detalle de la anterior H.E. 10x

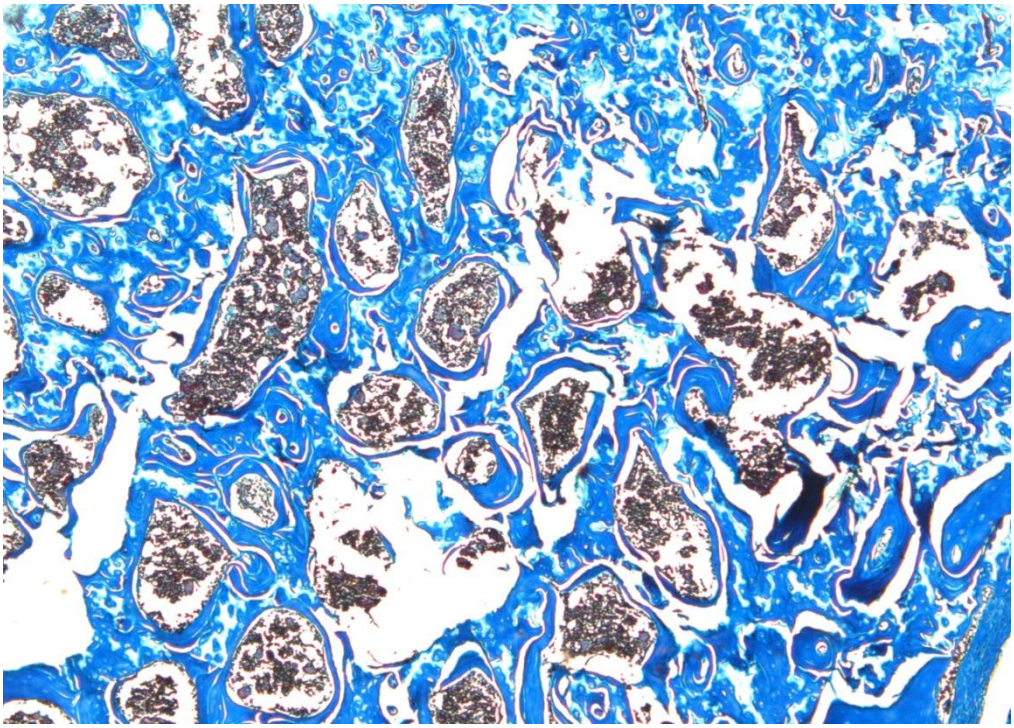


Figura 44. Sección histológica. Fémur, grupo I (control). Tricrómico de Masson. 5x

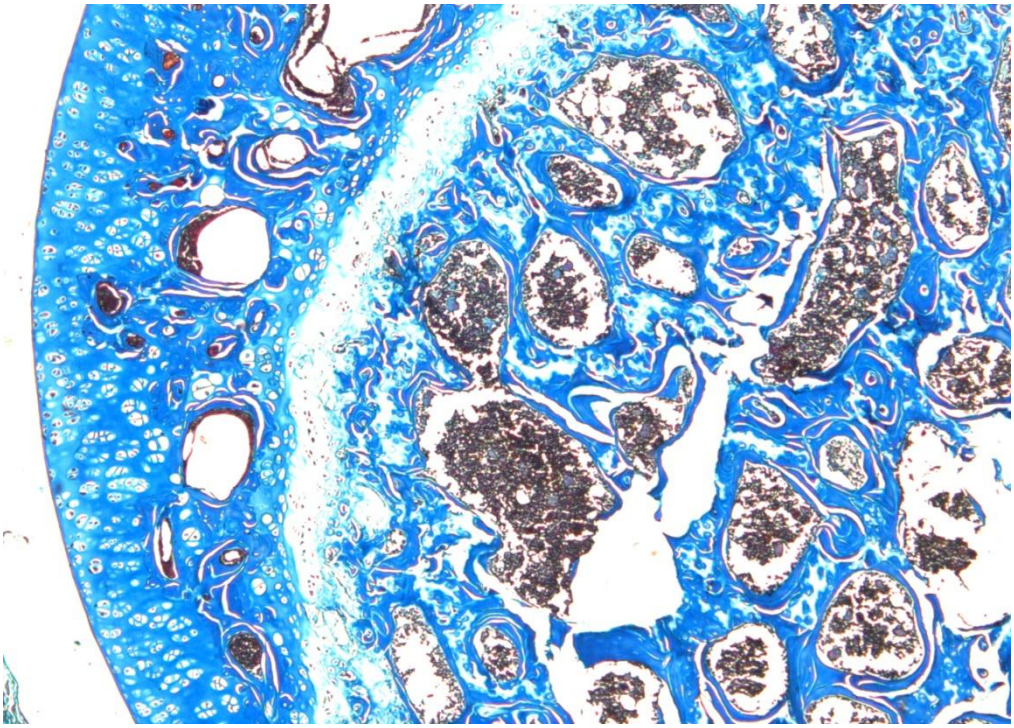


Figura 45. Sección histológica. Fémur, grupo I (control). T.M. 5x

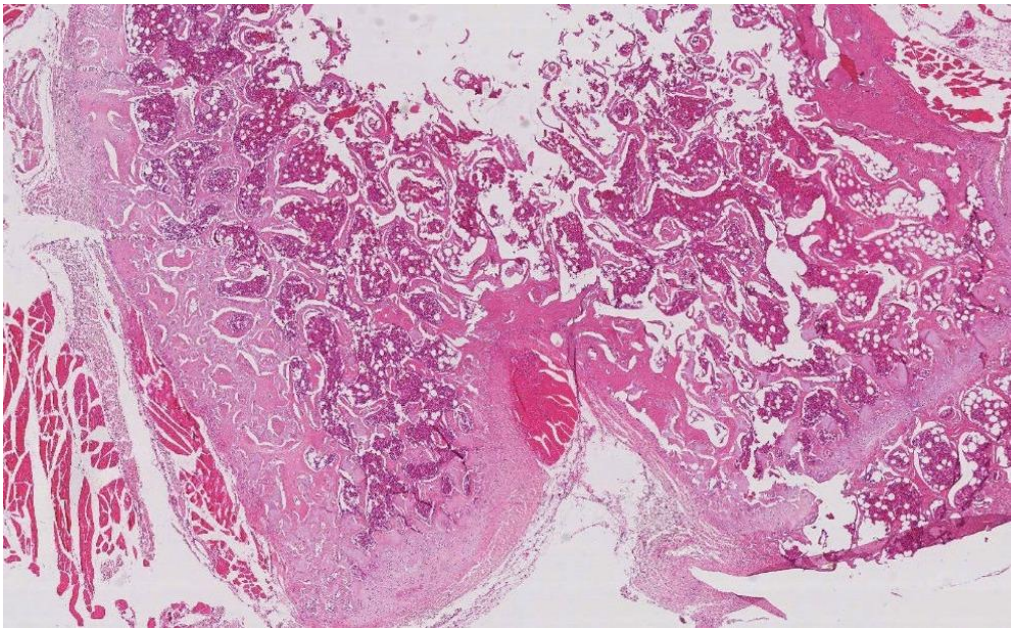


Figura 46. Sección histológica: tibia, grupo I (Control). Hematoxilina-eosina. 1,53x

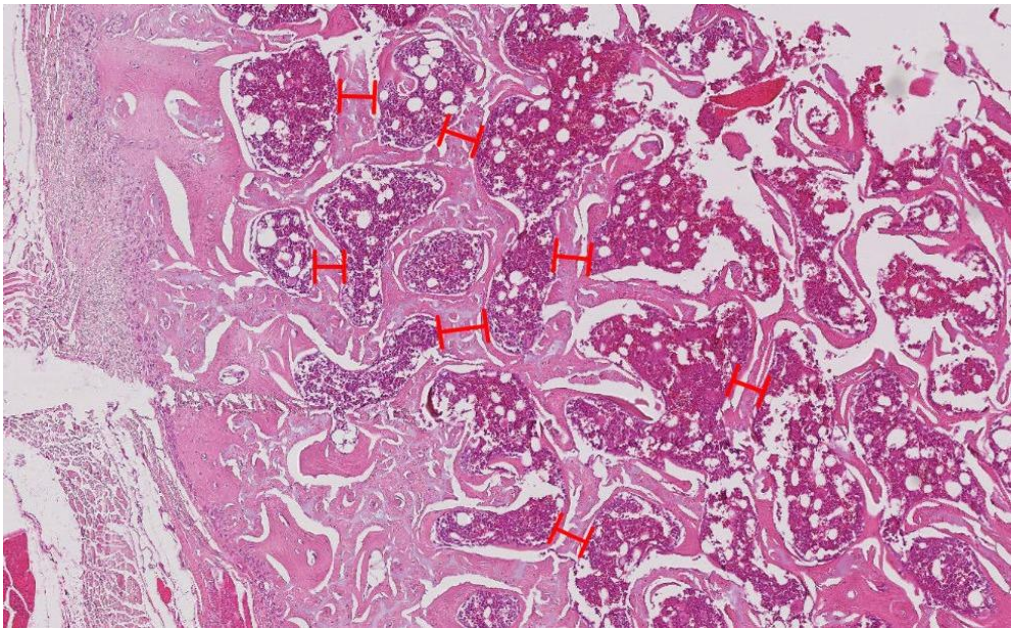


Figura 47. Detalle de la anterior H.E. 3,75x

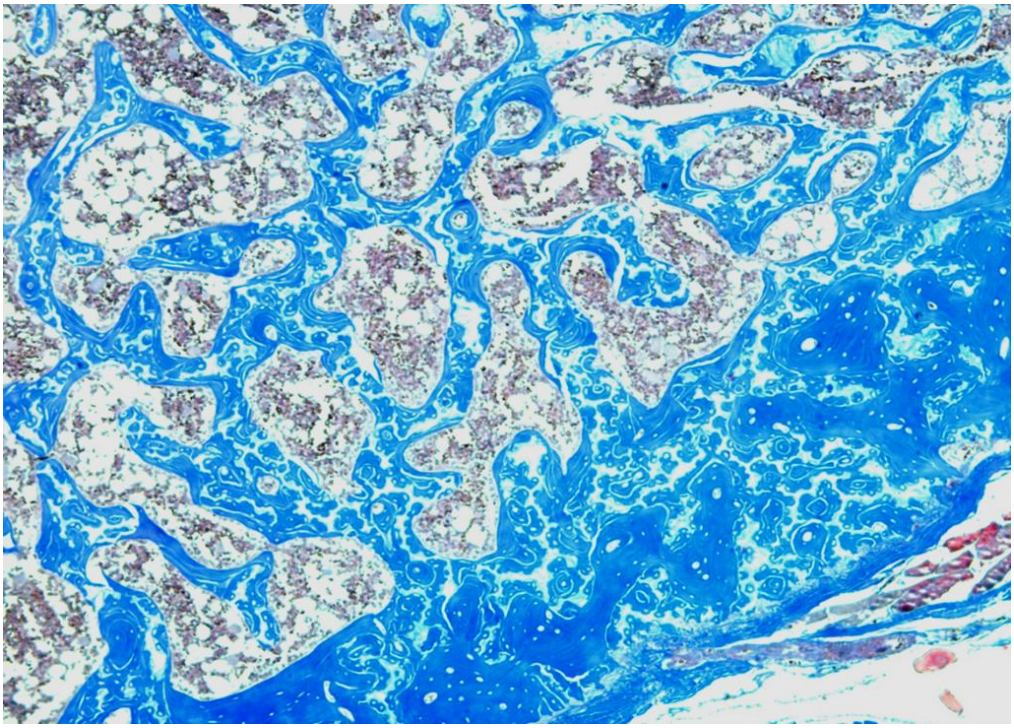


Figura 48. Sección histológica: tibia, grupo I (Control). Tricrómico de Masson. 5x

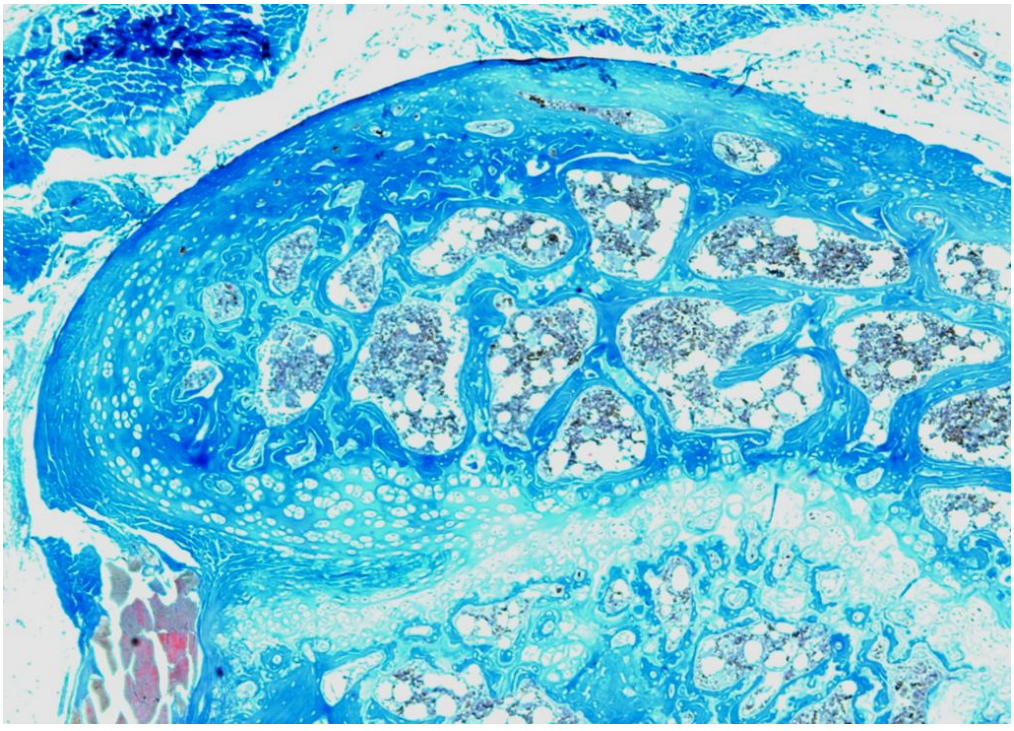


Figura 49. Sección histológica. Tibia, grupo I (control). T.M. 5x

Grupo II, Control OVX:

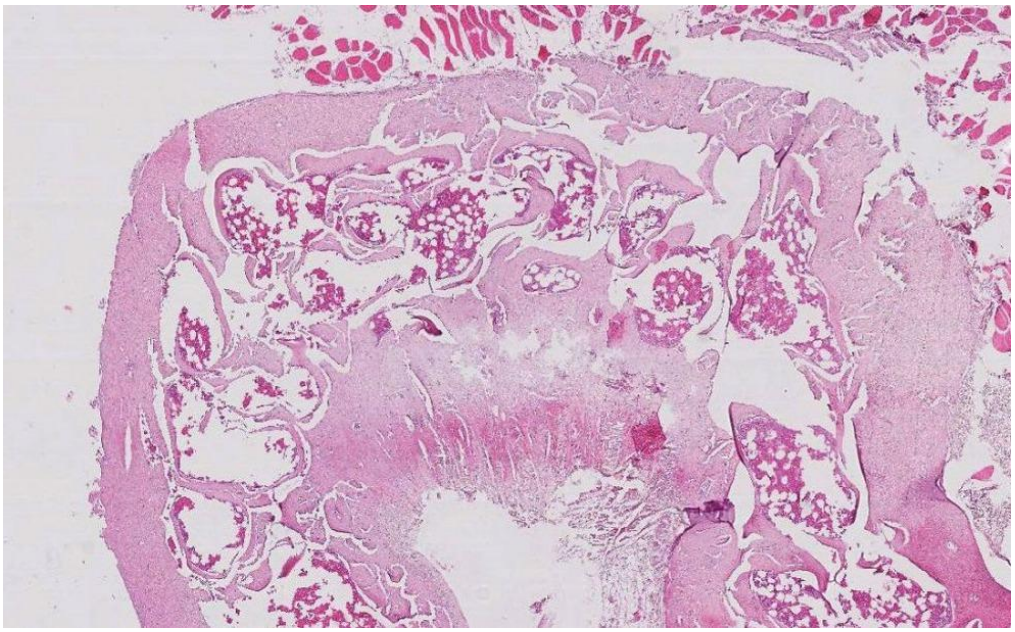


Figura 50. Sección histológica: fémur, grupo II (Control OVX). Hematoxilina-eosina. 2,27x

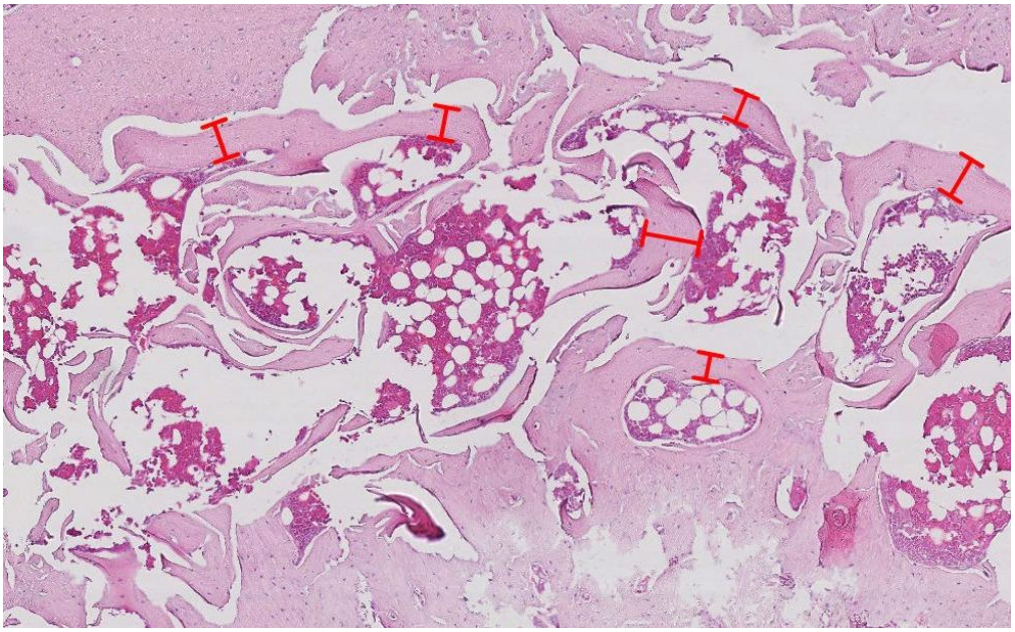
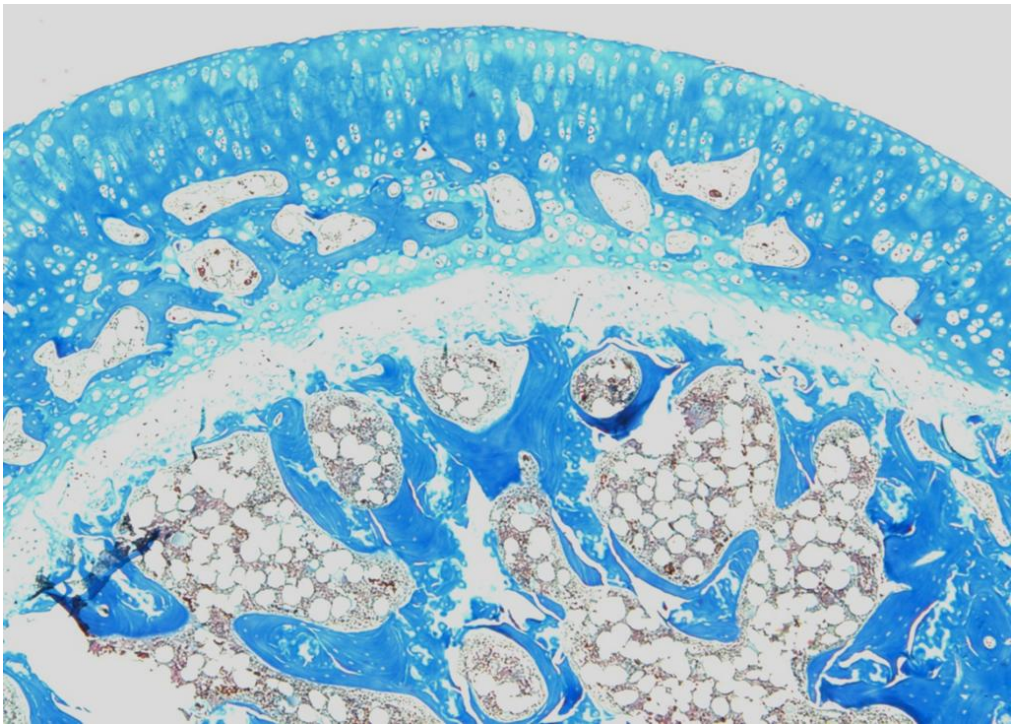
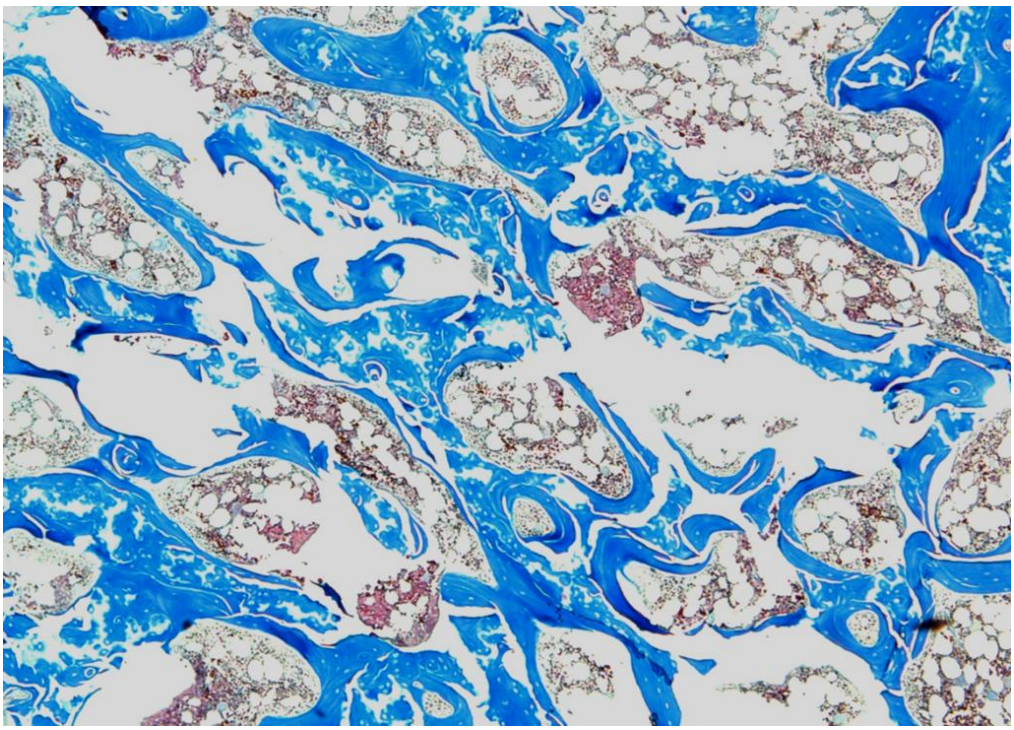


