

**Doctorado en Ciencias Biomédicas
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Rosario**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE
MONOFLUOROFOSFATO DE SODIO
SOBRE LA REMODELACIÓN ÓSEA EN RATAS.
EVALUACIÓN DEL EFECTO COMBINADO
CON DROGAS ANTI-REABSORPTIVAS.**

Médica María Lorena Brance

Director: Dr. Alfredo Rigalli

2014



Laboratorio de Biología Ósea

www.biologiaosea.com.ar

*A Jazmín y Ambar,
mis soles, que iluminan cada segundo de mi vida,
y que me acompañaron desde el comienzo y crecieron junto a esta tesis doctoral.*

A toda mi familia por el tiempo que les resté....

1	RESUMEN.....	5
2	INTRODUCCIÓN.....	8
2.1	FUNDAMENTACIÓN.....	8
2.2	ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL TEJIDO ÓSEO.....	10
2.2.1	Remodelación ósea.....	14
2.2.2	Diferenciación de osteoblastos.....	16
2.2.3	Diferenciación de osteoclastos.....	19
2.2.4	Regulación del remodelado óseo.....	20
2.2.5	Mineralización del tejido óseo.....	22
2.2.6	Marcadores de remodelado óseo.....	23
2.3	OSTEOPOROSIS Y TRATAMIENTO.....	29
2.3.1	Bisfosfonatos.....	31
2.3.2	Fluoruro de sodio y monofluorofosfato de sodio.....	34
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	GENERALES.....	41
3.2	ESPECÍFICOS.....	41
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
4.1	ANIMALES.....	43
4.2	GRUPOS EXPERIMENTALES.....	44
4.3	MODELO QUIRÚRGICO DE OVARECTOMÍA.....	45
4.3.1	Anestesia.....	46
4.3.2	Analgesia.....	46
4.3.3	Eutanasia.....	46
4.4	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.....	46
4.4.1	Calcemia.....	46
4.4.2	Fosfatemia.....	47
4.4.3	Calciuria.....	47
4.4.4	Fosfatasa alcalina total.....	47
4.4.5	Fosfatasa alcalina ósea.....	47
4.4.6	Deoxipiridinolina urinaria.....	48
4.4.7	Hormona paratiroidea.....	48
4.4.8	Fluoremia.....	48
4.5	DETERMINACIÓN DE DENSIDAD MINERAL ÓSEA.....	49
4.6	HISTOMORFOMETRÍA ÓSEA.....	49
4.6.1	Preparación de muestras histológicas.....	49
4.6.2	Análisis de imágenes digitales. Determinación de parámetros histomorfo-métricos a 40x.....	50
4.6.3	Análisis de imágenes digitales. Determinación de parámetros histomorfo-métricos a 400x.....	52
4.7	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	54
4.8	ÁNALISIS MORFOMÉTRICO.....	54
4.9	ESTUDIOS BIOMECÁNICOS.....	56
5	RESULTADOS.....	63
5.1	EVALUACIÓN A LOS 30 DÍAS.....	63
5.1.1	Peso uterino.....	63
5.1.2	Determinaciones bioquímicas.....	63
5.1.3	Glándulas paratiroideas.....	64
5.1.4	Histomorfometría ósea.....	64
5.1.5	Morfometría cortical.....	66
5.1.6	Estudios biomecánicos.....	67

5.2	EVALUACIÓN A 90 DÍAS.....	70
5.2.1	<i>Determinaciones bioquímicas</i>	70
5.2.2	<i>Histomorfometría ósea</i>	70
5.2.3	<i>Estudios biomecánicos</i>	71
5.2.4	<i>Morfometría cortical</i>	72
5.2.5	<i>Inmunohistoquímica</i>	73
5.3	EVALUACIÓN A LOS 150 DÍAS.....	76
5.3.1	<i>Determinaciones bioquímicas</i>	76
5.3.2	<i>Histomorfometría ósea</i>	77
5.3.3	<i>Morfometría cortical</i>	80
5.3.4	<i>Estudios biomecánicos</i>	81
5.3.5	<i>Contenido y densidad mineral ósea por DXA</i>	82
6	DISCUSIÓN.....	85
7	ANEXO.....	93
7.1	PREPARACIÓN DE DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO DE CALCIO.....	93
7.2	CORRECCIÓN DE VARIABLES BIOMECÁNICAS EN FUNCIÓN DEL PESO CORPORAL....	95
8	ABREVIATURAS	99
9	RESULTADOS PUBLICADOS	103
10	AGRADECIMIENTOS	107
11	REFERENCIAS	109

1 RESUMEN

La osteoporosis se caracteriza por pérdida de masa ósea con alteraciones en la microarquitectura ósea resultando en un aumento en el riesgo de fractura. Es conocido que el ácido zoledrónico (Z) disminuye la resorción ósea, mientras que el monofluorofosfato de sodio (MFP) aumenta la formación ósea. Se ha planteado la hipótesis que el efecto del MFP sería más efectivo sobre un hueso expuesto a alto estado de remodelación, debido a los factores de crecimiento liberados de la matriz ósea. Sobre esta hipótesis se evaluó el efecto de un tratamiento secuencial con MFP y ácido zoledrónico en ratas ovariectomizadas (OVX) con modificaciones simultáneas de la remodelación ósea empleando dietas con diferente contenido de calcio. Se utilizaron ratas Sprague Dawley de 7 semanas (n=7/grupo). Las ratas fueron ovariectomizadas, alimentadas con dieta hipocálcica por 30 días, tratadas con MFP y dieta hipercálcica por 60 días y finalmente con ácido zoledrónico y dieta hipercálcica (OVX.G3) hasta finalizar el tratamiento (150 días). Se realizaron controles: Sham: cirugía simulada, OVX: OVX sin tratamiento, OVX.G1: OVX con tratamiento secuencial con MFP y ácido zoledrónico pero con dieta normocálcica, OVX.G2: OVX con dieta hipo e hipercálcica sin tratamiento. Se realizaron mediciones bioquímicas de marcadoras de metabolismo óseo tanto plasmáticas como urinarias a 30, 90 y 150 días. Luego del sacrificio se extrajeron las tibias, en las cuales se realizó histomorfometría estática en tibia derecha y se analizó la morfometría y la densidad mineral ósea en tibia izquierda, y los fémures donde se realizaron determinaciones biomecánicas.

A 30 días se halló una disminución del volumen óseo trabecular, un aumento de la fuerza de fractura cortical con disminución de la fuerza máxima trabecular en el grupo OVX alimentado con dieta normocálcica. El grupo OVX tratado con dieta hipocálcica demostró a 30 días un aumento del remodelado óseo, un incremento en el porcentaje de superficie erodada, mayor número de osteoclastos y menor fuerza de fractura trabecular.

A 90 días no se hallaron diferencias en los parámetros histomorfométricos ni en las variables biomecánicas entre los diferentes grupos.

A 150 días el grupo que recibió dieta hipo e hipercálcica y tratamiento con MFP y ácido zoledrónico presentó disminución del remodelado óseo, aumento de la densidad mineral ósea y aumento del volumen óseo trabecular a expensas de un aumento del número de trabéculas.

Estos resultados se reflejaron en un aumento de la fuerza de fractura a la compresión y un aumento de la rigidez del hueso trabecular. A nivel cortical se observó un aumento en la fuerza de fractura. Las modificaciones en los parámetros mencionados no fueron observadas en los grupos controles.

Se concluye que el tratamiento secuencial con MFP y ácido zoledrónico es más efectivo con la combinación de dietas hipo e hipercálica que el tratamiento secuencial con MFP y ácido zoledrónico sobre un hueso sin remodelado óseo aumentado.

INTRODUCCIÓN

2 INTRODUCCIÓN

2.1 FUNDAMENTACIÓN

La pérdida de masa ósea que conduce a osteopenia y osteoporosis es un serio problema de salud pública. Son varias las drogas utilizadas para evitar esta pérdida o aumentar la masa ósea y todas están orientadas a modificar la remodelación ósea, proceso por el cual el hueso mantiene su estructura y función. Los mecanismos de acción de varias de las drogas actualmente utilizadas aún son motivo de estudio. En general están orientados a modificar la resorción o la formación ósea, existiendo pocos trabajos en los que se ha intentado modificar ambos procesos simultáneamente.

El monofluorofosfato de sodio (MFP) es un compuesto con flúor (F) en su estructura que puede generar fluoruro (F⁻), anión que tiene acción osteoformadora por acción directa sobre los osteoblastos [1]. Se ha demostrado que el MFP tiene mejor biodisponibilidad que el fluoruro de sodio (NaF) [2]. El mecanismo de acción del fluoruro se basa en su actividad inhibidora de una enzima tirosina fosfatasa ácida del osteoblasto y se ha demostrado que el fluoruro actúa sólo sobre los precursores de osteoblastos si hay factores de crecimiento presentes [3]. Por otro lado la unión de MFP a las alfa-macroglobulinas [4] determina que el MFP tenga un potencial mecanismo de acción sobre los osteoblastos adicional al mencionado anteriormente, a través de efectos sobre las vías de señalización mediadas por proteínas Wnt, involucradas en la diferenciación y proliferación de osteoblastos.

Los bisfosfonatos, por su parte, inhiben la acción de los osteoclastos disminuyendo su adherencia a la matriz ósea y aumentando la apoptosis de los mismos [5] así como actúan positivamente sobre la viabilidad de los osteoblastos y los osteocitos [6].

La remodelación ósea es un mecanismo secuencial que comienza con la resorción a cargo de los osteoclastos, produciendo una zona de resorción y liberando citoquinas que producirían la diferenciación y proliferación de los osteoblastos [7]. Luego de una fase de reversión, los osteoblastos rellenan con matriz ósea el defecto producido por los osteoclastos en un período de tiempo mayor que el empleado para la resorción y finalmente esta matriz se mineraliza, a una velocidad dependiente de la presencia de diversos factores como calcio, fosfato, pirofosfato y diversas proteínas no colágenas. Se denomina Unidad Básica Multicelular (BMU, *Basic Multicellular Unit*) a la zona del tejido óseo donde ocurren estos procesos y es evidente que una droga osteoformadora no hará efecto durante la fase osteoclástica y lo mismo

ocurrirá con una droga anti-resortiva durante la fase de formación. Un dato adicional es que las BMU no se encuentran en fase, mientras algunas están en etapa de resorción, otras pueden estar en reversión o formación.

Ciertos factores hormonales y parácrinos regulan la acción de las células óseas. La hormona paratiroidea (PTH), que se libera por el descenso del calcio iónico del plasma, estimula la resorción ósea, por acción indirecta sobre el osteoclasto. La acción del osteoclasto libera factores de crecimiento de la matriz ósea que estimulan la diferenciación y proliferación de los osteoblastos [8]. El aumento de la disponibilidad de calcio deprime la secreción de PTH, a la vez que estimula liberación de calcitonina, que entre otras tiene la función de disminuir la acción de los osteoclastos.

Dado que no existe información donde se haya intentado modificar la secuencia de remodelación con fines terapéuticos, este proyecto propone modificar secuencialmente los mecanismos involucrados en la remodelación ósea combinando drogas que actúen en los estadios adecuados para aumentar la masa ósea y de los resultados obtenidos obtener información sobre el mecanismo de acción del monofluorofosfato.

Se aplicaron las siguientes secuencias a tal fin:

- 1) Administración de una dieta hipocálcica de manera de producir un aumento del estado de resorción ósea y liberación de factores de crecimiento.
- 2) Cambio a una dieta hipercálcica a fin de proveer calcio en forma adecuada para la acción osteoformadora del MFP, el cual se administró conjuntamente. El mantenimiento de este tratamiento por un intervalo de tiempo conduciría a la acción sostenida de osteoblastos y al relleno de los defectos producidos por los osteoclastos.
- 3) Al final de este proceso se suspendió el MFP pero se mantuvo la dieta hipercálcica hasta el final del experimento de manera de contribuir al proceso de mineralización del tejido óseo neoformado. En este período se incorporó el bisfosfonato a modo de contribuir al mantenimiento de bajos niveles de resorción.

Esta situación no podría mantenerse indefinidamente debido a que el tejido óseo perdería la capacidad de remodelación, proceso que contribuye a mantener las propiedades del tejido. La

repetición de las secuencias mencionadas contribuiría a mantener la estructura y aumentar la masa ósea.

Se realizaron experimentos en ratas normales y con osteoporosis inducida por ovariectomía. El efecto de los tratamientos a lo largo del tiempo se evaluó a través de la realización de diferentes estudios como marcadores bioquímicos de remodelado óseo, densitometría ósea, histomorfometría estática ósea, inmunohistoquímica, análisis morfométrico y biomecánica de los huesos a nivel cortical y trabecular.

A continuación se detallan los fundamentos teóricos existentes que sustentan este trabajo de tesis.

2.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

El hueso está formado por tejido óseo, hematopoyético, adiposo, vasos sanguíneos, nervios y en las articulaciones presenta cartílago hialino.

Los huesos presentan dos tipos de tejido óseo: tejido compacto o cortical y trabecular o esponjoso. Al realizar un corte transversal del hueso el tejido compacto se reconoce como una capa densa, formando la capa externa del hueso. Mientras que en el interior del hueso puede reconocerse un tejido formado por finas espículas anastomosadas, con aspecto de esponja, siendo este el tejido trabecular.

El tejido óseo está formado por células y matriz extracelular mineralizada. Las principales células que intervienen en el proceso de formación ósea son: las *células osteoprogenitoras* las cuales contribuyen a mantener la población de osteoblastos; los *osteoblastos* encargados de sintetizar la matriz ósea; los *osteocitos* organizados en el interior de la matriz ósea; las *células planas* protegiendo la superficie ósea; y los *osteoclastos* involucrados en la resorción ósea.

Células osteoprogenitoras. Derivan de las *stem cells* y pueden diferenciarse a células madres hematopoyéticas o células madres mesenquimáticas, éstas últimas representan un 15% del total, dando origen a osteoblastos, aunque también pueden diferenciarse a condrocitos, adipocitos o fibroblastos.

Aproximadamente el 90% de la fracción orgánica del hueso está constituido por colágeno siendo el colágeno tipo I el más abundante, aunque también se encuentran el tipo II y V. Las proteínas no colágenas de la matriz son la osteocalcina, la osteopontina y la sialoproteína ósea, entre otras.

Osteoblastos. Los preosteoblastos se encuentran cerca de la superficie ósea pudiendo detectarse químicamente por la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, la cual es uno de los marcadores más tempranos de su fenotipo. El osteoblasto maduro se distingue por cambios morfológicos y ultraestructurales, caracterizado por la presencia de gran núcleo y aparato de Golgi, y un extenso retículo endoplasmático rugoso. Son los encargados de secretar colágeno tipo I y proteínas especializadas de la matriz ósea. Estas sustancias secretadas, antes de sufrir mineralización se conocen como osteoide [9].

Células planas. Sobre la superficie ósea quiescente, descansa una capa de células planas, los osteoblastos adelgazados. Estas células óseas inactivas separan la superficie ósea endóstica de la médula ósea o yacen en el periostio directamente sobre la superficie mineralizada. Tanto osteoblastos como las células planas están en estrecho contacto entre ambas a través de uniones adherentes. Las caderinas, proteínas transmembrana dependientes de calcio, forman parte de estas uniones, y junto con las uniones estrechas y los desmosomas unen a las células anclando sus citoplasmas [9].

Osteoclastos. El osteoclasto es una célula multinucleada encargada de la resorción ósea que se origina de la línea hematopoyética monocítica macrofágica.

Durante varios años se pensó que los osteoclastos no presentaban receptores de PTH y sus acciones eran indirectas mediadas por osteoblastos. Dempster y col [10] demostraron por inmunohistoquímica, Western blot, medición de expresión de ARNm y tratamiento con PTH en cultivos de osteoclastos, que PTH presenta un efecto directo en osteoclastos, y este es mediado por el receptor tipo 1 para PTH (PTH1R), además de actuar vía osteoblasto.

Otro hecho clave es la capacidad que tiene el osteoclasto en crear un microambiente con la matriz ósea subyacente. Este compartimiento es acidificado debido a la presencia de una bomba de protones (H^+ /ATPasa) acoplada a un canal de cloruro (Cl^-) y a un intercambiador Cl^-/HCO_3^- , este último a nivel de la membrana basolateral, llevando el pH a 4,5 [11]. El ácido disuelve el componente óseo mineralizado, exponiendo a las proteínas de la matriz, las cuales son degradadas por enzimas como catepsina K, fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), metaloproteasas y gelatinasa (Figura 1) [12].

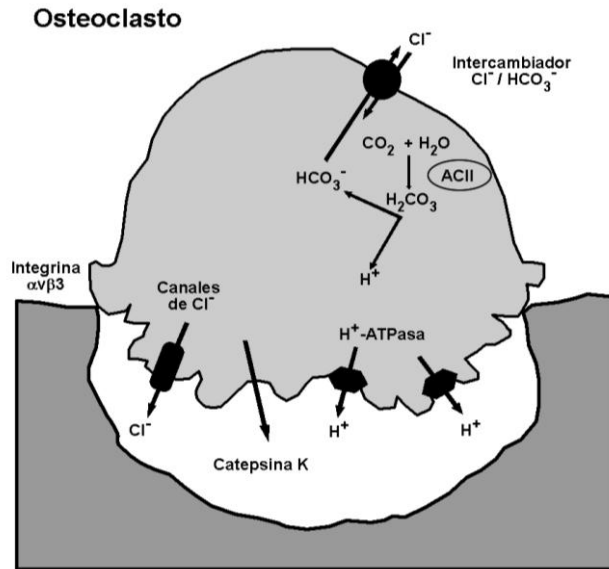


Figura 1. Mecanismos de resorción ósea producidos por osteoclastos.

Abreviaturas: Cl^- : cloruro; ACII: anhidrasa carbónica II; HCO_3^- : bicarbonato.

La integrina $\alpha v \beta 3$ es la principal integrina vinculada a la resorción ósea [13]. Esta tiene la capacidad de reconocer secuencias de aminoácidos Arg-Gli-Asp, los cuales están presentes en la mayoría de las proteínas óseas, como osteopontina y sialoproteína. De esta forma el osteoclasto se adhiere a la superficie ósea. Otra de las características del osteoclasto es la presencia de una membrana festoneada, hecho que se debe a la disposición en anillo y polarización de las fibrillas de actina, conocido como anillo de actina [14].

El osteoclasto migra hacia la zona de resorción gracias a la formación de lamelipodios que se originan por la reorganización del citoesqueleto de actina. Son claves en este proceso las proteínas codificadas por el protooncogen c-Src y proteínas de la familia GTPasa Rho [15].

Osteocitos. Los osteocitos componen el 90 a 95% de la totalidad de las células óseas del esqueleto adulto y son las principales células en responder a estímulos mecánicos y enviar señales que activen la resorción o formación ósea en un proceso denominado modelación ósea [16]. Estas son el último estadio de diferenciación de los osteoblastos y se encuentran rodeados de matriz ósea. Debido a su disposición en el tejido óseo pueden percibir estímulos mecánicos y hormonales los cuales inician la reparación y remodelación del tejido óseo. Los osteocitos están comunicados entre sí a través de uniones gap formados a su vez por la unión de dos hemicanales en células adyacentes, cada uno compuesto de seis moléculas de conexina, siendo la conexina 43 la más importante a nivel óseo [17,18]. Estos canales

normalmente cerrados se abren de forma transitoria ante determinados estímulos que aumentan la concentración intracelular de calcio regulando la transcripción de genes que involucran a la prostaglandina E2, ciclooxigenasa 2, kinasas, Runx2 y óxido nítrico [16].

Síntesis de la matriz ósea. Para la formación ósea los precursores osteoblásticos deben migrar desde la médula ósea hacia la superficie ósea, diferenciarse a osteoblastos maduros y depositar matriz ósea. Varios factores como factor de crecimiento fibroblástico (FGF-2), factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y proteínas óseas morfogenéticas-2 (BMP-2) no sólo son potentes agentes quimiotácticos para precursores osteoblásticos sino que presentan también efectos en su crecimiento y diferenciación [19]. Estos factores junto con integrinas y proteínas de la matriz extracelular como osteopontina, sialoproteína ósea, vitronectina, colágeno tipo I y fibronectina, son fundamentales en estos últimos dos efectos [20].

La síntesis de la matriz ósea por osteoblastos se inicia gracias a la interacción célula-célula y célula-matriz por medio de varios tipos de proteínas de adhesión. Entre ellas, las integrinas contactan proteínas de la matriz extracelular con proteínas estructurales del citoesqueleto mediante señales que modulan la diferenciación celular, la organización del citoesqueleto, la adhesión celular y cambios en la forma celular [21]. Las integrinas $\beta 1$ juegan un rol clave en la diferenciación de osteoblastos al unirse a varias proteínas colágenas e inducir señales que llevan a la expresión de genes fenotípicos de osteoblastos [22]. La interacción entre el colágeno tipo I de la matriz con las integrinas $\alpha 1\beta 1$ o $\alpha 2\beta 1$ activa la vía de señalización que involucra a la MAPK [21].

En base a estudios realizados *in vitro*, la síntesis de la matriz ósea puede dividirse en tres estadios: proliferación, maduración y desarrollo de matriz extracelular y mineralización. La expresión de genes vinculados a colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína ósea, péptido relacionado a PTH (PTHrp) y el receptor de PTH están regulados asincrónicamente en función de la diferenciación de las células progenitoras, los cambios en la matriz ósea y la mineralización del osteoide. Así, la fosfatasa alcalina y el receptor de PTH son marcadores tempranos en las células osteoprogenitoras que aumentan a medida que los osteoblastos maduran y depositan matriz ósea, disminuyendo en su transición a osteocitos; mientras que la osteocalcina es un marcador tardío asociado a la mineralización del osteoide [21].

Los osteoblastos son los responsables de la mineralización de la matriz extracelular cuando inducen la expresión de fosfatasa alcalina y proteínas óseas especializadas que hacen a la

matriz extracelular competente para el depósito mineral. La mineralización se produce por una sobreexpresión de varias proteínas no colágenas (osteocalcina, osteopontina, sialoproteína ósea). El calcio (Ca) y fósforo (P) contenido en las proteínas podría regular el depósito de mineral ordenado, la cantidad de cristales de hidroxapatita y el tamaño de los mismos.

2.2.1 Remodelación ósea

La remodelación ósea es un proceso por el cual el tejido óseo mantiene una continua renovación de su matriz ósea orgánica y mineral, para lo cual requiere del acoplamiento entre osteoclastos y osteoblastos. La remodelación ósea consta de 5 fases: activación, resorción, reversión, formación y mineralización [7,23] (Figura 2).

Una de las actividades de los preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos es la producción de factores parácrinos y autócrinos para la regulación del reclutamiento de células osteoprogenitoras, el crecimiento de preosteoblastos, el control de la resorción ósea y de la mineralización de la matriz.

Ese microambiente óseo es por lo tanto esencial para dos componentes de la osteoclastogénesis: por un lado para la maduración y fusión de las células mononucleares precursoras de los osteoclastos y por otro lado para la actividad de los mismos.

En la *fase de activación*, las células mononucleadas precursoras de osteoclastos, se reclutan en cercanía a la superficie ósea cubierta por células planas, para posteriormente fusionarse y formar grandes células multinucleadas, los osteoclastos. La formación, activación, y actividad de los osteoclastos están reguladas por citoquinas secretadas localmente y también por factores sistémicos [24,25].

Durante la *fase de resorción ósea*, gracias a la actividad de los osteoclastos se produce por un lado un descenso del pH en el espacio comprendido entre el osteoclasto y matriz ósea [11], y por otro lado la liberación de enzimas que producen la degradación de esta matriz. Esta fase presenta una duración estimada en 10 días [26]. Si bien los osteoclastos son las células que producen la resorción ósea, hay evidencia *in vivo* e *in vitro*, que las células mononucleadas pueden producir también resorción ósea [10]. La fase de resorción ósea finaliza con la apoptosis de los osteoclastos y continua con la fase de reversión, cuya duración es similar a la anterior. Durante esta fase, la laguna de resorción es poblada por células mononucleares, que incluyen a los monocitos, a osteocitos que fueron liberados del hueso cuando los osteoclastos lo oradaron y preosteoblastos que son reclutados para comenzar luego la formación ósea. Durante esta *fase de reversión* hay importantes señales de

acoplamiento entre las células que permiten que los osteoclastos sean reemplazados por osteoblastos. Una de las hipótesis es que ciertos factores actuarían en estas señales como lo son los factores de crecimiento derivados de la matriz, como factor de crecimiento transformante β (TGF- β , *transforming growth factor- β*), factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I, *insulin-like growth factor I*), factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF-II, *insulin-like growth factor II*), proteínas óseas morfogenéticas (BMP, *bone morphogenetic proteins*), factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factors*) y factor de crecimiento fibroblástico (FGF, *fibroblast growth factor*).

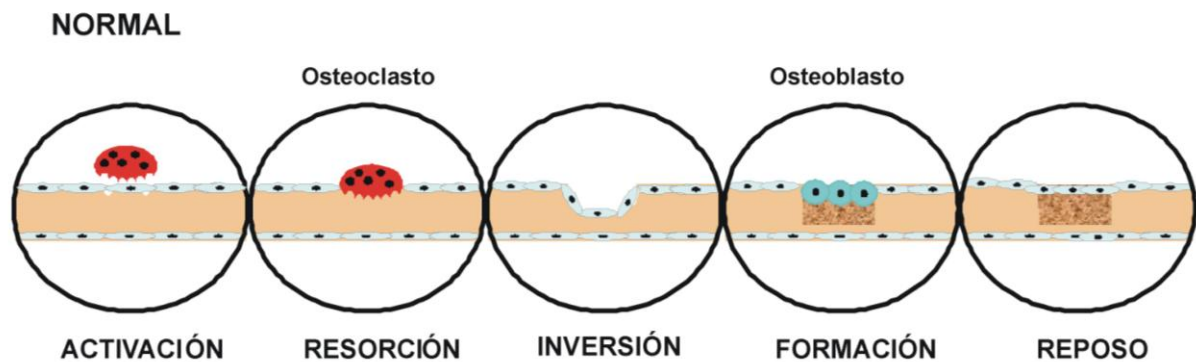


Figura 2. Ciclo de remodelación ósea en condiciones normales

En la *fase de formación* los osteoblastos inicialmente sintetizan la matriz orgánica y luego regulan su mineralización. Cuando la matriz orgánica es secretada los osteoblastos comienzan la mineralización mediante liberación de pequeñas vesículas, llamadas vesículas de matriz, que aportan condiciones adecuadas para iniciar el depósito de minerales por concentración de Ca y fósforo y a su vez por degradación enzimática de inhibidores de la mineralización como pirofosfato y proteoglicanos presentes en la matriz extracelular. A medida que la formación continúa, los osteoblastos quedan embebidos en la matriz y se transforman en osteocitos. Estos a través de importantes uniones presentes entre ellos tienen la propiedad de detectar cambios mecánicos y así transmitir información y adecuar el modelado según las necesidades. Cuando los osteoblastos cumplen su función, un 50 a 70% muere por apoptosis, una fracción se transforma en osteocitos o quedan en la superficie como células planas. Las células planas sirven principalmente para regular el flujo de iones entre el espacio extracelular y el hueso, actuando como una barrera hemato-ósea. Se ha descrito que ante determinadas circunstancias como el estímulo por PTH o fuerzas mecánicas, las células planas pueden volver a convertirse en osteoblastos [27,28]. El resultado neto de cada ciclo de remodelación

más importantes para la diferenciación del linaje de los osteoblastos: las BMP y el sistema Wnt^I. Otros reguladores importantes son el IGF-I y la leptina [29].