Figura 51. Detalle de la anterior H.E. 10x





Figuras 52 y 53. Secciones histológicas. Fémur, grupo II (control OVX). T.M. 5x

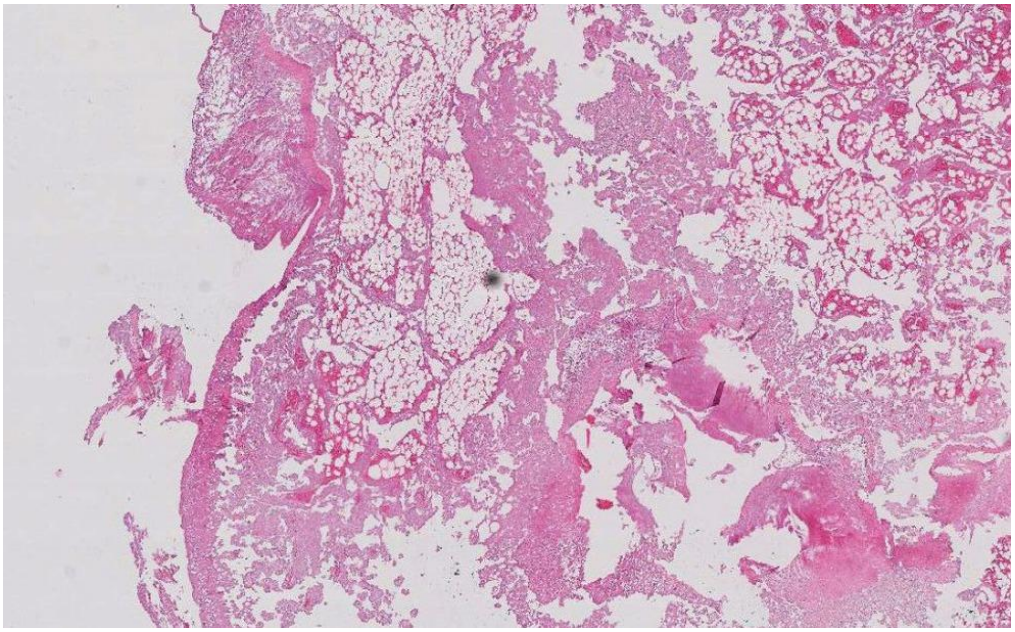


Figura 54. Sección histológica: tibia, grupo II (Control OVX). Hematoxilina-eosina. 2,27x

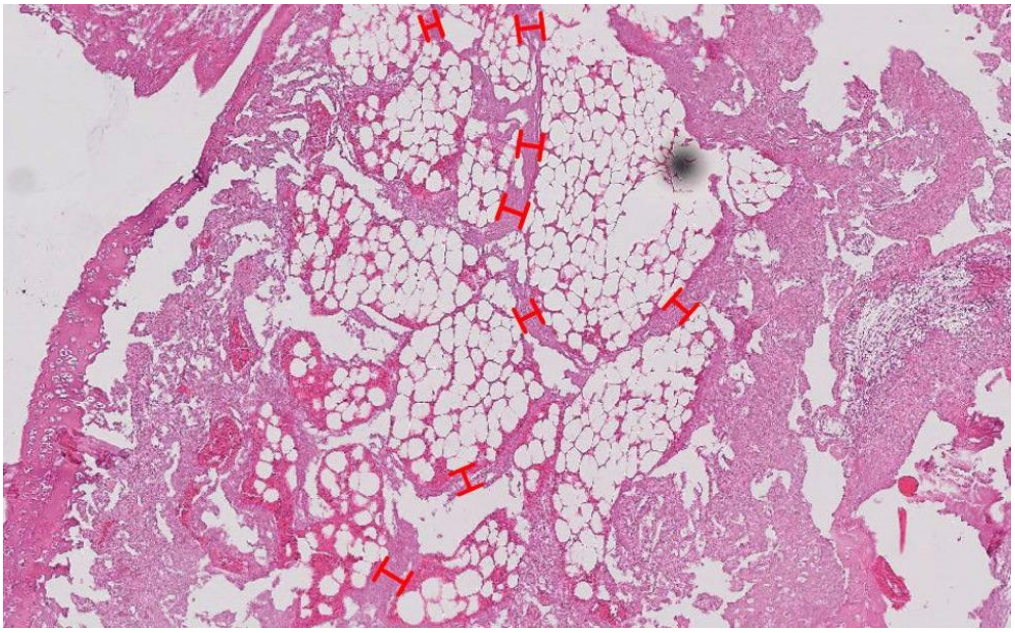
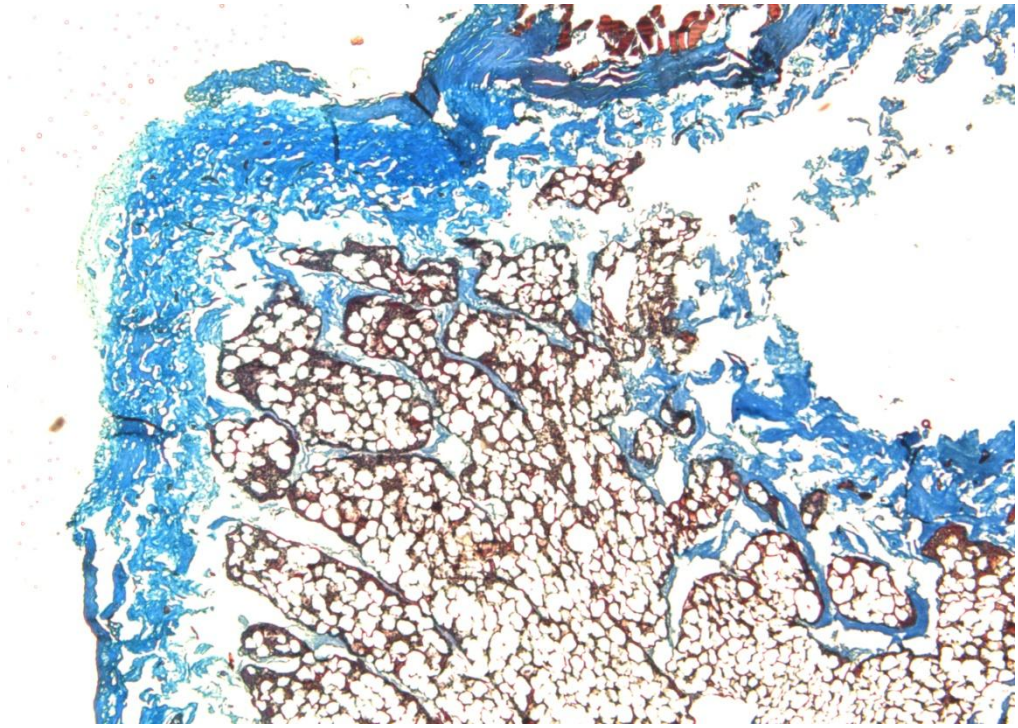
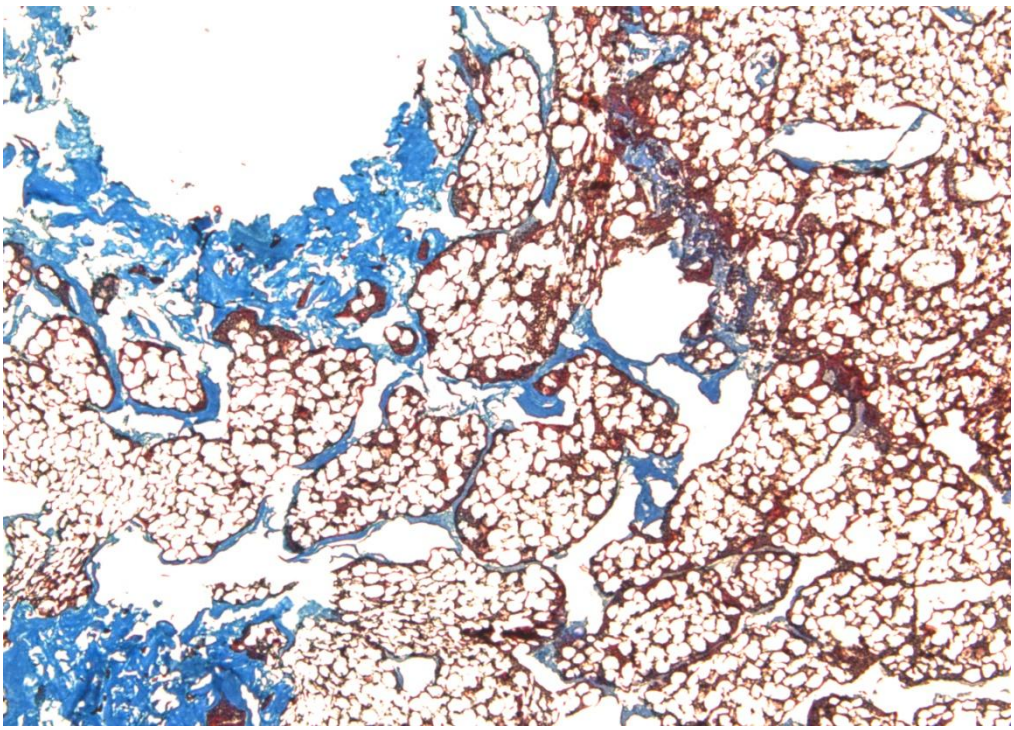


Figura 55. Detalle de la anterior H.E. 10x





Figuras 56 y 57. Secciones histológicas: tibia, grupo II (control OVX). T.M. 5x

Grupo III, EHL D1:

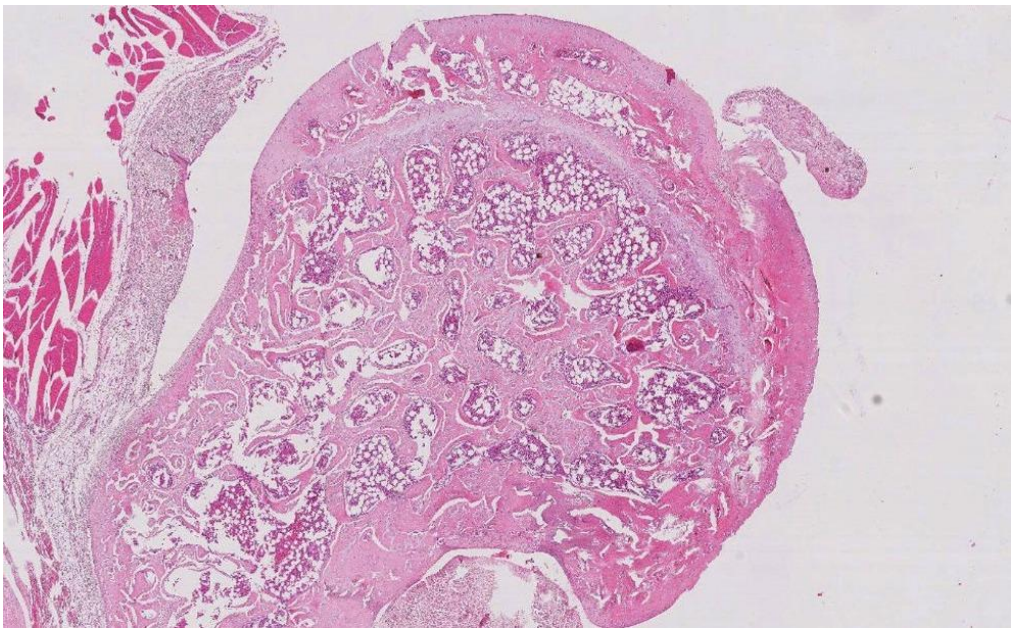
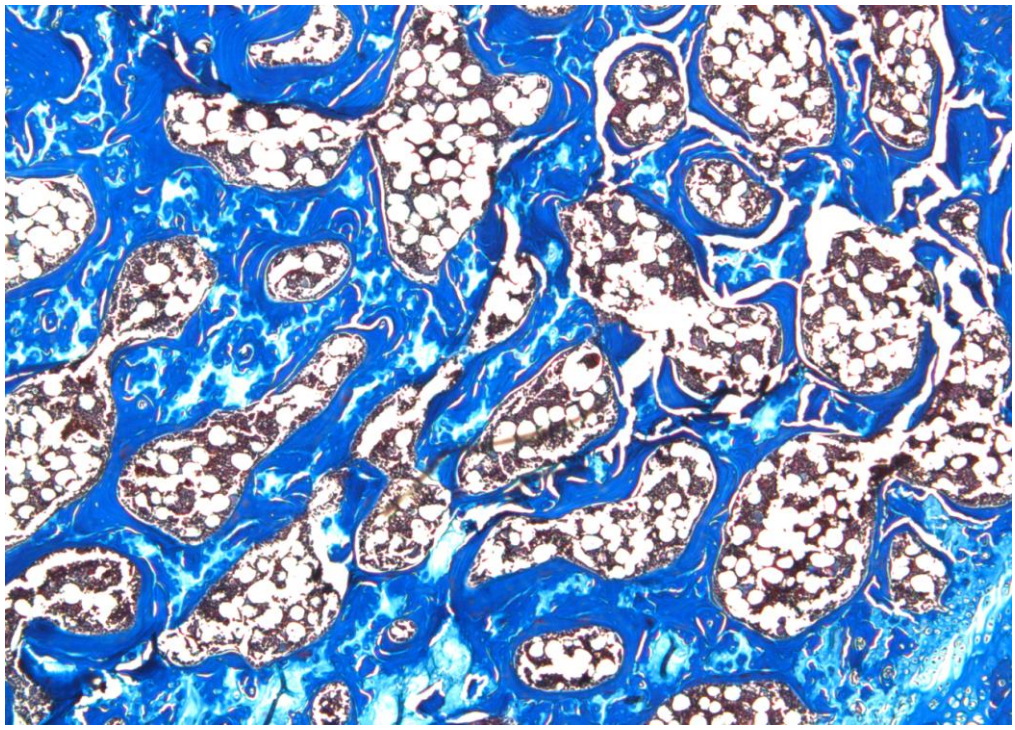
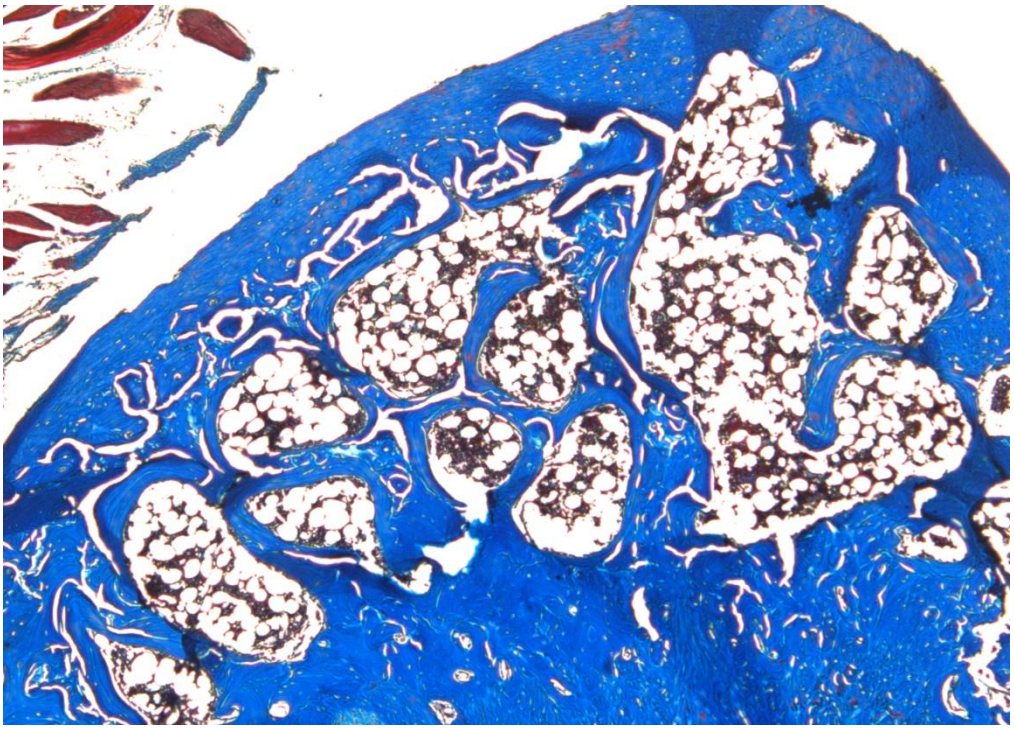


Figura 58. Sección histológica: fémur, grupo III (EHL D1). Hematoxilina-eosina. 1,53x

Figura 59. Detalle de la anterior H.E. 10x





Figuras 60 y 61. Secciones histológicas: fémur, grupo III (EHL D1). T.M. 5x

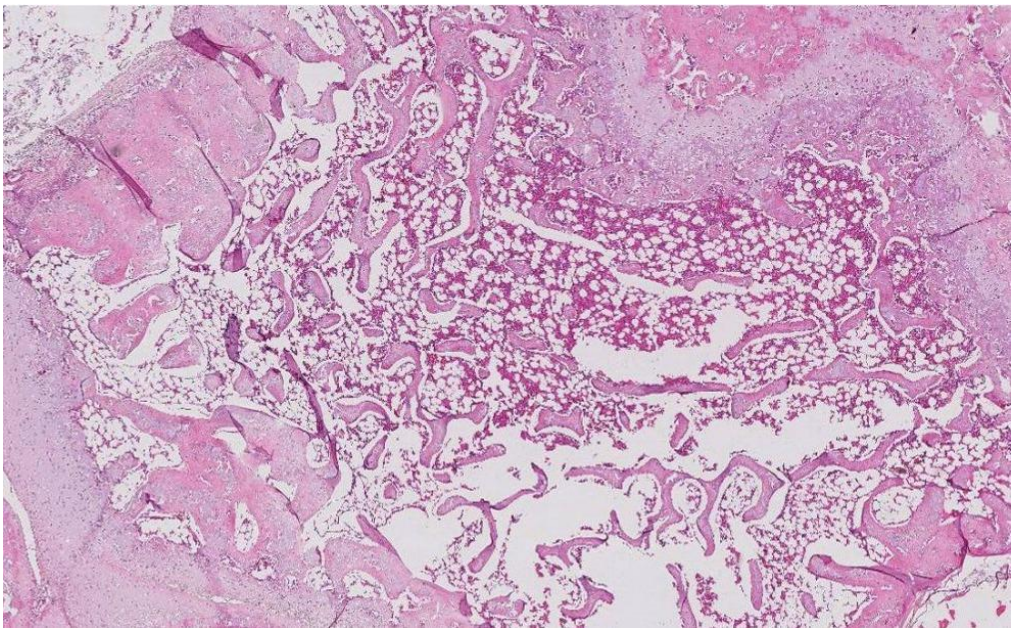


Figura 62. Sección histológica: tibia, grupo III (EHL D1). Hematoxilina-eosina. 2,27x