Las BMP son miembro de la superfamilia del TGF- β , el cual incluye activinas e inhibinas. Cuando las BMP se unen a los receptores predimerizados tipo I y II (RI-RII), las proteínas Smad^{II} 1 y 5 son fosforiladas, se asocian a Smad 4, y se traslocan al núcleo para regular la transcripción genética. Otra vía utilizada por estas proteínas involucra la unión al RII, una kinasa intrínseca que fosforila y activa al RI. Este complejo formado activa a la proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK, *mitogen activated protein kinase*) para también regular la transcripción génica y de esta forma llevar a la osteoblastogénesis [30].

Otra de las cascadas de señalización intracelular que controla la osteoblastogénesis es el sistema Wnt/ β -catenina [31]. Los osteoblastos expresan el receptor LRP (*low-density lipoprotein receptor-related protein*: proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad) en sus isoformas LRP5 y LRP6. Está demostrado que mutaciones que ocasionan pérdida de función de LRP5, co-receptor del ligando Wnt, causa pérdida de masa ósea [32] mientras que mutaciones que producen mayor actividad producen mayor masa ósea [33]. La vía canónica Wnt estimula la osteoblastogénesis al estimular la proliferación preosteoblástica y su diferenciación y al reducir la apoptosis de osteoblastos. La acción de Wnt sobre el osteoblasto requiere la heterodimerización del receptor LRP5/6 y el receptor Frizzled. En ausencia de dimerización de los receptores, la enzima glucógeno sintetasa kinasa 3 (GKS-3 β , *glycogen synthase kinase 3 β*) se encuentra formando un agregado molecular con las proteínas axina y proteína supresora del gen de la poliposis colónica familiar (APC). En estas circunstancias GKS-3 β fosforila a β -catenina, favoreciendo su degradación por proteosomas. Cuando se produce la heterodimerización de LRP y Frizzled, se producen señales intracelulares que inhiben a la enzima GKS-3 β lo cual produce un estado no fosforilado de β -catenina, la que se acumula en citoplasma y sería traslocada al núcleo donde interactúa con co-activadores produciendo la expresión de genes que determinan la diferenciación y proliferación del osteoblasto [34] (Figura 4).

Esta vía Wnt es regulada por antagonistas extracelulares naturales como las proteínas relacionadas al factor soluble Frizzled (sFRP1), Dickkopf 1 (Dkk1), el factor de crecimiento de tejido conectivo y esclerostina. Las caderinas son una familia de proteínas transmembrana

^I Wnt: Homólogo en mamíferos de *wingless* (un gen en drosophila) que induce la diferenciación de las células formadoras de hueso.

^{II} Smad: Proteínas intracelulares que traducen señales extracelulares por acción del ligando TGF β hacia el núcleo activando la transcripción de genes.

calcio dependientes que además de intervenir en la adhesión celular también regulan la vía Wnt. Está demostrado que N-caderina al interactuar con LRP5 y axina regula negativamente la vía Wnt mediante degradación de β -catenina [34].

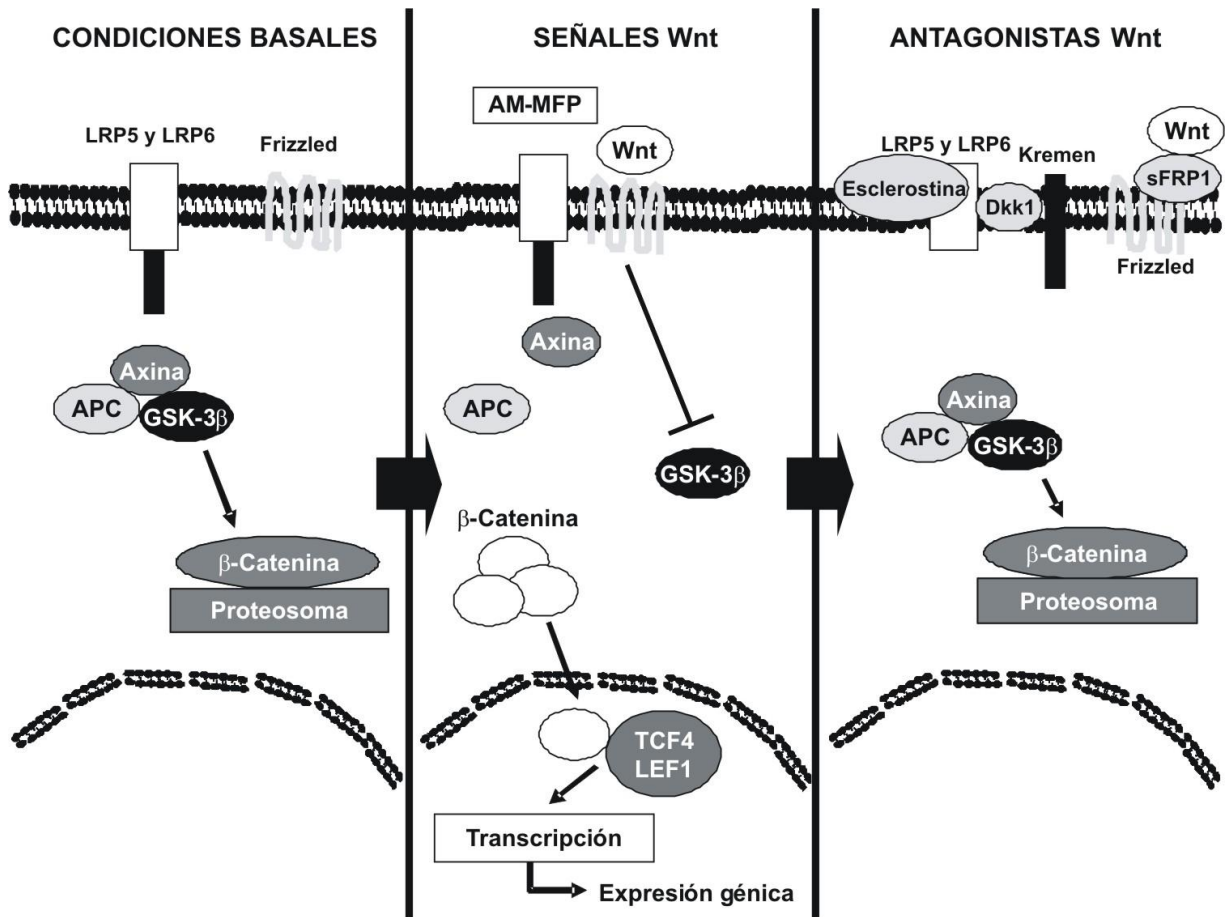


Figura 4. Vía de señalización intracelular Wnt/ β catenina. Abreviaturas: LRP5 y LRP6: proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad; APC: proteína supresora del gen de la poliposis colónica familiar; GSK-3: glucógeno sintetasa kinasa 3; TCF4: factor4 de células T; LEF1: factor 1 de unión potenciador linfoide; Dkk1: Dickkopf 1, sFRP1: proteína 1 soluble relacionada a Frizzled, y Kremen: antagonistas extracelulares Wnt. El complejo AM-MFP podría ser activador de la vía Wnt al reconocer receptores LRP. Modificado de Canalis et al [30].

El IGF-I, es sintetizado en hígado, hueso y otros tejidos, dependiente de PTH [35] teniendo por función principal mediar el efecto de la hormona de crecimiento sobre el crecimiento longitudinal óseo. IGF-I primariamente induce la diferenciación de los osteoblastos y previene su apoptosis [23].

La vía Wnt/ β -catenina presente también en osteocitos, transmite señales de carga mecánica que se presentan en las células de la superficie ósea. Se ha demostrado que la presencia de estas señales reducen los niveles de esclerotina en tejido óseo [16]. Como ya se mencionó otro de los factores que aumenta las conexiones intracelulares y la expresión de conexina 43 son los niveles de prostaglandinas E_2 . Al actuar sobre su receptor aumenta la concentración intracelular de AMP cíclico y proteína kinasa A.

Estas conexiones citoplasmáticas entre las células adyacentes, la superficie ósea y la médula ósea lo mantienen metabólica y eléctricamente acoplado, siendo fundamentales para su maduración, actividad y viabilidad. A su vez tienen la posibilidad de reclutar osteoclastos para estimular la resorción ósea y regular la diferenciación de las *stem cells* [16]. No presentan actividad para fosfatasa alcalina, pero producen grandes cantidades de osteocalcina, galectina-3 y CD44, receptor en la adhesión celular para hialuronidato y varias proteínas de la matriz involucradas en la formación de extensiones celulares, en la regulación del depósito de minerales y en la osteólisis mediada por vacuolas lisosómicas.

2.2.3 Diferenciación de osteoclastos

Dos citoquinas son esenciales para la osteoclastogénesis: RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear κ B), miembro de la familia de TNF y el M-CSF (factor estimulante de las colonias de monocitos) que contribuye a la proliferación, supervivencia y diferenciación de los precursores osteoclásticos. Otras citoquinas y factores como interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6), PTH, 1,25-dihidroxitamina D y calcitonina regulan su diferenciación y activación [8]. Los osteoblastos expresan RANKL el cual se une a su receptor, RANK (receptor activador del factor nuclear κ B) presente en precursores osteoclásticos, induciendo así su fusión y diferenciación a células maduras (Figura 5). Cuando RANKL se une a RANK recluta TRAF-6 (factor asociado al receptor de TNF). Este último activa al factor nuclear κ B (NF- κ B) el cual induce inicialmente a NFATc1 (factor nuclear de células T activadas), como también lo hacen señales mediadas por Ca y el complejo proteína activadora AP-1 que contiene c-Fos [36].

Por su parte los osteoblastos también sintetizan osteoprotegerina (OPG) que al unirse a RANKL impide la interacción RANK/RANKL y por lo tanto su diferenciación a osteoclastos. Es así como el balance entre RANKL y OPG es determinante de la formación y la actividad de los osteoclastos [37].

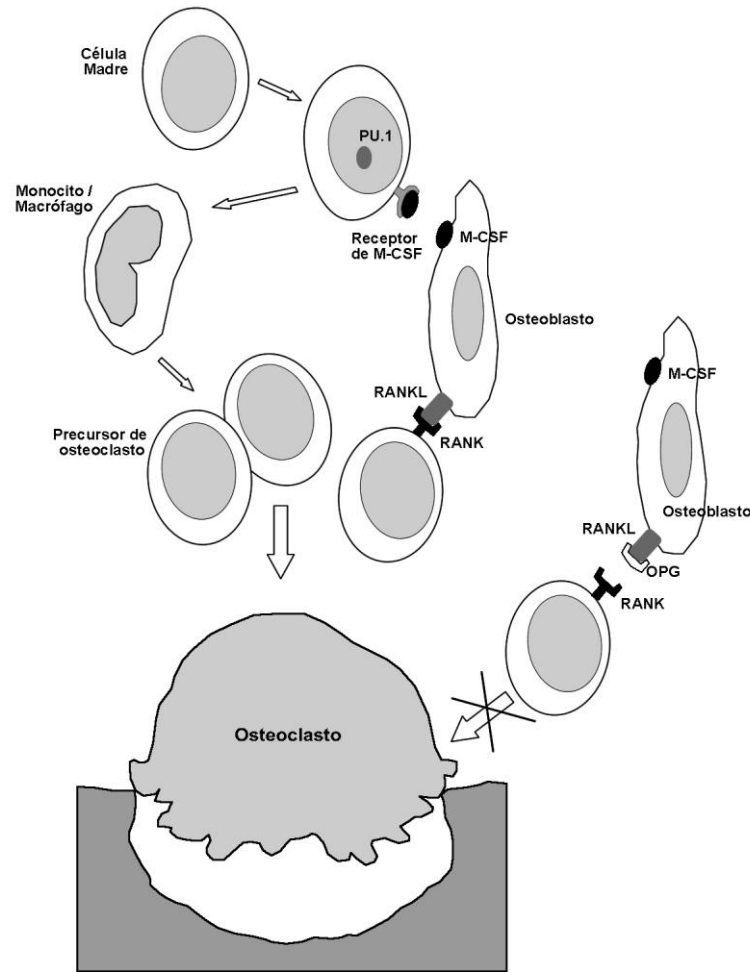


Figura 5. Diferenciación de osteoclastos a través de RANK/RANKL y M-CSF. OPG al unirse a RANKL inhibe la activación osteoclástica vía RANK/RANKL. Abreviaturas: OPG: osteoprotegerina; RANK: receptor activador del factor nuclear κ B; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear κ B; M-CSF: factor estimulante de las colonias de monocitos; PU.1: factor de transcripción PU.1.

2.2.4 Regulación del remodelado óseo

Múltiples polipéptidos, hormonas y citoquinas regulan la diferenciación, crecimiento, actividad y apoptosis de los osteoblastos [30]. Estos pueden tener efectos bifásicos o conductas opuestas en diferentes células.

PTH: La PTH es una proteína de 84 aminoácidos sintetizada por las glándulas paratiroides y cuya secreción aumenta ante disminuciones de la calcemia. A nivel óseo estimula el

crecimiento de las células osteoprogenitoras, mientras inhibe la apoptosis de los osteoblastos y osteocitos. También induce proliferación de osteoclastos con el consecuente aumento de la resorción ósea. A nivel renal estimula una mayor reabsorción de Ca por estimulación de receptores asociados a adenilil ciclasa en las células de los túbulos renales. Además estimula en el riñón la actividad de la enzima *25-hidroxivitamina D-1- α -hidroxilasa* lo cual conduce a un incremento de 1,25(OH)₂ vitamina D y como consecuencia una mayor absorción de Ca a nivel intestinal.

Péptido relacionado a PTH (PTHrp): Actúa localmente como factor parácrino y autócrino. Se aisló inicialmente de tumores asociados a hipercalcemia tumoral de origen humoral. De forma similar a la PTH, el PTHrP estimula la actividad osteoclástica y la resorción ósea, así como la reabsorción tubular y aumento de la absorción intestinal de calcio, acciones que conducen a hipercalcemia. En tejidos específicos, como el hueso, mediante su dominio N-terminal interactúa con el receptor tipo I de PTH (PTH1R), presentando un papel importante en la formación ósea, mediante la estimulación celular, la supervivencia y la diferenciación de osteoblastos [38]. Ratones homocigotos *knock out* para PTH presentan un aumento de la formación ósea asociado a sobre-expresión de PTHrp, mientras que ratones *knock out* para PTHrp presentan una notable disminución de la masa ósea [39].

Glucocorticoides (GCs): Es conocido que los glucocorticoides actúan a través de dos vías diferentes. Las acciones clásicas se producen a través de la vía genómica [40], pero algunos de los efectos de los GCs se producen en fracción de segundos o minutos, los cuales no podrían explicarse por esta vía [41,42]. Por lo tanto, se postula que estos efectos rápidos se producen a través de diferentes mecanismos no genómicos. Los GCs inducen disminución de la masa ósea, debido a sus amplios efectos en diferentes niveles del organismo: disminuyen la absorción intestinal de calcio [43], aumentan su excreción renal [44], disminuyen la liberación de estrógenos y testosterona [45], disminuyen la fuerza muscular [46], modifican factores óseos locales y alteran la actividad y diferenciación de las células óseas.

Vitamina D: La radiación solar ultravioleta B entre 290 a 315 nm convierte al 7-dehidrocolesterol en provitamina D la cual se convierte posteriormente en vitamina D. Luego esta es metabolizada a nivel hepático por acción de la enzima *25-hidroxilasa* en 25-hidroxivitamina D. La 25-hidroxivitamina D es metabolizada a nivel renal por la enzima *25-hidroxivitamina D-1- α -hidroxilasa* a su forma activa 1,25(OH)₂ vitamina D. Los niveles de esta

forma activa son regulados por la concentración plasmática de PTH, Ca y P. Otro de los factores que puede regularla es el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23). Este último es secretado por los osteocitos, y hace que el cotransportador Na^+/P sea internalizado en las células renales e intestinales suprimiendo la síntesis de $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D. La enzima *25-hidroxivitamina D-24-hidroxilasa* puede catabolizar tanto a $25(\text{OH})$ vitamina D como a $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D a su forma biológicamente inactiva [47]. Aunque son varios los metabolitos relacionados a la vitamina D, cuando se determina su concentración sanguínea el metabolito que se mide es la $25(\text{OH})$ vitamina D.

Esteroides sexuales: Los receptores clásicos para estrógenos o andrógenos están presentes en condrocitos, células del estroma de la médula ósea, osteoblastos y osteoclastos lo cual indica que en parte sus acciones son mediadas directamente. Ambos presentan efectos proapoptóticos en osteoclastos y antiapoptóticos en osteoblastos y osteocitos [45,48]. La disminución de estrógenos induce un aumento de la producción de citoquinas como IL-6, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 las cuales al actuar sobre células del estroma y precursores osteoclasticos regulan la expresión de RANKL, M-CSF y osteoprotegerina [49]. De esta forma la pérdida de estrógenos, común en la menopausia, produce pérdida de masa ósea.

Leptina: Presenta efectos duales en tejido óseo. En la etapa temprana de la vida puede estimular el crecimiento óseo mediante estímulos angiogénicos y osteogénicos sobre las células precursoras del estroma. Por el contrario en tejido óseo adulto con alto remodelado puede disminuir el crecimiento por estimulación de la expresión de osteoprotegerina [50].

2.2.5 Mineralización del tejido óseo

La nucleación y la mineralización del fosfato de calcio están reguladas por parámetros físicos y químicos. La hidroxiapatita le proporciona la rigidez mecánica y la resistencia de carga al hueso. Los cristales de hidroxiapatita son extremadamente pequeños, con menos de 200 \AA , y pueden contener numerosas impurezas como carbonato, magnesio y fosfato ácido. La matriz orgánica le otorga elasticidad y flexibilidad, siendo importante también en la organización estructural como en el remodelado óseo. Componentes específicos, tanto celulares como de la matriz extracelular, han sido implicados en el comienzo de la mineralización o en la formación del denominado sitio de nucleación. Estos sitios de nucleación pueden estar en varios lugares como en mitocondrias, fibras colágenas, estructuras interfibrilares y vesículas

de la matriz. Si bien muchos autores han publicado que estas vesículas de matriz son el sitio más probable donde comienza la nucleación, hay resultados controvertidos [51]. Las vesículas de matriz extracelular liberadas por los condrocitos y osteoblastos facilitan la mineralización ósea por liberación de Ca y P. A su vez hay enzimas que pueden degradar inhibidores de la mineralización como lo son el ATP, el pirofosfato y los proteoglicanos. La presencia de un núcleo de mineralización formado por proteínas, fosfolípidos ácidos, Ca y fosfato inorgánico, puede inducir a la formación de apatita. La formación del núcleo del cristal es uno de los pasos que más energía demanda a pesar del pequeño tamaño del mismo. En esta nucleación intervienen las proteínas colágenas y las no colágenas, especialmente la sialoproteína ósea y la proteína de la matriz dentina-1. Su naturaleza aniónica hace posible su unión al calcio en solución o en la superficie de apatita. Las enzimas también pueden regular la mineralización, particularmente la fosfoprotein-fosforilasa y la fosfatasa alcalina. Esta última hidroliza los ésteres fosfóricos aumentando la concentración local de P, y por lo tanto aumenta el grado de mineralización. La nucleación es seguida del agregado de otros iones que contribuyen al crecimiento del cristal, denominada nucleación secundaria. Al unirse a uno o más iones contribuyen al crecimiento de los cristales regulando el tamaño, la forma o el número de los mismos. En este proceso intervienen nuevamente las proteínas no colágenas. También iones como el Mg^{2+} , el Sr^{2+} pueden ser incorporados directamente en el mineral óseo sustituyendo al Ca, siendo estos cristales más pequeños y menos perfectos que los formados naturalmente. El Cd^{2+} tiene un efecto similar. El carbonato (CO_3^{2-}) es otra de las impurezas dentro del mineral óseo como lo es también el citrato. Mientras que cada una de estas impurezas hace a los cristales más pequeños, más imperfectos y más solubles, el flúor aumenta el tamaño de los mismos, y disminuye la solubilidad de los cristales de apatita. A causa del mayor tamaño de los cristales los hace más resistentes a la degradación de los osteoclastos [52]. Los bisfosfonatos se pueden unir a la superficie de los cristales de apatita y de esta forma bloquean su disolución, entre otros efectos que se mencionarán más adelante.

2.2.6 Marcadores de remodelado óseo

El tejido óseo es un tejido metabólicamente activo en continuo estado de remodelación. El tejido óseo trabecular representa aproximadamente el 20% de la masa ósea, y el 80% de la superficie ósea, y es metabólicamente más activo que el hueso cortical por presentar un estado de remodelación ósea mayor. Cada año un 25% del hueso trabecular sufre remodelación ósea, mientras que solo la presenta un 2 a 3% del hueso cortical [53].

Las células involucradas en este proceso son los osteoblastos y los osteoclastos. Dentro de las funciones de estas células se encuentran la secreción de proteínas colágenas y no colágenas de la matriz ósea y enzimas proteolíticas. Algunos de estos compuestos son liberados al plasma y excretados a nivel renal, pudiendo cuantificarse, y de esta forma pueden reflejar el estado de remodelación ósea.

2.2.6.1 Marcadores de formación ósea

Los marcadores de formación ósea más comúnmente medidos son la fosfatasa alcalina, la osteocalcina y el propéptido del colágeno tipo I.

Fosfatasa alcalina total y ósea. La fosfatasa alcalina es una enzima producida por gran variedad de células de diferentes tejidos. El 95% de su actividad plasmática total corresponde a las isoformas hepáticas y ósea. En pacientes con función hepática normal, la actividad de la fosfatasa alcalina total (FAt) aumentada correspondería a la isoforma ósea siendo útil como marcador de formación ósea [54]. La fosfatasa alcalina ósea (FAo) representa aproximadamente el 40% de la actividad total y los valores de FAo se correlacionan con los índices de mineralización ósea [53]. Ambas isoformas derivan de un mismo gen y difieren en las modificaciones postraduccionales de glucosilación y sialilación. Los métodos utilizados para su medición son frecuentemente laboriosos y con poca precisión, basados en inactivación enzimática por calor, inhibición química o electroforesis [53,55]. La precipitación de la FAo con lectinas de germen de trigo es una técnica simple para cuantificar FAo, sin embargo presenta poca reproducibilidad debido a la variación en los lotes de la lectinas de germen de trigo [56]. Cuando se utilizan anticuerpos para medir FAo hay cierta reactividad cruzada con la isoforma hepática.

Osteocalcina. Es una proteína no colágena de 49 aminoácidos y un peso molecular de 5800 Da producto de la actividad de los osteoblastos y odontoblastos. Es la más abundante de las proteínas no colágenas óseas. En su estructura presenta tres residuos ácidos glutámicos que por carboxilación hepática dependiente de vitamina K los convierte en residuos γ -carboxiglutamato. La mayor parte de la osteocalcina, más del 90% en jóvenes y más del 70% en adultos, se incorpora a la matriz ósea donde se une a hidroxapatita, teniendo un rol muy importante en la organización de la matriz extracelular y sólo una pequeña fracción se libera. Su vida media plasmática es de pocos minutos siendo rápidamente metabolizada, liberada a

circulación y depurada a nivel renal [53,54]. Si bien la FAo y la osteocalcina son marcadores de formación ósea, no siempre sus cambios plasmáticos son paralelos a los cambios óseos de remodelado [57]. La osteocalcina puede ser medida por diferentes equipos comerciales para inmunoensayo, aunque no se pueden realizar comparaciones entre ellos debido a que reaccionan contra diferentes epítomos de la molécula. Durante el almacenamiento de las muestras se puede producir el clivaje de la proteína en el fragmento N-terminal. Por lo tanto los equipos comerciales que miden la molécula intacta y los fragmentos N-terminales son más fiables que los que miden sólo proteína intacta [58].

Propéptidos del colágeno tipo I. El colágeno tipo I, sintetizado como precursor, representa casi el 90% de la matriz orgánica ósea y es sintetizado por osteoblastos y secretado hacia la matriz. Esta molécula de procolágeno presenta los péptidos amino y carboxilterminal (péptido amino terminal -PINP- y péptido carboxilterminal -PICP-), los cuales son clivados por endoproteasas específicas. Posterior al clivado la molécula de colágeno adquiere la triple hélice característica del colágeno maduro, y es incorporado a la matriz ósea [54]. EL PICP presenta puentes disulfuro intercatenarios que mantienen a la molécula presentando un peso molecular de 100 kDa, por lo que no filtra a nivel renal. Su vida media es de unos 6 a 8 minutos y es captado por las células endoteliales hepáticas mediante receptores de manosas. Si bien los niveles de PICP se correlacionan con las determinaciones histomorfométricas no es lo suficientemente sensible para detectar pequeños cambios en el remodelado óseo como los que ocurren en la menopausia [59]. El PINP circula en plasma como dos péptidos de diferente tamaño molecular, de 100 y 30 kDa, siendo esta última probablemente un producto de la degradación. La mayoría de los inmunoensayos reconocen ambos fragmentos, aunque los que miden la molécula intacta también son útiles en detectar cambios de remodelado óseo [53,60,61]. Como ambos fragmentos amino y carboxilterminal son generados desde el colágeno tipo I recién sintetizado se consideran como medidas cuantitativas del colágeno tipo I, y por lo tanto marcadores de formación ósea.

Sialoproteína ósea. Esta proteína es una fosfoproteína glicosilada de unos 80 KDa presente en hueso, sintetizada por osteoblastos y que participaría en la mineralización ósea. A pesar de su síntesis por osteoblastos sus concentraciones reflejan mejor estados de resorción ósea que de formación, razón que no es comprendida aún. Puede ser detectada por inmunoensayo [62].

Determinación simultánea de la formación y resorción ósea. Recientemente se ha publicado una nueva metodología para la determinación de la formación y resorción ósea en forma simultánea [63]. Esta técnica se realiza luego de una dosis de fluoruro y emplea un modelo matemático basado en la farmacocinética del fluoruro. La resorción y la formación ósea se estiman mediante la captación de fluoruro por el hueso y su velocidad de eliminación, respectivamente. El análisis ROC mostró que la sensibilidad, especificidad y el área bajo la curva ROC no fueron diferentes respecto de la determinación de deoxipiridinolina y fosfatasa alcalina ósea, marcadores óseos ya conocidos.

2.2.6.2 *Marcadores de resorción ósea*

Fosfatasas ácidas. Hay unas seis isoenzimas de fosfatasas ácidas. Los osteoclastos y los macrófagos activados expresan grandes cantidades de TRAP tipo 5. Solo dos isoenzimas han sido demostradas en osteoclastos. Una es sensible a tartrato como todas las otras isoenzimas, y la otra de menor peso molecular es resistente a tartrato. La TRAP está presente en el borde festoneado de los osteoclastos y se libera durante la resorción ósea [64]. Dos subformas de la TRAP están descritas, la banda 5a, que contiene ácido siálico y la banda 5b, que no lo contiene. La subforma 5b es sintetizada y secretada por osteoclastos a la circulación, siendo considerada la TRAP plasmática un marcador de resorción ósea.

Como se mencionó anteriormente durante la resorción ósea los osteoclastos secretan catepsina K la cual libera NTx (telopeptido N terminal del colágeno tipo 1) y CTx (telopéptido C terminal del colágeno tipo 1) de las fibras colágenas, mientras que las metaloproteasas secretadas no liberan ni NTx ni CTx y si están vinculadas a la liberación de TRAP 5b, hecho demostrado en pacientes con cáncer de mama y presencia de metástasis [65]. Si bien la subforma 5b puede ser medida por inmunoensayo [66,67] los métodos colorimétricos pueden medir ambas subformas, 5a y 5b [54]. A temperatura ambiente TRAP pierde más del 20% de su actividad por hora, hecho importante cuando se mide por colorimetría. Su concentración aumenta en mujeres postmenopáusicas y con alto remodelado óseo [53,64,65].