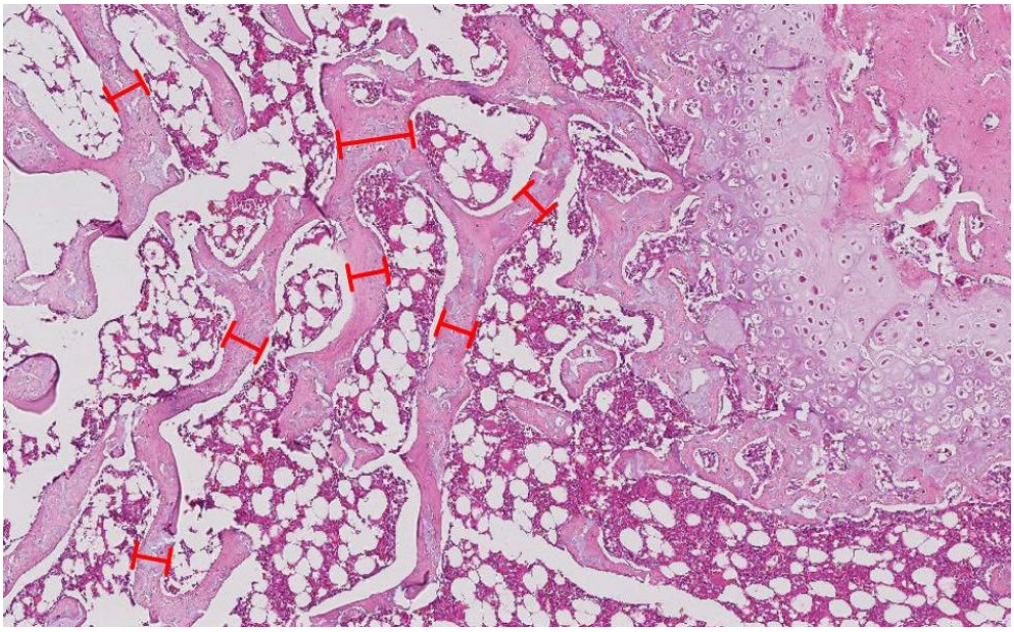
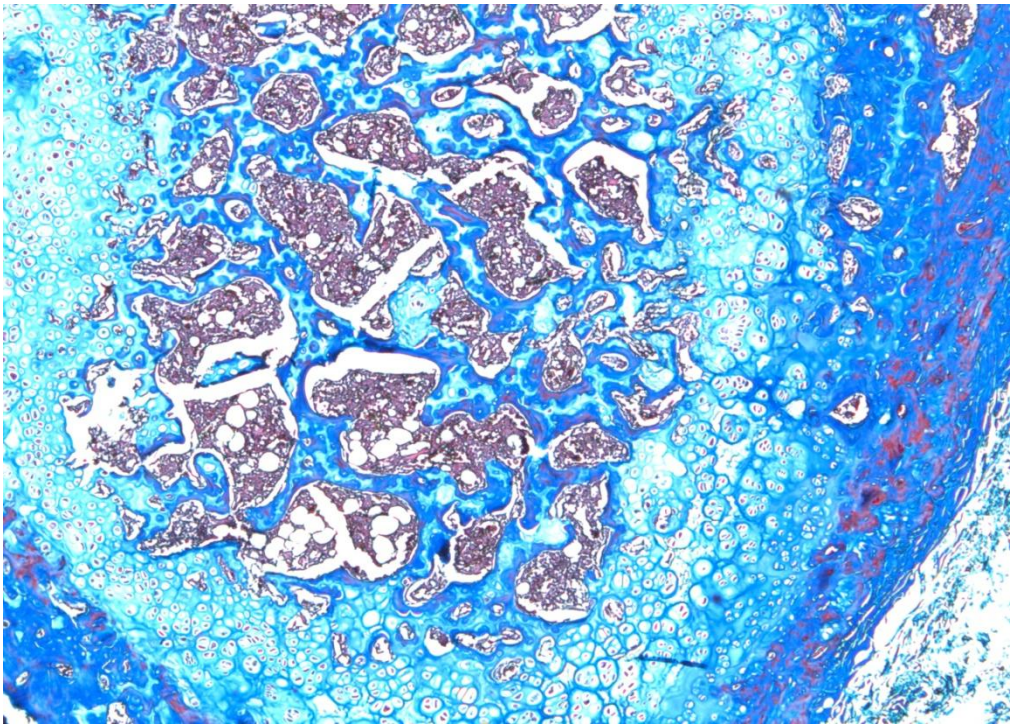
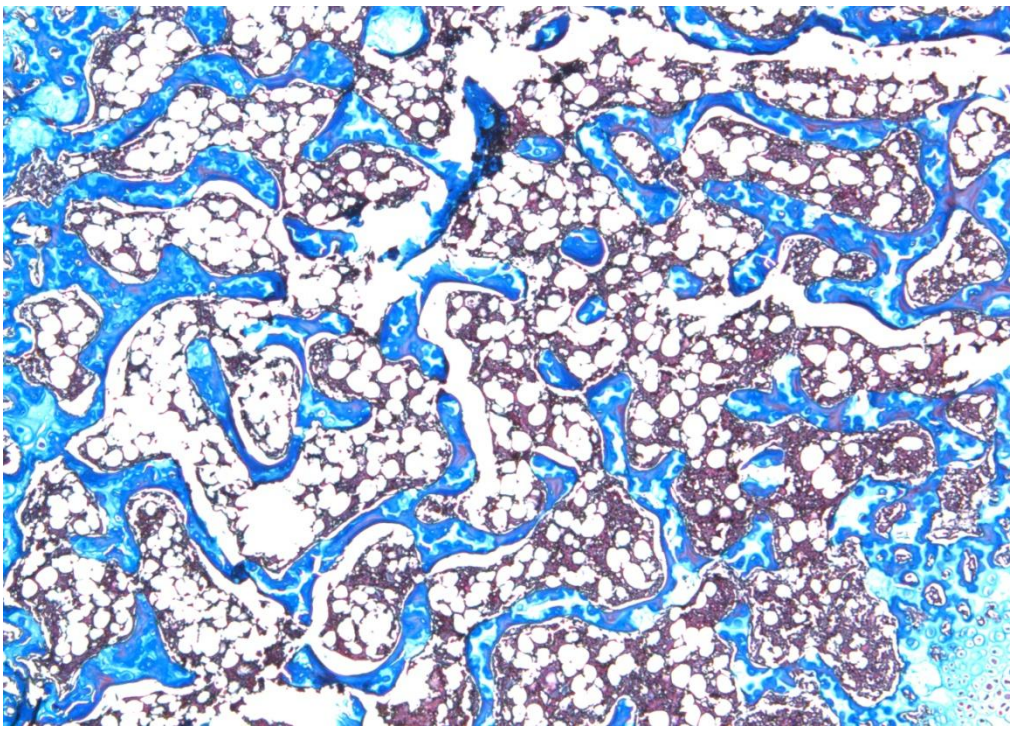


Figura 63. Detalle de la anterior H.E. 10x





Figuras 64 y 65. Secciones histológicas: tibia, grupo III (EHL D1). T.M. 5x

Grupo IV, EHL D2:

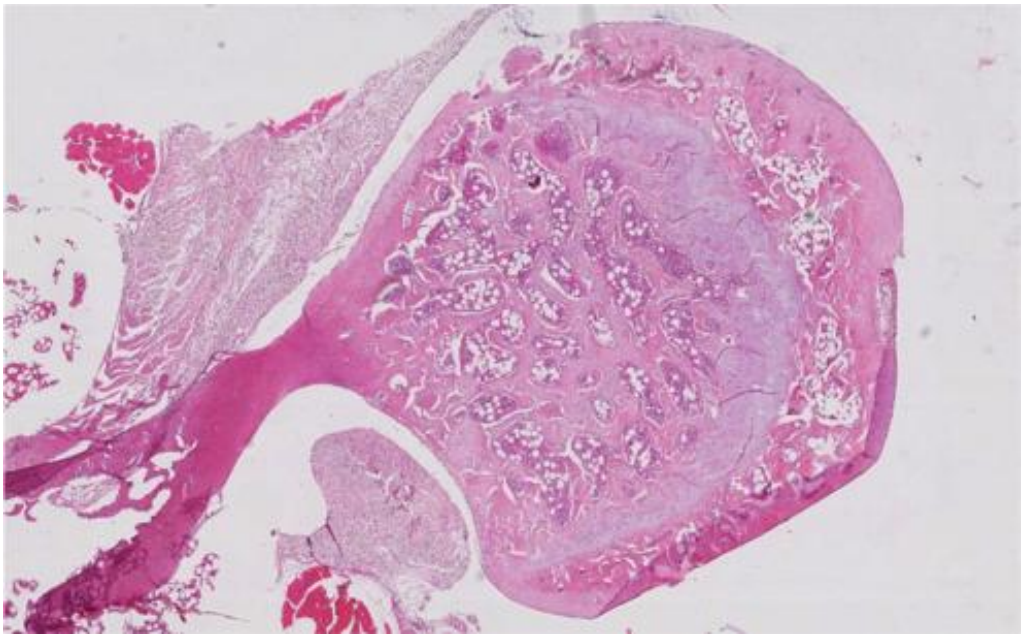


Figura 66. Sección histológica: fémur, grupo IV (EHL D2). Hematoxilina-eosina. 1,53x

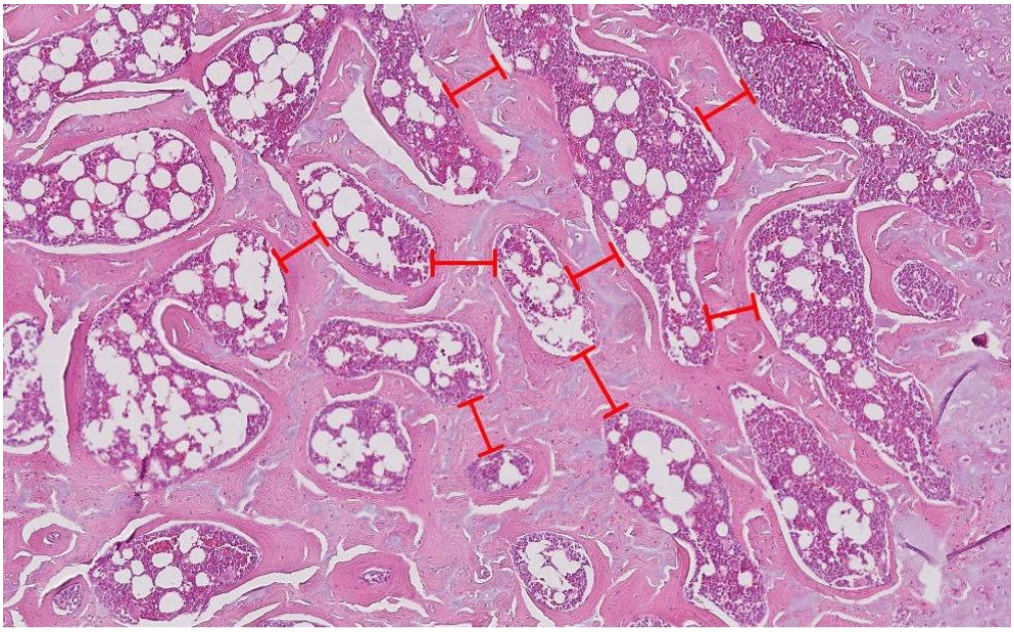
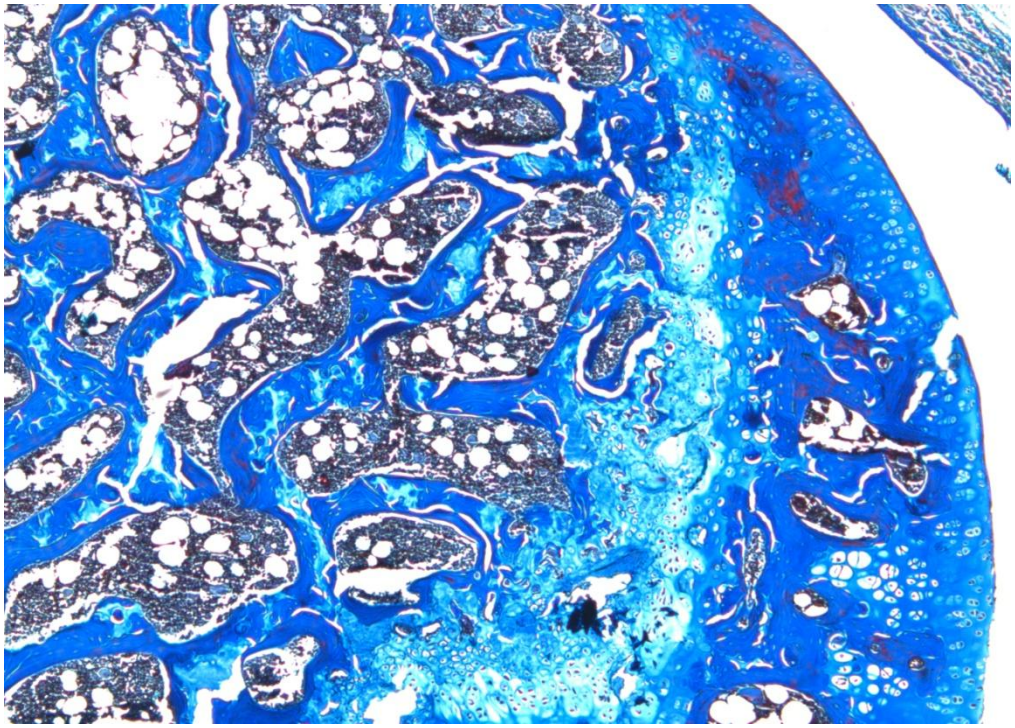
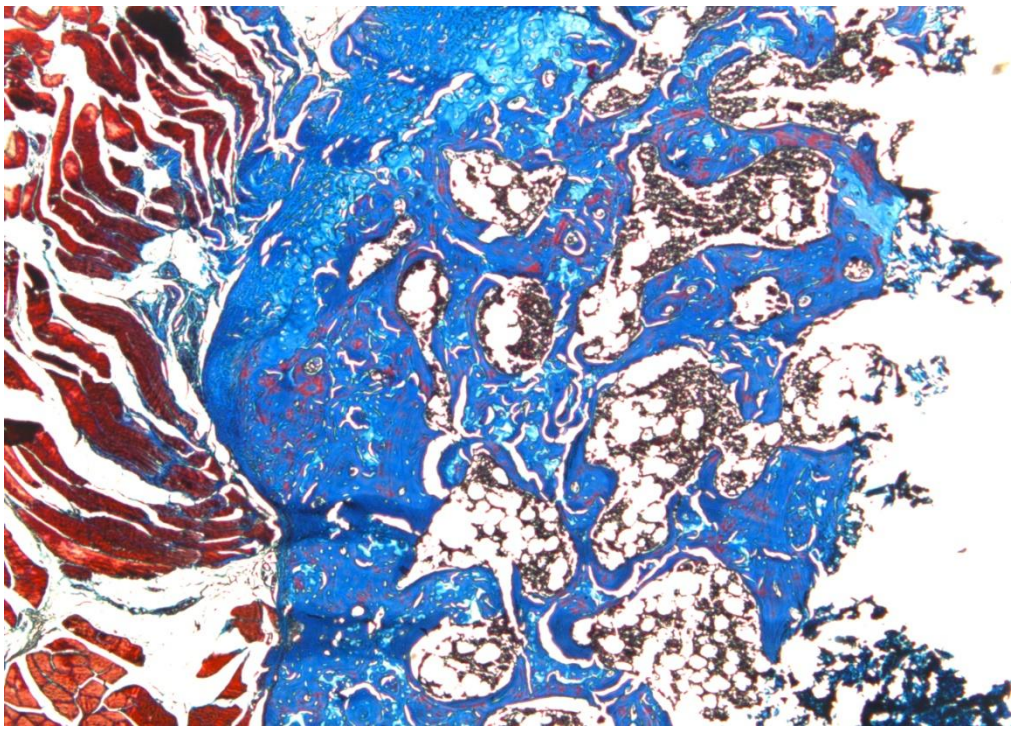


Figura 67. Detalle de la anterior H.E. 10x





Figuras 68 y 69. Secciones histológicas: fémur, grupo IV (EHL D2). T.M. 5x

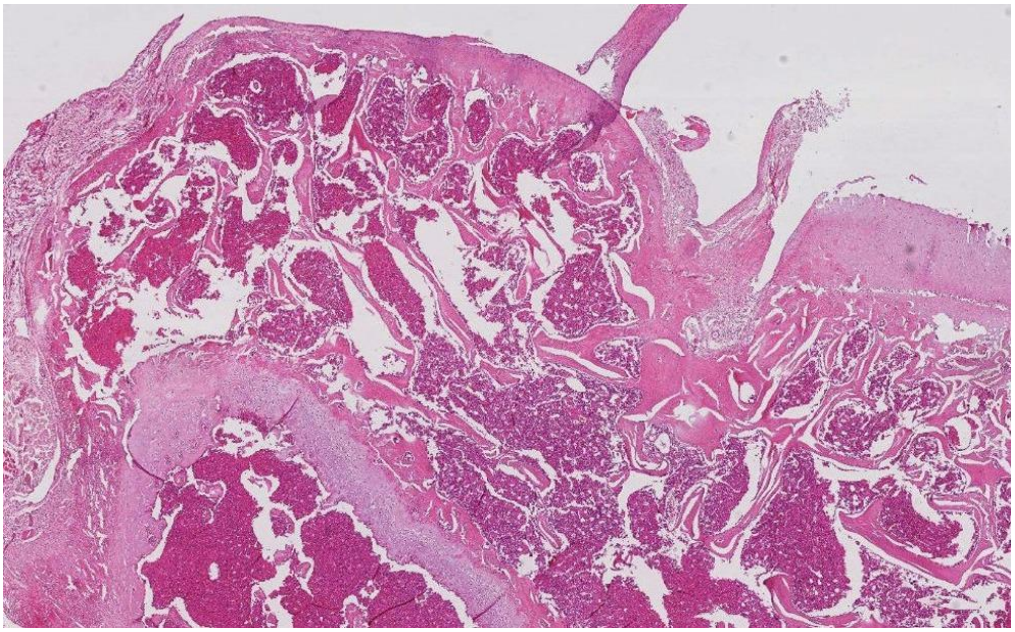


Figura 70. Sección histológica: tibia, grupo IV (EHL D2). Hematoxilina-eosina. 1,53x

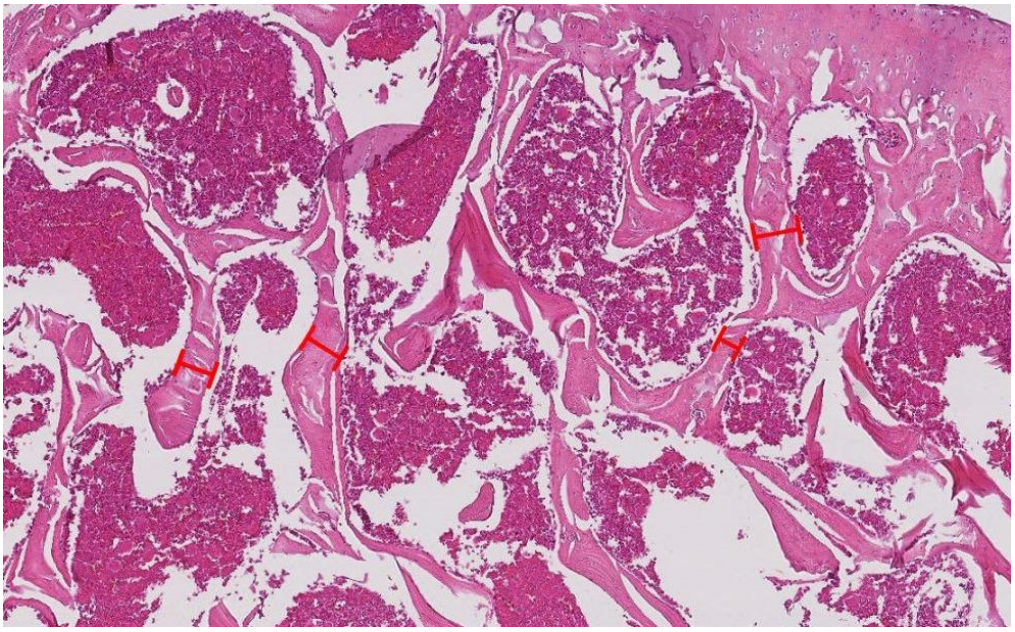
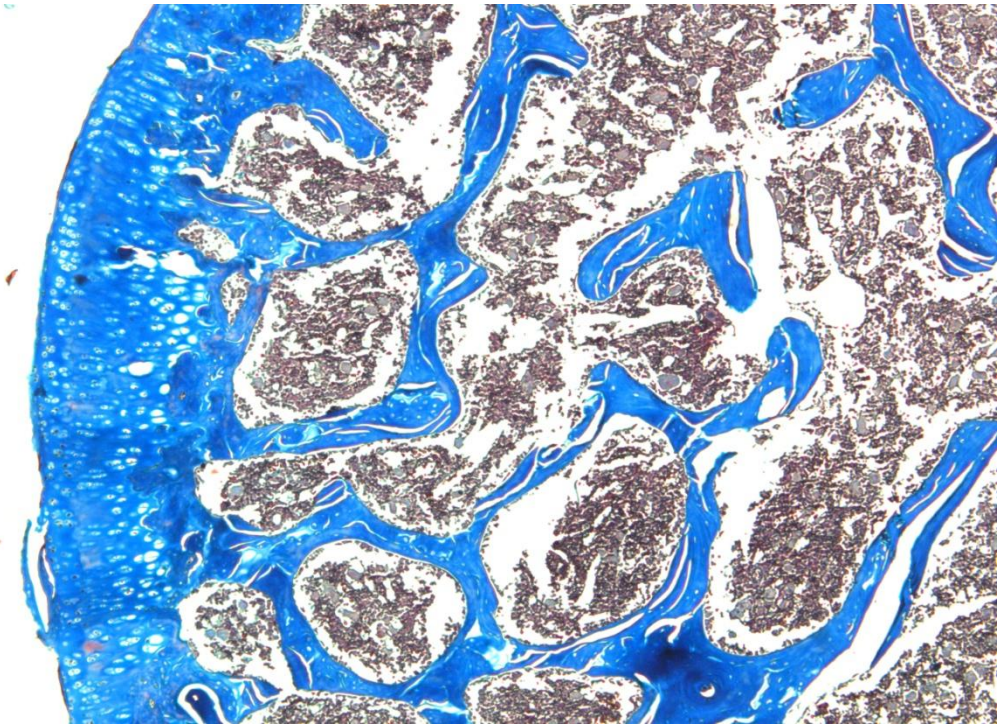
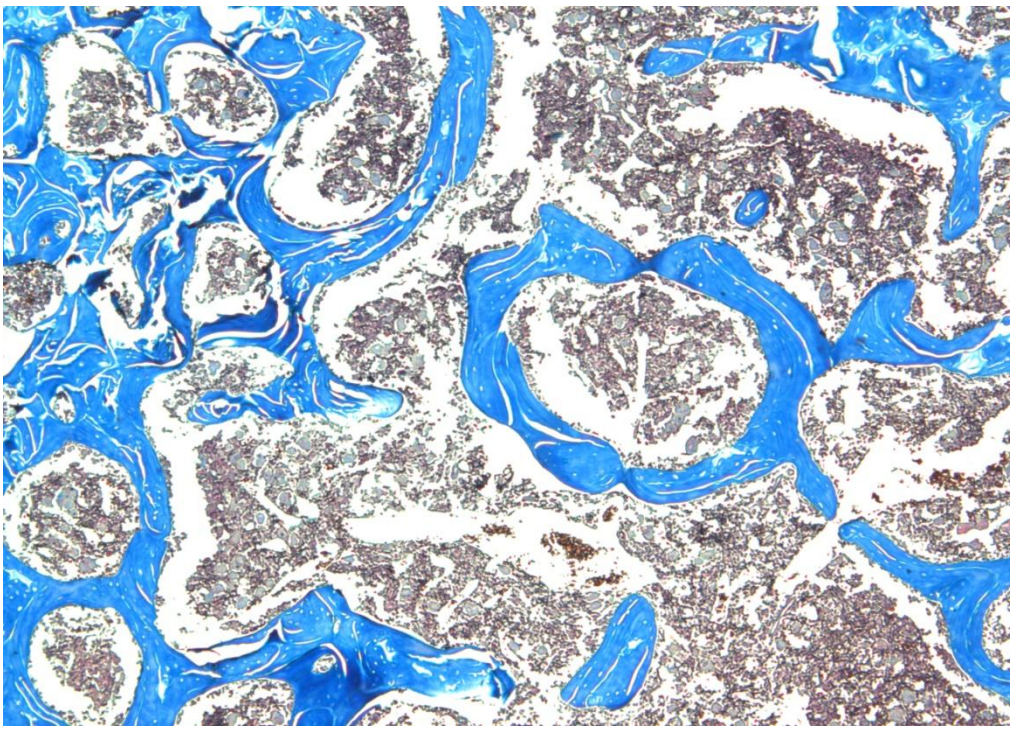


Figura 71. Detalle de la anterior H.E. 4,49x





Figuras 72 y 73. Sección histológica: tibia, grupo IV (EHL D2). T.M. 5x

Estudio ionómico óseo

En este estudio se detallan los elementos químicos que forman parte de la matriz ósea y que por tanto, tienen relación con la osteoporosis. Son: el calcio (Ca), el fósforo (P), el boro (B), el magnesio (Mg) y el zinc (Zn).

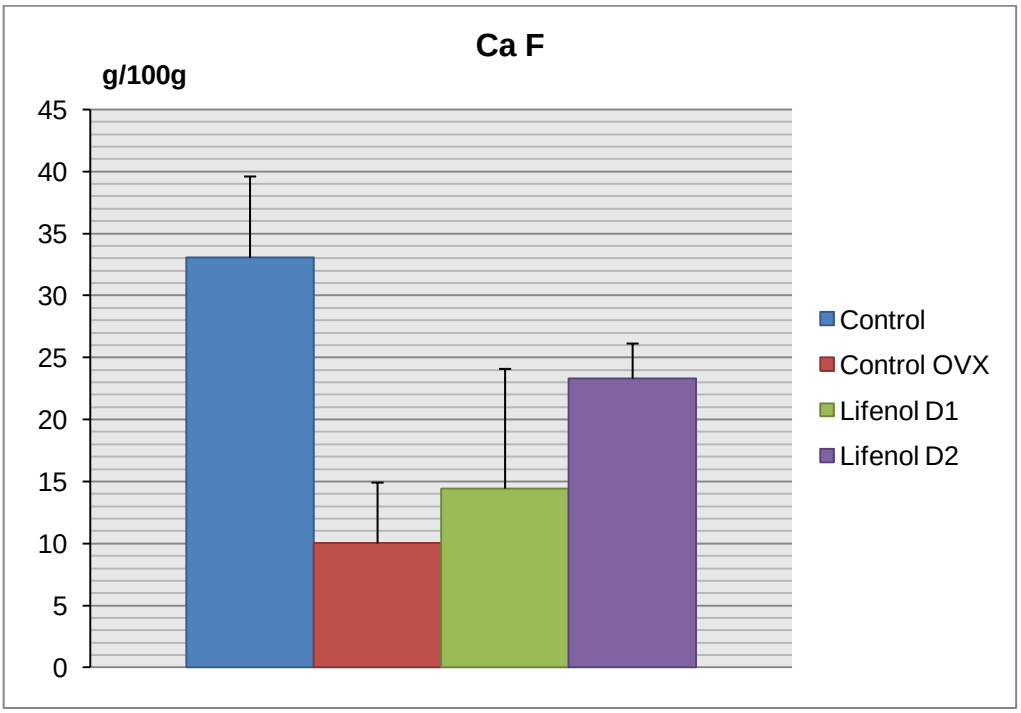
1. Calcio:

MEDIA Calcio		
Grupo:	**Fémur**	**Tibia**
Control	33,05	28,79
Control OVX	10,03	10,52
EHL D1	14,45	12,55
EHL D2	23,32	20,23
Desviación típica Calcio		
Grupo:	**Fémur**	**Tibia**
Control	6,56	2,42
Control OVX	4,90	3,70
EHL D1	9,65	9,30
EHL D2	2,82	3,69

Tabla 29. Media del calcio (g/100g) y desviación típica clasificado por hueso.

Fémur:

En el fémur encontramos que el valor medio de calcio más alto correspondía al grupo I: 33,05±6,56 g/100g, seguido del grupo IV con 23,32±2,82 g/100g y con los dos valores más bajos encontramos el grupo III con 14,45±9,65 g/100g y el grupo II con 10,03±4,90 g/100g. No existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.



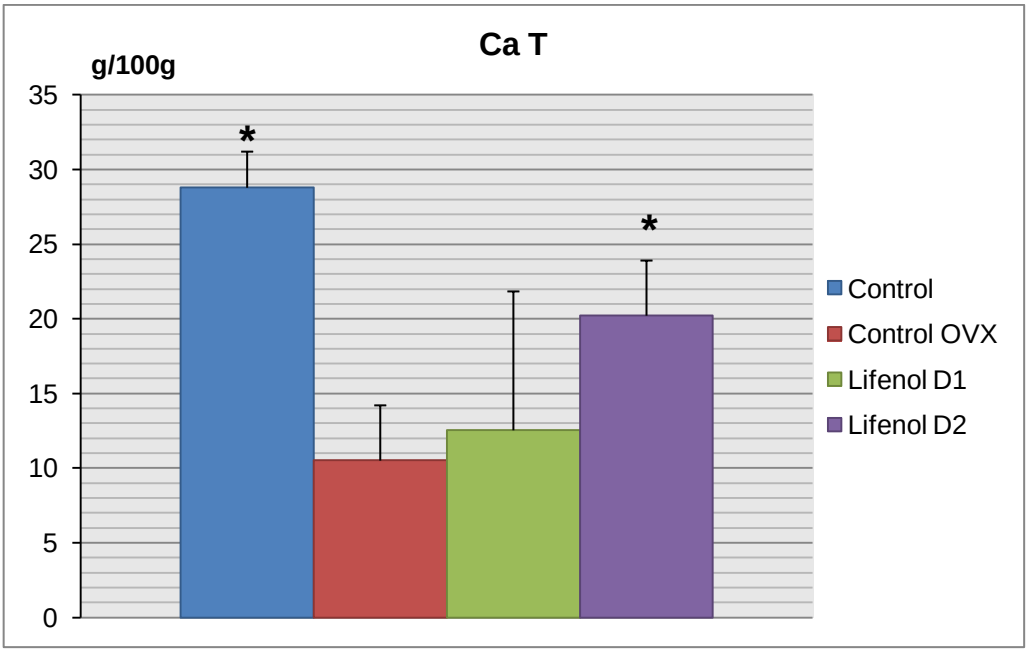
Gráfica 17. Representación de la media ±DE de calcio en fémur por grupos.

Calcio Fémur			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	33,0506	0,196
	EHL D1	10,025	0,295
	EHL D2	14,446	0,605
Control OVX	Control	23,320	0,196
	EHL D1	12,412	0,807
	EHL D2	33,050	0,489
EHL D1	Control	10,025	0,295
	Control OVX	14,446	0,807
	EHL D2	23,320	0,644
EHL D2	Control	12,412	0,605
	Control OVX	33,050	0,489
	EHL D1	10,025	0,644

Tabla 30. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Tibia:

El valor medio más alto lo encontramos en las tibias del grupo Control, con 28,79±2,42 g/100g. Entre los grupos tratados existía una diferencia importante, ya que el EHL D2 tenía 20,23±3,69 g/100g frente a los 12,55±9,30 g/100g del EHL D1. Por último, el grupo Control OVX obtuvo el valor más bajo: 10,52±3,70 g/100g. Existían diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre los grupos Control y EHL D2 con los demás grupos.



Gráfica 18. Representación de la media ±DE de calcio en tibia por grupos. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX (p<0,05).

Calcio Tibia			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	28,791	0,000
	EHL D1	10,519	0,000
	EHL D2	12,550	0,003
Control OVX	Control	20,226	0,000
	EHL D1	12,736	0,442
	EHL D2	28,791	0,001
EHL D1	Control	10,519	0,000
	Control OVX	12,550	0,442
	EHL D2	20,226	0,008
EHL D2	Control	12,736	0,003
	Control OVX	28,791	0,001
	EHL D1	10,519	0,008

Tabla 31. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

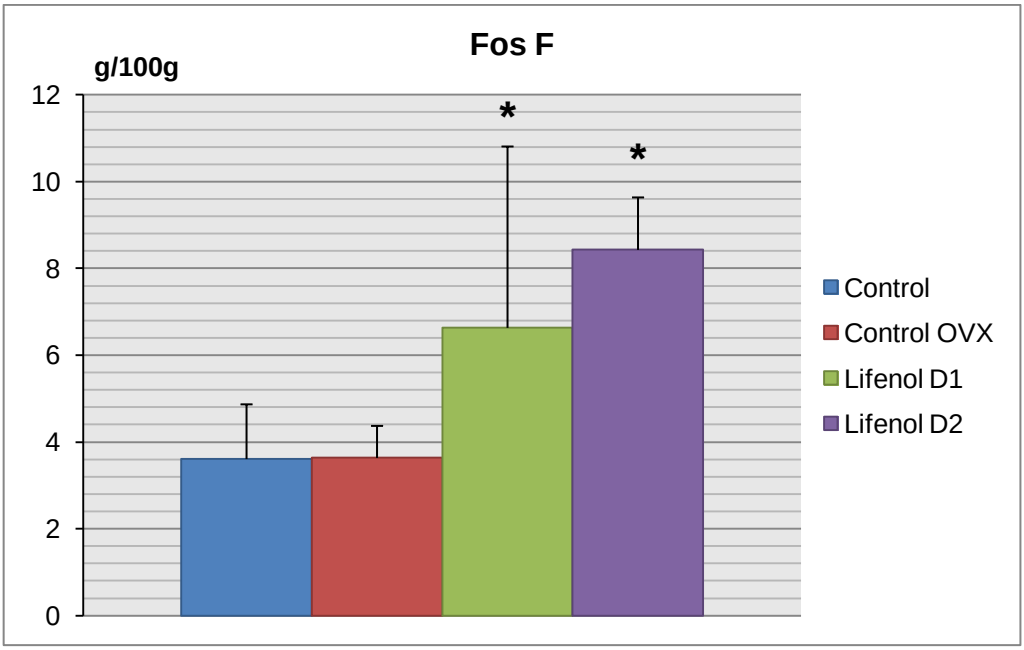
2. Fósforo:

MEDIA Fósforo		
Grupo:	**Fémur**	**Tibia**
Control	3,61	3,83
Control OVX	3,64	4,44
EHL D1	6,63	6,92
EHL D2	8,43	7,26
Desviación típica Fósforo		
Grupo:	**Fémur**	**Tibia**
Control	1,26	0,83
Control OVX	0,74	1,26
EHL D1	4,18	3,69
EHL D2	1,21	1,14

Tabla 32. Media y desviación típica del fósforo (g/100g) clasificado por hueso.

Fémur:

El valor más alto de la media de fósforo en el fémur lo encontramos en el grupo tratado con EHL D2 que presentaba 8,43±1,21 g/100g, seguido por el grupo EHL D1 con 6,63±4,18 g/100g y con valores muy similares los grupos Control y Control OVX con 3,61±1,26 y 3,64±0,74 g/100g respectivamente. Encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p<0,025$) entre los grupos tratados y ambos grupos control.



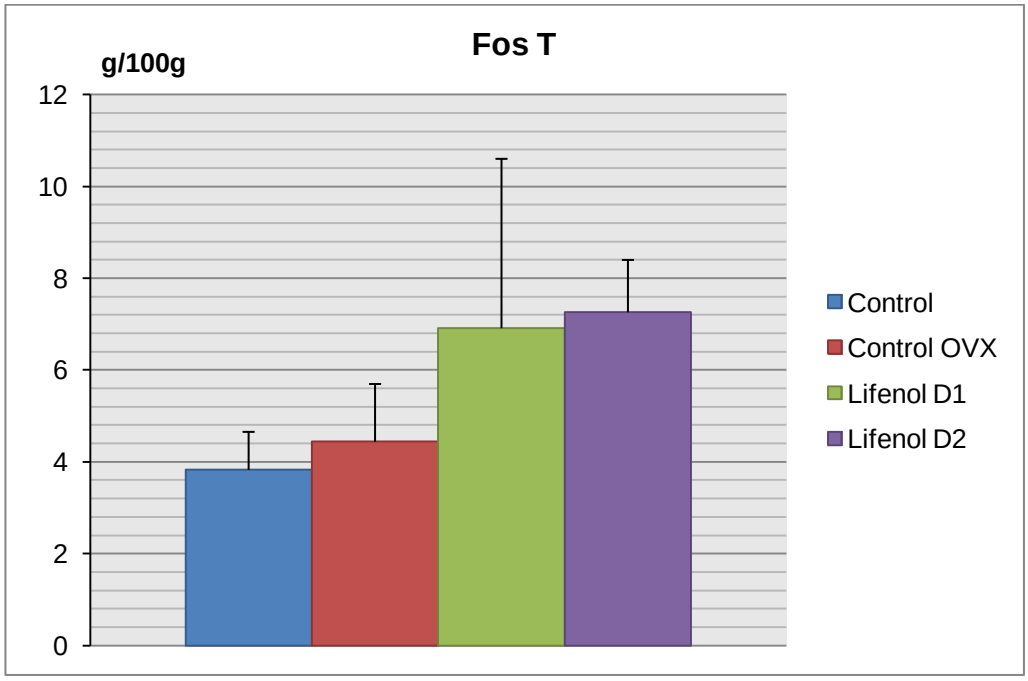
Gráfica 19. Representación de la media ±DE de fósforo en fémur por grupos. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX (p<0,05).

Fósforo Fémur			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	3,612	0,985
	EHL D1	3,635	0,021
	EHL D2	6,634	0,001
Control OVX	Control	8,430	0,985
	EHL D1	7,371	0,025
	EHL D2	3,612	0,001
EHL D1	Control	3,635	0,021
	Control OVX	6,634	0,025
	EHL D2	8,430	0,199
EHL D2	Control	7,371	0,001
	Control OVX	3,612	0,001
	EHL D1	3,635	0,199

Tabla 33. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tibia:

Los valores más altos los encontramos en los grupos tratados, siendo 7,26±1,14 y 6,92±3,69 g/100g en EHL D1 y EHL D2 respectivamente, seguidos por el grupo OVX, que mostraba un valor más alto que el del grupo Control: 4,44±1,26 g/100g frente a 3,83±0,83 g/100g. Existían diferencias estadísticamente significativas (p<0,028) entre el grupo Control con ambos tratados con EHL.



Gráfica 20. Representación de la media ±DE de fósforo en tibia por grupos.

Fósforo Tibia			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Control	Control OVX	3,826	0,649
	EHL D1	4,440	0,028
	EHL D2	6,916	0,022
Control OVX	Control	7,263	0,649
	EHL D1	7,661	0,077
	EHL D2	3,826	0,058
EHL D1	Control	4,440	0,028
	Control OVX	6,916	0,077
	EHL D2	7,263	0,817
EHL D2	Control	7,661	0,022
	Control OVX	3,826	0,058
	EHL D1	4,440	0,817

Tabla 34. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.

3. Boro, magnesio y zinc:

	MEDIA Boro		MEDIA Magnesio		MEDIA Zinc	
Grupo:	**Fémur**	**Tibia**	**Fémur**	**Tibia**	**Fémur**	**Tibia**
Control	11,64	11,22	0,33	0,32	140,56	165,16
Control OVX	8,32	5,98	0,26	0,17	165,95	141,64
EHL D1	6,05	4,80	0,30	0,30	155,17	162,21
EHL D2	3,85	3,90	0,32	0,28	113,91	114,26
	Desv. Tip. Boro		**Desv. Tip. Magnesio**		**Desv. Tip. Zinc**	
Grupo:	**Fémur**	**Tibia**	**Fémur**	**Tibia**	**Fémur**	**Tibia**
Control	5,43	3,12	0,06	0,03	11,48	17,42
Control OVX	9,22	1,22	0,31	0,04	45,78	35,57
EHL D1	3,66	2,18	0,12	0,12	37,13	36,34
EHL D2	0,56	0,89	0,03	0,05	17,64	22,07

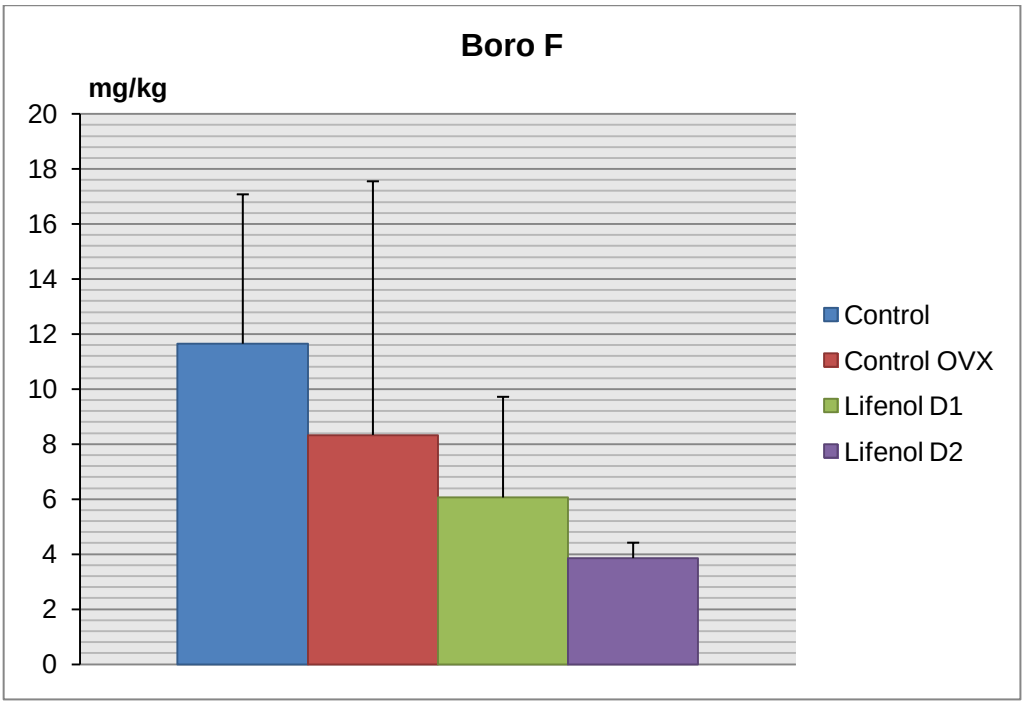
Tabla 35. Medias y desviación típica del boro (mg/kg), magnesio (g/100g) y zinc (mg/kg), clasificados por hueso.

Fémur:

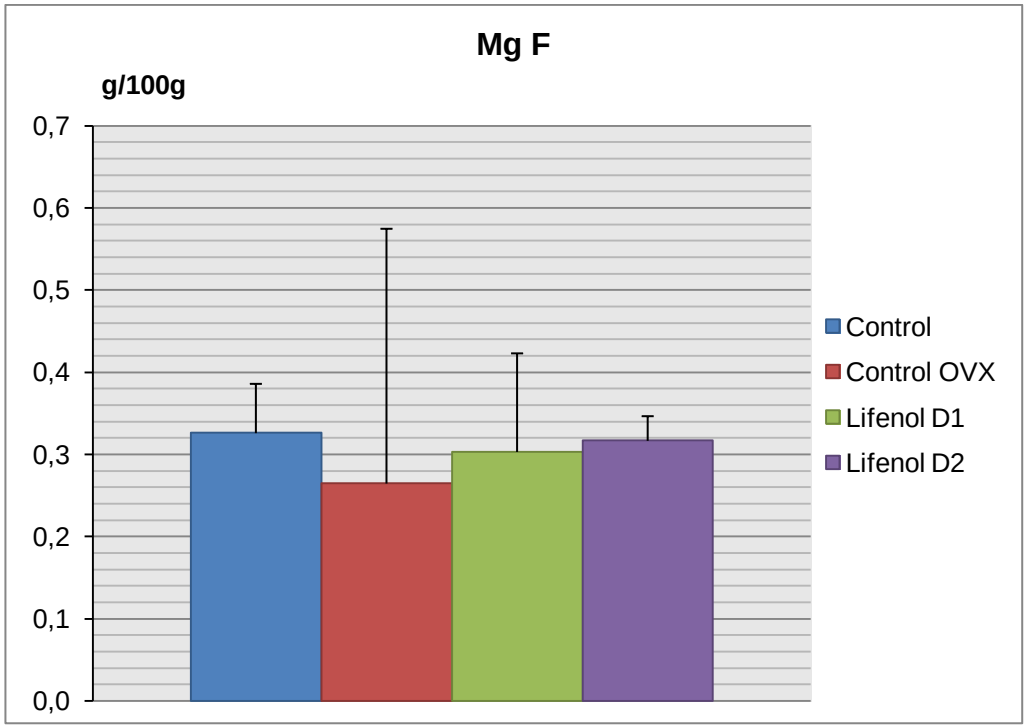
Respecto al boro, los valores más elevados los observamos en el grupo Control y Control OVX con 11,65±5,43 y 8,33±9,22 mg/kg respectivamente, y los más bajos en ambos tratados: 6,05±3,66 mg/kg el EHL D1 y 3,85±0,56 mg/kg el EHL D2 con diferencias estadísticamente significativas ($p<0,038$) entre el grupo Control respecto a ambos tratados.

En el magnesio, los valores son muy similares entre los grupos, siendo el más alto el del grupo Control con 0,33±0,06 g/100, seguido por EHL D2 y EHL D1 con 0,32±0,03 y 0,30±0,12 g/100g respectivamente, y por último el grupo OVX con 0,26±0,31 g/100g. No existían diferencias estadísticamente significativas.