Hidroxiprolina. La hidroxiprolina representa entre el 12 a 14% del contenido aminoacídico del colágeno maduro. Si bien la mitad del colágeno corporal se halla en hueso la hidroxiprolina también puede ser derivada del componente C1q del complemento y de la dieta. Cuando hay activación del complemento la hidroxiprolina urinaria puede representar hasta el 40%. El 85 a

90% es liberada desde el hueso, filtrada por riñón, reabsorbida y oxidada a nivel hepático. Como consecuencia solo el 10 a 15% aparece en orina. De la fracción presente en orina el 10% proviene de péptidos de procolágeno recién sintetizados o de moléculas que son degradadas en vez de depositarse en matriz ósea [54]. En orina el 90% de la hidroxiprolina aparece en forma de péptido, una pequeña fracción de forma libre y el resto como polipéptidos. La hidroxiprolina puede ser cuantificada por métodos colorimétricos o por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Sus niveles urinarios no se correlacionan adecuadamente con el estado de remodelación ósea, siendo influidos por la degradación de la elastina, por el complemento y por dietas con alto contenido de colágeno, como las carnes [53].

Hidroxilisina. Aminoácido presente en el colágeno el cual no es reutilizado en su síntesis. Este está presente bajo dos formas: como galactosil hidroxilisina y como glucosil-galactosil-hidroxilisina [54]. Ninguna está presente en péptidos de procolágeno por lo tanto no es liberada durante la formación ósea. A diferencia de hidroxiprolina la dieta no influye en su excreción, y estos no son metabolizados nuevamente por lo tanto son eliminados por orina sin cambios [53].

Enlaces cruzados del colágeno. La molécula de colágeno es estabilizada por enlaces cruzados entre el final de una de las cadenas de colágeno y la porción helicoidal de la adyacente. Los más importantes son piridinolina y deoxipiridinolina (Dpd) [53]. Un 40% de estos enlaces cruzados son liberados del hueso durante la resorción ósea sin uniones a estructuras polipeptídicas, mientras que el 60% restante se liberan unidos a péptidos constituyendo los enlaces cruzados telopéptidos del colágeno tipo I (NTx y CTx).

La piridinolina está ampliamente distribuida en hueso y cartílago, predominando en cartílago, mientras que deoxipiridinolina está presente en hueso, dentina, aorta y ligamentos, constituyendo cerca del 21% del total de los enlaces cruzados del colágeno óseo [68]. Tanto piridinolina como deoxipiridinolina están ausentes en las fibras colágenas de la piel y no son influenciados por la dieta [69] siendo mejores marcadores del estados de remodelado óseo que hidroxiprolina [70]. Como estas moléculas están presentes en el colágeno maduro su excreción refleja degradación de ese colágeno y no representa por lo tanto nuevo colágeno formado. Pueden medirse por HPLC, utilizando detector fluorométrico luego de hidrólisis o se puede realizar medición total. La fracción libre puede ser medida por inmunoensayo utilizando anticuerpos monoclonales en muestras plasmáticas o urinarias. La excreción de estas

moléculas está incrementada en estados de remodelación ósea aumentada donde predomina la resorción, como el hiperparatiroidismo e hipertiroidismo siendo de importancia para el monitoreo de la respuesta terapéutica en situaciones clínicas de alto remodelado óseo [71]. Se ha hallado correlación entre sus niveles e histomorfometría [53].

El colágeno tipo I forma enlaces cruzados en dos regiones, una en el extremo aminoterminal y otra en la región carboxilterminal [54]. Durante la resorción ósea, las fibras colágenas se degradan liberando los enlaces cruzados unidos a estos telopéptidos, denominados NTx al correspondiente al extremo aminoterminal o N-terminal y CTx al proveniente del extremo carboxilterminal o C-terminal. Estos componentes se pueden detectar en suero y orina por cromatografía o por inmunoensayo. Los ensayos solo detectan péptidos que contienen isoaspartil (β -aspartil). Esta isomerización es dependiente del tiempo y de las condiciones ambientales, por lo que se desprende que la interpretación de los resultados es compleja y requiere del conocimiento del índice de β -isomerización del colágeno tipo I. Otros ensayos miden formas no isomerizadas (α CTx) y β -isomerizadas (β CTx). El índice α CTx/ β CTx es más alto en niños que en adultos, y el mismo disminuye a medida que aumenta la edad ósea [72]. Así el índice α CTx/ β CTx puede reflejar diferentes estados de remodelación en enfermedades metabólicas óseas, como es el caso de pacientes con enfermedad de Paget, situación en la cual está aumentado y por el contrario, disminuido en pacientes bajo tratamiento con bisfosfonatos [73]. Está demostrado que la medición de marcadores de resorción son útiles también en evaluar el estado de remodelación ósea en pacientes con enfermedades reumatológicas como artritis reumatoidea y lupus eritematoso sistémico [74] lo cual permitiría hacer controles para monitoreo terapéutico cada tres meses en vez de esperar un año para evaluación por densitometría [75].

Determinación simultánea de la formación y resorción ósea. Como se describió previamente, recientemente se ha publicado una nueva metodología para la determinación de la formación y resorción ósea en forma simultánea [63] que emplea un modelo matemático basado en la farmacocinética del fluoruro.

Utilidad de los marcadores óseos

Bjarnason y Christiansen [76] estudiaron a 153 mujeres con tres años de evolución de estado postmenopáusico tratadas con estrógenos y placebo, y hallaron que los marcadores de remodelación ósea presentaban una correlación significativa acorde con el tratamiento ya a

las dos semanas de comenzada la terapéutica, mientras que a los seis meses los cambios estaban completamente establecidos. Delmas y col [77] en un estudio similar evaluaron 569 mujeres en estado postmenopáusico temprano y también encontraron correlación entre los marcadores de remodelado óseo y la terapéutica a los seis meses. En ambos estudios hallaron que los marcadores de resorción ósea tienen una respuesta más rápida que los marcadores de formación ósea.

Varios factores fisiológicos pueden afectar la concentración y excreción urinaria de los marcadores de remodelado óseo. Algunos como la hidroxiprolina urinaria son afectados por la dieta mientras que otros presentan un ritmo diurno como la osteocalcina, piridinolina, deoxipiridinolina, NTx y CTx [78]. Otros marcadores de formación ósea no sufren tanta variación por su larga vida media. En el caso de la osteocalcina los valores más altos se hallan a las 4:00 AM mientras que los más bajos a las 5:00 PM, con una variación entre ambas de un 15%. La excreción urinaria de deoxipiridinolina es un 61% más alta durante la noche respecto a valores matinales estando relacionado con cambios en la secreción de PTH. Similares variaciones evidencian CTx y NTx. A su vez el coeficiente de variación en una misma persona es grande siendo para la eliminación urinaria de hidroxiprolina del 25 a 53%, para deoxipiridinolina del 23%, para galactosil hidroxilisina del 38%, para NTx entre el 16 a 23% y del 19 al 23% para CTx. También se hallan diferencias en la concentración plasmática si bien presentan menos variación que las mediciones urinarias. Para osteocalcina estas diferencias son del 20 a 63%, para PINP del 10%, para CTx del 3% y NTx del 13% [53].

Por todas estas variaciones no existe un criterio uniforme acerca de cuál es el momento óptimo para realizar la toma de la muestra para posterior medición. Sin embargo lo más aceptado es la medición de los marcadores en orina de 24 horas, o en la segunda muestra urinaria de la mañana realizando posteriores mediciones de igual forma y a igual hora [53]. El seguimiento mediante la medición periódica cada tres a seis meses da cuenta de la respuesta a la terapéutica administrada cuando hayamos un descenso de los mismos [74,75].

2.3 OSTEOPOROSIS Y TRATAMIENTO

La osteoporosis es un importante problema de salud pública, problema que ha aumentado desde el siglo XIX por el aumento de la sobrevivencia de la población. La osteoporosis afecta a más de 200 millones de personas en el mundo y se estima que entre el 30 y el 50% de las mujeres postmenopáusicas desarrollarán esta enfermedad [79]. Estudios realizados en Argentina revelan que 2 de cada 4 mujeres mayores de 50 años de edad tienen osteopenia y

1 de cada 4 tiene osteoporosis. En promedio, ocurren anualmente alrededor de 320 fracturas de cadera cada 100.000 mujeres, y 125 fracturas cada 100.000 varones de más de 50 años de edad, con un cociente mujer/hombre de 2,56 [80].

Los mecanismos que intervienen en su fisiopatogénesis son múltiples y todos convergen a un mismo factor común que es la pérdida de masa ósea con alteración de la microarquitectura y de la estructura ósea [81]. La resistencia a la fractura está determinada por la solidez del hueso, la cual depende de las propiedades geométricas (tamaño, forma, conectividad de trabéculas), la actividad de las células en el tejido y las propiedades materiales del mismo. Estas últimas incluyen el contenido mineral, la composición mineral y el tamaño del cristal mineral, y el contenido de matriz así también como su composición [82]. Para que se produzca osteoporosis podemos deducir que hay un desbalance en el remodelado óseo, producido por una excesiva resorción ósea o una inadecuada formación.

Si bien la osteoporosis postmenopáusica es la causa más común de osteoporosis, múltiples son las entidades capaces de producir pérdida de la masa ósea.

El diagnóstico de osteoporosis según la Organización Mundial de la Salud se basa en los valores de DMO obtenidos por DXA. Se considera diagnóstico de osteoporosis la presencia de valores de T-score menores a -2,5 en mujeres postmenopáusicas y hombres mayores a 50 años. En mujeres premenopáusicas y hombres menores de 50 años, se consideran valores de Z-score menores a -2,0 [80,83]. En niños se requiere el hallazgo de baja masa ósea evidenciada por DXA, es decir valores de Z-score menores a -2,0 junto con la presencia de al menos una fractura de huesos largos en miembros inferiores, dos de huesos largos en miembros superiores o fractura por compresión vertebral. En estos casos el hallazgo únicamente de valores de Z-score menores a -2,0 nos indican que estos niños presentan baja masa ósea para la edad cronológica debiéndose hacer una correcta prevención para evitar la pérdida de masa ósea [84].

Los modelos animales juegan un rol importante para mejorar el conocimiento de la etiología, fisiopatología, diagnóstico, prevención y terapéutica de la osteoporosis [85]. La ovariectomía (OVX) en ratas es el modelo animal de pérdida de masa ósea postmenopáusica más utilizado y aceptado ya que las características de dichas pérdidas son comparables a los de la mujer postmenopáusica [86]. En este modelo se observa un rápido aumento de la remodelación ósea luego de la OVX lo cual lleva a un balance óseo negativo donde la resorción sobrepasa la formación. Este efecto es observado al día 14 post OVX y a los 30 días ya están establecidos todos los cambios óseos [87]. El modelo de osteoporosis inducida por

glucocorticoides permite el estudio de la remodelación ósea con función estrogénica conservada considerándose un modelo de osteoporosis por envejecimiento [88].

Diferentes dosis de calcio y vitamina D fueron aconsejadas a lo largo de los años. El efecto del tratamiento solo con calcio a dosis de 1.000 mg/día y vitamina D 400 UI/día fue evaluado en una de las ramas del estudio *Women's Health Initiative (WHI)*, realizado con mujeres con osteoporosis postmenopáusica comparado con placebo, durante un periodo de 7 años [89]. En esta rama del estudio se demostró que el calcio y vitamina D redujeron la fractura de cadera en mujeres postmenopáusicas.

Actualmente para lograr mantener la masa ósea todos los pacientes deben recibir la administración de calcio elemental 1.500 mg/día, vitamina D a dosis no menores de 800 UI/día, junto con actividad física regular [90]. Estos tres pilares son la mejor forma de prevención. Oliveri y Plantalech [91,92] han demostrado que gran parte de la población argentina, estudiada en diferentes latitudes, presenta déficit e insuficiencia de vitamina D. Es por eso que se aconseja la medición plasmática de 25(OH) vitamina D y mantener niveles plasmáticos mayores a 30 ng/ml.

Otras terapéuticas disponibles para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica son: *raloxifeno*, un modulador selectivo del receptor estrogénico; *anelato de estroncio*, fármaco con acción dual que aumenta la formación ósea y disminuye la resorción ósea; *calcitonina* sintética de salmón, *PTH recombinante*, fármaco anabólico al administrarse de forma diaria subcutánea; *denosumab*, anticuerpo monoclonal anti RANKL; *bisfosfonatos* y *MFP*. Estos últimos dos fármacos debido a que son los utilizados en esta tesis se detallan en profundidad a continuación.

2.3.1 Bisfosfonatos

Los bisfosfonatos son drogas que actúan disminuyendo el remodelado óseo. Aunque conocidas desde hace tres décadas sus mecanismos de acción no han sido dilucidado completamente. Los bisfosfonatos contienen dos grupos fosfatos unidos a una cadena carbonada simple, formando una estructura P-C-P con dos estructuras químicas unidas al átomo de carbono, que llamaremos R1 y R2. Los de primera generación: etidronato, clodronato y tiludronato no contienen nitrógeno en su cadena lateral R2 a diferencia de los de segunda generación: alendronato, risedronato, ibandronato y pamidronato y del de tercera generación como el ácido zoledrónico [5].

La presencia de nitrógeno en su cadena lateral modifica notablemente su mecanismo de acción promoviendo la apoptosis de los osteoclastos, hecho demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por su estructura química los bisfosfonatos inhiben las vías intracelulares que involucran al pirofosfato o fosfato. Se conoce que inhiben varios tipos de tirosina fosfatasas, y que inhiben enzimas de la síntesis de escualeno. Los bisfosfonatos nitrogenados inhiben los pasos a la síntesis del colesterol interfiriendo en la formación de geranyl geranyl pirofosfato por competir con farnesil pirofosfato o isopentenil pirofosfato en uno o varios pasos enzimáticos de esa vía. El farnesil pirofosfato y el geranyl pirofosfato se encuentran disminuido desde la vía del mevalonato siendo importantes sustratos en la prenilación de proteínas G monoméricas involucradas en la función del citoesqueleto y en el tráfico vesicular, como Rho, Rac, Cdc42 y Rab [93,94] (Figura 6). Los bisfosfonatos nitrogenados inhiben la farnesil pirofosfato sintetasa y la geranyl geranyl pirofosfato sintetasa de forma dosis dependiente relacionándose con su potencia anti-resortiva [95]. Rho, Cdc42 y Rac están involucradas en la reorganización del citoesqueleto que llevan a la polarización celular, a la formación de un anillo rico en actina y del borde festoneado. Rab participa en el tráfico vesicular [93,96]. Para la activación de los osteoclastos se produce una reorganización del citoesqueleto que lleva a la polarización celular y a la formación de un anillo rico en actina y en el borde festoneado, procesos que también son inhibidos por los bisfosfonatos [93].

Es conocido que el tratamiento con bisfosfonatos previene la apoptosis de osteoblastos y osteocitos. Los hemicanales de conexina 43 pero no los canales gap, presentes en osteocitos, son esenciales para la transmisión de las señales de supervivencia de los osteocitos [97], mediante la inducción de la activación de ERK1/2 [98]. Estudios recientes demostraron que la proteína β -arrestina es necesaria para que ERKs sean retenidas en el citoplasma [18].

La eficacia de los bisfosfonatos como fármacos anti-resortivos en el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica fue evaluada en varios ensayos clínicos. En la actualidad los bisfosfonatos más utilizados en la práctica clínica para mujeres con osteoporosis postmenopáusica son el alendronato, risedronato e ibandronato. Está demostrado que el alendronato en dosis de 10 mg/día administrado durante tres años aumenta la DMO en columna lumbar un 8,8%, un 5,9% en cuello femoral y un 7,8% en trocánter respecto del placebo [99]. En el mismo trabajo se demostró que el alendronato redujo un 48% la incidencia de nuevas fracturas vertebrales.

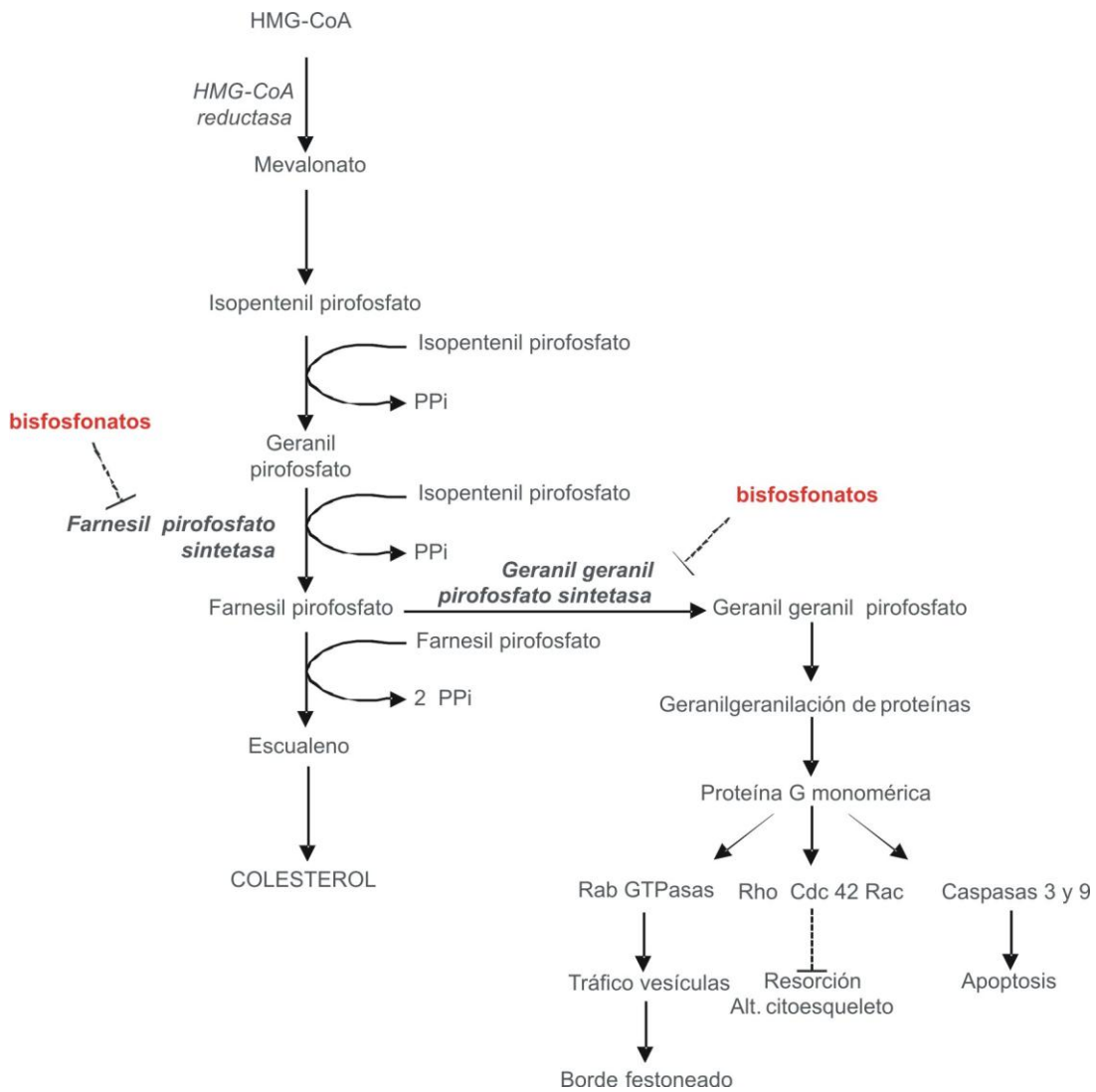


Figura 6. Mecanismo de acción de los bisfosfonatos. Las flechas (→) indican reacciones químicas y las flechas (---|) indican procesos inhibitorios.

El risedronato en dosis de 5 mg/día redujo la incidencia de nuevas fracturas vertebrales en un 41% mientras que disminuyó un 39% la incidencia de fracturas no vertebrales, ambos respecto del grupo tratado con placebo cuando se evaluaron mujeres con osteoporosis postmenopáusicas con antecedente de una fractura previa, a los tres años del seguimiento. El aumento en el grupo que recibió risedronato de la DMO en columna lumbar, cuello femoral y trocánter fue de 5,4%, 1,6% y 3,3% respectivamente; mientras que en el grupo tratado con placebo fue de 1,1%, -1,2% y -0,7% respectivamente [100].

El ibandronato administrado por vía oral a dosis de 2,5 mg/día redujo la incidencia de fracturas vertebrales en un 62% y un 50% cuando se administró intermitentemente, respecto del

placebo. En estos pacientes hubo un aumento de la DMO en columna lumbar del 5,5%, 5,7% y del 1,3%, en los grupos tratados con ibandronato diariamente, intermitentemente y placebo, respectivamente. Si bien no hubo diferencias en la incidencia de fracturas no vertebrales a tres años en los diferentes grupos, un análisis posterior demostró reducir un 69% la incidencia de fracturas no vertebrales en un grupo de pacientes que presentaban en cuello femoral DMO con T-score menor a -3,0 [101]. El risedronato disminuyó la incidencia de fractura de cadera en mujeres ancianas con diagnóstico de osteoporosis pero no lo hizo en aquellas que se administró solo por la presencia de factores de riesgo [102]. Puede ser administrado vía oral a dosis de 150 mg mensuales o vía endovenosa 2 mg cada 2 meses o 3 mg cada tres meses. El pamidronato es otro bisfosfonato que puede ser administrado por vía endovenosa a dosis de 30 a 60 mg cada tres meses dependiendo del cuadro clínico del paciente.

El ácido zoledrónico es el bisfosfonato más potente hasta el momento y ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de la hipercalcemia maligna, de la enfermedad de Paget y recientemente en la osteoporosis. La dosis de 4 mg/año administrada por vía endovenosa ha demostrado que en pacientes con osteoporosis postmenopáusica reduce un 70% la incidencia de fracturas vertebrales, un 41% la incidencia de fracturas de cadera y un 25% las de fracturas no vertebrales, en pacientes tratados durante tres años. Estos pacientes presentaron un aumento de la DMO en columna lumbar del 6,71%, en cadera total del 6,02% y en cuello femoral del 5,06% [103].

2.3.2 Fluoruro de sodio y monofluorofosfato de sodio

El fluoruro tiene acción mitogénica sobre las células óseas, y de esta manera produce incremento de la masa ósea. Su farmacocinética y farmacodinamia han sido ampliamente investigadas y actualmente existe un sólido conocimiento sobre los mismos [104]. El mecanismo de acción sobre el osteoblasto es explicado por dos modelos [1]. El de mayor sustento experimental se basa en la actividad inhibitoria sobre la tirosín fosfatasa ácida del osteoblasto [3,105], encargada de desfosforilar proteínas involucradas en la transducción de señales de receptores de tirosin kinasa intrínseca relacionadas a la acción de factores de crecimiento. El otro modelo propone que la acción podría ser llevada a cabo por mecanismos que involucran a las proteínas G triméricas asociadas a adenilil ciclasa y fosfolipasa C [106,107]. En ambos casos el fluoruro prolongaría el efecto de factores de crecimientos sobre las células involucradas. Además de actuar sobre los osteoblastos, el fluoruro es incorporado al mineral óseo formando fluorapatita o es excretado por orina [108]. Existen algunos trabajos en los que no se ha hallado el mencionado efecto sobre las células óseas [109]. Las drogas

más utilizadas como fuente de fluoruro en terapéutica clínica son el fluoruro de sodio (NaF) [110,111] y el monofluorofosfato de sodio (MFP) [112,113]. Trabajos previos de comparación farmacocinética luego de la administración de NaF o MFP no mostraron diferencias entre ambas drogas. En estos trabajos se demostró que la única especie con flúor presente en el plasma es el anión fluoruro. En estos trabajos la técnica analítica utilizada solo determinaba fluoruro [114,115,116]. Trabajos posteriores demostraron que la farmacocinética del MFP es diferente de la del NaF [2,117] (Figura 7). En estos experimentos se utilizó plasma de rata y el ultrafiltrado del mismo. La determinación de flúor se realizó por potenciometría directa utilizando un electrodo de ión específico y destilación isotérmica del flúor. Esta técnica permite medir no sólo el anión fluoruro sino también el flúor ligado por enlaces lábiles al tratamiento con ácido fuerte [118,119,120]. En estos experimentos se demostró que a igualdad de dosis, el hueso de ratas tratadas con MFP presenta un contenido de flúor óseo superior al de las ratas tratadas con NaF. Hallazgos más recientes demostraron que el mayor contenido de flúor óseo no se debe al ión fluoruro sino a proteínas con flúor ligado por enlaces resistentes a los ácidos [121,122]. Se ha demostrado que la biodisponibilidad de flúor cuando se administra MFP es el doble de la biodisponibilidad de flúor si se utiliza NaF en dosis equimolares. Esta propiedad permite disminuir la dosis de flúor a la mitad, con el beneficio adicional de disminuir la presentación de efectos colaterales indeseables. Estos efectos se presentan cuando la concentración plasmática de fluoruro supera los 10 $\mu\text{mol/l}$ [123].

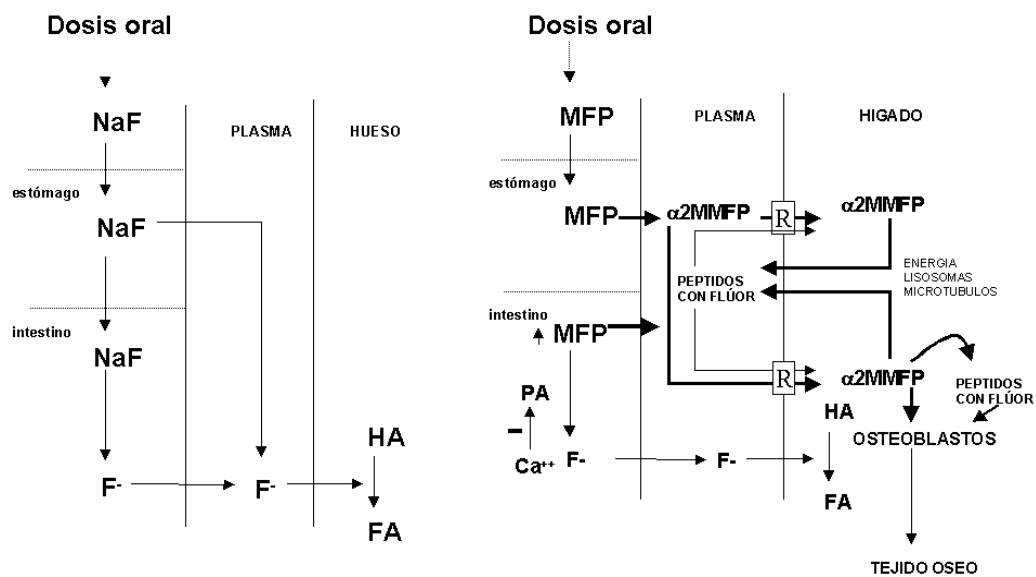


Figura 7. Farmacocinética del NaF (panel izquierdo) y del MFP (panel derecho). Abreviaturas: NaF: fluoruro de sodio; F⁻: fluoruro; MFP: monofluorofosfato; HA: hidroxiapatita; FA: fluorapatita; $\alpha 2\text{M}$: alfa-2-macroglobulina.

Como se mencionó en el párrafo anterior, al administrar NaF, en plasma se encuentra al anión fluoruro, única especie detectable. En cambio, luego de la administración oral de una dosis de MFP, además del anión fluoruro, se encuentra en plasma una fracción de flúor ligado a proteínas. Esta fracción se origina en el plasma, como consecuencia de una fracción de MFP que se absorbe en el estómago sin sufrir hidrólisis [117] y se liga a las alfa-macroglobulinas (Figura 7). La fracción de proteínas con flúor ligado también se encuentra presente en el plasma de seres humanos tratados con MFP [124] (Figura 8).

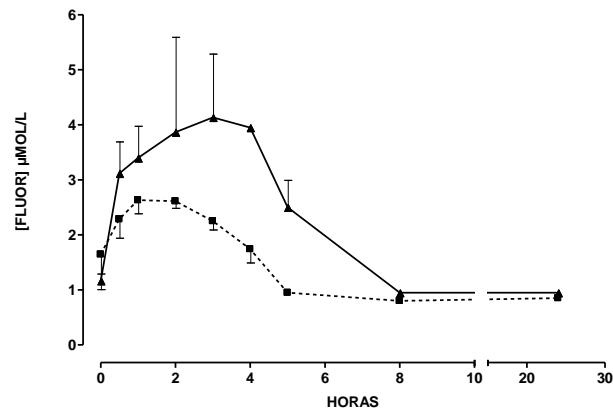


Figura 8. Fluoruro (■) y flúor unido a proteína en plasma (▲) de pacientes luego de una dosis oral de 7,5 mg de flúor como MFP [124].

Las alfa-macroglobulinas (AM) son las proteínas plasmáticas que ligan MFP. Estas proteínas pierden su actividad biológica cuando se ligan al MFP *in vitro* e *in vivo* [4]. La absorción de MFP y la formación del complejo AM-MFP se encuentra aumentada en ratas tratadas con MFP y Ca, situación en la que aumenta la absorción intestinal del MFP debido a inhibición de la enzima fosfatasa alcalina intestinal [125]. El complejo AM-MFP es biológicamente activo con respecto al metabolismo óseo, debido a que su catabolismo genera fluoruro iónico que vuelve al espacio extracelular [2]. En sujetos tratados crónicamente con MFP, luego de 10 horas de una dosis de MFP, sólo se encuentra elevada la fracción de flúor ligada a las proteínas [126]. Una ventaja adicional del MFP es que la fracción de flúor ligada a las proteínas, a diferencia del NaF que produce inhibición transitoria de la secreción de insulina [127,128,129], no tiene efecto negativo sobre la secreción de esta hormona [130], efecto indeseable presente en los tratamientos con NaF.

El complejo AM-MFP es captado *in vivo* e *in vitro* por receptores presentes en hígado y hueso de rata. Posteriormente, ambos tejidos liberan péptido/s de menor peso molecular [131]. En

plasma de pacientes tratados con MFP se encuentran péptidos de peso molecular similar [126]. Dado que estos péptidos se encuentran solo en el tratamiento con MFP se sospecha que los mismos podrían deberse al metabolismo del complejo y que quedan retenidos en la matriz ósea en el proceso de remodelación del tejido calcificado [121].

Además de péptidos con flúor de peso similar al de las especies obtenidas *in vivo*, se encuentran en la matriz ósea otros péptidos de mayor peso molecular con flúor ligado por un enlace resistente a la hidrólisis ácida. Al suspender el tratamiento en ratas en crecimiento, estos péptidos disminuyen su concentración aumentando los péptidos de menor peso molecular y el fluoruro ligado a la fluorapatita, no produciéndose modificación del contenido total de fluoruro. Se postula que estas transformaciones producirían un aumento local de la concentración de fluoruro, lo que estaría actuando como estímulo del crecimiento óseo.

Es conocido que el receptor LRP reconoce a la alfa-macroglobulina luego de su inactivación, proceso que puede ser llevado a cabo por la unión a proteinasas o a moléculas como el MFP [4,131]. El complejo AM-MFP es captado por el tejido óseo. El efecto del MFP sobre el hueso podría en parte atribuirse al fluoruro liberado por su hidrólisis. Sin embargo, el mecanismo no parece ser igual al ejercido por el fluoruro, ya que al suspender el tratamiento, la masa ósea de los animales se mantiene elevada, respecto de los controles y los animales tratados con NaF, en los que la masa ósea se asemeja a los controles luego de 30 días [132]. Se conoce que el proceso de diferenciación de osteoblastos depende de la interacción de las proteínas Wnt con los receptores LRP5/6 y Frizzled. La interacción Wnt LRP5/6-Frizzled produce aumento intracelular de la proteína β -catenina no fosforilada, la cual se trasloca al núcleo y activa ciertos genes claves para la diferenciación a osteoblastos. Los resultados mencionados en los párrafos anteriores sugieren una posible interacción del complejo AM-MFP con el receptor LRP5/6 de precursores osteoblásticos. Esta interacción podría aumentar la afinidad entre LRP5/6 y el receptor Frizzled, disminuir la acción de proteínas inhibitoras del receptor LRP5/6 como son las proteínas Dkk y esclerostina o la relación del receptor LRP con el co-receptor Kremen. En cualquiera de estas situaciones la acción de Wnt sobre los niveles de β -catenina no fosforilada serían mayores.

El fluoruro era uno de los agentes osteoformadores mas potentes utilizados para el tratamiento de la osteoporosis. El primero en ser utilizado fue el NaF que presentaba muchos efectos adversos tales como dolores epigástricos, gastritis, hemorragias gástricas, dolor en miembros inferiores y fracturas por estrés. Los efectos a nivel gástrico se producían por las acciones del ácido fluorhídrico generado luego de la interacción del NaF con el pH ácido del

estómago. Posteriormente se utilizó MFP como prodroga del flúor. Este no origina ácido fluorhídrico y es por eso que es bien tolerado.

Ringe y col [133] realizaron un estudio prospectivo, con seguimiento a tres años, con 134 mujeres con osteoporosis postmenopáusica. Las pacientes fueron divididas en tres grupos: un grupo recibió MFP y Ca intermitentemente (durante 3 meses y un mes de descanso), el segundo grupo recibió MFP y Ca continuo y el último grupo solo recibió Ca. Estos investigadores hallaron un aumento del 12,6%, 19,5% y un descenso del 1,6% en la DMO en columna lumbar en cada uno de los grupos mencionados. En cuanto a nuevas fracturas vertebrales estas se desarrollaron en un 18%, 27% y en el 67% de los pacientes respectivamente. Las fracturas no vertebrales ocurrieron en un 18%, 31% y en un 56% respectivamente.

Otro estudio fue realizado en 60 mujeres postmenopáusicas [134] las cuales recibieron MFP/Ca y terapia de reemplazo hormonal. A los 3 años la DMO de columna lumbar fue un 15,6% mayor; un 8,3% de los pacientes presentaron nuevas fracturas vertebrales y un 10% fracturas no vertebrales respecto del grupo placebo.

Otros resultados son controvertidos. El trabajo realizado por Meunier y col [135] prospectivo, randomizado, fue realizado con 354 mujeres osteoporóticas con antecedente de fracturas vertebrales osteoporóticas las cuales fueron divididas en tres grupos. flúor como NaF, flúor como MFP y placebo. Todos recibieron 1.000 mg Ca y 800 UI vitamina D₂. A los dos años del seguimiento el grupo tratado con MFP presentó un aumento del 10,8% de la DMO en columna lumbar mientras que en el otro grupo fue del 2,4%. Cuando evaluaron nuevas fracturas no vertebrales estas no fueron diferentes entre ambos grupos (1,9% en el grupo placebo y 1,4% en los grupos que recibieron flúor) para fractura de cadera.

Varios trabajos estudiaron la asociación de MFP a otras drogas. Así se evaluó la eficacia de MFP combinada con raloxifeno en mujeres con osteopenia, osteoporosis postmenopáusica y osteoporosis severa [136]. En este trabajo un grupo recibió raloxifeno 60 mg/día y 20 mg F/día como MFP, y el otro placebo durante 18 meses. Todos recibieron 1.000 mg/día de Ca y 500 UI/día de vitamina D. El primer grupo aumentó un 1,37% mientras que el segundo aumentó un 0,33% la DMO en cuello femoral, un 0,89% y -0,42% en cadera total, y un 8,80% y 5,47% en columna lumbar respectivamente. No hubo diferencias significativas en la incidencia de fracturas vertebrales y no vertebrales entre ambos grupos.

Otro estudio evaluó etidronato y MFP. El etidronato fue administrado junto con Ca y vitamina D en un grupo, comparado con MFP, Ca y vitamina D en otro. Las nuevas fracturas

vertebrales ocurrieron en el 12% de los pacientes del primer grupo y en el 35% del segundo [137].

A pesar del aumento sobre la DMO en columna lumbar el MFP se utiliza muy poco en la atención clínica del paciente con osteoporosis debido al advenimiento de nuevas terapias osteoformadoras, como la teriparatida [30].

En síntesis, el MFP tiene efecto osteoformador y menos efectos adversos que el NaF pero su mecanismo de acción es aun parcialmente conocido. Dado que está demostrado que la acción del fluoruro sobre la diferenciación y proliferación osteoblástica se produce en presencia de factores de crecimiento, nuestra hipótesis es que el efecto del MFP sería más efectivo sobre un hueso expuesto a alto estado de remodelación, debido a los factores de crecimiento liberados de la matriz ósea. La administración de dieta hipercálcica simultáneamente con MFP y la posterior administración de ácido zoledrónico contribuirían a mantener el efecto osteoformador del MFP.

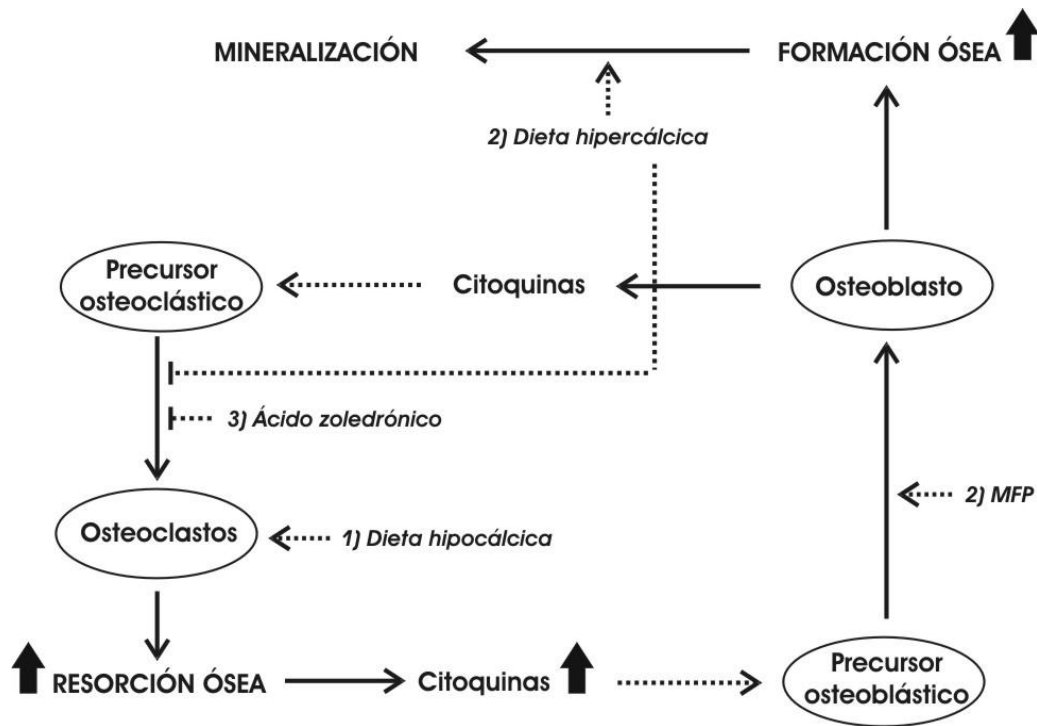


Figura 9. Modelo de acción hipotético del MFP y el ácido zoledrónico en forma secuencial acompañado de modificaciones en el calcio de la dieta. Los números indican el orden de aplicación del tratamiento. Las flechas (→) indican procesos estimulatorios, las líneas (---|) indican procesos inhibitorios y las flechas (↑) indican aumento de actividad o concentración.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 GENERALES

Investigar el mecanismo de acción del MFP sobre la estructura y resistencia ósea utilizando un tratamiento que involucra variaciones en la velocidad de remodelado óseo y la combinación con una droga anti-resortiva.

3.2 ESPECÍFICOS

En función del mecanismo de acción hipotético se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar los parámetros bioquímicos durante un tratamiento con MFP y modificaciones en el remodelado óseo.
2. Evaluar parámetros morfométricos óseos.
3. Evaluar la densidad mineral ósea.
4. Evaluar los parámetros histomorfométricos del tejido óseo.
5. Evaluar los parámetros biomecánicos del hueso y del tejido óseo.

MATERIALES Y MÉTODOS

4 MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de investigar el mecanismo de acción del MFP se realizaron:

A. Modelo de osteoporosis postmenopáusicas: Se trabajó sobre un modelo de osteoporosis inducida por ovariectomía.

B. Modificación en el contenido de calcio de la dieta: Las ratas fueron alimentadas con dietas con diferente contenido de calcio. Un grupo recibió dieta normocálcica (0,9 g Ca/100 g de dieta = 0,9%), y otro dieta hipocálcica (0,2%) e hipercálcica (2%). La administración inicial de dieta hipocálcica (del día cero hasta el día 30) y la posterior alimentación con dieta hipercálcica (del día 90 al día 150) se denominará *dieta secuencial*.

C. Tratamientos farmacológicos con diferente mecanismo de acción: Los animales recibieron en forma secuencial:

1. **Monofluorofosfato de sodio (MFP):** se administró a dosis de 400 $\mu\text{mol/kg/día}$ por sonda orogástrica del día 31 al día 90.
2. **Ácido zoledrónico (Z):** se administró a dosis de 1,5 $\mu\text{g/kg/mes}$ por vía subcutánea del día 91 al día 150.

4.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas hembra de la línea Sprague Dawley de 7 semanas de vida provistas por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Los animales fueron alimentados con dieta balanceada para roedores (Gepsa, Buenos Aires, Argentina) contenido fósforo: hasta 0,8% y calcio hasta 1,2% y agua *ad libitum*. Se utilizaron también dietas hipocálcica e hipercálcica en algunas de las etapas de los experimentos (Ver 7.1). Para el manejo de los mismos se siguieron las guías de NIH (*National Institute of Health, USA*) y CCAC (*Canadian Council on Animal Care guidelines, Canadá*) [138,139].

4.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

El experimento tuvo una duración total de 150 días y se emplearon 21 ratas por grupo experimental. Para evaluar la evolución de cada tratamiento en cada grupo experimental un subgrupo fue sacrificado a los 30 días (n=7), otro a los 90 días (n=7) y luego al finalizar el tratamiento a los 150 días (n=7). Se realizaron 5 grupos experimentales:

Sham: ratas a las cuales se les realizó cirugía simulada de ovariectomía, alimentadas con dieta normocálcica (NCaD); **OVX:** ratas ovariectomizadas (OVX) alimentadas con NCaD; **OVX.G1:** ratas OVX alimentadas con NCaD, tratadas con MFP desde el día 31 al día 90 y con Z desde el día 91 al 150; **OVX.G2:** ratas OVX alimentadas con dieta hipocálcica (LCaD) desde el día 0 al día 30 y con dieta hipercálcica (HCaD) desde el día 31 al día 150, sin tratamiento farmacológico; y **OVX.G3:** ratas OVX alimentadas con LCaD desde el día 0 al día 30 y con HCaD desde el día 31 al día 150, tratadas con MFP desde el día 31 al día 90 y con Z desde el día 91 al 150. Los grupos tratados (OVX.G1 y OVX.G3) recibieron MFP 400 $\mu\text{mol/kg/día}$ por sonda orogástrica y Z 1,5 $\mu\text{g/kg/mes}$ SC. La Tabla 1 resume los tratamientos aplicados.

Tabla 1. Grupos experimentales

	Sham	OVX	OVX.G1	OVX.G2	OVX.G3
Ovariectomía	-	+	+	+	+
LCaD (0,2%) desde el día 0 al día 30	-	-	-	+	+
HCaD (2%) desde el día 31 al día 150	-	-	-	+	+
MFP (400 $\mu\text{mol/kg/día}$) desde el día 31 al día 90	-	-	+	-	+
Z (1,5 $\mu\text{g/kg/mes}$) desde el día 91 al día 150	-	-	+	-	+

+ Indica el tratamiento aplicado

OVX y OVX.G1 fueron alimentados con NCaD hasta el día 30, es por esto que en los resultados se muestran como un único grupo llamado OVX₃₀.NCaD (n=14). De modo similar, OVX.G2 y OVX.G3 fueron alimentados con LCaD hasta el día 30 y se muestran como un único grupo: OVX₃₀.LCaD (n=14). Posteriormente ambos grupos fueron divididos en dos grupos: con y sin tratamiento farmacológico.

La remodelación ósea fue estudiada a los 30, 90 y 150 por medidas bioquímicas y por histomorfometría ósea. Al finalizar el experimento se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca, se sacrificaron los animales (Ver 4.3.3) y se extrajeron las tibias y fémures, a los cuales posteriormente se les realizó extracción de los tejidos blandos con bisturí.

Para evaluar el efecto de la administración de dietas con diferente contenido de calcio sobre las glándulas paratiroides se realizó extracción de las mismas luego de realizar una incisión medial en cuello, aperturas de los correspondientes planos musculares y aponeuróticos, y mediante la utilización de lupa se extrajeron ambas glándulas para evaluar comparativamente el peso de las mismas y la histología.

Las tibias izquierdas fueron colocadas en acetona durante una semana con el objetivo de eliminar la materia grasa. Posteriormente se secaron a 60°C durante 7 días hasta peso constante. Con ellas se determinó la densidad mineral total del hueso por DXA (Ver 4.5) y se obtuvieron medidas morfométricas (Ver 4.8).

Las tibias derechas fueron colocadas en formol durante 72 horas, luego se colocaron en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10% pH 7 durante 35 días. Posteriormente se realizó la técnica histológica habitual (Ver 4.6.1) para realizar determinaciones histomorfométricas (Ver 4.6) e inmunohistoquímica (Ver 4.7). Ambos fémures fueron colocados en solución fisiológica y guardados a -20 °C. Con ellos se realizaron determinaciones biomecánicas (Ver 4.9).

Se realizaron determinaciones bioquímicas (Ver 4.4) tales como calcemia, fosfatemia, calciuria, fosfatasa alcalina (FAt), fosfatasa alcalina ósea (FAo), deoxipiridinolina urinaria (Dpd) y hormona paratiroidea (PTH).

4.3 MODELO QUIRÚRGICO DE OVARIECTOMÍA

Se realizó la ablación bilateral de los ovarios [140] bajo anestesia general (Ver 4.3.1). Luego de alcanzado un estado de anestesia adecuado se rasuró la zona a incidir, se desinfectó con iodopovidona y se aplicó una dosis intramuscular de ceftriaxona (3 mg/100 g peso corporal) en la pata trasera izquierda. La cirugía se realizó utilizando material estéril a través de una laparotomía paramediana bilateral. Se ligó la arteria ovárica y el extremo proximal del útero antes de la extirpación de cada ovario. Se cerró el plano muscular abdominal con sutura continua y la piel con hilo de nylon 5.0 y punto simple. Finalmente se colocó un collar Isabelino para evitar la autoinjuria, el cual se retiró pasadas 72 horas. Luego de la cirugía los animales recibieron una dosis de analgésico (Ver 4.3.2) y se mantuvieron en jaulas individuales. El éxito de la ovariectomía se evaluó al final del experimento mediante la presencia de atrofia del útero en los grupos ovariectomizados determinado por el peso del mismo utilizando una balanza analítica de sensibilidad 0,1 mg. El peso del útero se expresó en mg por 100 gramos de peso corporal.

Para realizar la cirugía simulada (grupo Sham) se realizaron los mismos procedimientos detallados previamente sin la extirpación de ovarios.

4.3.1 Anestesia

Se realizó preanestesia por inyección subcutánea en el flanco derecho de una mezcla de 1,2 mg xilazina/100 g peso corporal y 3 mg ketamina/100 g de peso corporal. Luego de alcanzado un grado adecuado de narcosis y sedación se inyectó por vía SC, en la pata trasera derecha, clorhidrato de lidocaína (0,6 ml al 2%) y 5 minutos después en el mismo sitio se inyectaron 3 mg ketamina/100 de peso corporal [141].

4.3.2 Analgesia

Antes de la cirugía o procedimiento experimental potencialmente doloroso para el animal se inyectó por vía subcutánea 2,5 mg de diclofenac/100 g de peso corporal. Se evaluó el dolor a través del estado de movilidad, agresividad y reacción al contacto y se repitió la dosis a intervalos requeridos no menor a 12 horas [142].

4.3.3 Eutanasia

Se realizó sometiendo en primer término al animal a anestesia inhalatoria con éter sulfúrico, hasta obtener una profunda anestesia y analgesia. Luego se realizó una inyección intracardiaca de 1 ml de KCl saturado que produce un paro cardiorespiratorio instantáneo [143].

4.4 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

4.4.1 Calcemia

La calcemia se determinó con un equipo comercial CaColor AA (Wiener Lab. Rosario). El método se fundamenta en la reacción del calcio con o-cresoltaleína complexona a pH 10,8, dando un complejo de color magenta que se mide espectrofotométricamente a 570 nm. Para la determinación se utilizaron 5-15 µl de muestra y simultáneamente se construyó una curva de calibración de tres puntos (3,3, 6,6 y 10 mg/dl) utilizando una solución patrón de 10 mg Ca/dl. La medición de la absorbancia es proporcional a la concentración de calcio en la solución, la que se determinó utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11.

4.4.2 Fosfatemia

El fósforo inorgánico se midió utilizando un equipo comercial Fosfatemia UV AA (Wiener Lab. Rosario). El método se fundamenta en la reacción del fósforo con el molibdato en medio ácido y la formación de un complejo fosfomolibdico. Para la determinación se utilizó 5 µl de plasma o suero y simultáneamente se procesó una solución patrón de 4 mg/dl de fosfato, con la que se construyó una curva de calibración. La absorbancia a 340 nm es proporcional a la concentración de fósforo inorgánico en la muestra, la que se determinó utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11.

4.4.3 Calciuria

La calciuria fue determinada utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Arolab MK II. La orina se diluyó 1/5 con agua destilada fijando la concentración de SrCl₂ en 1% para eliminar interferentes. Se utilizó una curva de calibración con concentraciones de calcio 0-100 µg/ml y la llama utilizada se obtuvo por mezcla de acetileno: aire en proporción 1,5:1. Con los valores de concentración de calcio y la diuresis de 24 h se obtuvieron los resultados que se expresaron en µg Ca/día.

4.4.4 Fosfatasa alcalina total

La actividad de la fosfatasa alcalina plasmática total (FAt) se determinó utilizando un equipo comercial ALP 405 línea líquida (Wiener Lab. Rosario). Se utilizaron 5 µl de muestra y 0,5 ml de reactivo. La técnica se fundamenta en la medida del cambio de absorbancia a 405 nm, generado por la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato en medio alcalino por la enzima fosfatasa alcalina. Los resultados se obtienen en unidades/litro (U/l) y las medidas de absorbancias se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer lambda 11.

4.4.5 Fosfatasa alcalina ósea

La fosfatasa alcalina ósea (FAo) se determinó por diferencia entre la actividad de fosfatasa alcalina total y la actividad de fosfatasa alcalina remanente después de precipitación con lectina de germen de trigo [144]. Los resultados se obtienen en unidades/litro (U/l).

4.4.6 Deoxipiridinolina urinaria

La deoxipiridinolina (Dpd) urinaria se determinó por radioinmunoensayo (RIA) (DPD RIA, Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK). La técnica consiste en la competencia entre deoxipiridinolina marcada con ^{125}I y la deoxipiridinolina de la muestra o las soluciones estándar, por un anticuerpo anti-deoxipiridinolina fijado al tubo. Luego de dos horas de incubación a 20 °C, se decanta el sobrenadante y se determina la radioactividad fijada al tubo. La radiactividad sigue una función inversa de la concentración de deoxipiridinolina en la muestra. Los resultados se expresaron en nmol/nmol creatinina urinaria de 24 h.

4.4.7 Hormona paratiroidea

Se realizó medición de la concentración de PTH sérica con la utilización de un kit IRMA para PTH de rata (Immunotopics, Inc. San Clemente CA, USA). Se colocaron 200 μl del estándar o la muestra, con 100 μl de anticuerpo de rata anti-PTH marcado con ^{125}I . Con una pinza adecuada se colocó una esfera plástica conteniendo el anticuerpo a cada tubo, se cubrieron con un papel film y fueron incubados durante 24 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se aspiró el contenido de cada tubo, luego fueron lavados cada uno con 2 ml de solución acuosa y aspirados nuevamente, procedimiento que se realizó tres veces consecutivas. Cada esfera se colocó en un contador gamma (Alfanuclear modelo Cmos) durante tres minutos para medir la radioactividad. Los resultados se expresaron en pg/ml.

4.4.8 Fluoremia

La medición de la concentración de flúor plasmático se realizó por potenciometría directa utilizando un electrodo de ión específico ORION 94-09 y un electrodo de referencia de Ag/AgCl conectados a un conversor analógico digital. La determinación se fundamenta en la relación lineal existente entre los mV desarrollados por los electrodos y el logaritmo de la concentración de fluoruro en las muestras o patrones utilizados. Previo a la determinación potenciométrica, el flúor se aisló de las muestras por destilación isotérmica, tratando la muestra con ácido fosfórico concentrado durante 24 horas a 60 °C y recuperando el ácido fluorhídrico desprendido de la muestra sobre NaOH sólido depositado en la tapa de la cámara de destilación isotérmica. Luego de la destilación isotérmica, la trampa de NaOH se ajustó a pH 5,5 con 60 μl de ácido acético glacial diluido 1/120. Este procedimiento requirió muestras de plasma o suero de 20-100 μl y simultáneamente con las muestras se procesaron testigos de NaF de concentraciones 10^{-3} M - 10^{-6} M [120].

4.5 DETERMINACIÓN DE DENSIDAD MINERAL ÓSEA

La medida de densidad mineral ósea (DMO, mg Ca/cm²) y del contenido mineral óseo (CMO, mg Ca/g peso corporal) fueron obtenidas por análisis de las tibias izquierdas realizadas con equipo DXA (software para pequeños animales, Lunar DPX).

4.6 HISTOMORFOMETRÍA ÓSEA

4.6.1 Preparación de muestras histológicas

Fijación y descalcificación: La tibia derecha se fijó con formol-PBS al 10% durante 72 horas [145]. Posteriormente se descalcificó en EDTA 10% por 35 días a 4 °C. *Inclusión en parafina:* Para la inclusión en parafina se realizó en primera instancia una deshidratación mediante pasajes sucesivos en alcoholes de concentración creciente para facilitar la penetración del agente inclusor, posteriormente se llevó a cabo la aclaración mediante el pasaje en xilol y finalmente la inclusión propiamente dicha mediante la utilización de parafina a una temperatura de 60 °C. *Preparación del bloque:* La realización del bloque de parafina se llevó a cabo empleando moldes plásticos y anillos de inclusión. *Cortes:* Se realizaron cortes de 5 µm con un micrótopo (Minot-Mikrotm Typ 1212. Leitz, Wetzlar, Germany) con cuchilla especial para tejidos duros (Microtome Blades N35H. Feather Safety Razor Co, Ltd, Medical Division, Japón) y fueron adheridos a un portaobjeto mediante albúmina glicerizada de Mayer. *Coloración:* Se realizaron tinciones del tejido con hematoxilina-eosina, realizándose en primer término la eliminación de la parafina con xilol y seguidamente la rehidratación mediante una serie de soluciones alcohólicas de graduación decreciente. Finalmente se cubrió con un cubre objeto montado con bálsamo de Canadá.