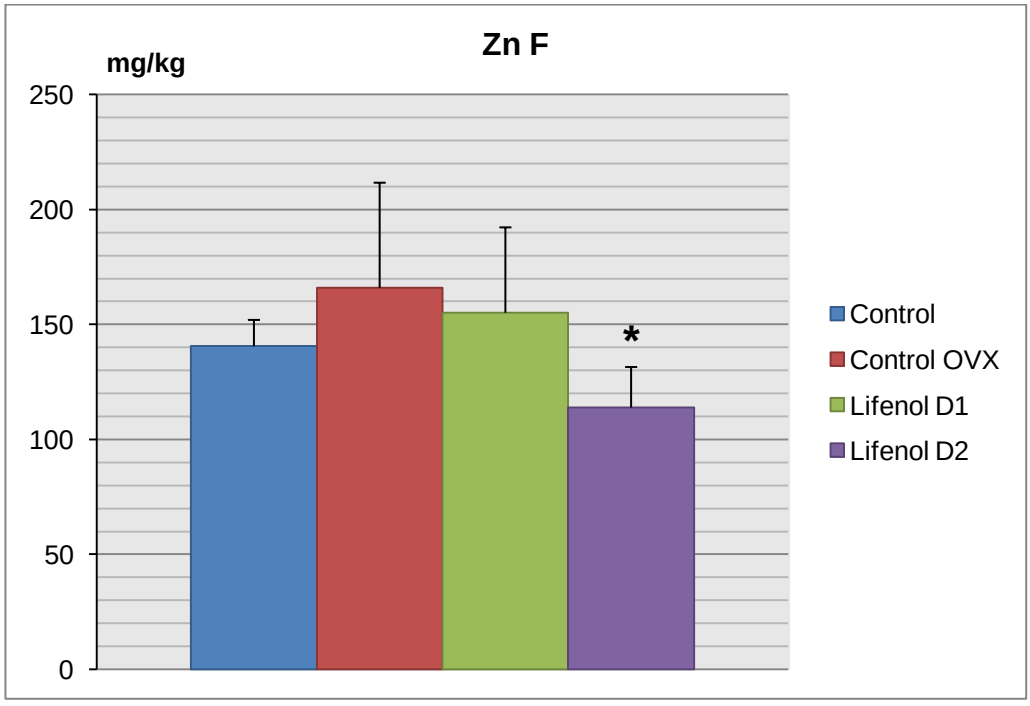
Por último, respecto al zinc, fue el grupo Control OVX el que mostró niveles más elevados con 165,95±45,78 mg/kg, con diferencias estadísticamente significativas (p<0,015) respecto a los grupos EHL D2 (113,91±17,64 mg/kg) y EHL D1 (155,17±37,13 mg/kg). El grupo Control obtuvo un valor de 140,56±11,48 mg/kg.



Gráfica 21. Representación de la media ±DE de boro en fémur por grupos.



Gráfica 22. Representación de la media ±DE de magnesio en fémur por grupos.



Gráfica 23. Representación de la media ±DE de zinc en fémur por grupos. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX ($p<0,05$).

Fémur			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Boro			
Control	Control OVX	3,316	0,199
	EHL D1	5,590	0,038
	EHL D2	7,792	0,008
Control OVX	Control	-3,316	0,199
	EHL D1	2,274	0,387
	EHL D2	4,476	0,113
EHL D1	Control	-5,590	0,038
	Control OVX	-2,274	0,387
	EHL D2	2,202	0,439
EHL D2	Control	-7,792	0,008
	Control OVX	-4,476	0,113
	EHL D1	-2,202	0,439
Magnesio			
Control	Control OVX	0,061	0,437
	EHL D1	0,022	0,776
	EHL D2	0,009	0,913
Control OVX	Control	-0,061	0,437
	EHL D1	-0,038	0,634
	EHL D2	-0,051	0,545
EHL D1	Control	-0,022	0,776
	Control OVX	0,038	0,634
	EHL D2	-0,013	0,877
EHL D2	Control	-0,009	0,913
	Control OVX	0,051	0,545
	EHL D1	0,013	0,877

Zinc			
Control	Control OVX	-25,389	0,129
	EHL D1	-14,608	0,386
	EHL D2	26,654	0,136
Control OVX	Control	25,389	0,129
	EHL D1	10,781	0,469
	EHL D2	52,043	0,002
EHL D1	Control	14,608	0,386
	Control OVX	-10,781	0,469
	EHL D2	41,262	0,015
EHL D2	Control	-26,654	0,136
	Control OVX	-52,043	0,002
	EHL D1	-41,262	0,015

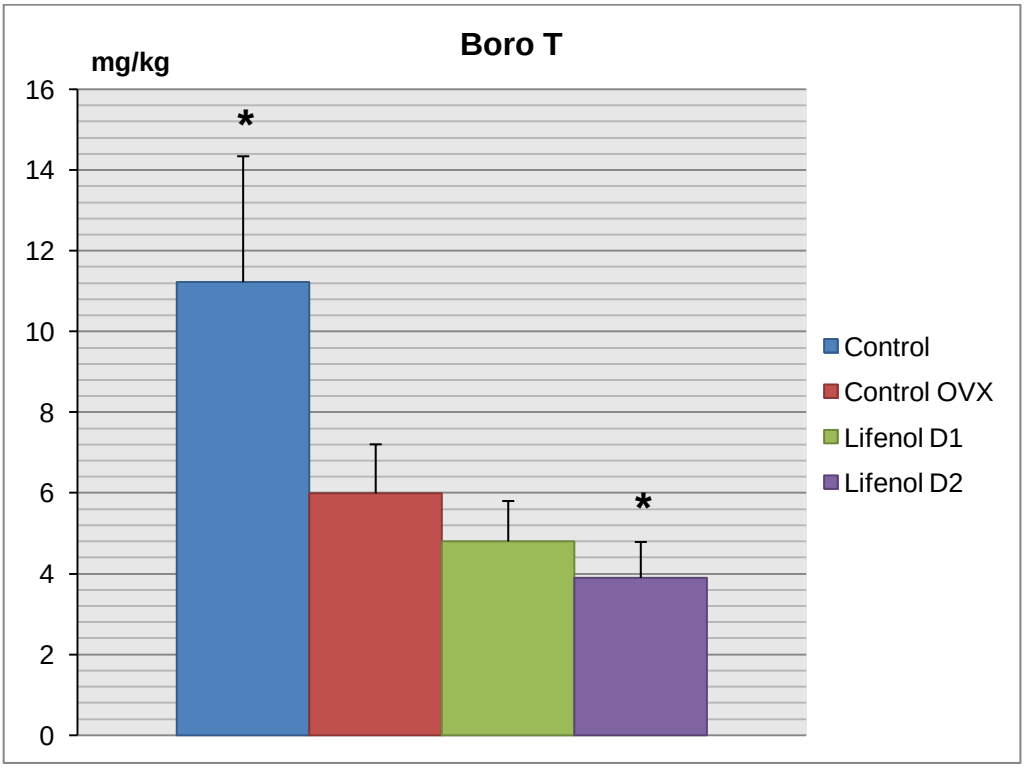
Tabla 36. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tibia:

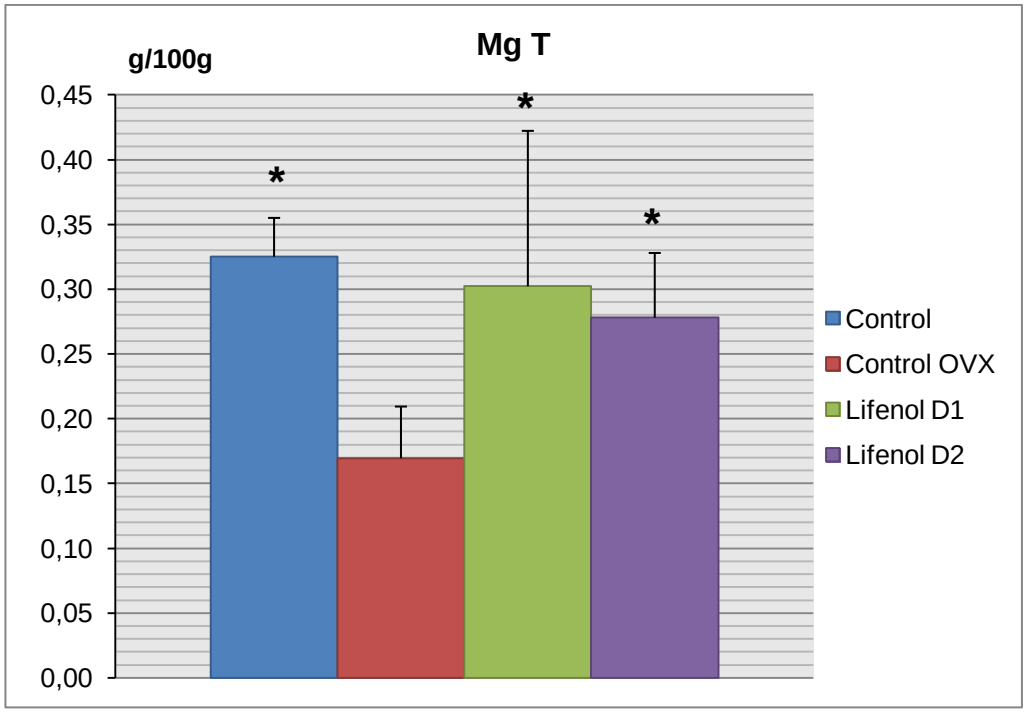
Respecto al boro, el grupo Control obtuvo valores más elevados que el resto de los grupos (11,22±3,12 mg/kg), con diferencias estadísticamente significativas ($p<0,047$). Le seguía el grupo control OVX (5,98±1,22 mg/kg) y los grupos EHL D1 y D2: 4,80±2,18 y 3,90±0,89 mg/kg respectivamente.

En el caso del magnesio, había diferencias estadísticamente significativas ($p<0,004$) entre todos los grupos y el grupo Control OVX, que presentaba los niveles más bajos de este elemento: 0,17±0,04 g/100g, siendo los más altos los del grupo Control: 0,32±0,03 g/100g, seguido por muy poca diferencia de los grupos tratados: EHL D1 con 0,30±0,12 g/100g y EHL D2 con 0,28±0,05 g/100g.

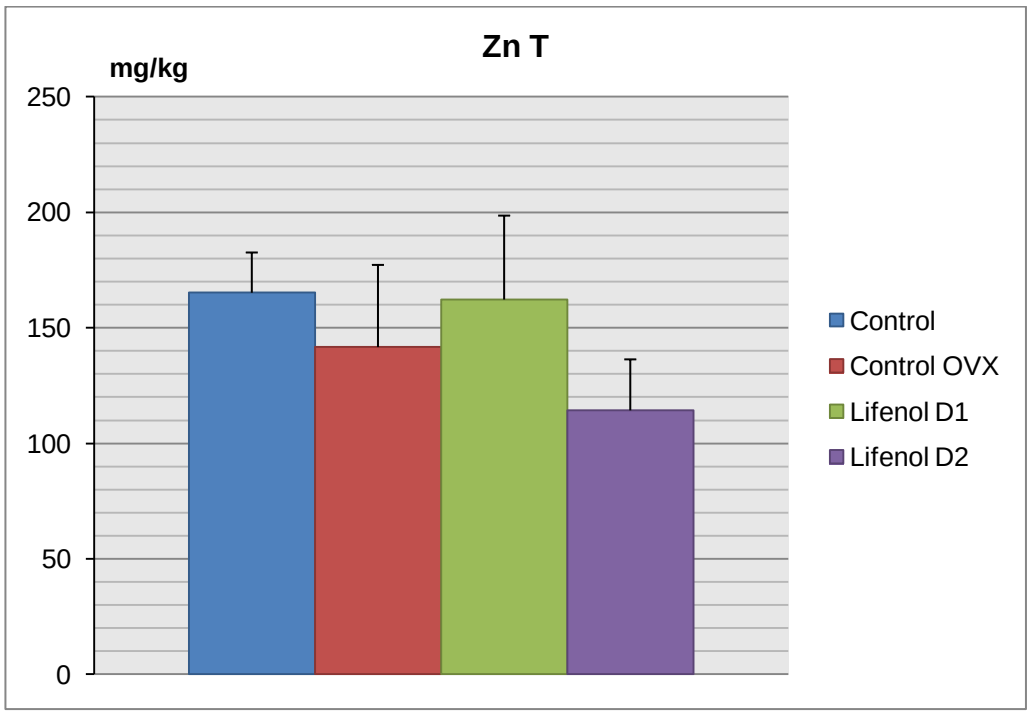
Por último, en el caso del zinc el valor más bajo lo presentaba el grupo EHL D2 con 114,26±22,07 mg/kg, seguido por el grupo OVX con 141,65±35,57 mg/kg, y con los valores más altos los grupos Control y EHL D1 con 165,17±17,42 y 162,21±36,34 mg/kg respectivamente. Existían diferencias estadísticamente significativas (p<0,002) entre el grupo Control y todos los demás, así como entre el EHL D2 y el Control OVX.



Gráfica 24. Representación de la media ±DE de boro en tibia por grupos. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX (p<0,05).



Gráfica 25. Representación de la media ±DE de magnesio en tibia por grupos. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al grupo II: Control OVX ($p<0,05$).



Gráfica 26. Representación de la media ±DE de zinc en tibia por grupos.

Tibia			
(I)Grupo	**(J)Grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Sig.[a]**
Boro			
Control	Control OVX	5,236	0,000
	EHL D1	6,420	0,000
	EHL D2	7,324	0,000
Control OVX	Control	-5,236	0,000
	EHL D1	1,184	0,223
	EHL D2	2,088	0,047
EHL D1	Control	-6,420	0,000
	Control OVX	-1,184	0,223
	EHL D2	0,904	0,378
EHL D2	Control	-7,324	0,000
	Control OVX	-2,088	0,047
	EHL D1	-0,904	0,378
Magnesio			
Control	Control OVX	0,155	0,000
	EHL D1	0,023	0,483
	EHL D2	0,047	0,177
Control OVX	Control	-0,155	0,000
	EHL D1	-0,132	0,000
	EHL D2	-0,108	0,004
EHL D1	Control	-0,022	0,483
	Control OVX	0,132	0,000
	EHL D2	0,024	0,491
EHL D2	Control	-0,047	0,177
	Control OVX	0,108	0,004
	EHL D1	-0,024	0,491

Zinc			
Control	Control OVX	23,519	0,103
	EHL D1	2,951	0,838
	EHL D2	50,904	0,002
Control OVX	Control	23,519	0,103
	EHL D1	2,951	0,129
	EHL D2	50,904	0,059
EHL D1	Control	23,519	0,838
	Control OVX	2,951	0,129
	EHL D2	50,904	0,002
EHL D2	Control	23,519	0,002
	Control OVX	2,951	0,059
	EHL D1	50,904	0,002

Tabla 37. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Estudio anatomopatológico de los úteros:

En las muestras del grupo I (Control) el epitelio de la superficie endometrial, presentaba características normales. Estaba formado por células cilíndricas altas, algunas de ellas con cilios, mientras que el resto poseían microvellosidades superficiales. Las células del estroma mostraban núcleos grandes y fusiformes y poco citoplasma. En algunas preparaciones obserfamos frecuentes figuras de mitosis en el estroma como corresponde a la fase proliferativa (figuras 74 y 75).

En el grupo control OVX observamos cambios atróficos característicos del endometrio postmenopáusico. Éste era fino y sólo constaba de un estrato basal, con glándulas escasas e inactivas. No había signos de proliferación ni de actividad secretora. Se observaba también un estroma mucho menos celular, con abundantes fibras de colágeno.

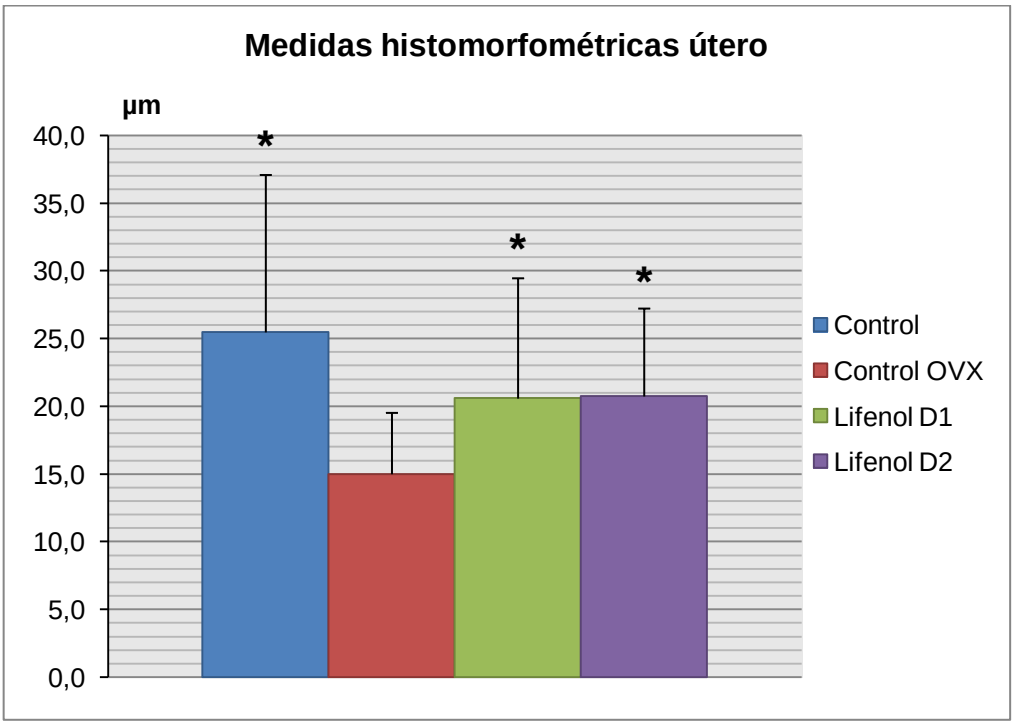
En ambos grupos tratados con EHL, el espesor endometrial era semejante al normal. Se observaba alguna vacuolización citoplasmática (sobre todo en el grupo EHL D2), pero existía proliferación tanto del epitelio como del estroma, que era más celular que en el grupo control OVX.

Al realizar el análisis histomorfométrico, obtuvimos los siguientes resultados expresados en µm:

	Medidas histomorfométricas útero	
Grupos:	**Media**	**Desviación típica**
Control	25,48	11,62
Control OVX	15,00	4,53
EHL D1	20,59	8,88
EHL D2	20,75	6,49

Tabla 38. Resultados estadísticos descriptivos.

En el grupo Control, la media de espesor del epitelio endometrial fue de 25,48±11,62 µm frente a los 15±4,53 µm que obtuvo el grupo II (OVX). El tratamiento con EHL mejoró los valores de espesor del grupo OVX, en 20,59±8,88 y 20,75±6,49 µm de espesor para la dosis alta (D1) y baja (D2) respectivamente. Esta diferencia de espesor fue estadísticamente significativa entre el grupo OVX y el resto de los grupos.

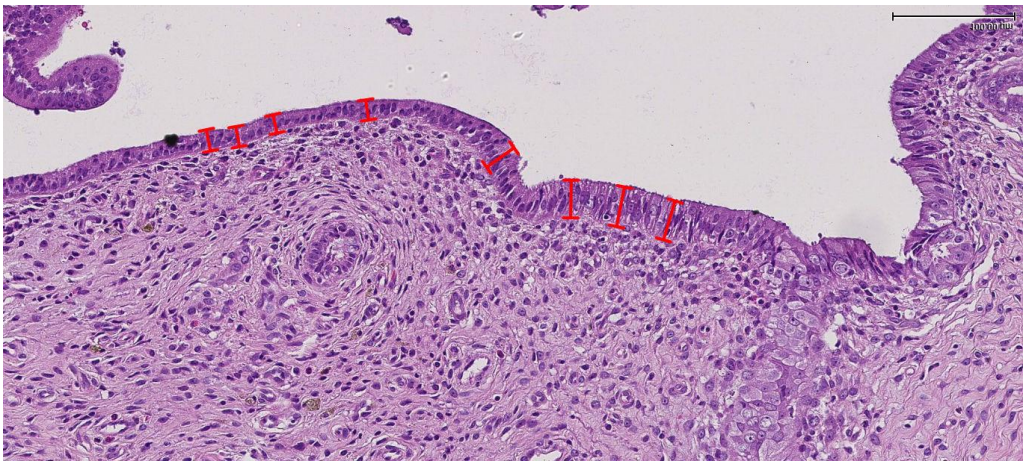


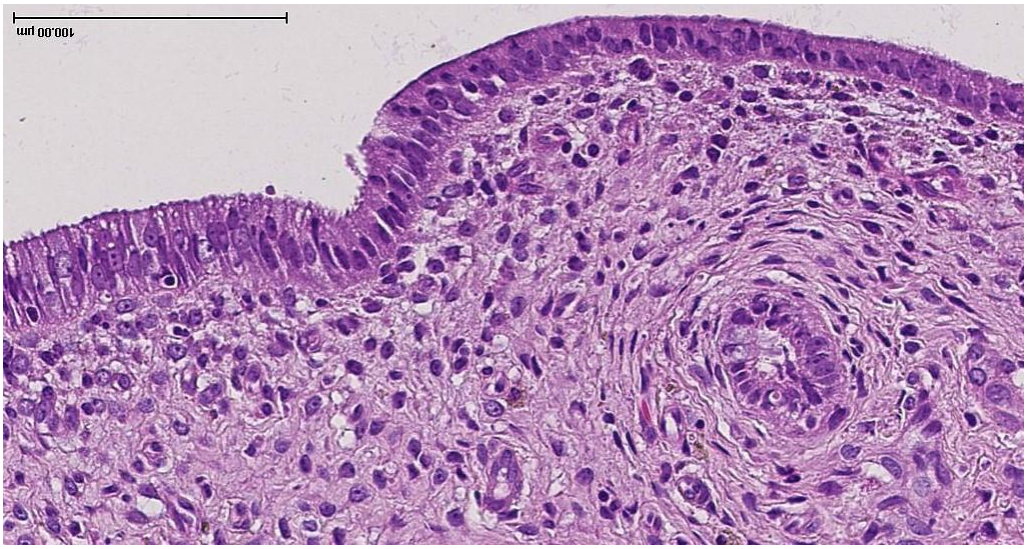
Gráfica 27. Representación de las medias ±DE del grosor del epitelio luminal del útero.

t		Sig.[a]	Significativa a nivel
Control	Control OVX	7,495	P<0,001
	EHL D1	1,663	No existe significación
	EHL D2	3,834	P<0,001
Control OVX	EHL D1	6,146	P<0,001
	EHL D2	3,424	P<0,01
EHL D1	EHL D2	2,395	P<0,02

Tabla 39. Comparaciones por pares.