También se procesaron muestras histológicas de glándulas paratiroides. Se realizó la técnica histológica descrita anteriormente excepto que los cortes fueron realizados con cuchilla para tejidos blandos (Microtome Blades S35. Feather Safety Razor Co, Ltd, Medical Division, Japón).

4.6.2 Análisis de imágenes digitales. Determinación de parámetros histomorfométricos a 40x

Se procedió a la digitalización de las imágenes obtenidas de los preparados histológicos descritos en 4.6.1 mediante un microscopio (Olympus, Zeiss, West Germany) con una cámara fotográfica adaptada (Olympus SP-350, China).

Se tomaron fotografías a 40x de la epífisis proximal de la tibia a fin de evaluar el hueso trabecular en un área de 2 mm². Para ello se seleccionó una región de interés (ROI) de 2 mm de largo y 1 mm de ancho a un mm del cartílago de crecimiento. Esta imagen fue recortada y posteriormente analizada con un software específico ImageJ 1.40 (NIH, Maryland, USA) (Figura 10).

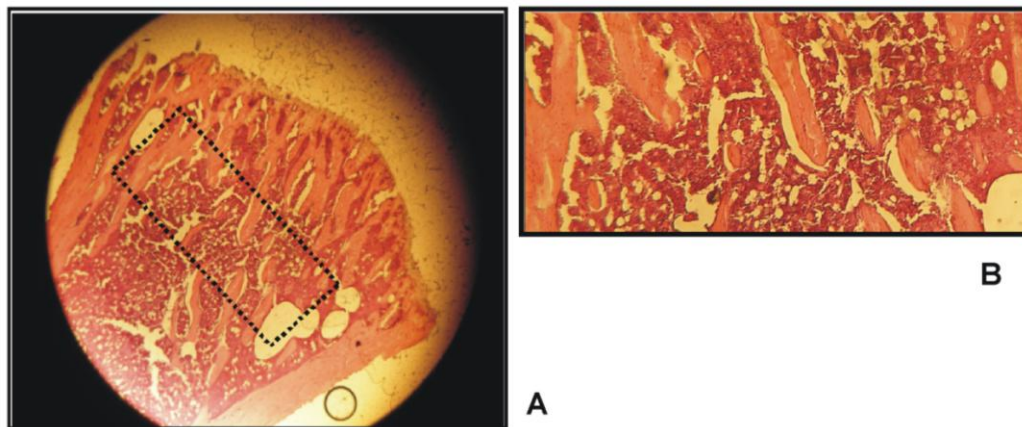


Figura 10. Microfotografía a 40x. A: Extremo proximal de la epífisis de tibia derecha. El área seleccionada corresponde al ROI para estudios histomorfométricos. **B:** ROI seleccionado.

Sobre el ROI seleccionado en las microfotografías a 40x y con la aplicación del software anteriormente descrito se procedió a delimitar cada una de las trabéculas observadas (Figura 11). Así se determinó, como describió Parfitt et al. [26], volumen tisular total: TV (μm^2), volumen óseo trabecular: BV (μm^2); y superficie ósea trabecular: BS (μm). Aclaración: dada que las medidas se hacen en figuras en dos dimensiones, los volúmenes se expresan en μm^2 y las áreas en μm . Con estos valores se calcularon diferentes parámetros histomorfométricos cuyos nombres, abreviatura, fórmula de cálculo y unidades se muestran a continuación en la Tabla 2.

La precisión del software en determinar el BV/TV fue medida en nuestras condiciones de trabajo. El coeficiente de variación (CV) intra ensayo fue del 1,03% y el CV interensayo del 1,07%.

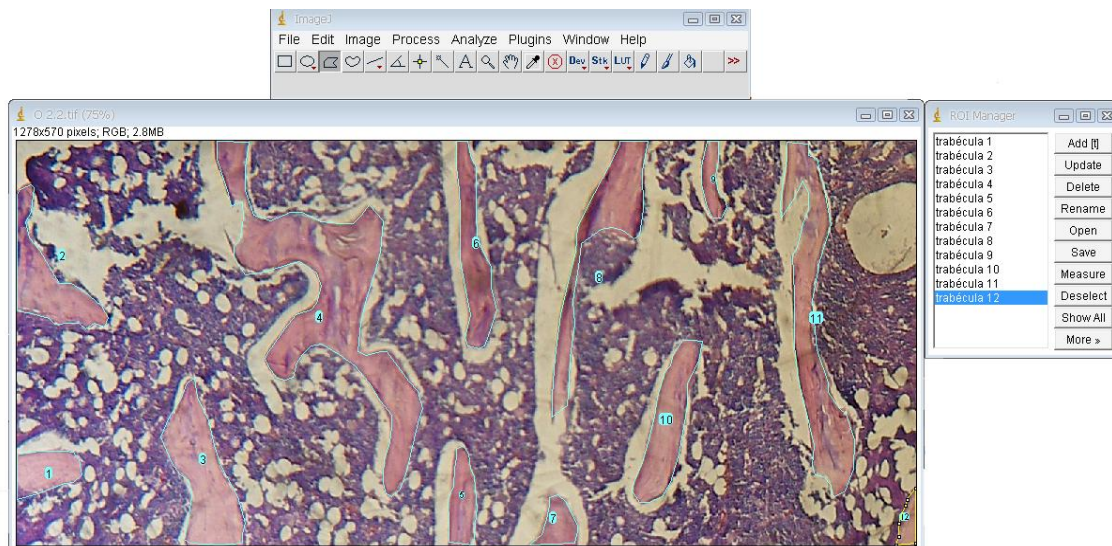


Figura 11. Imagen con ROI seleccionado con delimitación de las trabéculas (izquierda) y valores de BV y BS (derecha) obtenidos con el programa.

Tabla 2. Histomorfometría ósea de hueso trabecular (40x). Se incluyen los nombres en inglés de cada variable ya que las abreviaturas utilizadas mundialmente derivan de dichos nombres.

Nombre	Inglés	Abreviatura	Unidad	Fórmula
Volumen tisular total	<i>Total tissue volume</i>	TV	μm^2	medida directa
Volumen óseo trabecular	<i>Trabecular bone volume</i>	BV	μm^2	medida directa
Superficie ósea trabecular	<i>Trabecular bone surface</i>	BS	μm	medida directa
Volumen óseo	<i>Bone volume</i>	BV/TV	adimensional	$\text{BV} \cdot 100 / \text{TV}$
Grosor trabecular	<i>Trabecular thickness</i>	Tb.Th	μm	$2 / (\text{BS} / \text{BV})$
Número de trabéculas	<i>Trabecular number</i>	Tb.N	1/mm	$(\text{BV} / \text{TV}) / (\text{Tb.Th})$
Separación trabecular	<i>Trabecular separation</i>	Tb.Sp	μm	$(1 / \text{Tb.N}) - \text{Tb.Th}$

4.6.3 Análisis de imágenes digitales. Determinación de parámetros histomorfométricos a 400x

Del ROI seleccionado a 40x aumentos se obtuvieron 4 microfotografías a 400x (Figura 12).

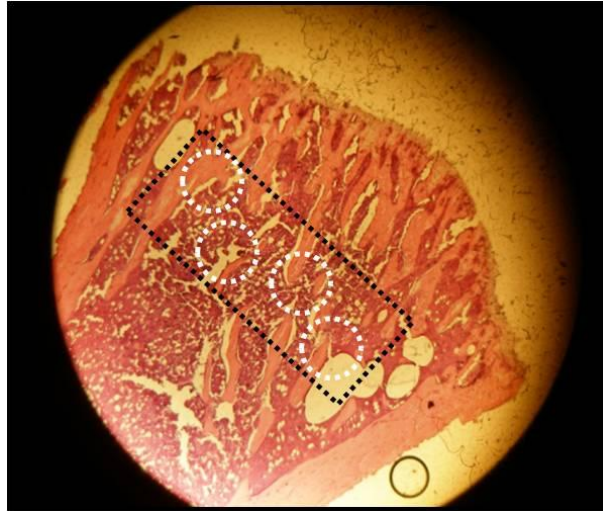


Figura 12. Microfotografía a 400x aumentos. Se observa el ROI seleccionado previamente del extremo proximal de la epífisis de tibia derecha y dentro de ella cuatro sectores los cuales se obtienen con microfotografías a 400x.

En cada microfotografía 400x se determinó:

1) superficie total (TA): superficie de las ROIs seleccionadas sin discriminar tipo de tejido; 2) superficie ósea cubierta por osteoblastos (Ob.S); 3) superficie ósea trabecular (BS); 4) superficie erodada (ES): superficie ósea trabecular que se encuentra erodada incluyendo lagunas activas con osteoclastos y lagunas en fase de reversión; 5) número de osteoclastos (N.Oc) en el área total. Con dichas mediciones y aplicando fórmulas conocidas se calcularon otros parámetros histomorfométricos que se detallan en Tabla 3 y Figura 13.

Tabla 3. Histomorfometría ósea de hueso trabecular (400x)

Nombre	Inglés	Abreviatura	Unidad	Fórmula
Superficie ósea total	<i>Total bone surface</i>	TA	μm^2	medida directa
Superficie ósea trabecular	<i>Trabecular bone surface</i>	BS	μm	medida directa
Superficie ósea cubierta por osteoblastos	<i>Bone surface covered by osteoblast</i>	Ob.S	μm	medida directa
Superficie erodada	<i>Eroded surface</i>	ES	μm	medida directa
Número de osteoclastos	<i>Osteoclast number</i>	N.Oc	adimensional	medida directa
Superficie cubierta por osteoblastos	<i>Surface covered by osteoblast</i>	Ob.S/BS	adimensional	Ob.S/BS*100
Porcentaje de superficie erodada	<i>Eroded surface of trabecular surface</i>	ES/BS	adimensional	ES/BS*100
Número de osteoclastos por unidad de superficie ósea total	<i>Osteoclast number per unit of total bone surface</i>	N.Oc/mm ²	1/mm ²	N.Oc/TA

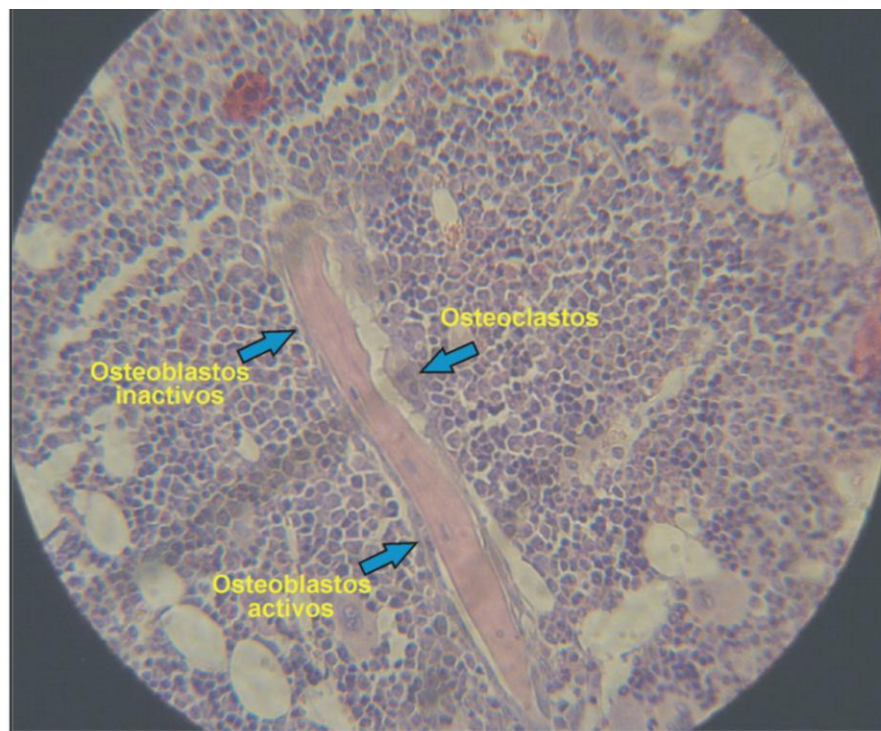


Figura 13. Microfotografía obtenida a 400x de una de las áreas seleccionadas. Las flechas muestran osteoblastos inactivos, osteoblastos activos y osteoclastos.

4.7 INMUNOHISTOQUÍMICA

Para los estudios histoquímicos se siguió el procedimiento histológico descrito anteriormente. A diferencia de la técnica histológica descrita, el colado de los preparados se realizó con cola vinílica, en dilución 1/10, dejándolos secar 90 minutos a temperatura ambiente. Una vez adheridos los cortes a los portaobjetos se dejaron secar 12 horas en estufa de 60 °C. La desparafinación se realizó iniciando los pasajes en xilol durante 30 minutos, luego metanol durante 2 minutos. Al paso anterior se le agregó agua oxigenada de 4 volúmenes dejándolo en recipiente tapado durante 30 minutos. A continuación se procedió a la inmersión en etanol 96% y etanol 70% durante 10 minutos cada uno. Se realizaron 3 lavados en buffer Tris salino 0,05 M, pH 7,6 durante 5 minutos cada uno. Posteriormente se realizó el desbloqueo antigénico en un horno de microondas colocando los portaobjetos en citrato de sodio 10 g/l durante 10 minutos a 100 °C. Luego de dejarlos enfriar 15 minutos se procedió al lavado 3 veces en buffer Tris salino 0,05 M, pH 7,6 durante 5 minutos cada uno. Los preparados histológicos fueron incubados con anticuerpo primario, un anticuerpo policlonal anti alfa-macroglobulina producido en cobayo, en dilución 1/10000, durante 60 minutos. Luego fueron realizados 3 lavados con buffer Tris salino de 5 minutos cada uno. Posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de cobayo conjugado con peroxidasa, en dilución 1/1000, durante 60 minutos, se realizaron 3 lavados con buffer Tris salino 5 minutos cada uno. Los preparados fueron incubados con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) hasta observar la aparición macroscópica de la coloración. Finalmente se procedió a un nuevo lavado y montaje con glicerina. Luego de obtener imágenes digitales mediante un microscopio (Olympus, Zeiss, West Germany) con una cámara fotográfica adaptada (Olympus SP-350, China) se procedió a determinar la densidad óptica integrada (DOI) a nivel trabecular, peritrabecular y de los osteocitos de un grupo ovariectomizado tratado con MFP (OVX.G3₉₀) y un grupo control no tratado con MFP (OVX₉₀).

4.8 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

El análisis morfométrico de las tibias se llevó a cabo sobre un corte transversal de 1 mm de espesor. Las tibias izquierdas extraídas fueron medidas longitudinalmente con un calibre (*Calibre Mitutoyo absolute digimatic*) con precisión de 0,01 mm. Posteriormente se les realizó un corte transversal de 1 mm a nivel del 50% de su longitud ósea con una sierra (IsoMet, Buehler Ltd. Illinois. USA). Luego se observaron los cortes al microscopio óptico a 40x y se obtuvieron imágenes digitales con una cámara fotográfica (Olympus SP-350, China).

Empleando el software ImageJ 1.40 (NIH, Maryland, USA) se procedió a realizar las determinaciones morfométricas a nivel cortical como se observa en la Figura 14 [132].

Se determinó en forma directa el perímetro perióstico (mm) (Figura 14A) y el perímetro endóstico (mm) (Figura 14B). También se determinó el área de corte transversal y el área medular y por la diferencia entre dichos valores se calculó el área de tejido cortical (mm²). El diámetro medular (mm) (Figura 14D) y el diámetro óseo (mm) (Figura 14E) se obtuvieron de 4 determinaciones realizadas sobre 4 líneas imaginarias que dividen el área de corte transversal en 8 partes de igual tamaño. El ancho cortical (mm) (Figura 14C) se obtuvo de 8 determinaciones realizadas sobre las mismas líneas imaginarias y el valor fue corroborado por la diferencia entre el ancho total y el ancho medular.

El área cortical fue calculada como la diferencia entre el área de corte transversal y el área medular.

Tabla 4. Medidas en hueso cortical

Nombre	Inglés	Abreviatura	unidad
Perímetro perióstico	<i>Periosteal perimeter</i>	Ps.Pm	mm
Perímetro endóstico	<i>Endocortical perimeter</i>	Ec.Pm	mm
Área de corte transversal	<i>Cross-sectional area</i>	CS.Ar	mm ²
Área medular	<i>Medullary area</i>	Me.Ar	mm ²
Área de tejido cortical	<i>Cortical bone area</i>	CB.Ar	mm ²
Ancho cortical	<i>Cortical width</i>	Ct.Wi	mm

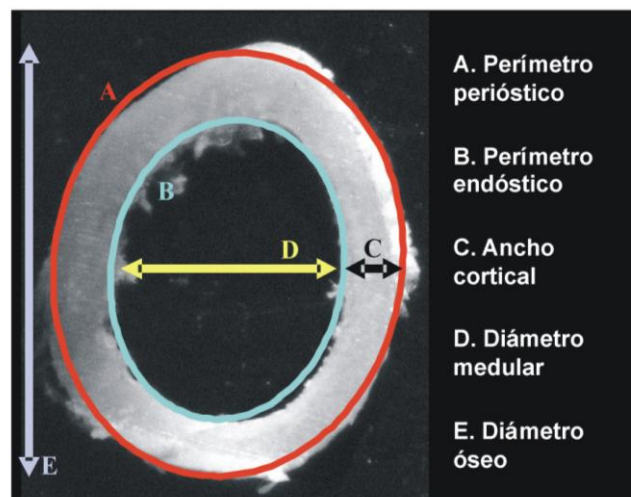


Figura 14. Esquema de las determinaciones morfométricas sobre el tejido cortical

4.9 ESTUDIOS BIOMECÁNICOS

Se realizaron estudios biomecánicos de ambos fémures con un equipo diseñado para tal fin el cual mide la fuerza realizada sobre un hueso en función del desplazamiento del mismo. La fuerza se midió con una discriminación de 0,01 Newton a través de una celda de carga, lo cual equivale a un error de 0.01% y permitió medir desplazamientos con una precisión de 10 μm . Los estudios biomecánicos incluyeron la realización de 2 tipos de ensayos: ensayo de flexión a tres puntos que permitió evaluar el tejido cortical y ensayo de compresión que permitió evaluar el hueso trabecular.

Ensayo de flexión a tres puntos

Para la realización del ensayo de flexión a tres puntos inicialmente se determinó la longitud de cada fémur y se realizó una marca al 50% de la diáfisis. En este sitio se ejerció la fuerza empleando un punto de apoyo superior. Para la realización del ensayo el hueso fue colocado en un soporte metálico de 2 puntos de apoyo inferiores con una separación de 11 o 12 mm en función de la longitud del fémur quedando así establecidos los tres puntos de apoyo del ensayo [146].

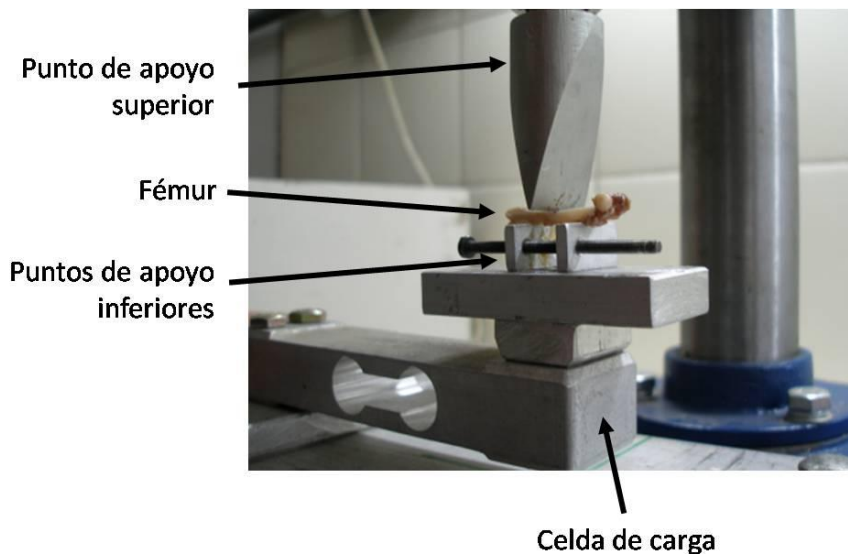


Figura 15. Ensayo de flexión a tres puntos

El voltaje desarrollado por la celda de carga es proporcional a la fuerza aplicada en el rango de 0 a 200 N. El voltaje es medido por un conversor analógico digital cuya señal es transferida a una computadora a través de un puerto RS232 y un software de diseño propio (Biomedical

Data Acquisition Suite 1.0, Rosario, Argentina) permite transformar los datos en pares fuerza-desplazamiento. A medida que se realiza el ensayo un software grafica los valores de fuerza (N) producida sobre el hueso por unidad de desplazamiento (mm). En la curva (Figura 16) pueden evidenciarse diferentes sectores: el primero lineal que corresponde a la zona elástica del hueso, luego se produce un aplanamiento de la curva que corresponde a la zona plástica alcanzando la fuerza máxima que puede soportar el hueso donde la acumulación de microfracturas termina produciendo la fractura del hueso. La fuerza máxima soportada por el hueso y la fuerza de fractura no necesariamente coinciden. El punto donde cambia la curva de lineal a plástica se denomina “*yield point*”. De la pendiente de la zona lineal se obtiene la rigidez del hueso y del área bajo la curva hasta el punto de fractura se obtiene la energía absorbida. Todos estos parámetros evalúan las propiedades mecánicas del hueso como órgano.

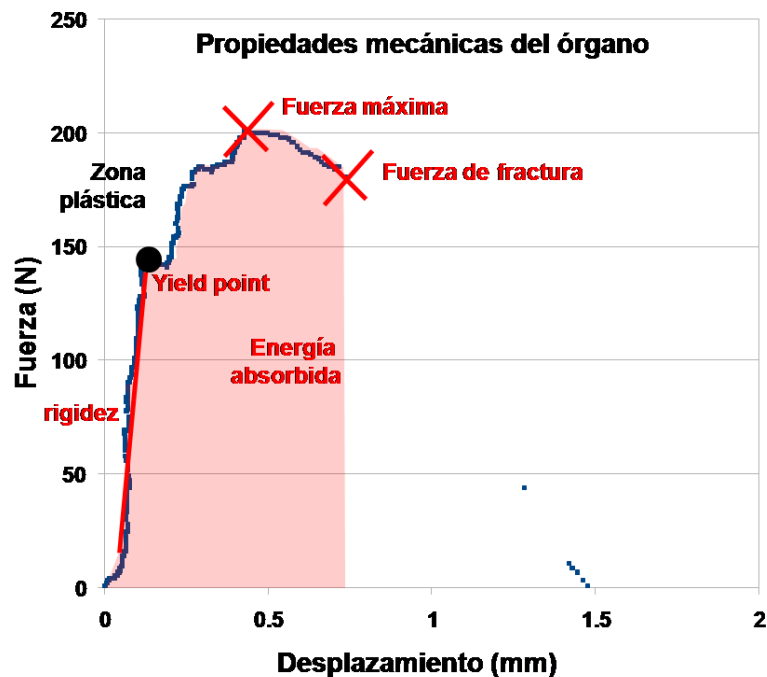


Figura 16. Curva fuerza (N) vs desplazamiento (mm), ensayo biomecánico de flexión a 3 puntos.

También se pueden obtener parámetros que evalúan las propiedades mecánicas del tejido. Para ello se obtiene el estrés (o esfuerzo) a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Estrés} = \text{Fuerza} * \text{distancia de separación de los puntos de apoyo} * \text{radio externo del hueso} / (4 * \text{CSMI})$$

El CSMI o momento de inercia de sección transversal se obtiene a través de la siguiente fórmula:

$$\text{CSMI} = \pi * (\text{diámetro externo}^4 - \text{diámetro interno}^4) / 64$$

El diámetro interno y externo se obtuvieron de un corte transversal de 1,5 mm de espesor (sierra IsoMet. Buehler Ltd. Illinois. USA) a nivel del 50% de la diáfisis femoral, luego de realizado el ensayo de flexión. El corte de 1,5 mm de espesor fue colocado en microscopio 40x sobre fondo negro y se obtuvieron fotografías con una cámara fotográfica (Olympus SP-350, China). Sobre la imagen digital se determinó el diámetro interno y externo en la misma dirección de la fuerza realizada sobre el hueso.

A partir de los valores de desplazamiento se obtiene la deformación a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Deformación} = (12 * \text{radio externo} * \text{desplazamiento} * 10^6) / (\text{distancia de separación de puntos de apoyo})^2$$

De la gráfica de estrés vs deformación, se obtiene el módulo de Young que es la pendiente de la zona lineal de la gráfica.

Ensayo de compresión

Luego de realizado el ensayo de flexión se realizó otro corte transversal de 2,5 mm de espesor (sierra IsoMet, Buehler Ltd. Illinois. USA) del extremo distal del fémur para realizar el ensayo de compresión sobre el hueso trabecular (Figura 17). El corte se colocó sobre una base plana de metal apoyado sobre la celda de carga. La fuerza se ejerció con un cono de compresión de superficie plana de 7.068 mm² [147].

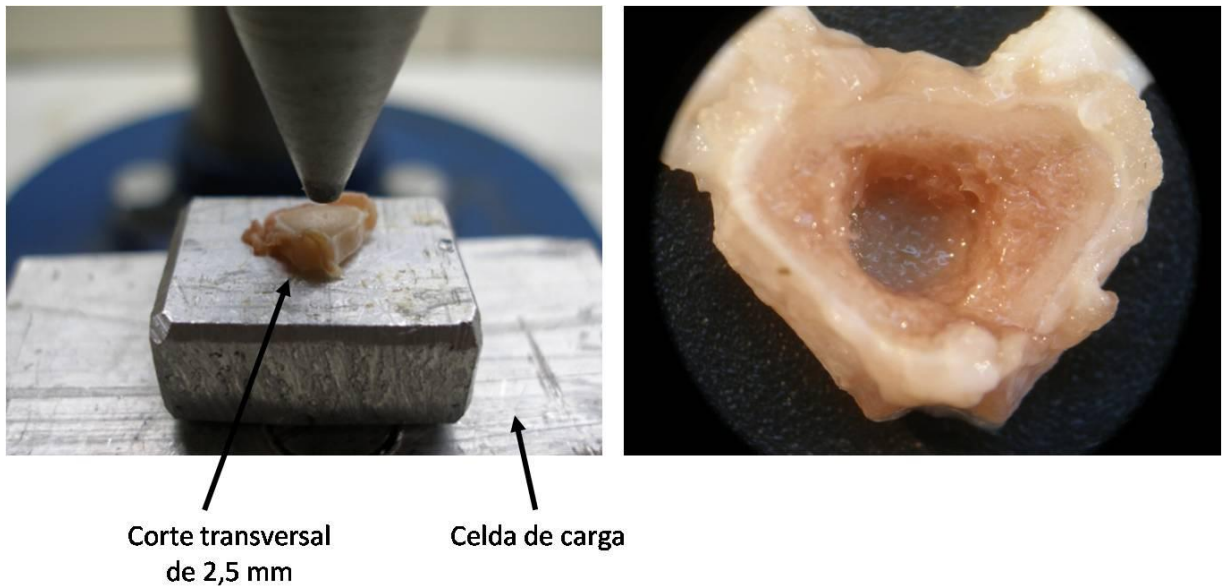


Figura 17. Ensayo de compresión. Izquierda: corte transversal sobre la superficie plana sobre la celda de carga. **Derecha:** corte transversal luego del ensayo.

El software, al igual que en el ensayo de flexión, grafica los valores de fuerza (N) producida sobre el hueso por unidad de desplazamiento (mm). En la curva pueden evidenciarse diferentes sectores: una primer zona lineal y luego una serie de picos que representan el tejido trabecular que va cediendo (Figura 18). La pendiente de la zona lineal hasta el punto de primer fractura trabecular evalúa la rigidez del hueso y el punto mencionado indica la fuerza de fractura. El área bajo la curva obtenida hasta ese punto indica la energía absorbida. De la gráfica también se obtiene la fuerza máxima de fractura. El módulo de Young se obtiene de la siguiente fórmula:

$$\text{Módulo de Young} = \text{rigidez} * \text{grosor del corte transversal} / \text{área del cono de compresión} / 1000$$

Del ensayo de compresión se obtienen rigidez, fuerza máxima, fuerza de fractura, energía absorbida. El estrés y módulo de Young se calculan a partir de datos obtenidos.

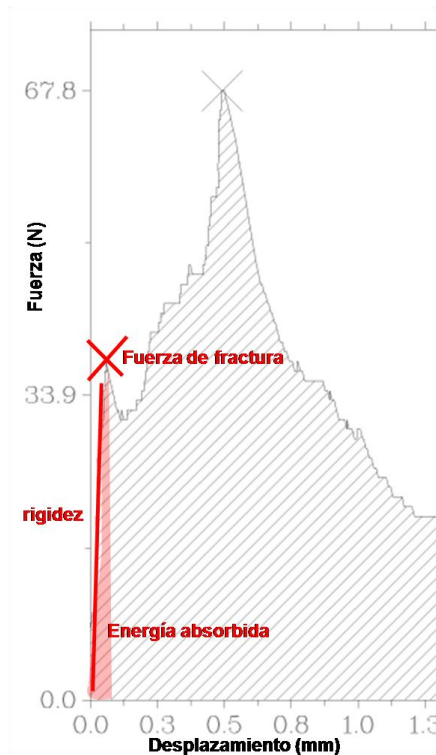


Figura 18. Curva fuerza (N) vs desplazamiento (mm), test de compresión y variables biomecánicas calculadas.

Tabla 5. Resumen de variables biomecánicas evaluadas

Denominación	Fórmula	Significado
PROPIEDADES MECÁNICAS DEL ÓRGANO		
Fuerza de fractura (N)		Resistencia del hueso
Fuerza máxima (N)		Máxima fuerza aplicada
Rigidez (N/mm²)	Pendiente de la zona lineal de la gráfica fuerza vs desplazamiento.	Fuerza aplicada para producir unidad de desplazamiento
Energía absorbida (mJ)	Área bajo la curva de la gráfica fuerza vs desplazamiento al producirse la fractura	Resistencia a la fractura
Deformación (mm)	Deformación = $d/L * 10^6$	Desplazamiento relativo al grosor de la pieza investigada

PROPIEDADES MECÁNICAS DEL TEJIDO ÓSEO

Estrés (MPa)	Estrés = F / A	Resistencia del tejido óseo
Módulo de Young (GPa)	Pendiente de la zona lineal de la gráfica estrés vs deformación	Rigidez del material

Abreviaturas: d: desplazamiento; L: distancia de separación de puntos de apoyo; F: fuerza; A: área del accesorio que ejerce la fuerza.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el software R 2.14.0 [148]. Se realizó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, y el test de homogeneidad de variancias de Bartlett. En el caso en el cual la distribución fue normal y las variancias homogéneas se aplicaron test paramétricos (t de Student para la comparación de dos grupos, y análisis de la variancia a un criterio de clasificación (ANOVA) para datos independientes, post test LSD, para la comparación de más de dos grupos) y los resultados se expresaron como $\text{media} \pm \text{SEM}$. Si la distribución no fue normal y/o las variancias homogéneas se aplicaron test no paramétricos (Mann-Whitney para la comparación de dos grupos y Kruskal-Wallis, post test Dunns, para la comparación de más de dos grupos) y los resultados se expresaron como mediana y [rango]. Se consideró diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Con el fin de simplificar la presentación de los resultados, los mismos se presentarán agrupados por tiempo en que se realizó la eutanasia respecto del inicio del experimento.

5.1 EVALUACIÓN A LOS 30 DÍAS

Las mediciones a los 30 días se realizaron para evaluar el cambio en el remodelado óseo inducido por el diferente contenido de calcio de las dietas, la pérdida de masa ósea por efecto de la ovariectomía y validar el modelo experimental.

5.1.1 **Peso uterino**

Finalizado el tiempo experimental de cada rata se obtuvieron los úteros y se pesaron. Este dato fue utilizado para incluir los animales definitivamente en los grupos experimentales. El peso de los úteros fue significativamente más bajo en ratas OVX ($25,6 \pm 2,7$ mg/100 g peso corporal) comparado con el grupo Sham ($171,3 \pm 13,1$ mg/100 g peso corporal); prueba t de Student para datos independientes, $p < 0,05$.

5.1.2 **Determinaciones bioquímicas**

Los resultados de las determinaciones bioquímicas se muestran en la Tabla 6. De acuerdo a lo esperado a los 30 días hallamos que el grupo que recibió dieta hipocálcica (OVX₃₀.LCaD) presentó mayor estado de resorción ósea. Aunque las diferencias en los niveles de Dpd no son estadísticamente significativas, los niveles en OVX₃₀.LCaD son más altos respecto del grupo que recibió dieta normocálcica (OVX₃₀.NCaD). Los niveles de FAo fueron menores en el grupo OVX₃₀.LCaD respecto del grupo OVX₃₀.NCaD. El índice FAo/Dpd en el grupo OVX₃₀.LCaD mostró un valor 15 veces menor respecto de los grupos Sham₃₀ y OVX₃₀.NCaD lo que nos indica un aumento en la proporción de BMU en estado de resorción.

No se hallaron diferencias en la calcemia y la calciuria. La fosfatemia en el grupo que recibió dieta hipocálcica (OVX₃₀.LCaD) fue más baja que en el grupo que recibió dieta normocálcica (OVX₃₀.NCaD) y que el grupo Sham₃₀. La PTH se halló aumentada en el grupo OVX₃₀.NCaD por efecto de la ovariectomía, mientras que no sucedió lo mismo en el grupo OVX₃₀.LCaD. Esto se debería a que la dieta baja en calcio administrada tenía bajo contenido de fósforo con

el objetivo de lograr un estado de alta remodelación sin incrementar la PTH para evitar una mayor pérdida de masa ósea por efecto de la hormona.

Tabla 6. Determinaciones bioquímicas a 30 días

30 días	Sham ₃₀	OVX ₃₀ .NCaD	OVX ₃₀ .LCaD
Calcemia (mg/dl)*	9,75±0,36	10,41±0,56	10,57±0,74
Fosfatemia (mg/dl)*	8,52±0,09 a	8,70±1,18	6,58±0,41 a
Calciuria (mg/24-h)*	0,30±0,08	0,44±0,09	0,52±0,11
Dpd (nmol/mmol creatinina)**	197,20 [168,10-877,90]	224,40 [198,80-626,30]	285,50 [16,00-2366,00]
FAo (U/l)*	93,96±34,42 a	71,45±24,43 b	12,24±6,63 a,b
Relación FAo/Dpd*	0,28	0,24	0,017
PTH (pg/ml)*	18,52±4,05 a	26,84±9,24 b	10,58±1,56 a,b

*Abreviaturas: FAo: fosfatasa alcalina ósea; PTH: parathormona. Letras iguales indican diferencias significativas. *Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD, p<0.05. **Los resultados se expresan como mediana [rango], Mann-Whitney test.*

5.1.3 Glándulas paratiroides

El peso de las glándulas paratiroides no mostró diferencias significativas entre ambos grupos alimentados con contenido de calcio diferente (OVX₃₀.NCaD: 0,42±0,17 mg/100g peso corporal; OVX₃₀.LCaD: 0,28±0,26 mg/100g peso corporal). El análisis histológico de las glándulas paratiroides tampoco mostró diferencias entre ambos grupos.

5.1.4 Histomorfometría ósea

A los 30 días se observó una disminución en el BV/TV en los grupos alimentados con dieta normocálcica e hipocálcica (OVX₃₀.NCaD y OVX₃₀.LCaD) comparados con el grupo Sham₃₀ debido al efecto de la ovariectomía (Figura 19). Esta diferencia se debió a una disminución en el número de trabéculas sin diferencias en el espesor trabecular. Acorde a los marcadores bioquímicos de remodelado óseo, el análisis histomorfométrico en el grupo alimentado con dieta hipocálcica (OVX₃₀.LCaD) presentó mayor resorción ósea con un aumento significativo en el porcentaje de superficie erodada (ES/BS) y el número de osteoclastos (Tabla 7) con respecto al grupo alimentado con dieta normocálcica (OVX₃₀.NCaD). Sin embargo, la

disminución en los niveles de FAo no correlacionó con la ausencia de cambios observados en Ob.S/BS.

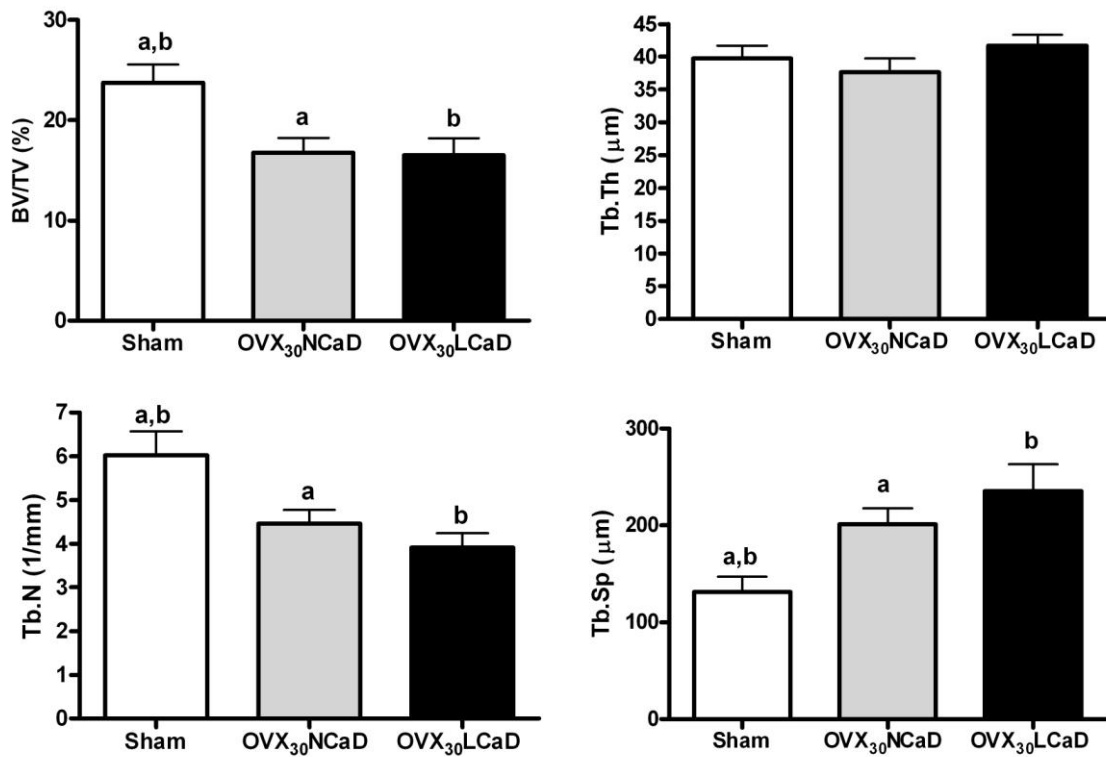


Figura 19. Histomorfometría ósea 40x. Abreviaturas: BV/TV: volumen óseo trabecular; Tb.Th: espesor trabecular; Tb.N: número de trabeculas; Tb.Sp: separación trabecular. Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD, $p < 0.05$. Letras iguales indican diferencias significativas.

Tabla 7. Histomorfometría ósea 400x

30 días	Sham ₃₀	OVX ₃₀ .NCaD	OVX ₃₀ .LCaD
Ob.S/BS (%)	13,45±1,33	18,41±2,76	20,00±2,79
ES/BS (%)	6,38±2,36	7,45±1,05 a	12,41±1,90 a
N.Oc/mm ²	1,06±0,49	0,19±0,19 a	3,06±1,08 a

Abreviaturas: Ob.S/BS(%): porcentaje de superficie cubierta por osteoblastos; ES/BS (%): porcentaje de superficie erodada; N.Oc/mm²: número de osteoclastos. Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD, $p < 0.05$. Letras iguales indican diferencias significativas.

A modo ilustrativo se muestran imágenes de cortes histológicos de los tratamientos donde se puede observar la disminución del número de trabéculas en los grupos ovariectomizados alimentados con dieta normocálcica e hipocálcica (OVX₃₀.NCaD y OVX₃₀.LCaD) respecto del grupo Sham₃₀ (Figura 20).

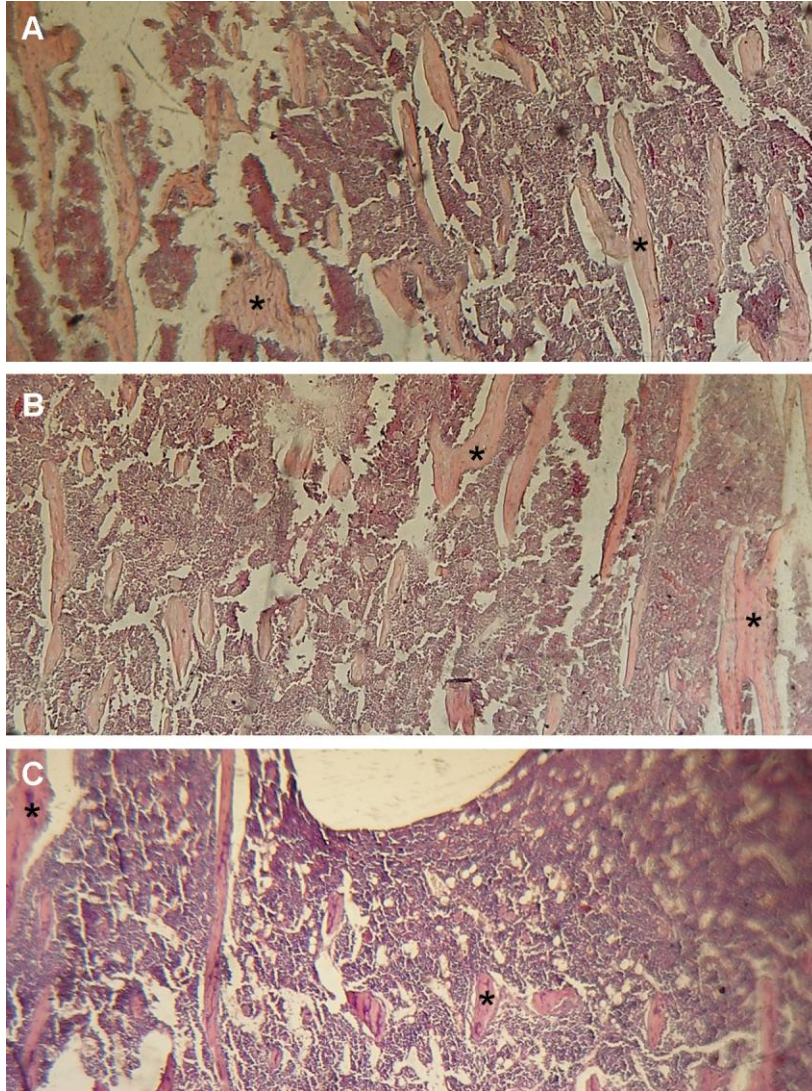


Figura 20. Volumen óseo trabecular (BV/TV). Imágenes representativas (40x) de cortes histológicos de rata. **A.** Sham₃₀. **B.** Grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica (OVX₃₀.NCaD). **C.** Grupo ovariectomizado alimentado con dieta hipocálcica (OVX₃₀.LCaD). *Los asteriscos indican, a modo de ejemplo, las trabéculas óseas.*

5.1.5 Morfometría cortical

A los 30 días la ovariectomía condujo a un mayor perímetro endóstico y mayor perímetro perióstico con conservación del ancho cortical comparado con el grupo Sham₃₀, siendo estadísticamente significativo en el grupo ovariectomizado alimentado con dieta hipocálcica

(OVX₃₀.LCaD) (Tabla 8). Adicionalmente OVX₃₀.LCaD mostró mayor área cortical, mayor diámetro medular y mayor diámetro total comparado con el grupo Sham₃₀. Los grupos ovariectomizados solo mostraron diferencias en el área cortical.

Tabla 8. Morfometría cortical

30 días	Sham ₃₀	OVX ₃₀ .NCaD	OVX ₃₀ .LCaD
Perímetro endóstico (mm)	4,22±0,22 a	4,85±0,16	5,02±0,12 a
Perímetro perióstico (mm)	8,09±0,15 a	8,74±0,32	9,00±0,11 a
Ancho cortical (mm)	0,61±0,03	0,60±0,03	0,64±0,01
Área cortical (mm ²)	3,51±0,19 a	3,76±0,29 b	4,11±0,08 a,b
Diámetro medular (mm)	1,25±0,07 a	1,42±0,05	1,48±0,03 a
Diámetro total (mm)	2,47±0,05 a	2,62±0,08	2,75±0,03 a

Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD, p<0.05.

Letras iguales indican diferencias significativas.

5.1.6 Estudios biomecánicos

El hueso cortical fue evaluado por el ensayo de flexión a tres puntos (Tabla 9). Si bien ambos grupos ovariectomizados presentaron mayor fuerza de fractura y fuerza máxima que el grupo Sham₃₀, sólo en el grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica (OVX₃₀.NCaD) esta diferencia fue estadísticamente significativa. Los resultados coinciden con las medidas morfométricas mostradas en el apartado anterior. El hecho de que los grupos OVX presenten mayor fuerza de fractura se explica por el hecho de que la OVX induce una pérdida ósea fundamentalmente a nivel trabecular y es el tejido cortical el que modifica sus propiedades para evitar la fractura. El CSMI aumentó en los grupos ovariectomizados y fue significativamente menor en el grupo que recibió dieta hipocálcica (OVX₃₀.LCaD) respecto del grupo con dieta normocálcica (OVX₃₀.NCaD).

El tejido trabecular se evaluó a través del ensayo de compresión (Tabla 10) y mostró que el grupo ovariectomizado alimentado con dieta hipocálcica (OVX₃₀.LCaD) presentó menor fuerza de fractura, menor fuerza máxima y menor rigidez respecto del grupo Sham₃₀. OVX₃₀.LCaD presentó menores valores que el grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica (OVX₃₀.NCaD) en las variables mencionadas con diferencias significativas en fuerza de fractura y fuerza máxima.

Tabla 9. Ensayo de flexión a tres puntos a los 30 días

30 días	Sham	OVX ₃₀ .NCaD	OVX ₃₀ .LCaD
Fuerza de fractura (N)*	127,80±6,98 a	147,50±4,52 a	141,20±5,06
Fuerza máxima de fractura (N)*	141,20±5,13 a	158,00±4,87 a	150,00±4,89
Rigidez (N/mm)**	460,50 [329,50-792,40]	556,50 [440,50-704,60]	476,30 [228,30-1125]
Energía absorbida (mJ)*	103,9±8,9	116,7±8,8	103,8±6,0
CSMI (mm ⁴)*	4,87±0,35 a	6,48±0,21 a,b	5,70±0,26 b
Estrés máximo (MPa)*	131,60±8,21	116,50±3,31	123,90±4,62
Módulo de Young (GPa)**	3,04 [1,58-4,07]	2,29 [1,54-3,40]	2,02 [1,27-7,00]

Abreviaturas: CSMI: momento de inercia de sección transversal. Letras iguales indican diferencias significativas. *Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD, p<0.05. **Los resultados se expresan como mediana [rango], Mann-Whitney test.

Tabla 10. Ensayo de compresión a los 30 días

30 días	Sham	OVX ₃₀ .NCaD	OVX ₃₀ .LCaD
Fuerza de fractura (N)**	57,02 [36,60-114,0] a	52,18 [13,99-41,96]	18,29 [3,23-41,96] a
Fuerza máxima (N)**	92,52 [52,72-142,00] a	62,40 [15,06-121,6] a	38,19 [9,68-60,25] a
Rigidez (N/mm)**	773,80 [375,50-2447,00] a,b	476,70 [218,40-1509,00] a	164,60 [24,60-467,00] b
Energía absorbida (mJ)*	2,5±0,9	3,0±0,6	1,6±0,3
Módulo de Young (GPa)**	0,27[0,13-0,86] a,b	0,17[0,08-0,53] a	0,06[0,008-016] b

Letras iguales indican diferencias significativas. *Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD, p<0.05. **Los resultados se expresan como mediana [rango], Mann-Whitney test.

**Conclusiones parciales
30 días**

El análisis de los resultados a los 30 días permitió validar el modelo de osteoporosis inducida por ovariectomía al hallar una disminución del volumen óseo trabecular ocasionado por una mayor resorción ósea debido a mayor número de osteoclastos y superficie erodada.

Los estudios biomecánicos evidenciaron menor fuerza de fractura, fuerza máxima y rigidez a nivel trabecular consistentes con los hallazgos histológicos.

5.2 EVALUACIÓN A 90 DÍAS

A los 90 días se realizaron determinaciones con el fin de evaluar el efecto osteoformador del MFP.

5.2.1 Determinaciones bioquímicas

La fluoremia fue menor en el grupo alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP (OVX.G3₉₀=145,2±35,80 µM) versus el grupo alimentado con dieta normocálcica y tratado con MFP (OVX.G1₉₀=216,3±48,72 µM). Este resultado indicó una mayor captación de flúor por el hueso en el grupo que recibió dieta secuencial (OVX.G3₉₀) respecto del grupo con dieta normocálcica (OVX.G1₉₀), aun cuando ambos grupos recibieron MFP. Este resultado es consistente con un estado de mayor formación ósea.

5.2.2 Histomorfometría ósea

No se observaron diferencias significativas en los parámetros histomorfométricos óseos entre los grupos experimentales a nivel de la cantidad y distribución del tejido óseo (Tabla 11).

Tabla 11. Histomorfometría ósea 40x

90 días	OVX ₉₀	OVX.G1 ₉₀	OVX.G2 ₉₀	OVX.G3 ₉₀
BV/TV (%)	18,56±5,74	18,53±7,15	18,98±1,81	21,19±6,62
Tb.Th (µm)	50,28±11,09	48,65±9,14	60,69±6,17	55,68±9,960
Tb.N (1/mm)	3,74±1,17	3,73±1,09	3,29±0,42	3,44±0,60
Tb.Sp (µm)	236,8±77,49	243,5±115,6	278,8±45,9	243,9±57,29

Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD (p>0,05)

Abreviaturas: BV/TV: volumen óseo trabecular; Tb.Th: espesor trabecular; Tb.N: número de trabéculas;

Tb.Sp: separación trabecular.

Luego de 90 días de tratamiento no se hallaron diferencias significativas en los parámetros celulares evaluados (Tabla 12).

Tabla 12. Histomorfometría ósea 400x

90 días	OVX ₉₀	OVX.G1 ₉₀	OVX.G2 ₉₀	OVX.G3 ₉₀
Ob.S/BS (%)	21,72± 4,48	20,74± 2,49	19,60±1,85	18,62±2,89
ES/BS (%)	10,84±1,91	21,55±10,46	19,51±4,23	18,08±3,55
N.Oc/mm ²	2,05±0,95	3,92±1,40	1,35±1,15	1,05±0,35

Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD (p>0,05)

Abreviaturas: Ob.S/BS(%): porcentaje de superficie cubierta por osteoblastos; ES/BS (%): porcentaje de superficie erodada; N.Oc/mm²: número de osteoclastos.

5.2.3 Estudios biomecánicos

El tratamiento con MFP en el grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica (OVX.G1₉₀) no mostró mejores parámetros biomecánicos respecto del grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica (OVX₉₀), con excepción de mayor estrés máximo indicando que existiría una mayor resistencia del tejido óseo, que no se refleja en una mayor fuerza de fractura del hueso investigado debido a una disminución en variables arquitectónicas como el CSMI (Tabla 13). Sin embargo, se observó que OVX.G1₉₀ presentó menor fuerza de fractura y menor CSMI que OVX₉₀ evidenciando que el tratamiento con MFP no mejoraría los parámetros biomecánicos e incluso los afectaría negativamente. El grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial que no recibió tratamiento farmacológico (OVX.G2₉₀) si mostró un aumento significativo en la rigidez y el módulo de Young respecto del grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica (OVX₉₀). El grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP (OVX.G3₉₀), si bien no mostró diferencias estadísticas respecto del grupo OVX₉₀, presentó mayor rigidez, estrés máximo y módulo de Young.

En el ensayo de compresión el grupo alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP (OVX.G3₉₀) no mostró mejorías en ninguno de los parámetros biomecánicos analizados. Solo el grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial que no recibió tratamiento farmacológico (OVX.G2₉₀) mostró mayor fuerza de fractura, fuerza máxima y rigidez (Tabla 14) respecto de OVX₉₀.

Tabla 13. Ensayo de flexión a 3 puntos

90 días	OVX ₉₀	OVX.G1 ₉₀	OVX.G2 ₉₀	OVX.G3 ₉₀
Fuerza de fractura (N)*	173,40±8,12 a	149,3±6,32 a,b,c	175,20±4,79 b	168,50±3,94 c
Fuerza máxima de fractura (N)*	180,40±6,70	168,80±3,46	184,10±3,34	183,30±4,63
Rigidez (N/mm)*	615,5±62,3 a	642,9±99,3 b	1021,0±88,90 a,b	835,5±116,3
Energía absorbida (mJ)**	127,80 [70,60-248,30]	112,00 [52,20-127,90]	112,90 [64,96-174,10]	145,00 [44,20-184,30]
CSMI (mm ⁴)*	7,20±0,22 a	4,73±0,32 a,b,c	7,50±0,55 b	6,64±0,36 c
Estrés máximo (MPa)*	132,70±9,06 a	176,70±10,56 a,b,c	137,70±6,70 b	148,90±6,95 c
Módulo de Young (GPa)*	3,10±0,31 a	4,77±0,52	5,09±0,45 a	4,66±0,61

Abreviaturas: CSMI: momento de inercia de sección transversal. Letras iguales indican diferencias significativas. *Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD, $p<0.05$. **Los resultados se expresan como mediana [rango], Kruskal-Wallis, post test Dunns.

Tabla 14. Ensayo de compresión

90 días	OVX ₉₀	OVX.G1 ₉₀	OVX.G2 ₉₀	OVX.G3 ₉₀
Fuerza de fractura (N)*	27,89±5,83 a	38,29±4,96	56,17±7,23 a,b	18,30±4,56 b
Fuerza máxima de fractura (N)*	44,22±7,61 a	48,57±6,93	89,03±5,76 a,b	33,62±2,86 b
Rigidez (N/mm)**	193,00 [92,30-454,00] a	335,00 [45,30-650,40]	515,40 [71,60-1683] a,b	45,50 [33,48-385,00] b
Energía absorbida (mJ)**	1,52 [0,75-2,60] a,b	4,38 [0,84-12,84] a,c	4,48 [0,55-7,96] b,d	1,09 [0,25-5,84] d,c,d
Módulo de Young (GPa)**	0,07 [0,03-0,16] a	0,12 [0,02-0,23]	0,18 [0,02-0,59] a,b	0,02 [0,01-0,13] b

Letras iguales indican diferencias significativas. *Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD, $p<0.05$. **Los resultados se expresan como mediana [rango], Kruskal-Wallis, post test Dunns.