Grupo I, Control:





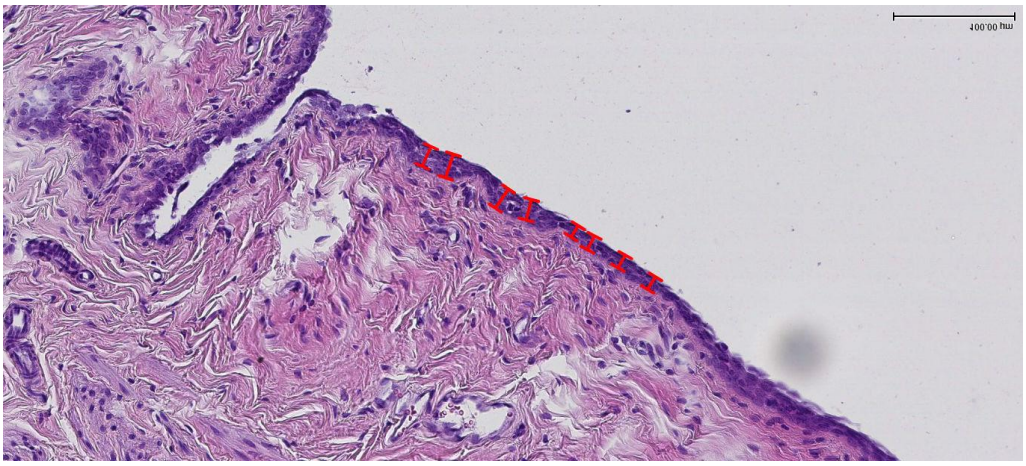
Figuras. 74 y 75.

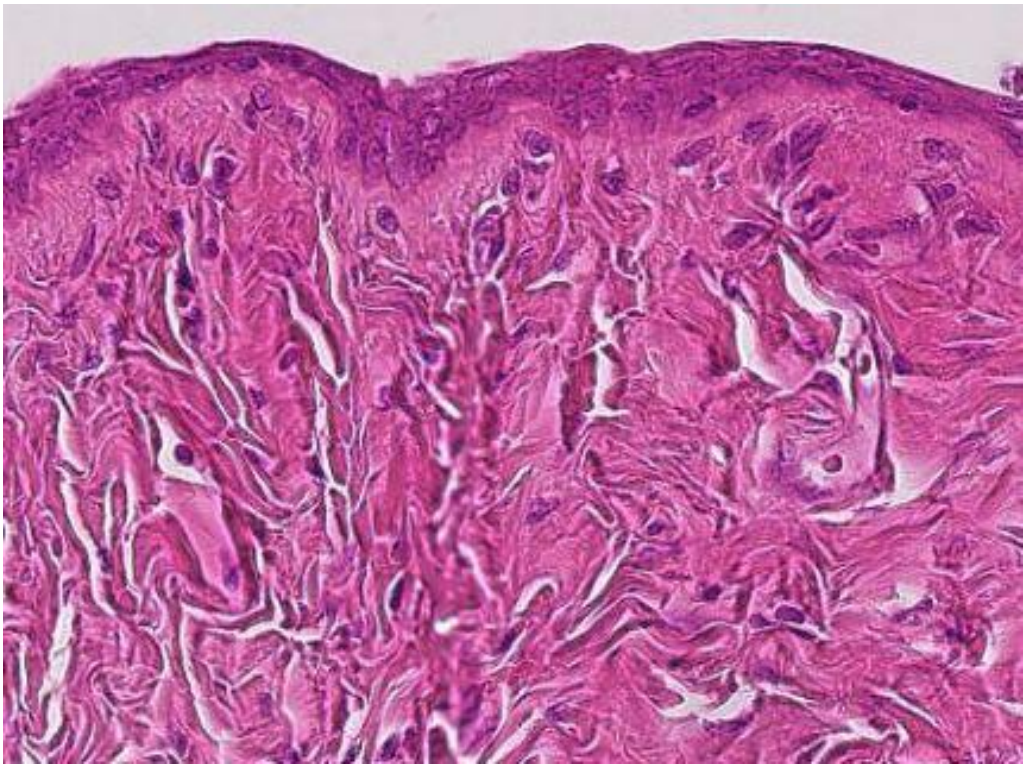
Epitelio: Células cilíndricas ciliadas.

Estroma: Abundante celularidad y ocasionales glándulas.

H.E. 2,5x y 20x.

Grupo II, Control OVX:





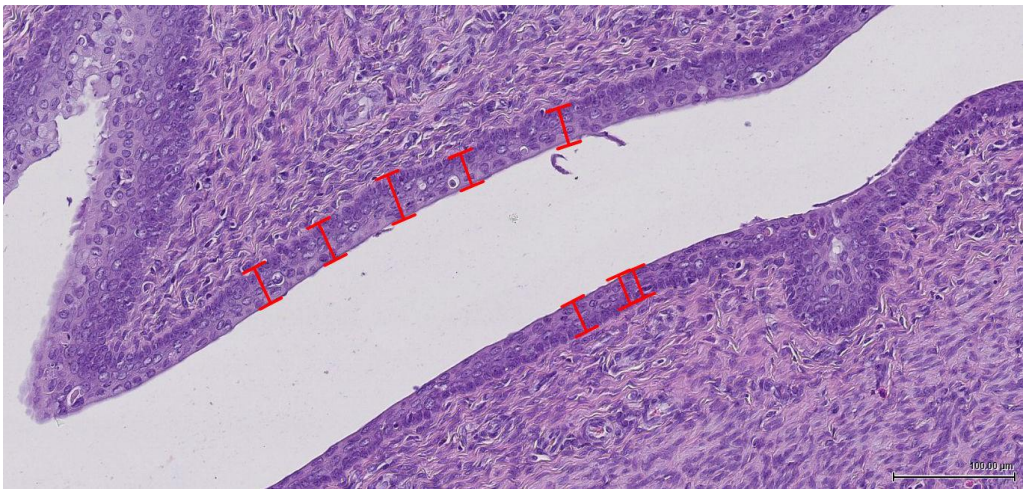
Figuras. 76 y 77.

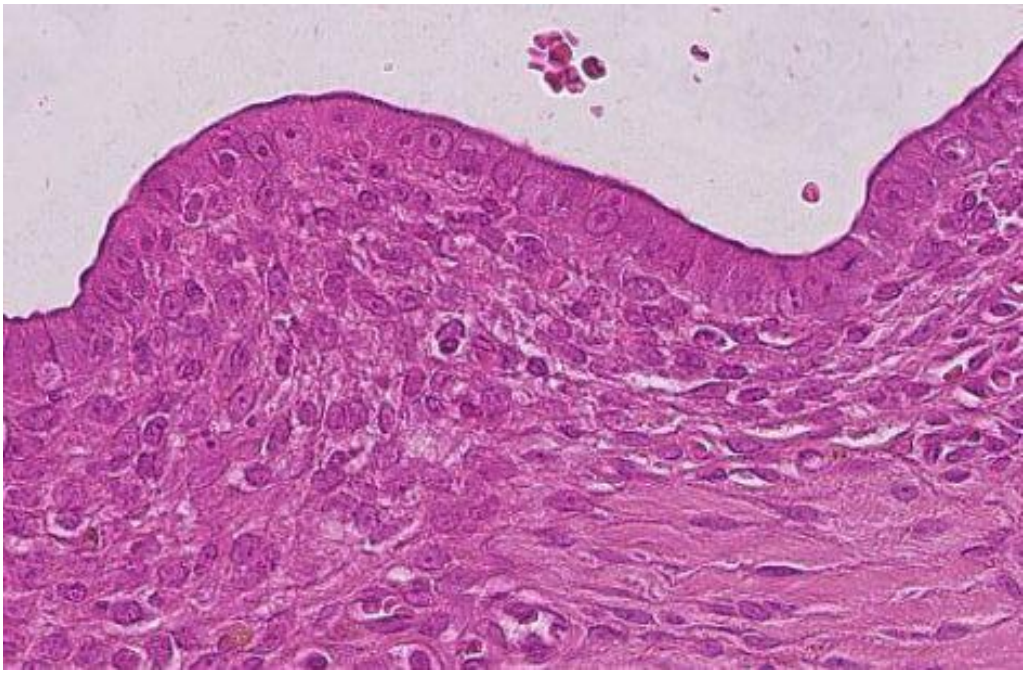
Epitelio atrófico.

Estroma: predominan las fibras de colágeno. Escasas glándulas atróficas.

H.E. 2,5x y 40x.

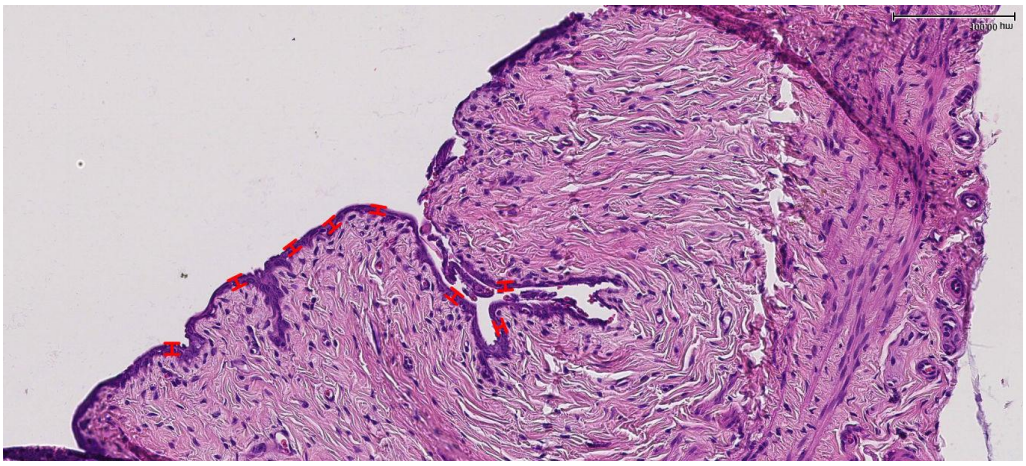
Grupo III, EHL D1:

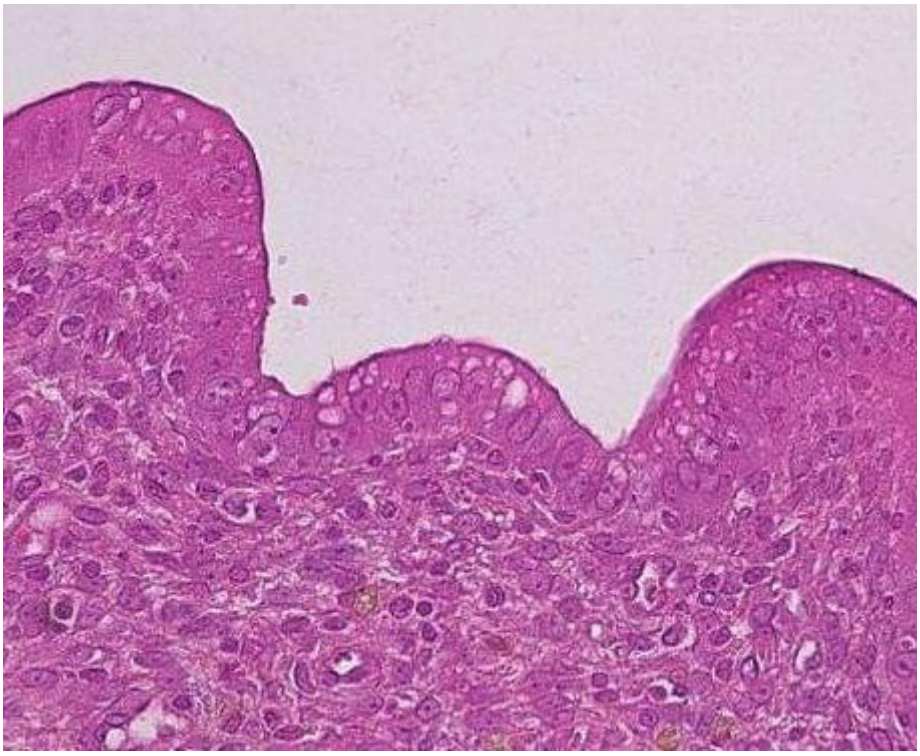




Figuras. 78 y 79.
Epitelio: Vacuolización citoplasmática.
Estroma: de características normales.
H.E. 2,5x y 40x.

Grupo IV, EHL D2:





Figuras. 80 y 81.

Epitelio y estroma sin alteraciones relevantes.

H.E. 2,5x y 40x.

A continuación se muestra una tabla resumen de los parámetros más relevantes obtenidos mediante los diferentes métodos empleados:

				Grupo I: Control	Grupo II: OVX	Grupo III: EHL D1	Grupo IV: EHL D2
Peso (incremento)			g	19,37	116,81	116,60	120,73
Bioquímica		**Ca++**	mg/dl	10,95	10,20	10,40	10,57
		FOS	mg/dl	5,80	4,26	5,00	4,20
		ALPt	U/L	141,50	97,67	110,00	91,67
		ALP-B		19,69	9,02	11,45	9,84
µTC	**BV/TV**		%	5,82	3,79	4,72	5,84
	BS/TV		mm^{-1}	2,74	2,56	2,79	2,86
	Tb.N		µm	0,67	0,55	0,63	0,72
	Tb.Pf		$mm-^{1}$	15,22	25,63	20,06	15,62
	Ct.Th		µm	312,93	142,75	440,97	458,57
	B.Ar		Mm^2	6,15	5,51	5,47	5,67
Histo. ósea	**Fémur**		µm	91,55	66,28	71,21	78,05
	Tibia			72,40	47,27	73,58	64,49
Histo. del útero			µm	25,48	15,00	20,59	20,75
Est. Ionómico	**Ca**	**Fémur**	g/100g	33,05	10,03	14,45	23,32
		Tibia		28,79	10,52	12,55	20,23
	Fos	**Fémur**	g/100g	3,61	3,64	6,63	8,43
		Tibia		3,83	4,44	6,92	7,26
	B	**Fémur**	mg/kg	11,64	8,32	6,05	3,85
		Tibia		11,22	5,98	4,80	3,90
	Mg	**Fémur**	g/100g	0,33	0,26	0,30	0,32
		Tibia		0,32	0,17	0,30	0,28
	Zn	**Fémur**	mg/kg	140,56	165,95	155,17	113,91
		Tibia		165,16	141,64	162,21	114,26

Tabla 40.

VI. DISCUSIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, la osteoporosis se define como una *"enfermedad sistémica del esqueleto caracterizada por disminución de la masa ósea por alteraciones de la microestructura del tejido óseo con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y, por lo tanto, de la susceptibilidad a la fractura"* (NIH, 1993). Esta pérdida progresiva de la masa ósea es debida a un desequilibrio en el remodelado óseo, que comienza por la pérdida de los minerales que otorgan las características de dureza y densidad propias de un hueso normal (osteopenia) y se habla de osteoporosis cuando la pérdida de masa ósea es tan importante que causa fragilidad ósea y por lo tanto fracturas.

Los factores de riesgo que provocan este desequilibrio son numerosos: antecedentes familiares, sedentarismo, enfermedades relacionadas con las hormonas, fármacos como los glucocorticoides, falta de ingesta de calcio, delgadez extrema, etc., aunque la causa principal es la deprivación hormonal característica en el envejecimiento natural, sobre todo en la mujer, siendo la prevalencia de un 52% en las mujeres mayores de 70 años (SEIOMM, 2003) y como consecuencia del envejecimiento de la población mundial, se estima que el riesgo de padecerla aumente en un 280% en 2050 (IOF, 2012).

La osteoporosis es una enfermedad silenciosa, normalmente diagnosticada después de aparecer la primera fractura, por lo que los tratamientos suelen estar dirigidos a ralentizar la destrucción de masa ósea una vez detectado el problema. Entre los más utilizados, encontramos los bifosfonatos, el tratamiento de primera elección por su acción inhibidora de los osteoclastos, seguidos de los tratamientos hormonales con calcitonina. El raloxifeno es un fármaco cuya función es similar a la terapia sustitutiva con estrógenos, pero no causa los efectos secundarios provocados por ésta. Y por último, los tratamientos menos usados son los osteoformadores como la hormona paratiroidea

y el ranelato de estroncio, que aumentan la actividad de los osteoblastos.

Por lo tanto, el objetivo de la medicina debe ser prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad. La prevención de la osteoporosis no solo permite el ahorro económico del sistema sanitario, sino que además, si se tomaran las medidas adecuadas una vez alcanzado el pico máximo de masa ósea (lo que ocurre hacia los 23-25 años), se retrasaría la aparición de la enfermedad con lo que tendría una evolución más lenta, mejorando la calidad de vida del paciente. Para ello son recomendables los hábitos de vida saludables, tales como hacer un ejercicio moderado pero constante, evitar las conductas nocivas como el exceso del tabaco y alcohol, y sobre todo mantener una buena alimentación rica en calcio y vitamina D.

Existen diferentes métodos *in vivo* para inducir la osteoporosis de forma experimental, que incluyen la deprivación estrogénica mediante ovariectomía bilateral, la administración de fármacos supresores de estrógenos o glucocorticoides (Reid, 1990; Reid, 1997), la inmovilización, y otros métodos menos desarrollados como dietas bajas en calcio o grandes ingestas de alcohol para debilitar el esqueleto del animal (Lelovas, 2008).

Para elegir un modelo idóneo, hay que tener en cuenta aspectos éticos, ecológicos, la homogeneidad genética, características biológicas que garanticen la validez del diseño y aspectos de disponibilidad como el coste, el manejo del animal, la racionalidad y la factibilidad a la hora de realizar el experimento en relación con el objetivo de la investigación. También hay que tener en cuenta que el modelo debe reproducir la patogenia de la enfermedad humana con la mayor fidelidad posible (Davidson, 1987).

Entre los modelos animales se encuentran: el **primate no humano**, ideal por su similitud genética con el ser humano, pero con grandes inconvenientes como el elevado coste, el difícil manejo o los aspectos éticos (Hodgen, 1977); el **cerdo**, con un aparato reproductor y una remodelación ósea muy parecidos a los del ser humano, pero de nuevo encontramos inconvenientes como el elevado coste y la agresividad de estos animales (Turner, 2001); **ovejas**, con un perfil hormonal muy similar al de la mujer, de fácil manejo y bajo coste, pero al tener una alimentación herbívora sus niveles de minerales varían, lo que complica el estudio de la osteoporosis a nivel bioquímico (Pastoureau, 1989); los **gatos** y los **perros** no son útiles a la hora de inducir osteoporosis por deprivación estrogénica, ya que no les afecta al sistema óseo (Boyce, 1990); los **conejos** son un buen modelo por su bajo coste, su facilidad en el manejo y su rápida inducción de la osteoporosis por ovariectomía; los **ratones**, constituyen uno de los modelos más elegidos porque pierden masa ósea con la edad, son fáciles de manejar y porque se puede inducir osteoporosis por ovariectomía; y por último la **rata**, también es uno de los modelos favoritos por responder rápidamente y de manera satisfactoria a los tratamientos hormonales sustitutivos, son fáciles de manipular y tienen un bajo coste (Rodgers, 1993).

Tras valorar los diferentes modelos animales y los métodos de inducción de la osteoporosis nos decantamos para realizar nuestro trabajo por el modelo de osteoporosis secundaria a ovariectomía bilateral en ratas Sprague-Dawley. Los motivos fueron, principalmente, la facilidad y rapidez para inducir la enfermedad mediante ovariectomía, y de forma secundaria: su bajo coste económico y la facilidad de manejo del animal tanto en el mantenimiento como a la hora de realizar pruebas analíticas como la extracción de sangre o la medición del peso.

La inducción de osteoporosis por deprivación estrogénica nos permitió comenzar el tratamiento antes de intervenir a los animales y continuarlo durante todo el estudio para evaluar el efecto preventivo de la administración de sustancias protectoras.

El objetivo fundamental de nuestro estudio, una vez desarrollado el modelo de osteoporosis experimental, consistió en estudiar los efectos de los flavonoides contenidos en el extracto de *Humulus Lupulus* L. sobre la evolución del modelo.

Los flavonoides son antioxidantes polifenólicos muy abundantes en la naturaleza, principalmente en frutas y verduras. Aunque no es una denominación correcta, algunos de ellos han sido descritos como fitoestrógenos, debido a que por su estructura química, muy similar al estrógeno, pueden unirse a sus receptores y activarlos, ejerciendo una función análoga. También ejercen una función antiinflamatoria, por su acción reguladora de algunos mediadores químicos (IL-8, MCP-1 y ICAM-1) (Youdim, 2002; Wang, 2002).

Otra función descrita corresponde a la inhibición de la actividad osteoclástica y al incremento de la osteoblastogénesis (Swarnkar, 2011). Por estos motivos, dichos agentes están siendo empleados en múltiples investigaciones cuyo objetivo es incluir en la dieta aquellos flavonoides que demuestren un efecto preventivo sobre la osteoporosis o bien, que permitan sustituir o complementar a los fármacos que actualmente se utilizan para tratar esta enfermedad, disminuyendo así los efectos adversos y complicaciones derivadas de su uso (Kawakita, 2009).

El agente utilizado en nuestro estudio fue el extracto de la planta *Humulus Lupulus* L (en adelante EHL). Esta planta ha sido muy utilizada por el hombre a lo largo de la historia. Desde la Edad Media,

el lúpulo procedente de las plantas hembras es utilizado para dar estabilidad a la cerveza, práctica que sigue vigente actualmente.

Una de las moléculas con mayor actividad biológica contenida en el EHL es la 8-prenilnaringenina, caracterizada por tener una fuerte afinidad por los receptores α y β de los estrógenos, con lo que posee un efecto muy similar a la hormona 17β-estradiol (E2) (Milligan, 2000; Schaefer, 2003). El estradiol es el tipo de estrógeno más importante y más potente del ser humano, cuya función es el desarrollo de los órganos sexuales femeninos, pero también ejerce un efecto protector sobre el sistema cardiovascular, y controla el estado de ánimo y el humor de la persona (Ray, 2012).