5.2.4 Morfometría cortical

El grupo que recibió dieta secuencial y MFP (OVX.G3₉₀) mostró mayor perímetro endóstico respecto al grupo ovariectomizado (OVX₉₀). A pesar de que no se halló aumento estadístico en el perímetro perióstico en OVX.G3₉₀ vs OVX₉₀, este aumento fue suficiente para que se observe un incremento significativo del ancho y área cortical en OVX.G3₉₀. El grupo alimentado con dieta secuencial pero que no recibió MFP (OVX.G2₉₀) mostró cambios

similares mientras que no sucedió lo mismo con el grupo alimentado con dieta normocálcica que recibió MFP (OVX.G1₉₀) lo cual estaría indicando que el MFP no influye positivamente en la adaptación a la ovariectomía a menos que se acompañe de modificaciones del contenido de calcio de la dieta (Tabla 15).

Tabla 15. Morfometría cortical 90 días

90 días	OVX ₉₀	OVX.G1 ₉₀	OVX.G2 ₉₀	OVX.G3 ₉₀
Perímetro endóstico (mm)	4,95±0,17 a,b	5,14±0,21 c,d	5,62±0,18 a,c	5,32±0,18 b,d
Perímetro perióstico (mm)	8,87±0,13	8,29±0,21	10,32±0,23	9,88±0,20
Ancho cortical (mm)	0,61±0,01 a,b,c	0,49±0,02 a,d,e	0,65±0,01 b,d,f	0,71±0,01 c,e,f
Área cortical (mm ²)	3,92±0,1 a,b,c	2,99±0,21 a,d,e	4,82±0,13 b,d	5,06±0,18 c,e
Diámetro medular (mm)	1,45±0,05	1,49±0,08	1,56±0,06	1,58±0,05
Diámetro total (mm)	2,67±0,04 a,b	2,47±0,08 c,d	2,87±0,06 a,c	3±0,06 b,d

Los resultados se expresan como media±SEM, ANOVA, post test LSD, p<0.05.

Letras iguales indican diferencias significativas.

5.2.5 Inmunohistoquímica

Se determinó la densidad óptica integrada a nivel trabecular, peritrabecular y en osteocitos luego de realizar inmunohistoquímica para detectar la presencia de alfa-macroglobulina en el grupo que recibió tratamiento con MFP (OVX.G3₉₀) en comparación con el grupo ovariectomizado que no recibió MFP (OVX₉₀). El tratamiento con MFP presentó aumento de la densidad óptica integrada de forma estadísticamente significativa a nivel peritrabecular (p=0,019) y en osteocitos (p=0,040) respecto del control sin diferencias a nivel de las trabéculas óseas (Figura 21).

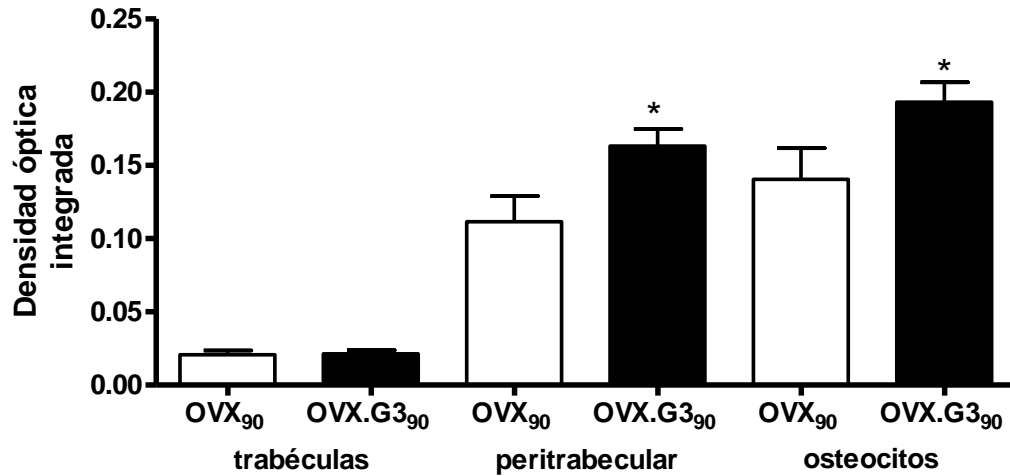


Figura 21. Medición de alfa-macroglobulina en el tejido óseo. *t de Student para datos independientes; * indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto del grupo ovariectomizado (OVX₉₀),*

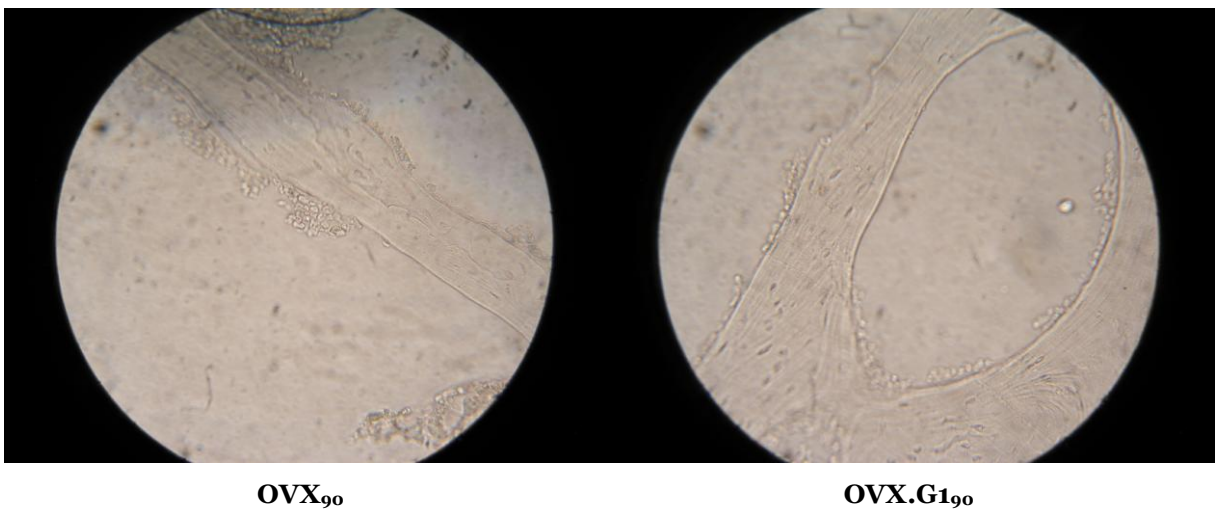


Figura 22. Imágenes representativas de inmunohistoquímica. **Izquierda:** grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica (OVX₉₀). **Derecha:** grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP (OVX.G3₉₀)

**Conclusiones parciales
90 días**

El análisis de los resultados a los 90 días no mostró diferencias en los parámetros histomorfométricos.

En lo que respecta a las variables biomecánicas de flexión como de compresión no se hallaron diferencias significativas de relevancia entre los diferentes grupos.

Por inmunohistoquímica se halló mayor densidad óptica integrada a nivel peritrabecular y en osteocitos en el grupo tratado con MFP.

5.3 EVALUACIÓN A LOS 150 DÍAS

5.3.1 Determinaciones bioquímicas

A los 150 días los niveles de FAo y Dpd mostraron una pequeña disminución en el grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica y tratado con MFP/Z (OVX.G1₁₅₀) y en el grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀) indicando una disminución en el remodelado óseo (Tabla 16). El índice FAo/Dpd en el grupo alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀) fue dos veces más alta que en el grupo alimentado con dieta normocálcica y tratado con MFP/Z (OVX.G1₁₅₀) como consecuencia del aumento en los niveles de FAo indicando alta actividad de los osteoblastos. Contribuyó también al aumento de la relación FAo/Dpd en el grupo OVX.G3₁₅₀, los menores valores hallados en Dpd. Esta relación está indicando una mayor tasa de formación y menor tasa de resorción en el grupo con dieta secuencial y tratamiento farmacológico (OVX.G3₁₅₀).

La calciuria fue más alta en los grupos que recibieron dieta secuencial (OVX.G2₁₅₀ y OVX.G3₁₅₀) o únicamente tratamiento farmacológico (OVX.G1₁₅₀) respecto del grupo ovariectomizado (OVX₁₅₀) aunque solo se hallaron diferencias significativas en el grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀). No hubo diferencias en calcemia, fosfemia o PTH a los 150 días.

Tabla 16. Determinaciones bioquímicas a 150 días

150 días	OVX ₁₅₀	OVX.G1 ₁₅₀	OVX.G2 ₁₅₀	OVX.G3 ₁₅₀
Calcemia (mg/dl)	9,62±0,50	10,32±0,35	9,52±0,32	10,34±0,53
Fosfemia (mg/dl)	5,69±1,04	5,84±0,94	8,23±0,48	7,42±0,53
Calciuria (mg/24-h)	0,59±0,14 a	1,35±0,29	1,81±0,36	1,61±0,26 a
Dpd (nmol/mmol creatinuria)	97,44±34,34	40,34±4,06	52,23±4,01	34,00±4,23
FAo (U/l)	110,90±25,79 a,b,c	23,34±13,61 a	28,70±14,21 b	44,37±21,87 c
Relación FAo/Dpd	1,14	0,58	0,55	1,30
PTH (pg/ml)	11,69±6,57	11,81±1,93	22,30±7,35	35,67±13,27

Abreviaturas: Dpd: deoxipiridinolina urinaria; FAo: fosfatasa alcalina ósea; PTH: hormona paratiroidea.

Los resultados se expresan como media±SEM, ANOVA, post test LSD, p<0.05.

Letras iguales indican diferencias significativas.

5.3.2 Histomorfometría ósea

Luego de 150 días se observó un aumento en el BV/TV en el grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀) respecto del grupo ovariectomizado (OVX₁₅₀), del grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica tratado con MFP/Z (OVX.G1₁₅₀) y del grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial sin tratamiento farmacológico (OVX.G2₁₅₀). Esta diferencia fue a expensas de un aumento en el número de trabéculas sin modificación del espesor trabecular (Figura 23 y Figura 24).

Este aumento podría ser consecuencia de una disminución en el número de osteoclastos, el cual fue de dos veces a los 90 días y de tres veces a los 150 días cuando se comparan con el grupo OVX₁₅₀ (Tabla 17).

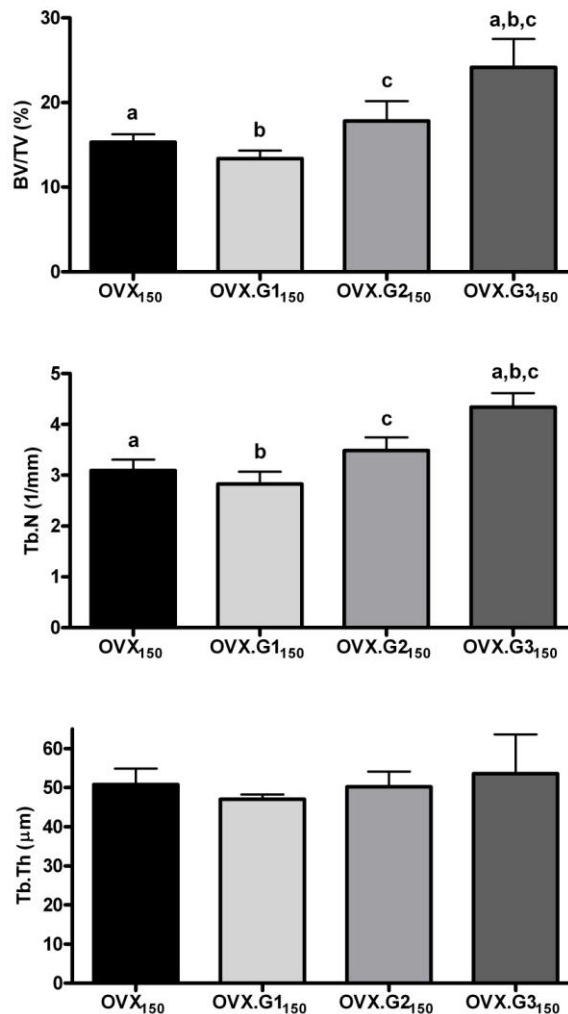


Figura 23. Histomorfometría 40x. Los resultados se expresan como media \pm SEM, ANOVA, post test LSD, $p < 0.05$. Abreviaturas: BV/TV: volumen óseo trabecular; Tb.Th: espesor trabecular; Tb.N: número de trabéculas; Tb.Sp: separación trabecular. Letras iguales indican diferencias significativas.

El grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica y tratado con MFP/Z (OVX.G1₁₅₀) y el grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial sin tratamiento farmacológico (OVX.G2₁₅₀) no mostraron aumento en el BV/TV, lo que indica que el tratamiento con MFP/Z y diferente consumo de Ca tiene una respuesta favorable en el hueso trabecular, y este efecto no es consecuencia del contenido de Ca en la dieta o el tratamiento farmacológico individualmente (Figura 23).

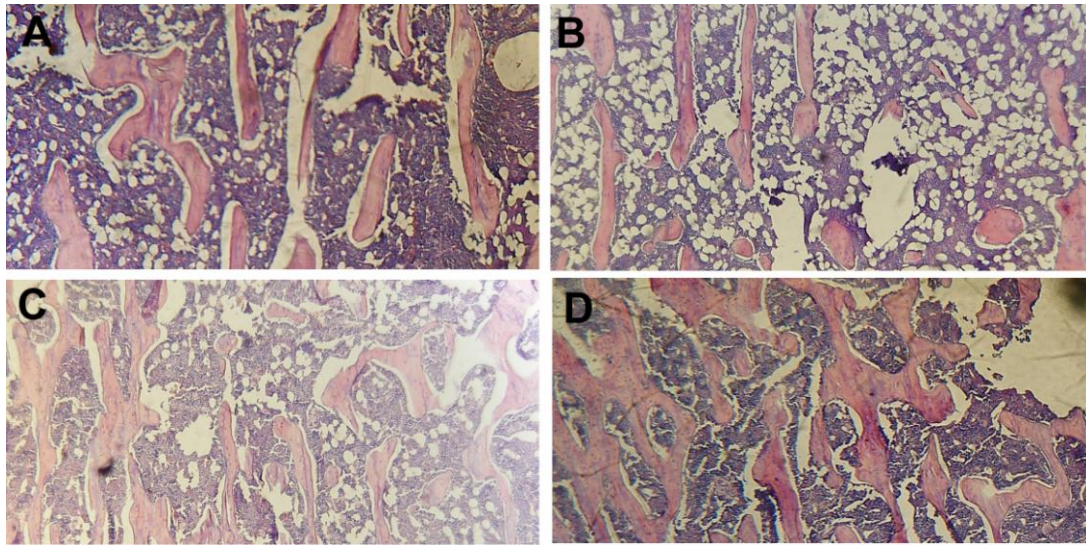


Figura 24. Imágenes representativas 40x. A. Grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica (OVX₁₅₀). B. Grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica y tratado con MFP/Z (OVX.G1₁₅₀). C. Grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial, sin tratamiento farmacológico (OVX.G2₁₅₀). D. Grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀).

Tabla 17. Histomorfometría ósea 400x

150 días	OVX ₁₅₀	OVX.G1 ₁₅₀	OVX.G2 ₁₅₀	OVX.G3 ₁₅₀
Ob.S/BS (%)	16,17±2,71	13,39±3,41	24,16±2,72	19,34±4,48
ES/BS (%)	5,09±0,96 a	9,21±3,08	6,49±1,78	10,45±2,54 a
N.Oc/mm ²	0,90±0,25	2,06±0,74	2,45±1,23	0,28±0,18

Abreviaturas: Ob.S/BS(%): porcentaje de superficie cubierta por osteoblastos; ES/BS (%): porcentaje de superficie erodada; N.Oc/mm²: número de osteoclastos. Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD, p<0.05. Letras iguales indican diferencias significativas.

A continuación se observan microfotografías representativas del grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica (OVX₁₅₀) y del grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀). En la Figura 25 se observa diferente grado de mineralización en los grupos tratados con MFP respecto del grupo alimentado con dieta normocálcica (OVX₁₅₀).

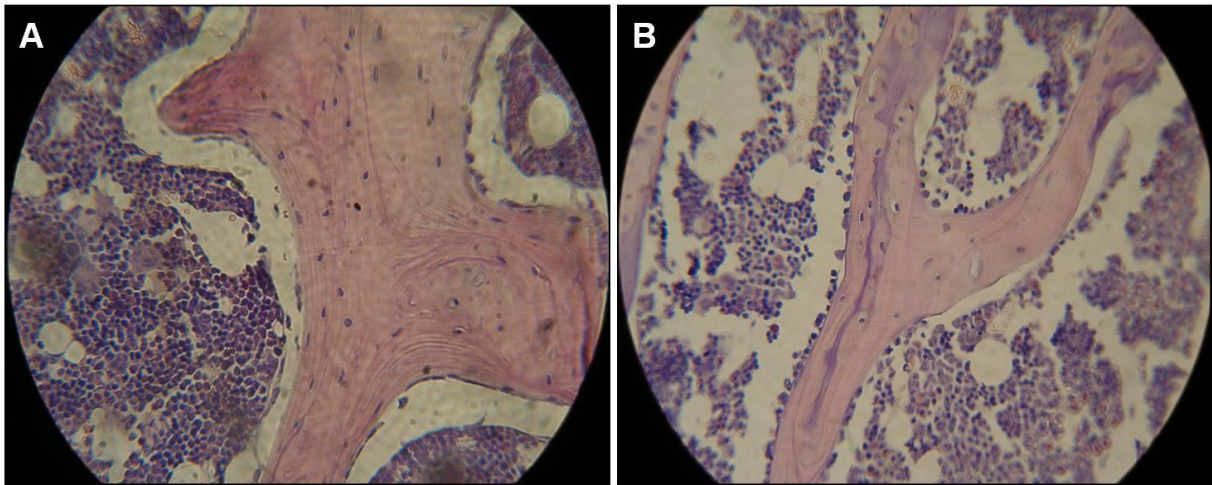


Figura 25. Imágenes representativas 400x. A. Grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica (OVX₁₅₀) **B.** Grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀). La tinción diferente observada en el interior de las trabéculas da una idea del diferente grado de mineralización.

En la Figura 26 se observan en el grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀) osteoblastos y osteoclastos, ambos de mayor tamaño respecto de los grupos que no recibieron tratamiento farmacológico.

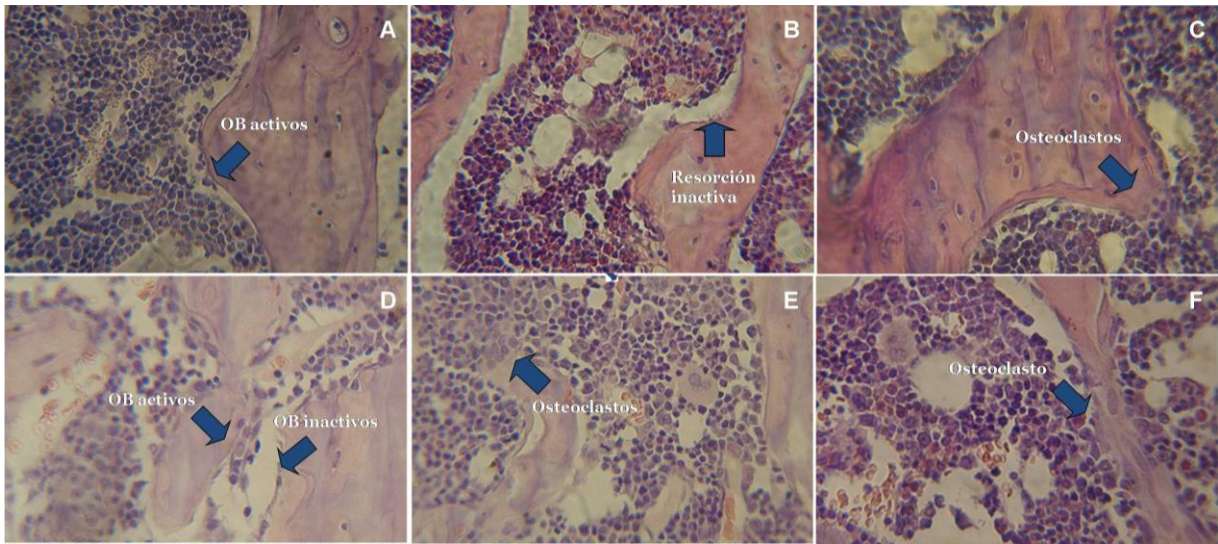


Figura 26. Imágenes representativas 400x. A-B-C Imágenes del grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocalcica (OVX₁₅₀). **D-E-F** Imágenes del grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G₃₁₅₀). Con flechas se observan las diferencias en el tamaño celular de osteoblastos y osteoclastos entre los grupos mencionados. También es señalada un área de resorción inactiva (B) y osteoblastos inactivos (D).

5.3.3 Morfometría cortical

Luego de 150 días la morfometría cortical no mostró diferencias significativas entre el grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G₃₁₅₀) y el resto de los grupos. Sólo se halló diferencia significativa en el ancho cortical en el grupo ovariectomizado (OVX₁₅₀) y el grupo alimentado con dieta secuencial que no recibió tratamiento farmacológico (OVX.G₂₁₅₀) (Tabla 18).

Tabla 18. Morfometría cortical 150 días

150 días	OVX ₁₅₀	OVX.G ₁₁₅₀	OVX.G ₂₁₅₀	OVX.G ₃₁₅₀
Perímetro endóstico (mm)	4,72±0,10	4,87±0,22	4,99±0,14	4,71±0,16
Perímetro perióstico (mm)	9,49±0,09	9,31±0,25	9,47±0,11	9,39±0,16
Ancho cortical (mm)	0,74±0,01 a	0,70±0,01	0,69±0,01 a	0,71±0,02
Área cortical (mm ²)	4,83±0,09	4,62±0,17	4,52±0,08	4,61±0,14
Diámetro medular (mm)	1,37±0,03	1,42±0,06	1,46±0,04	1,37±0,04
Diámetro total (mm)	2,86±0,03	2,81±0,06	2,83±0,04	2,79±0,04

Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD, $p < 0.05$.

Letras iguales indican diferencias significativas.

5.3.4 Estudios biomecánicos

En el ensayo de flexión a 3 puntos que evalúa el tejido cortical mostró diferencias en la fuerza máxima y fuerza de fractura. Esta última fue un 19,7% mayor en el grupo ovariectomizado alimentado con dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀) respecto del grupo ovariectomizado (OVX₁₅₀), indicando mayor resistencia a la fractura lo que se puede explicar por mejores propiedades del material evaluado por el módulo de Young con una distribución del material similar evaluadas por CSMI. Los grupos OVX.G1₁₅₀ (alimentado con dieta normocálcica y tratado con MFP/Z) y OVX.G2₁₅₀ (alimentado con dieta secuencial sin tratamiento farmacológico) no mostraron diferencias respecto del grupo ovariectomizado (OVX₁₅₀). El resto de los parámetros no mostró diferencias entre los grupos (Tabla 19).

Tabla 19. Ensayo de flexión a 3 puntos 150 días

150 días	OVX ₁₅₀	OVX.G1 ₁₅₀	OVX.G2 ₁₅₀	OVX.G3 ₁₅₀
Fuerza de fractura (N)*	184,20±4,87 a	194,60±5,87 b	195,8±4,27 c	220,50±4,13 a,b,c
Fuerza máxima de fractura (N)*	197,10±4,40 a	206,30±7,77 b	200,60±4,18 c	227,00±5,04 a,b,c
Rigidez (N/mm)**	854,80 [367,70-2232,00]	1058,00 [629,30-3049,00]	730,10 [412,10-2485,00]	944,90 [443,70-3748,00]
Energía absorbida (mJ)*	113,90±9,90 a	95,80±13,30	77,40±9,50 a	83,30±7,60
CSMI (mm ⁴)*	6,76±0,38	7,25±0,50	6,32±0,29	6,70±0,34
Estrés máximo (MPa)*	161,80±8,39	154,90±6,71	170,40±5,68	183,70±9,42
Módulo de Young (GPa)**	4,33 [1,22-14,39]	4,89 [3,84-1260,00]	4,26 [2,35-12,86]	6,13 [2,49-28,14]

*Abreviaturas: CSMI: momento de inercia de sección transversal. Letras iguales indican diferencias significativas. *Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD, p<0.05. **Los resultados se expresan como mediana [rango], Kruskal-Wallis, post test Dunns.*

Por otro lado, el ensayo de compresión mostró un descenso en fuerza de fractura, fuerza máxima, rigidez, deformación y módulo de Young en el grupo ovariectomizado (OVX₁₅₀) respecto del grupo Sham₁₅₀ (datos no mostrados), confirmando el efecto negativo de la ovariectomía sobre el tejido trabecular. El tratamiento con MFP y Z en ratas alimentadas con dieta secuencial (OVX.G3₁₅₀) luego de 150 días de tratamiento mostró un incremento en la fuerza de fractura, fuerza máxima y rigidez (Tabla 20) lo que se explica por el incremento en el volumen óseo trabecular medido por histomorfometría. Un aumento en el módulo de Young, sin diferencia en la energía absorbida, también fue observado en el grupo OVX.G3₁₅₀ respecto del grupo OVX₁₅₀.

Tabla 20. Ensayo de compresión

150 días	OVX ₁₅₀	OVX.G1 ₁₅₀	OVX.G2 ₁₅₀	OVX.G3 ₁₅₀
Fuerza de fractura (N)**	19,90 [9,68-65,63]	23,67 [20,44-39,81]	21,52 [3,28-50,56]a	40,34 [9,68-78,54]a
Fuerza máxima de fractura (N)*	55,71±5,47	46,13±3,72 a	55,85±5,86	71,77±6,00 a
Rigidez (N/mm)**	184,10 [32,62-726,40]a	235,30 [123,30-77,40]	188,30 [38,32-575,00]	572,70 [131,10-702,00]a
Energía absorbida (mJ)**	1,65[0,44-9,09]	1,61[1,15-2,83]	1,55[0,13-5,51]	1,69[0,55-6,61]
Módulo de Young (GPa)**	0,06[0,01-0,26]a	0,08[0,04-0,20]	0,07[0,01-0,56]	0,20[0,05-0,60]a

*Letras iguales indican diferencias significativas. *Los resultados se expresan como media±SEM. ANOVA, post test LSD, p<0.05. **Los resultados se expresan como mediana [rango], Kruskal-Wallis, post test Dunns*

5.3.5 Contenido y densidad mineral ósea por DXA

El análisis densitométrico realizado por DXA mostró una disminución del 7,5% en la DMO en el grupo ovariectomizado (OVX₁₅₀) comparado con Sham₁₅₀. Los grupos que recibieron tratamiento farmacológico mostraron un aumento estadísticamente significativo en la DMO comparado con OVX₁₅₀. El grupo alimentado con dieta normocálcica y tratado con MFP/Z (OVX.G1₁₅₀) aumentó un 16,2% mientras que el grupo que recibió dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀) aumentó un 9,8%. El CMO (mg Ca en tibia/g peso corporal) mostró similares resultados: OVX₁₅₀ (0,90±0,08) presentó menor CMO comparado con Sham₁₅₀ (1,31±0,06), mientras que OVX.G1₁₅₀ (1,28±0,04) y OVX.G3₁₅₀ (1,14±0,08) mostraron un aumento comparado con OVX₁₅₀. Por último, la DMO y el CMO en el grupo que solo recibió modificaciones en el contenido de calcio en la dieta (OVX.G2₁₅₀) fueron similares a OVX₁₅₀.