Respecto al hueso, el estradiol realiza una función reguladora sobre el crecimiento y la homeostasis (Turner, 1994), ejerciendo un efecto tanto directo, sobre los receptores estrogénicos α y β localizados en la superficie de los osteoblastos y osteoclastos (Komm 2001), como indirecto sobre el hueso, como es el control sobre la absorción intestinal (Bolscher, 1999) y la excreción renal del calcio, la secreción de PTH y la regulación de los niveles de vitamina D (Riggs, 1998; Prince, 1994).

Diversos estudios han demostrado que el tratamiento con EHL en mujeres menopáusicas provocaba un alivio de los llamados “sofocos” así como de otros síntomas característicos (Heyerick, 2006; Erkkola, 2010). También existen algunos trabajos realizados sobre modelos animales de osteoporosis, en los que se ha documentado una menor pérdida ósea en los animales tratados con EHL (Hümpel, 2005; Overk, 2008).

Hümpel y colaboradores (2005) estudiaron el efecto del 8-PN sobre el hueso y el útero de ratas Sprague-Dawley a las que se les indujo deprivación estrogénica mediante la extirpación de ambos

ovarios. Observaron que el 8-PN provocaba un notable efecto protector sobre la pérdida de tejido óseo sin causar efectos tróficos indeseables sobre el endometrio.

Además, se ha demostrado que el 8-PN puede ejercer otros efectos positivos para la salud, como reducir el colesterol LDL y los triglicéridos en plasma y por lo tanto disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y arterioesclerosis. En el sistema cardiovascular, también se ha descrito un efecto positivo sobre la regulación del tono vascular (Mendelsohn, 1994). Sin embargo, diversos autores sugieren que una dosis elevada de 8-PN puede provocar un efecto estrogénico indeseable debido a una posible disminución de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), lo que causaría hiperplasia del endometrio y mayor riesgo de padecer cáncer de endometrio (Feeley, 2001).

En este sentido, Shaefer y colaboradores (2003), observaron hiperplasia endometrial que afectaba al peso total del útero al administrar 8-PN en ratas jóvenes no ovariectomizadas. Para Christoffel y colaboradores (2006), el exceso de 8-PN podría causar una disminución de la transcripción del mRNA de los receptores ERα y ERβ (Christoffel, 2006).

En nuestro estudio hemos utilizado 40 ratas Sprague-Dawley hembras, de un peso aproximado a los 250 gramos y de 12 semanas de edad, que es cuando la rata ha alcanzado su pico máximo de masa ósea. Tres de los cuatro grupos fueron ovariectomizados y dos de ellos tratados con dos dosis diferentes de EHL (0,32 g/kg y 0,032 g/kg).

Para valorar el estado del hueso de los animales, las consecuencias de la deprivación estrogénica y del tratamiento con las diferentes dosis de EHL, hemos realizado diferentes estudios: determinación del peso corporal, estudio bioquímico, estudio de la

morfología ósea mediante microtomografía computerizada, estudio anatomopatológico óseo y uterino y estudio ionómico óseo.

Tras la ovariectomía, suele observarse un incremento del peso de los animales, ya que existe una relación estrecha entre los niveles de estrógenos y el metabolismo lipídico (Wang, 1994). Los estrógenos intervienen en la regulación de la secreción de la leptina, una proteína que se encuentra en el tejido adiposo encargada de avisar al cerebro de la magnitud de las reservas energéticas en el organismo, por lo que al disminuir los estrógenos tras la menopausia ocurre una disminución de la leptina y por lo tanto un aumento del tejido adiposo (Milewicz, 2001). Este aumento de peso tras la extirpación de ambos ovarios en ratas ha sido descrito en numerosos estudios sobre la obesidad (Argañaraz, 2007) y sobre la deprivación estrogénica (Meli, 2004).

En nuestro estudio también pudimos comprobar este hecho, ya que observamos un aumento de peso mayor de 100 g en las ratas que fueron ovariectomizadas, mientras que los animales del grupo I (Control) aumentaron solo 19,37±12,1 g. El aumento de peso fue brusco un mes después de la ovariectomía, sobre todo en el grupo Control ovariectomizado, para continuar ganando peso de manera más lenta hasta el final del experimento. Los animales de los tres grupos ovariectomizados alcanzaron un peso muy similar al final del experimento: Control OVX (116,81±19,32 g); EHL D1 (116,70±23,45 g) y EHL D2 (120,73±0,98 g).

También realizamos el estudio bioquímico: al inicio del experimento (basal); a los dos meses tras la ovariectomía y al sacrificio de los animales (cuarto mes tras la intervención). En cuanto al estudio de los resultados de los distintos parámetros (albúmina, alanina aminotransferasa, BUN, bilirrubina y amilasa), éstos se encontraban dentro del rango de normalidad de referencia para esta especie, sin diferencias significativas, lo que indica el correcto funcionamiento de

los distintos órganos (función hepática, renal, pancreática) en los animales de nuestro estudio.

Por otra parte y con el objetivo de analizar los efectos potenciales del agente estudiado sobre los parámetros relacionados con la osteoporosis a nivel bioquímico, realizamos distintas determinaciones: calcio (Ca^{2+}), fósforo (FOS), fosfatasa alcalina total (ALPt) y fosfatasa alcalina específica ósea (ALP-B).

El calcio, junto con el fósforo, se encuentra estrechamente relacionado con el sistema esquelético por ser los componentes principales de la matriz ósea que le otorgan rigidez y propiedades mecánicas de protección y sostén (Fukugawa, 2002). Del calcio total del organismo, el 99% se encuentra en el hueso en formas de cristales de hidroxiapatita; el 1% restante se divide en: 50% como calcio iónico libre; 40% está ligado a proteínas y el 10% restante está ligado a aniones (Nordin, 1988).

En la fase de remodelado óseo, los osteoclastos digieren tejido óseo para expulsar calcio al torrente sanguíneo, pero esa misma cantidad es la que precisan los osteoblastos para volver a reconstruir el hueso que se ha destruido. En el caso patológico, como es el de la osteoporosis, en que hay una mayor acción de los osteoclastos, el calcio en sangre no aumenta, si no que es eliminado por la orina. Una elevación de los valores de calcio en sangre en osteoporosis se debería, en todo caso, a la disminución de los niveles de hormonas reguladoras del calcio, como la calcitonina y la vitamina D, provocada por la falta de estrógenos (Bushinsky, 1999; Lemann, 1999).

El fósforo se encuentra en mayor concentración en los dientes y en los huesos, a los que les corresponde el 85% del total de fósforo del organismo. Colabora en estrecha relación con el calcio para la formación de hueso, siendo necesaria una aportación adecuada de

fósforo para que la mineralización sea adecuada (Torres, 2003). Si los niveles son muy elevados, se forma fosfato de calcio, que es insoluble, no reabsorbible y se elimina por la orina, disminuyendo también los niveles de calcio en sangre. Por el contrario, una disminución de los niveles de fósforo impide que el calcio se asimile en el hueso.

En nuestro estudio, los niveles de calcio y el fósforo en sangre se mantuvieron estables en todos los grupos, coincidiendo con lo que ocurre en humanos enfermos de osteoporosis y con lo descrito en la bibliografía.

La fosfatasa alcalina total (ALPt) es un marcador de formación ósea en suero. Existen 4 isoenzimas diferentes: ALP placentaria, ALP intestinal, ALP de las células germinales y la más común que se encuentra en el hígado, riñón y hueso (Cons, 2003).

Actualmente es posible medir cada isoenzima mediante pruebas específicas para cada una de ellas (Cons, 2003). Por ello hemos realizado un análisis que diferencie y especifique la cantidad de ALP correspondiente a los dos orígenes más abundantes: ósea *(ALP Bone)* y hepática *(ALP Liver).* Hemos centrado el estudio en la fosfatasa alcalina específica ósea, que es una glucoproteína tetramérica que se encuentra en la superficie de los osteoblastos, que indica la actividad osteoblástica y ofrece información sobre la formación del hueso (Gundberg, 2000).

En nuestro estudio, al final del experimento, el grupo de animales no sometidos a ovariectomía presentó 141,50±39,53 U/L de ALPt, mientras que los grupos ovariectomizados presentaban 97,67±46,54 U/L el grupo control II: ovariectomizado, 110±20,31 U/L el grupo tratado con EHL D1 y 91,67±45,40 el tratado con EHL D2, sin diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos.

En el estudio de la fosfatasa alcalina ósea (ALP-B), que indica de forma más específica la actividad osteoblástica, se obtuvieron resultados superponibles a los de la ALPt, es decir, niveles más bajos en los grupos operados, II, III y IV: 9,02±4,78 U/L; 11,45±5,91 U/L y 9,84±4,08 U/L respectivamente, que en el grupo control (19,69±11,14 U/L), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control respecto al resto de los grupos.

Habitualmente, en los pacientes con osteoporosis se ven incrementados los niveles de ALPt y ALP-B hasta el doble de los valores normales por el aumento de la actividad osteoblástica en el remodelado óseo. También incrementa su nivel con la presencia de fracturas u alteraciones del metabolismo óseo como en la enfermedad de Paget o en la osteomalacia (Delmas, 1990; Watkins, 2005; Zang, 2007).

De forma experimental, en ratas sometidas a ovariectomía, también suele observarse un aumento de la ALPt y ALP-B en relación a los grupos sin operar (Zeni, 1997; Shirwaikar, 2003). Sin embargo, algunos autores han descrito niveles similares de estas enzimas en animales ovariectomizados y no ovariectomizados (Arjmahdi, 1996; Brem, 2005), e incluso, la situación contraria, es decir, niveles inferiores de ALPt y ALP-B en los animales ovariectomizados respecto al control (Chang, 2013). Esta última situación, a la que no hemos encontrado una justificación en la bibliografía consultada, es la que hemos observado en nuestro estudio.

Diversos estudios han demostrado que medir la densidad ósea es insuficiente para valorar el riesgo de fractura (Damilakis, 2007), por ello el estudio de la microarquitectura ósea es una prueba complementaria que ha ido ganando importancia en los últimos años (Nieto, 2008). Por este motivo, en nuestro trabajo, además del estudio bioquímico, hemos realizado el análisis de la calidad del hueso a través de la

microtomografía computerizada (µTC), que nos ha permitido la visualización del hueso en dos y tres dimensiones y el análisis microestructural cuantitativo del hueso trabecular y cortical con una alta resolución en las imágenes (Shuller, 1992).

Hemos realizado el estudio del fémur de todos los animales, centrándonos en la región de la metáfisis distal, por ser la región con mayor proporción de hueso trabecular, ya que en las demás secciones con alto riesgo de fractura no se puede valorar con tanta precisión la presencia de trabéculas, por ser más escasas y finas.

Una de las características principales de la osteoporosis es la reducción del número y el tamaño de las trabéculas de hueso esponjoso. Mientras la osteoporosis senil tiende a presentar una disminución del espesor de las trabéculas, en la osteoporosis postmenopáusica aparece una perturbación de las conexiones entre las mismas. La pérdida de conectividad trabecular, lleva aparejada una disminución de la resistencia biomecánica y provoca fracturas.

En este sentido, la determinación del porcentaje medio del volumen del hueso trabecular total (BV/TV) y la densidad trabecular (BS/TV) son dos de los parámetros analizados por el µTC que aportan mayor valor diagnóstico y pronóstico. En nuestro estudio, el BV/TV de la región estudiada, fue significativamente mayor en los grupos I, III y IV (5,82±0,03; 4,72±0,41 y 5,84±0,29%), que en el grupo II (control OVX) (3,79±0,04%). Además, el hueso trabecular era de una densidad mayor (BS/TV) en los grupos I, III y IV (2,75±0,11 mm-^{1}; 2,8±0,07 mm^{-1} y de 2,86±0,15 mm^{-1}), que en el control OVX (2,57±0,25 mm^{-1}) de forma estadísticamente significativa

En cuanto a los parámetros relacionados con las trabéculas: el grosor trabecular (Tb.Th), el espacio entre trabéculas (Tb.Sp), el número de trabéculas que atravesaban el espacio (Tb.N) y el índice de

conectividad entre éstas (Tb.Pf), los grupos tratados mostraron valores significativamente superiores al control OVX. El grupo control no ovariectomizado superaba en todos los parámetros a los tres grupos de animales ovariectomizados.

La porción de hueso cortical es normal en las personas con osteoporosis, aunque las nuevas técnicas de densitometría y de imagen, son lo suficientemente sensibles y precisas como para detectar pequeñas deficiencias de hueso a este nivel.

De hecho, en nuestro estudio, los parámetros que medían el hueso cortical tanto en 2D (Ct.Th) como en 3D (Cs.Th) evidenciaron una diferencia sustancial entre los grupos I, III y IV y el grupo II (control OVX). Así, observamos un grosor de la pared cortical de 458,578±5,38 µm (Ct.Th) y 486,712±5,52 µm (Cs.Th) para el grupo EHL D2, de 440,970±5,96 µm (Ct.Th) y 415,623±9,81 µm (Cs.Th) en el grupo EHL D1 y de 312,933±2,16 µm (Ct.Th) y 423,948±1,44 µm (Cs.Th) en el grupo Control; mientras que el grosor de la cortical en el grupo OVX fue solamente de 142,757±4,89 µm (Ct.Th) y 142,033±4,13 µm (Cs.Th).

Por tanto, mediante la microtomografía computerizada, hemos observado efectos beneficiosos del tratamiento con EHL (ambas dosis) tanto en la región trabecular como en la cortical del fémur.

Además del estudio con µCT, realizamos el estudio anatomopatológico, en el que evaluamos el estado del hueso de forma general. También hicimos un estudio histomorfométrico en el que medimos mediante análisis de imagen, el grosor de las trabéculas de fémur y tibia.

En el estudio anatomopatológico de fémur y tibia de los dos grupos tratados, destacaba fundamentalmente, la menor disminución de la masa ósea y de desconexión entre las trabéculas, respecto al

control OVX. Destacaba el aumento del grosor de las mismas y los fenómenos de regeneración ósea, caracterizados por áreas laminales de depósitos de mineral osteoide que se disponían de forma superpuesta, de modo semejante al característico de la remodelación de las trabéculas óseas.

En el estudio histomorfométrico, en el caso del fémur, el mayor grosor trabecular fue observado en el grupo Control no OVX (91,55±33,72 µm), seguido por los dos grupos tratados, estando el EHL D2 por encima del EHL D1 (78,05±28,35 vs 71,21±23,94 µm), y por último el grupo OVX, que presentaba 66,28±18,71 µm.

En la tibia, las trabéculas más anchas se encontraban en el grupo tratado con EHL D1 con 73,58±22,97 µm, muy similar a los del grupo Control (72,40±22,5 µm). El grupo EHL D2 presentó valores más bajos (64,49±15,17 µm), pero superiores a los del grupo OVX (47,27±8,89 µm).

Ambos grupos tratados presentaron mayor grosor trabecular que el Control OVX, tanto en el fémur como en la tibia. Coincidiendo con los resultados obtenidos en el µTC, la dosis mayor de EHL fue muy efectiva sobre el fémur. Consideramos que este hecho posee gran relevancia clínica, por ser las fracturas a este nivel las que presentan una mayor prevalencia y complicaciones asociadas.

En el estudio ionómico, hemos determinado mediante espectrofotometría, la cantidad en gramos, por cada 100 gramos de muestra ósea, de los iones calcio (Ca), fósforo (P), boro (Br), magnesio (Mg) y zinc (Zn).

La determinación de la cantidad presente de estos iones es importante por formar parte de los componentes minerales principales de la matriz del hueso; el calcio y el fósforo formando parte de la propia

estructura ósea, y el magnesio, el boro y el zinc se encuentran en el interior de las células que forman parte de la matriz.

Los niveles de calcio y de fósforo están relacionados entre sí; el aumento o la disminución de uno implica alteración en los niveles del otro.

Respecto al calcio, sus niveles eran más elevados en ambos huesos en el grupo control (tibia: 28,79±2,42 g/100; fémur: 33,05±6,56 g/100g), seguido por la dosis más alta del EHL (tibia: 20,23±3,69 g/100g; fémur: 23,32±2,82 g/100g) y con unos valores muy inferiores la dosis baja de EHL (tibia: 12,55±9,3 g/100g; fémur: 14,45±9,65 g/100g) y todavía menores en el grupo OVX (tibia: 10,52±3,7 g/100g; fémur: 10,03±4,9 g/100g).

Respecto al fósforo, aunque en la mayoría de los trabajos consultados presenta un comportamiento similar al calcio, en nuestro estudio observamos que ambos grupos tratados presentaban niveles significativamente superiores que los controles OVX y no OVX. Debido a que este hecho no guarda relación con las características propias de la enfermedad consideramos que debe tener relación con el tratamiento administrado a los animales.

El boro, el magnesio y el zinc son elementos intercelulares de la matriz ósea y por tanto, su regulación no depende directamente de las hormonas.

Las mayores concentraciones de boro también se encuentran en el hueso (Murray, 1998), y en menor cantidad en el riñón, pulmón, nódulos linfáticos, hígado, testículos y cerebro (Nielsen, 1986). No se conoce con exactitud su función en el organismo, pero sí se sabe que es un componente esencial de la matriz ósea, otorgándole fuerza y consistencia y su concentración está relacionada con las

concentraciones de Ca, P, Mg y Zn, equilibrando las deficiencias cuando hay una disminución de los niveles de alguno de estos elementos (Nielsen, 1992).

Respecto al magnesio, un 70% del total del organismo se encuentra en el hueso, pudiendo reponerse en caso de alguna alteración, directamente del líquido intersticial del hueso, muy rico en minerales. A diferencia del calcio y del fósforo, no se conocen muy bien sus mecanismos de regulación (Bushinsky, 1999; Lemann, 1999).

Sobre el zinc, aproximadamente el 83% del total en el organismo se encuentra en el hueso, del cual un 95% es intracelular (López de la Romaña, 2010). Aunque su papel no está muy claro en la osteoporosis, estudios recientes han demostrado que ejerce una acción inhibidora sobre la resorción ósea (Bowman, 1998) y se ha demostrado que la administración de zinc-histidina en ratas ovariectomizadas previene la pérdida de masa ósea a nivel de fémur (Salman, 1993).

En nuestro estudio, en estos elementos intracelulares de la matriz ósea, observamos un comportamiento parecido entre ellos, similar en ambos huesos, encontrándose dentro de los valores de normalidad para la especie.

En las dos últimas décadas ha habido un interés científico creciente en el estudio de los efectos de determinados compuestos de la dieta sobre el aparato reproductor humano. En la actualidad, no hay duda de que muchas plantas poseen sustancias químicas con actividad estrogénica. Los principales grupos de “fitoestrógenos” no esteroideos presentes en la dieta son: isoflavonas (genisteína), lignanos, cumestanos y lactonas del ácido resorcíclico. En 1993, *Miksicek* publicó que muchos de los flavonoides presentes en las plantas podían unirse y activar los receptores estrogénicos (chalconas, flavanonas y flavonas).

Una de las moléculas con actividad estrogénica más estudiadas es la 8-prenilnaringenina (8-PN), uno de los principales componentes del extracto utilizado como tratamiento en nuestro trabajo. Existen evidencias de que el 8-PN puede ejercer una acción similar al estradiol sobre el tejido óseo, pero sus efectos no son selectivos sobre dicho tejido sino que también se producen a otros niveles: mama, ciclo menstrual, vagina o útero. Para *Hümpel* y colaboradores (2005), el tratamiento con 8-PN en ratas, protegía frente a la pérdida ósea secundaria a ovariectomía con efectos tróficos mínimos sobre el útero. Sin embargo, otros trabajos han documentado un crecimiento sustancial y rápido indeseable del endometrio uterino tras el tratamiento con 8-PN (Milligan, 2002).

En nuestro estudio, al realizar el análisis histomorfométrico del epitelio luminal del endometrio, observamos que el grupo Control sin operar ni tratar era el que presentaba mayor espesor (25,48±11,62 µm). Ambos grupos tratados presentaron grosores similares (EHL D1: 20,59±8,88 µm; EHL D2: 20,75±6,49 µm), que fueron inferiores a los del control no operado pero superiores al del control OVX (15±4,53 µm), aunque sin diferencias significativas. Es decir, en nuestro trabajo hemos observado la preservación de la morfología y función del endometrio de los animales ovariectomizados tratados con EHL, sin que éstos experimentaran una proliferación exagerada a este nivel. En cambio, en el grupo control OVX constatamos cambios atróficos del endometrio con disminución del espesor epitelial y disminución del número y tamaño glandular.

Por tanto, aunque en nuestro estudio el contenido en 8-PN presente en el EHL (1%) era muy inferior al utilizado por *Hümpel* (2005) (98%), coincidimos en que el tratamiento con este agente provoca una disminución de la pérdida de masa ósea secundaria a ovariectomía sin ocasionar efectos adversos sobre el útero. En cualquier caso, consideramos que son necesarias investigaciones futuras que nos

permitan conocer mejor el mecanismo de acción de esta molécula en los diferentes órganos y tejidos.

En resumen, la osteoporosis es una patología que se caracterizada por la pérdida progresiva de masa ósea debido a un desequilibrio en el remodelado óseo que provoca que las trabéculas sean más finas, estén menos conectadas y se originen microfracturas, y a largo o corto plazo, puedan provocar una fractura del hueso (González, 2004).

Los flavonoides son compuestos fenólicos muy abundantes en la naturaleza con capacidad antioxidante. Algunos de ellos poseen una estructura química muy similar a los estrógenos, y son capaces de unirse a sus receptores, activándolos, por lo que pueden ejercer una función análoga (Milligan, 2000; Schaefer, 2003). Por este y otros motivos, se está considerando su inclusión como suplemento alimentario.

El objetivo de nuestro estudio ha sido analizar el efecto de los flavonoides contenidos en el extracto de *Humulus Lupulus* L. sobre un modelo de osteoporosis secundaria a ovariectomía en ratas Sprague-Dawley a través de diferentes estudios: del peso de los animales, bioquímico general y de la fosfatasa alcalina ósea, estudio de la distribución de la masa ósea y cuantificación de la densidad mineral mediante microtomografía computerizada, estudio anatomo-patológico del grosor de las trabéculas óseas y del espesor del epitelio luminal del endometrio uterino a través del microscopio óptico, y por último, el estudio ionómico de los componentes químicos del hueso mediante espectrofotometría.

Para ello, utilizamos 40 ratas Sprague-Dawley distribuidas en cuatro grupos (n=10): I: Control; II: Control ovariectomía; III: Ovariectomía + EHL D1 (0,032 g/kg) y IV: Ovariectomía + EHL D2 (0,32 g/kg). La ovariectomía realizada a los grupos II, III y IV fue bilateral y tras cuatro meses de tratamiento, los animales fueron sacrificados para extraer los huesos fémur y tibia y los úteros para su

posterior análisis. Durante el experimento se pesó a los animales periódicamente y se les extrajo sangre para realizar el estudio bioquímico en tres tiempos: antes de ser tratadas, dos meses después de la intervención y al sacrificio.

Al final del estudio los animales tratados presentaron un retraso del aumento de peso comparado con el grupo intervenido sin tratar. En el estudio bioquímico, los niveles séricos de calcio y fósforo se mantuvieron estables en todos los grupos experimentales y los niveles de fosfatasa alcalina total y ósea descendieron en todos los grupos.

Sin embargo, nuestros resultados más relevantes fueron observados a nivel óseo. Así, tanto el grosor como el volumen de las trabéculas de los huesos de los animales tratados con EHL fueron mayores que en los animales ovariectomizados no tratados (constatado mediante histomorfometría y microtomografía computerizada). Estos animales, además, sufrieron menor pérdida de los minerales que conforman la matriz ósea que los controles operados, como confirmó el estudio ionómico. Al estudiar el epitelio endometrial uterino, observamos que el de los animales tratados con EHL mostraba proliferación y presencia de glándulas similar a la normalidad (control no operado), mientras que en los animales operados no tratados, dicho epitelio presentaba signos claros de atrofia.

Por todo ello, concluimos que la ingesta de EHL ha sido efectiva en el tratamiento de la osteoporosis provocada por deprivación hormonal en nuestro estudio, siendo necesario profundizar más en el conocimiento de este agente en futuros estudios que permitan clarificar su mecanismo de acción y seguir avanzando en su posible uso en clínica humana.

VIII. CONCLUSIONES

1. Todos los animales ovariectomizados aumentaron de peso significativamente respecto al control a lo largo del estudio. Dicho aumento era menos acusado al comienzo del experimento en los grupos tratados respecto al grupo de animales ovariectomizados sin tratar.

2. Los niveles séricos de calcio y fósforo se mantuvieron estables durante todo el estudio, sin diferencias entre los grupos experimentales. Los niveles de fosfatasa alcalina total y de su isoenzima ósea descendieron en todos los grupos a lo largo del estudio.

3. La microtomografía computerizada del fémur demostró mayor volumen óseo cortical y trabecular, siendo el grupo tratado con la dosis mayor el que presentaba valores más similares a los del hueso sano.

4. El estudio anatomo-patológico evidenció también mayor grosor trabecular en los animales tratados con EHL. Asimismo el espesor del epitelio endometrial fue mayor en los grupos tratados.

5. En el estudio ionómico los animales tratados mostraban niveles de calcio superiores a los del control ovariectomizado tanto en fémur como en tibia, con diferencias significativas en la tibia en el grupo tratado con la dosis mayor. Mientras; que la dosis menor mostró un aumento significativo de los niveles de boro, magnesio y zinc respecto a los controles ovariectomizados.

VII. 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, Obrien NM. Dietary flavonols: Chemistry, food content and metabolism. Nutrition 2002; 18: 75–81.

Ahmed HH, Morcos NYS, Eskander EF, Seoudi DMS, Shalby AB. Role of dehydroepiandrosterone in management of glucocortioid-induced secondary osteoporosis in female rats. Experimental and Toxicologic Pathology; 2012; 64: 659-664.

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

Alekel DL, Van Loan M, Koehler KJ, Hanson LN, Stewart JW, Hanson KB et al. The soy isoflavones for reducing bone loss study: a 3-y randomized controlled trial in postmenopausal women. Am J Clin Nur. 2010; 91: 218-230.

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

Argañaraz Martínez FE, Iruzubieta L, Rodríguez C, Burke S, Tereschuk ML, Peralta LE. Efecto de *Tagetes minuta* L. sobre el peso corporal de ratas obesas. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas 2007; 6 (6): 325-327.

Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC. Dietary Soybean Protein Prevents Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis.

Bagur AC, Mautalen CA. Risk for developing osteoporosis in untreated premature menopause. Calcif Tissue Int 1992; 51:4-7.

Brem JJ, Trulls HE, Ortíz de Rus ML, Picot JA, Brem JC. Concentración de minerals en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógeno y progesterona. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005.

Bolscher M, Netelenbos JC, Barto R, Van Buuren LM, Van der Vijgh WJF. Estrogen regulation of intestinal calcium absorption in the intact and ovariectomized adult rat. J. Bone Mine Res 1999; 14: 1197–1202.

Bowe J, Li X, Kinsey-Jones J, Heyerick A, Brain S, Milligan S, and O'Byrne K. The hop phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, reverses the ovariectomy-induced rise in skin temperature in an animal model of menopausal hot flushes. 2006. J Endocrinol; 191.

Bowman W. Farmacología, Bases Bioquímicas y Patológicas. Ed. Interamericana, Vol I y II, México, 1998.

Boyce RW, Franks AF, Jankowsky ML, Orcutt CM, Piacquadio AM, White JM, Bevan JA. Sequential histomorphometric changes in cancellous bone from ovariohysterectomized dogs. J. Bone Miner. Res; 1990: 5: 947-953.

Bushinsky DA. Calcium, magnesium and phosphorous: renal handling and urinary excretion. En: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society for Bone and Mineral Research. Lippincott Williams and Wilkins, 1999; 4: 67-74.

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

Castelo-Branco C, Haya Palazuelos J. Osteoporosis y menopáusica. 2 ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A, 2009.

Chang KL, Hu YC, Hsieh BS, Cheng HL, Hsu HW, Huang LW, Su SJ. Combined effect of soy isoflavones and vitamin D3 on bone loss in ovariectomized rats. Nutrition. 2013; 29: 250-257.

Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W. Effects of 8-prenylnaringenin on the hypothalamo-pituitary-uterine axis in rats after 3-month treatment, J. Endocrinol. 2006; 188: 397–405.

Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of US adults. J Nutr. 2007; 137 (5): 1244.

Chwalisz K, Stockemann K, Fritzemeier KH and Fuhrmann U. Modulation of oestrogenic effects by progesterone antagonists in the rat uterus. Hum Reprod Update. 1998; 4, 570–583.

Cons F. Marcadores Bioquímicos de Remodelado Óseo. Rev Metab Óseo Min, 2003; 1 (3): 91-98.

Consensus Development Conference on Osteoporosis. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. Hong Kong. Am J Med April 1993; 94: 646-650.

Cooper C, Campion G, Melton LJ. Hip fractures in the elderly: a wordwide projection. Osteoporosis Int 1992; 2: 285-289.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, biovailability and effects on health. Natural products reports; 2009: 26: 1001-1043.

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.

Cummings SR, Melton LJ III. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. Lancet 2002, 359: 1761-1767.

Daisy Miranda C, Laura Leiva B, José Pablo León S, Ma Pía de la Maza C. Diagnóstico y tratamiento de la deficiencia de vitamina D. Rev Chi Nutr; 2009: Vol. 36: 269-277.

Damilakis J, Maris TG, Karantanas AH. An update on the assessment of osteoporosis using radiology techniques. Eur Radiol. 2007; 17: 1591-602.

Davidson MK, Lindsey JR, Davis JK. Requirements and selection of an animal model. Isr J Med Sci 1987; 23: 551-555.

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

Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. Endocrinol Metab Clin North Am 1990; 19:1-19.

Diaz Curiel M, Carrasco de la Peña JL, Honorato Perez J, Perez Cano R, Rapado A, Ruiz Martinez I. Study of bone mineral density in lumbar spine and femoral neck in a Spanish population. Multicentre Research Project on Osteoporosis. Osteoporos Int 1997; 7: 59-64.

Díaz Curiel M, García JJ, Carrasco JL, Honorato J, Pérez Cano R, Rapado A, Álvarez Sanz C. Prevalencia de osteoporosis determinada

por densitometría en la población femenina española. Barecelona: Med Clin; 2001: 116: 86-88.

Díaz Curiel M, Moro MJ. Prevalencia de osteoporosis densitométrica en la población española. En: Díaz Curiel M, ed. Actualización en osteoporosis. Editorial FHOEMO. Madrid 2001: 3-11.

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

Diel P, Thomae RB, Caldarelli A, Zierau O, Kolba S, Schmidt S et al. Regulation of gene expression by 8-prenylnaringenin in uterus and liver of Wistar rats. 2004. Planta Med 70.

Duke JA. Handbook of energy crops. 2000.

Erkkola R, Vervarcke S, Vansteelandt S, Rompotti P, De Keukeleire D, and Heyerick A. A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over pilot study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts. 2010. Phytomedicine 17: 389-396.

FAO/WHO. Human Vitamin and Mineral Requirements. 2002.

Feeley KM, Wells M. Hormone replacement therapy and the endometrium. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54: 435–440.

Fukugawa M, Kurokawa K. Calcium homeostasis and imbalance. Nephron 92 2002; S1: 41-45.

Gay G, Debaud JC. Genetic study on indole-3 acetic acid production by ectomycorhizal 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.

Glerean M, Plantalech L. Osteoporosis en embarazo y lactacia. Buenos Aires: Medicina Buenos Aires; 2000: 60 (6): 973-981.

González Macías, J; Riancho Moral JA. Osteoporosis: Definición y etiología. En Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Jarpyo Madrid; 2004: 99-105.

Grupo de Trabajo de la Sociedad Española de Investigaciones Óseas y Metabolismo Mineral (SEIOMM). Osteoporosis postmenopáusica. Guía de práctica clínica. Rev Clin Esp 2003; 203 (10): 496-506.

Gundberg CM. Biochemical markers of bone formation. Clin Lab Med. 2000; 20: 489-501.

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

Heyerick A, Vervarcke S, Depypere H, Bracke M, De Keukeleire D. A first prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts, Maturitas 2006; 54: 164–175.

Hodgen GD, Goodman AL, O'Connor A, Johnson D. Menopause in rhesus monkeys . Model for study of disorders in the human climacteric. Am J Obstet Gynecol 1977; 127: 581-584.

Hoffmann G. Osteoporosis. Nueva York: Health alert; 2008: 34-37.

Hümpel M, Isaksson P, Schaefer O, Kaufmann U, Ciana P, Maggi A, Schleuning WD. Tissue specificity of 8-prenylnaringenin: Protection from ovariectomy induced bone loss with minimal trophic effects on the uterus. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology; 2005: 97: 299-305.

IOF World Congress on Osteoporosis & 10th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis. Osteoporos Int; 2010: 21: (Supl 1): S25–S388.

IOF. Epidemiología, costos e impacto de la osteoporosis en 2012; 2012.

Johannot L, Somerset SM. Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population. Public Health Nutr. 2006; 9 (8): 82-88.

Kanis JA, Devogelaer JP, Gennari C. Practical guide for the use of bone mineral measurements in the assessment of treatment of osteoporosis: a position paper of the European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease. Osteoporosis Int; 1996.

Kawakita S, Marotta F, Naito Y, Gumaste U, Jain S, Tsuchiya J et al. Effect of an isoflavones-containing red clover preparation and alkaline supplementation on bone metabolism in ovariectomized rats. Clinical Interventions in Aging; 2009: 4: 91-100.

Kerstetter JE, O'Brien K, Insogna KL. Dietary protein and intestinal calcium

King CS, Weir EC, Gundberg CW, Fox J, Insogna KL. Effects of continuous glucocorticoid infusion on bone metabolism in the rat. Calcif Tissue Int 1996; 59: 184–191.

Kneckt P, Kumpulainen J, Javinen J, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A et al. Flavonoid intake and rick of chronic diseases. Am J Clin Nutr; 2002; 76 (3): 560.

Komm BS, Bodine PVN. Regulation of Bone Cell Function by Estrogens. Osteoporosis 2nd Ed (I) 2001: 305-337.

Krizt-Silverstein D, Goodman-Guren DL. Usual Dietary Isoflavone Intake, Bone Mineral Density, and Bone Metabolims in Postmenopausal Women. Journal of Women's Health & Gender-Based Medicine. 2002; 11 (1): 69-80.

Le Bricon T, Gay-Bellile C, Cottu P, Benlakehal M, Guillon H, Houzé P. Lectin Affinity Electrophoresis of Serum Alkaline Phosphatase in Metastasized Breast Cancer. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2010; 24: 20-24.

Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as animal model for osteoporosis research. Comparative medicine. 2008; 58 (5): 424-430.

Lemann J, Favus MJ. The intestinal absorption of calcium, magnesium and phosphate. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society for Bone and Mineral Research. Lippincott Williams and Wilkins 1999; 4: 63-67.

Leung HW, Kuo CL, Yang WH, Lin CH, Lee HZ.: Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. Eur J Pharmacol 2006; 534 (1-3): 12–8.

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

López de Romaña D, Castillo C, Diazgranados D. El zinc en la salud humana-1. Rev Chil Nutr 2010; 37 (2): 234-239.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jiménez L. Polyfphenols: food

Martínez Álvarez JR, Valls Bellés V, Villarino Marín A. El lúpulo contenido en la cerveza, su efecto antioxidante en un grupo controlado de población. Centro de información Cerveza y Salud. Madrid. 2007; 16.

Meli R, Pacilio M, Raso GM, Esposito E, Coppola A, Nasti A, et al. Estrogen and Raloxifene Modulate Leptin and Its Receptor in Hypothalamus and Adipose Tissue form Ovariectomiezed Rats. Endocrinology. 2004; 145 (7): 3115-21.

Mendelsohn ME, Karas RH. Estrogen and the blood vessel wall. Current Opinion on Cardiology 1994; 9: 619-26.

Miksicek, RJ. Mol. Pharmacol. 1993; 44: 37‑43 .

Milewicz A, Tworowska U, Demissie M. Menopausal obesity -myth or fact? Climateric 2001; 4: 273-83.

Milligan SR, Kalita JC, Pocock V, Van de Kauter V, Stevens FJ, Deinzer ML, Rong H, and De Keukeleire D. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (Humulus lupulus L.) flavonoids. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 85. 2000.

Moyano FJ, Díaz M, Alarcón FJ, Sarasquete MC. Characterization of digestive enzyme activity during larval developement of gilthead seabream (Sparus aurata). Fish Physiol. Biochem; 1996; 15: 121-130.

Murray FJ. A comparative review of the pharmacokinetics of Boric Acid in rodents and humans. Biol Trace Elem Res 1998; 66: 331-41.

Nielsen FH. Other elements. En: Mertz W, editor. Trace elements in human and animal nutrition, Fifth Edition. Orlando: Academic Press, Inc, 1986, p, 420-63.

Nielsen FH, Schuler TR. Studies of the interaction between boron and calcium, and its modification by magnesium and potassium, in rats. Biol Trace Element Reser 1992; 35: 225-37.

Nieto L, Moratal D, Martí-Bonmatí L, Alberich A, Galant J. Caracterización morfológica de la estructura trabecular ósea mediante resonancia magnética de alta resolución. Radiología 2008; 50: 401-8.

Nordin BEC. Calcium In Human Biology. Springer Verlarg, Berlin 1988.

NIH consensus panel: Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. Am J Med. 1993; 94: 646-50

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

NIH. Consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis y therapy. JAMA; 2001: 14; 785-795.

Oria Mundín E. Factores preventivos y nutricionales de la osteoporosis. Ant Sist Sanit Navar; 2003: 26 (Supl. 3): 81-90.

Overka CR, Lucas JG, Daniel C, Minassic A, Appendinoc G, Chena SN et al. In vivo estrogenic comparisons of Trifolium pratense (red clover) Humulus lupulus (hops), and the pure compounds isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. Chemico-Biological Interactions. 2008; 176: 30–39.

Pastoureau P, Arlot ME, Caulin F, Barier P, Meunier PJ, Delmas PD. Effects of oophorectomy on biochemical and histological indices of bone turnover in ewes. J. Bone Min. Res; 1989: 4: Supl. 1: 477.

Prince RL. Counterpoint: Estrogen effects on calciotropic hormones and calcium homeostasis. Endoc. Rev 1994; 15: 301–309.

Rad M, Hümpel M, Schaefer O, Schoemaker RC, Schleuning WD, Cohen AF, Burggraaf J. Pharmacokinetics and systemic endocrine effects of the phyto-oestrogen 8-prenylnaringenin after single oral doses to postmenopausal women, Br. J. Clin. Pharmacol. 2006; 62: 288–296.

Ray JA, Kushnir MM, Bunker A, Rockwood AL, Meikle W. Direct measurement of free estradiol in human serum by equilibrium dialysis–liquid chromatography–tandem mass spectrometry and reference intervals of free estradiol in women. Clinica Chimica Acta 2012; 413: 1008–1014.

Rayón, E. Manual de Enfermería Médico-quirúrgica. Volumen II. Editorial Síntesis. Madrid. 2000.

Ren W, Qian Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: Promising anticancer agents. Medicinal Res Rev. 2003; 23 (4): 519–534.

Rimoldi G, Christoffel J, Wuttke W. Morphologic changes induced by oral long-term treatment with 8-prenylnaringenin in the uterus, vagina, and mammary gland of castrated rats, Menopause 2006; 13: 669–677.

Riggs BL, Khosla S, Melton LF. A unitary model for involutional osteoporosis: Estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. J. Bone Miner Res 1998; 13: 763–773.

Riggs BL, Melton LJ. Osteoporosis: diagnóstico y tratamiento. Nueva York Raven Press, 1998: 171-271.

Riggs BL**,** Parfitt MA. Drugs used to treat Osteoporosis: The critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodelling. J. Bone Min. Res; 2005. 30: 117-184.

Rodgers JB, Monier-Faugere M-C, Malluche H. (1993) Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. Bone 1993; 14: 369-377.

Saag KG, Koehnke R, Caldwell JR, Brasington R, Burmeister LF, Zimmerman B et al. Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events. Am J Med 1994; 96: 115-123.

Salman P, Strausse, L. The role of trace minerals in osteoporosis. J. Am Coll Nutr. 1993; 12: 384-389.

Schaefer O, Bohlmann R, Schleuning WD, Schulze-Forster K. Development of a radioimmunoassay for the quantitative determination

of 8-prenylnaringenin in biological matrices. J. Agric. Food Chem. 2005; 53: 2881–2889.

Schaefer O, Hümpel M, Fritzemeier KH, Bohlmann R, Schleuning WD. 8-Prenyl naringenin is a potent ERα selective phytoestrogen in hops and beer, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2003; 84: 359–360.

Seeman E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. Lancet 2002; 359: 1841-1850.

Shirwaikar A, Khan S, Malini S. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of Cissus quadragularis Linn. on ovariectomized rat. Journal of Ethnopharmacology. 2003; 89: 245-250.

Shuller H, Frentzen M, Jervoe-Storm ZA, Brings ZA, Nolden R. La tomografia computarizada de alta resolución en parodontología. Comparación con el procedimiento radiológico convencional (1). Quintessence 1992; 43: 651-6.

Schurman L, Bagur A, Claus-Hermberg H, Messina OD, Negri A, Sánchez A. Guías para diagnostic, prevención y tratamiento de la osteoporosis. Actualizaciones en Osteología; 2007: 3 (3): 117-136.

Slemenda CW, Miller JZ, Hui SL, et al. Role of physical activity in the development of skeletal bone mass in children. J Bone Miner Res 1991; 6: 1227-33.

Sociedad española de reumatología. Manual de enfermedades óseas. 2 ed. Editorial Panamericana; 2010.

Swarnkar G, Sharan K, Siddiqui JA, Chakravarti B, Rawat P, Kumar M, et al. A novel flavonoid isolated from the steam-bark of Ulmus Wallichiana Planchon stimulates osteoblast function and inhibits

osteoclast and adipocyte differentiation. European Journal of Pharmacology 2011; 698: 65–73.

Takayanagi R. Hormones and osteoporosis update. Adrenal androgen and bone. Clin Calcium 2009; 19: 963–969.

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

Torres A, Cannata JB. Metabolismo calcio-fósforo y sus alteraciones. Nefrologíamclínica. Ed. por Hernando et al. Editorial Médica Panamericana, Madrid 2003: 91-101.

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

Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. Endocr. Rev. 1994; 15: 275–300.

Wang J, Mazza G: Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. J Agric Food Chem, 2002, 50: 4183-4189.

Wang P, Hassager C, Ravn P, Wang S, Christiansen C. Total and regional body-composition changes in early postmenopausal women: age related or menopausal related? Am J Clin Nutr 1994; 60: 843-8.

Watkins BA, Reinwald S, Li Y, Seifert MF. Protective actions of soy isoflavones and n-3 PUFAs on bone mass in ovariectomized rats. Journal of Nutritional Biochemistry 2005; 16: 479–488.

WHO Regional Office for the Western Pacific. Basic Theories. In WHO International Standard Terminologies on Traditional Medicine in the Western Pacific Region; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2007; p.

Youdim KA, McDonald J, Kalt W y Joseph JA: Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). J Nutr Biochem, 2002, 13:282-288.

Zanoli P, and Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of Humulus lupulus L. Journal of Ethnopharmacology. 2008; 116: 383-396.

Zeni S, Gómez-Acotto C, Mautalen C. The Effect of Olpadronate in Ovariectomized Thyroxine-Treated Rats. Bone. 1997; 21 (4): 329-333.

Zhang Y, Li XL, Lai WP, Chen B, Chow HK, Wu CF et al. Anti-osteoporotic effect of Erythrina variegata L. in ovariectomized rats. Journal of Ethnopharmacology 2007; 109: 165–169.