**Conclusiones parciales
150 días**

El grupo que recibió dieta secuencial y tratamiento con MFP/Z presentó un aumento del volumen óseo trabecular con disminución del número de osteoclastos y un aumento de la relación FAo/Dpd.

Estos hallazgos explican el aumento de la fuerza de fractura, fuerza máxima y rigidez a nivel trabecular.

Además se observó un aumento en la densidad mineral ósea.

Estos hallazgos no se debieron a efectos de la dieta secuencial o del tratamiento farmacológico únicamente.

DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

La deficiencia de estrógenos causada por la ovariectomía produce pérdida de masa ósea en ratas [149] y está aceptada como modelo experimental de osteoporosis [86].

Tanto la menopausia fisiológica como la inducida por ovariectomía producen un aumento del remodelado óseo con un aumento tanto de la resorción ósea como de la formación ósea, predominando el primer proceso. Como consecuencia de esto es que se observa una disminución en la DMO [150].

Son numerosas las drogas utilizadas para lograr detener la pérdida de masa ósea o recuperar la masa perdida. En general los tratamientos utilizan una única droga ya sea osteoformadora o anti-resortiva, aunque se han descrito tratamientos combinados [151,152]. El MFP es una droga que contiene flúor en su estructura, elemento que tiene acción osteoformadora. Los resultados de efecto espontáneo del flúor sobre la masa ósea evidencian este poder osteoformador y los estudios del mecanismo de acción avalan su acción osteogénica [3]. Si bien el mecanismo molecular que desata esa respuesta es conocido no se ha podido reflejar en efectos beneficiosos reproducibles sobre la masa ósea. Esta tesis propuso diseñar una combinación farmacológica y dietaria para lograr un efecto positivo sobre la masa ósea, la microarquitectura y finalmente sobre las propiedades biomecánicas del hueso sometido a ese tratamiento. El objetivo principal de esta tesis fue, a través de este tratamiento, dilucidar parte del mecanismo de acción del MFP y la combinación necesaria de otros factores farmacológicos, cambios en el contenido de calcio en la dieta y tiempos de administración de cada uno de esos factores. Un punto clave en el tratamiento con flúor, evidenciado por trabajos de Lau y col [3] es que el fluoruro tiene acción osteoformadora si su llegada a los precursores de osteoblastos coincide con la presencia de factores de crecimiento. Normalmente esto no es tenido en cuenta en los experimentos descritos en la bibliografía. Este ha sido el punto central a probar en esta tesis.

De forma similar a lo propuesto por Black y col. [153], nosotros propusimos un tratamiento con una droga anabólica seguida de una terapia anti-resortiva. En vez de PTH, utilizamos MFP como droga anabólica [134,154,155] y en vez de alendronato utilizamos ácido zoledrónico como droga anti-resortiva. Además propusimos realizar cambios secuenciales en el contenido de calcio en la dieta administrando una dieta con bajo contenido de calcio inicialmente seguido de la administración de una dieta con alto contenido de calcio. La administración de

una dieta con bajo contenido de calcio durante los primeros 30 días tuvo como objetivo aumentar el estado de remodelación ósea. Como consecuencia de esto se produciría un aumento en la liberación de citoquinas y esto estimularía la diferenciación y proliferación osteoblástica. Ha sido demostrado que el fluoruro tiene efecto como droga anabólica solo si los factores de crecimiento están presentes en el medio [3].

Como se esperaba, a los 30 días, hallamos que el grupo que recibió dieta hipocálcica (OVX₃₀.LCaD) presentó un aumento del remodelado óseo y una disminución en la formación ósea confirmada por un incremento en la Dpd y una disminución en los niveles de FAo, respectivamente. El índice FAo/Dpd fue 15 veces más bajo en el grupo ovariectomizado que recibió dieta hipocálcica (OVX₃₀.LCaD) comparado con Sham₃₀ y con el grupo que recibió dieta normocálcica (OVX₃₀.NCaD) indicando un claro predominio de la actividad osteoclástica por sobre la actividad osteoblástica. Cuando se evaluó el porcentaje de superficie erodada (ES/BS) y el número de osteoclastos por histomorfometría también se observó un aumento estadísticamente significativo en el grupo ovariectomizado alimentado con dieta hipocálcica (OVX₃₀.LCaD) por sobre los otros grupos. La superficie ósea cubierta por osteoblastos (Ob.S/BS) no difirió entre los grupos experimentales, lo que estaría indicando que la actividad osteoblástica está disminuida aunque su número permaneció constante. La observación histológica de los osteoblastos no permitió inferir menor actividad de los mismos. Sin embargo los niveles de FAo 4-6 veces menor estarían evidenciando un menor número de precursores osteoblastos ingresando a la etapa activa de estas células o que los osteoblastos no son tan activos. Este tratamiento creó en el grupo OVX₃₀.LCaD un ambiente con predominio de la resorción ósea y mayor disponibilidad de factores de crecimientos liberados de la matriz ósea en el proceso de resorción. La aplicación de un tratamiento osteoformador con fluoruro encontraría un ambiente molecular más propicio en el grupo ovariectomizado alimentado con dieta hipocálcica (OVX₃₀.LCaD) que en grupo ovariectomizado alimentado con dieta normocálcica (OVX₃₀.NCaD).

Posteriormente administramos dieta hipercálcica junto con MFP como droga anabólica durante 60 días. El objetivo de cambiar la dieta a una condición hipercálcica fue reducir la actividad osteoclástica a través de un descenso de los niveles de PTH y proveer una apropiada concentración de calcio para la mineralización, aumentando la absorción gastrointestinal de MFP. Parte de la acción del MFP se debe a su unión a las proteínas plasmáticas y esta fracción es dependiente de la hidrólisis intestinal del MFP por acción de la enzima fosfatasa alcalina. Esta enzima es inhibida por calcio, proceso que aumenta la fracción de MFP ligado a las proteínas [125]. Luego de 60 días de tratamiento con MFP se observó un

claro efecto osteoformador, reflejado en los valores de fluoremia. El grupo que recibió dieta secuencial y tratamiento con MFP (OVX.G3₉₀) mostró menor fluoremia que el grupo que recibió sólo MFP sin dieta secuencial (OVX.G1₉₀) aun cuando ambos recibieron dosis equivalentes de MFP. La menor fluoremia en tratamientos con flúor se asoció a mayor captación de flúor por el hueso como consecuencia de un estímulo en la formación ósea [128]. Sin embargo este efecto no se reflejó en las mediciones histomorfométricas del hueso trabecular, que si bien tuvo valores más elevados que los otros grupos, no fueron estadísticamente significativas. La fuerza de fractura en el grupo que recibió dieta secuencial y tratamiento con MFP (OVX.G3₉₀) fue mayor que la del grupo tratado con MFP sin dieta secuencial (OVX.G1₉₀), pudiéndose explicar por una mayor área cortical. Llamó la atención que el mismo resultado haya sido obtenido en el grupo que recibió dieta secuencial sin tratamiento farmacológico (OVX.G2₉₀). Podría argumentarse que el resultado sobre los parámetros biomecánicos sería más consecuencia de cambios en la dieta que del tratamiento farmacológico. Dado que luego del tratamiento con ácido zoledrónico que se aplicó a continuación se observó una notable mejoría de los parámetros histomorfométricos y biomecánicos en el grupo OVX.G3 por sobre los otros grupos, la combinación MFP y dieta secuencial ha creado una condición para que la recuperación de hueso perdido por la ovariectomía se revierta.

Por último el tratamiento fue rotado los últimos 60 días a ácido zoledrónico como droga anti-resortiva manteniendo la dieta hipercálica. Tanto FAo como Dpd mostraron una pequeña disminución en los grupos tratados con MFP/Z (OVX.G1₁₅₀ y OVX.G3₁₅₀) independientemente de la dieta administrada. La relación FAo/Dpd fue 2 veces más alta en el grupo que recibió dieta secuencial y tratamiento con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀) que en el grupo que solo recibió tratamiento farmacológico (OVX.G1₁₅₀) lo cual indica un predominio en la formación ósea posiblemente por la acción sostenida del MFP que se hallaría ligado a las proteínas óseas y que, como se postuló en trabajos previos, produce una acción sostenida del fluoruro sobre los precursores osteoblásticos [121].

Al evaluar los parámetros histomorfométricos, el volumen óseo trabecular, espesor trabecular y número de trabéculas en el grupo que recibió dieta secuencial y tratamiento con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀), se hallaron valores similares al grupo Sham₁₅₀. El mantenimiento de estos parámetros histomorfométricos sería en parte una consecuencia de la disminución en el número de osteoclastos observados a los 90 días (2 veces) y a los 150 días (3 veces). El grupo que recibió dieta normocálica y tratamiento con MFP/Z (OVX.G1₁₅₀) y el grupo que solo recibió dieta secuencial (OVX.G2₁₅₀) no mostraron aumento en el volumen óseo

trabecular. Estos resultados indican que el efecto sobre el hueso no se debe únicamente a la administración de dieta secuencial como tampoco se debe únicamente al tratamiento farmacológico. El hecho que luego del tratamiento completo el volumen óseo trabecular haya alcanzado los valores del grupo sin ovariectomía, está indicando que ha existido un fuerte estímulo osteoformador, ya que a los 30 días fue evidente la pérdida de masa ósea en el grupo con dieta hipocálcica (OVX₃₀.LCaD). Si bien a los 90 días este el grupo tratado (OVX.G3₉₀) no evidenció aumento del volumen óseo trabecular respecto de los otros grupos, el resultado al final de los 150 días de tratamiento demuestra que el MFP ha tenido más efecto sobre la masa ósea si fue precedido por una dieta hipocálcica en lugar de dieta normocálcica.

A pesar de que el grupo que solo recibió dieta secuencial (OVX.G2₁₅₀) no logró prevenir la pérdida de masa ósea comparada con el grupo Sham₁₅₀, OVX.G2₁₅₀ mostró incremento en el volumen óseo comparado con el grupo OVX₁₅₀ aunque no fue de la magnitud del incremento hallado en el grupo que recibió dieta secuencial y tratamiento con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀). El incremento del BV/TV en OVX.G3₁₅₀ a expensas del número de trabéculas estaría indicando que el aumento del volumen óseo se debió a una recuperación del número de trabéculas. Esto podría estar explicando porque a 90 días no se observó aumento de la superficie ósea cubierta por osteoblastos. El estímulo osteoformador del MFP podría estar ocurriendo en precursores osteoblásticos que actuarían en sitios que no son las trabéculas existentes. De esta manera los 60 días de tratamiento con MFP crearía nuevos sitios de osificación que a posteriori darían lugar a nuevas trabéculas. La investigación de células precursoras de osteoblastos a través de estudios histo e inmunohistoquímicos podrían confirmar esta hipótesis. Es importante remarcar también que a los 150 días el grupo que recibió dieta secuencial y tratamiento con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀) mostró una relación FAo/Dpd dos veces mayor que el grupo que recibió solo tratamiento con MFP/Z (OVX.G1₁₅₀) y solo dieta secuencial (OVX.G2₁₅₀) como consecuencia de valores más altos de FAo y menores de Dpd. Si bien se aproxima a los valores del grupo OVX₁₅₀, los valores de Dpd y FAo son más bajos indicando una menor tasa de remodelado óseo con predominio osteoformador. La disminución en los niveles de Dpd y en el número de osteoclastos en el grupo que recibió dieta secuencial y tratamiento con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀) fue consistente con la inhibición de los osteoclastos causada por el ácido zoledrónico. Los valores de superficie erodada mayores en el grupo OVX.G3₁₅₀ con respecto a OVX₁₅₀ ha sido interpretada con el conocimiento que en las BMU el tiempo de acción de los osteoblastos es mucho mayor al tiempo de acción de los osteoclastos [156], por lo tanto llevaría más tiempo observar una disminución en la superficie erodada. En

OVX.G3₁₅₀ los valores de superficie erodada fueron consistentes con un bajo número de osteoclastos.

La fuerza ósea depende de las propiedades materiales del material, del contenido mineral del tejido y de las características estructurales de tejido como el tamaño, la forma y la arquitectura tridimensional. El aumento observado en la fragilidad ósea que ocurre con la edad es el resultado de la pérdida de la densidad mineral ósea como así también de cambios óseos estructurales que podrían influir en la fuerza ósea.

Acorde al análisis histomorfométrico el estudio biomecánico mostró mayor resistencia ósea en el grupo que recibió dieta secuencial y tratamiento con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀) comparado con el grupo ovariectomizado (OVX₁₅₀). Los animales del grupo OVX.G3₁₅₀ mostraron mayor fuerza de fractura, fuerza máxima y rigidez. Esto estaría indicando que el hueso resistiría fuerzas más grandes con menor deformación. Esto se reflejó en una menor energía absorbida. Si bien los huesos resistirían mayores fuerzas y menores deformaciones al ser sometidos a la acción de fuerzas, la menor energía absorbida de los mismos no debe ser menospreciada. Los estudios biomecánicos realizados prueban los huesos en una forma en que la fuerza es aplicada de una manera gradual. El comportamiento biomecánico ante fuerzas aplicadas con otros patrones de regularidad y velocidad no puede ser anticipado por lo hallado en este estudio. La combinación de un tratamiento osteoformador seguido de una droga anti-resortiva junto con la administración de una dieta con diferente contenido de calcio luego de 150 días mostró un incremento en la fuerza de fractura en el hueso cortical indicando una mayor resistencia a la fractura lo cual puede ser explicada por una mejor propiedad del material evaluada por el módulo de Young con similar distribución del material evaluada por el CSMI. La evaluación del hueso trabecular mostró que el grupo que recibió dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀) presentó mayor fuerza de fractura, fuerza máxima y rigidez, lo cual podría ser explicado por un aumento en el volumen óseo y en el número de trabéculas en la evaluación por histomorfometría.

El tratamiento sin cambios en el contenido de calcio en la dieta (OVX.G1₁₅₀) mostró un incremento en la DMO (16,2%) mayor que el grupo ovariectomizado que recibió dieta secuencial y tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀) (9,8%). La menor DMO en el grupo OVX.G3₁₅₀ respecto del grupo OVX.G1₁₅₀ podría explicarse por una mayor calciuria en el grupo OVX.G3₁₅₀ (Tabla 16). Sin embargo, este resultado lejos de ser perjudicial para el hueso se reflejó en un aumento de volumen óseo trabecular (BV/TV = OVX.G1₁₅₀: 13,38% vs OVX.G3₁₅₀: 22,49%) y especialmente sobre la fuerza de fractura del tejido óseo cortical y trabecular (fuerza de fractura cortical = OVX.G1₁₅₀: 193,9 N vs OVX.G3₁₅₀: 227,3 N; fuerza de

fractura trabecular = OVX.G1₁₅₀: 26,63 N vs OVX.G3₁₅₀: 42,42 N). El grupo con tratamiento secuencial con MFP/Z pero que no recibió modificaciones en el contenido de calcio en la dieta (OVX.G2₁₅₀) mostró un aumento en la DMO, sin embargo las propiedades histomorfométricas y biomecánicas fueron menores respecto del grupo que recibió secuencial y fue tratado con MFP/Z (OVX.G3₁₅₀).

El ácido zoledrónico ha sido eficaz en el tratamiento de la osteoporosis en ratas OVX aumentando la DMO, la tasa de formación de hueso y mejorando los parámetros histomorfométricos y biomecánicos [157,158]. En mujeres postmenopáusicas el tratamiento con ácido zoledrónico durante 36 meses produjo un incremento del 6,02% en la DMO en cadera total, del 5,06% en cuello femoral y del 6,71% en columna lumbar. Aunque los datos con la aplicación de un tratamiento secuencial muestran mayores incrementos en la DMO (9,8%) que publicaciones previas donde se ha utilizado solo el ácido zoledrónico no podemos atribuir estas diferencias al tratamiento secuencial.

Si bien los resultados de nuestro trabajo no tienen un impacto clínico inmediato sugiere que el tratamiento secuencial con una droga anabólica seguido de una droga anti-resortiva podría ser un tratamiento a tener en cuenta para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica. Los resultados de esta tesis sugieren que de aplicarse un tratamiento con MFP y ácido zoledrónico en forma secuencial, debería anticiparse una dieta hipocálcica o inducir un aumento del remodelado óseo.

En síntesis, esta tesis demuestra que el tratamiento secuencial con MFP y ácido zoledrónico, combinado con cambios en el contenido de calcio en la dieta, aumenta la masa ósea trabecular, la DMO y las propiedades biomecánicas. Para implementación en pacientes más estudios son necesarios.

La aplicación a pacientes requeriría un estudio previo del estado de remodelado óseo, tanto a nivel de formación como de resorción. En base a los resultados de esta tesis, la aplicación consecutiva de MFP y ácido zoledrónico tendría mejores efectos si el remodelado se encuentra aumentado. Por otra parte la aplicación de un tratamiento osteoformador con MFP u otros compuestos que libere fluoruro no tendría efecto si previamente se aplicó un tratamiento anti-resortivo y los marcadores bioquímicos indican una baja velocidad de remodelado óseo.

Finalmente podemos resumir el tratamiento farmacológico con MFP y ácido zoledrónico consecutivos y una dieta con variación en la concentración de calcio (Figura 27): un período previo con dieta hipocálcica, produciría un aumento del remodelado óseo y la liberación de

factores de crecimiento. Luego e inmediatamente de este período, la administración de MFP estimularía la diferenciación y proliferación osteoblástica que conduciría a un aumento del número de trabéculas, el restablecimiento del volumen óseo y las propiedades mecánicas del hueso tanto a nivel cortical como trabecular. El tratamiento con ácido zoledrónico luego del MFP contribuiría a mantener la masa ósea disminuyendo el número de osteoclastos, pero con un mantenimiento de la actividad osteoblástica.

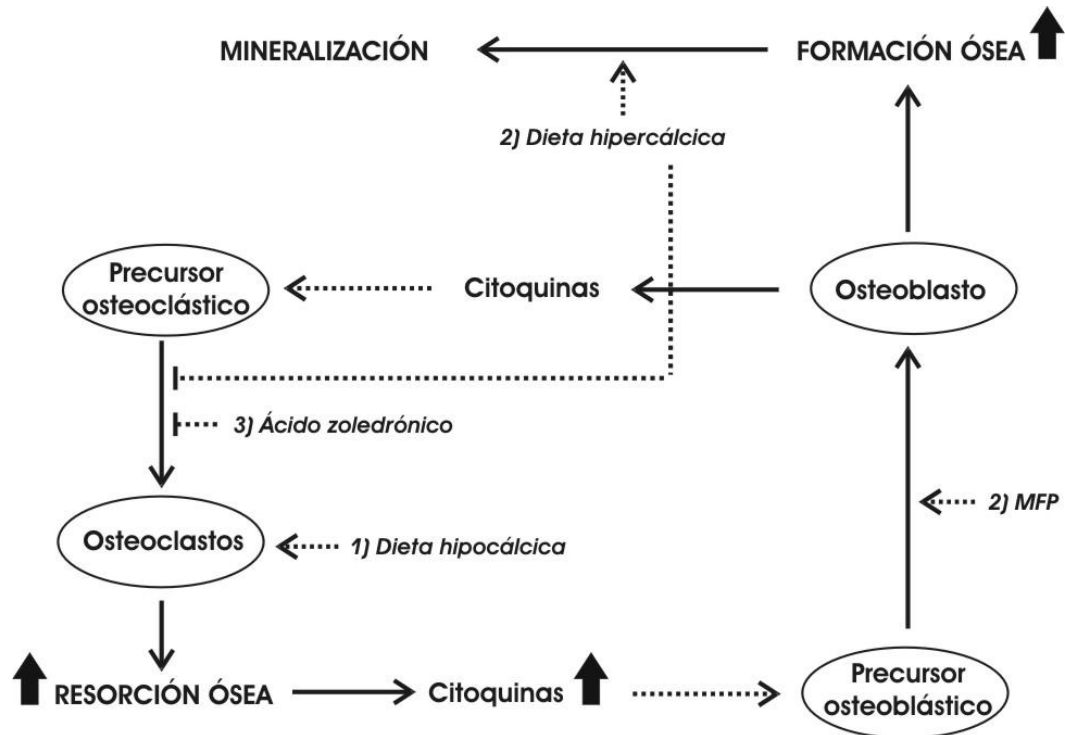


Figura 27. Modelo de acción hipotético del MFP y el ácido zoledrónico en forma secuencial acompañado de modificaciones en el contenido de calcio de la dieta. Los números indican el orden de aplicación del tratamiento. Las flechas (→) indican procesos estimulatorios, las líneas (---|) indican procesos inhibitorios y las flechas (↑) indican aumento de actividad o concentración.

ANEXO

7.1 PREPARACIÓN DE DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO DE CALCIO

Dieta hipocálcica

Las dietas para roedores denominadas AIN-93 (*American Institute of Nutrition*, reformuladas en el año 1993 [159]) se clasifican en AIN-93G, dieta que es utilizada para ratas en fase de crecimiento y durante la reproducción, y AIN-93M dieta utilizada para mantener ratas adultas con crecimiento estable. Las dietas preparadas por nuestro laboratorio corresponden a AIN-93G. Se empleó para ajustar la cantidad de nutrientes excepto el contenido de calcio, el cual fue variable en función del diseño experimental. La composición de las dietas fue la siguiente (Tabla 21): proteínas = albúmina 70 g/kg y caseína 100 g/kg, lípidos = 70 g/kg, hidratos de carbono = almidón de maíz 397,5 g/kg y sacarosa 114,9 g/kg, fibras = celulosa microcristalina 50 g/kg, minerales = 35 g/kg de una mezcla de minerales fue preparada a partir de drogas de calidad analítica, vitaminas = se utilizaron 10 g/kg de una mezcla de vitaminas detallada en la Tabla 22.

Calcio. El contenido de calcio fue variable según el grupo experimental. Para la *dieta hipocálcica* se agregó carbonato de calcio anhidro 2 g Ca/kg, para la *dieta normocálcica* se adicionó 9 g Ca/kg y para la *dieta hipercálcica* se adicionó 20 g Ca/kg. Cuando se determinó el contenido de Ca en muestras al azar se obtuvieron las siguientes concentraciones de Ca: *dieta hipocálcica* = $0,16 \pm 0,05$ g%, *dieta normocálcica* = $0,87 \pm 0,23$ g%, *dieta hipercálcica* = $1,05 \pm 0,20$ g%.

Tabla 21. Ingredientes utilizados en la preparación de dietas sintética para ratas (en gramos de ingrediente por kilogramo de dieta a preparar)

Ingredientes	g/kg
Almidón de Maíz	397,5
Caseína	100
Albúmina	70
Sacarosa	114,9
Aceite de girasol	70
Celulosa	50
Mix de minerales	35
Mix de vitaminas	10
Calcio	Variable según grupo experimental

Tabla 22. Mezcla de vitaminas recomendada para la preparación de alimento

Vitaminas	g/Kg
Ácido nicotínico	3
Pantotenato de calcio	1,6
Piridoxina-HCl	0,7
Tiamina-HCl	0,6
Riboflavina	0,6
Ácido fólico	0,2
Biotina	0,02
Vitamina B12	2,5
Vitamina E (500 IU por gramo)	15
Vitamina A (500000 UI por gramo)	0,8
Vitamina D3 (400000 UI por gramo)	0,25
Vitamina K1	0,075
Azúcar impalpable	975

7.2 CORRECCIÓN DE VARIABLES BIOMECÁNICAS EN FUNCIÓN DEL PESO CORPORAL

Dado que la OVX puede producir cambios en el peso corporal y el peso corporal influye sobre las variables biomecánicas se evaluó el efecto de los tratamientos y dietas aplicadas sobre el peso corporal. Se analizó si existió diferencia de pesos entre los grupos experimentales a los diferentes días de tratamiento. Constatada la diferencia, se halló la función que relaciona (si existe) cada variable biomecánica con el peso utilizando todos los animales. Luego se corrigió en los casos necesarios el valor de la variable biomecánica con la función del peso.

Las comparaciones entre tratamiento a los diferentes días se realizó utilizando la variable corregida por peso o no, dependiendo si existió asociación entre la variable y el peso o no.

ANÁLISIS DEL PESO ENTRE GRUPOS A DIFERENTES DÍAS DE TRATAMIENTO

Variable respuesta: peso

Variables determinantes:

Tratamiento (Sham, OVX, OVX+MFP, OVX+MFP+Z)

Dieta (30 días normocálcica, 30 días hipocálcica, 90 días normocálcica, 90 días secuencial, 150 días normocálcica, 150 días secuencial)

Análisis a 30 días (edad animales: 79 días)

Se realizó un análisis ANOVA a dos criterios de clasificación donde se evaluó el peso en función del tratamiento (Sham, OVX) y la dieta (normocálcica, hipocálcica).

No se hallaron diferencias de pesos asociadas a tratamiento ($p=0,110$) o dieta ($p=0,109$).

Análisis a 90 días (edad animales: 139 días)

Se realizó un análisis ANOVA a dos criterios de clasificación donde se evaluó el peso en función del tratamiento (Sham, OVX, OVX+MFP) y la dieta (normocálcica, secuencial).

Se hallaron diferencias de peso asociado al tratamiento ($p=0,002$), mientras que no hubo diferencia de peso asociada a la dieta ($p=0,056$)

Análisis a 150 días (edad animales: 199 días)

Se realizó un análisis ANOVA a dos criterios de clasificación donde se evaluó el peso en función del tratamiento (Sham, OVX, OVX+MFP+Z) y la dieta (normocálcica, secuencial).

Se hallaron diferencias de peso asociado al tratamiento ($p=9,97e^{-10}$), y también del peso asociado a la dieta ($p=0,014$)

Dado el análisis anterior se buscaron las funciones de ajuste de las variables biomecánicas con el peso para los días 90 y 150.

En todos los casos se utilizaron modelos lineales:

$$\text{Variable} = a + b * \text{peso}$$

Donde

a = intercepción

b = pendiente

A continuación se detalla la función lineal de ajuste para cada variable.

Ensayo de flexión:

- Fuerza de fractura = $53,1 + 0,327 * \text{peso}$ (intercepción y pendiente diferentes de cero, $p < 0,01$).
- Fuerza máxima = $63,5 + 0,33 * \text{peso}$ (intercepción y pendiente diferentes de cero, $p < 0,01$).
- Rigidez = no hay relación.
- Energía absorbida = no hay relación en pendiente.
- Módulo de Young = no hay relación.
- Estrés = $64,9 + 0,229 * \text{peso}$ (intercepción y pendiente diferentes de cero, $p < 0,01$).

Ensayo de compresión:

- Fuerza de fractura = $73,1 - 0,09 * \text{peso}$ (intercepción y pendiente diferentes de cero, $p < 0,01$)
- Fuerza máxima = no hay relación
- Rigidez = $996 - 1,47 * \text{peso}$ (intercepción y pendiente diferentes de cero, $p < 0,01$).
- Energía absorbida = no hay relación
- Módulo de Young = $0,35 - 0,0005 * \text{peso}$ (intercepción y pendiente diferentes de cero, $p < 0,01$)

Para aquellas variables biomecánicas que se halló una asociación con el peso se utilizó la función para realizar la corrección del valor de la variable biomecánica ajustándola al peso.

A continuación se grafica un ejemplo (fuerza de fractura del ensayo de flexión) del procedimiento seguido para la corrección:

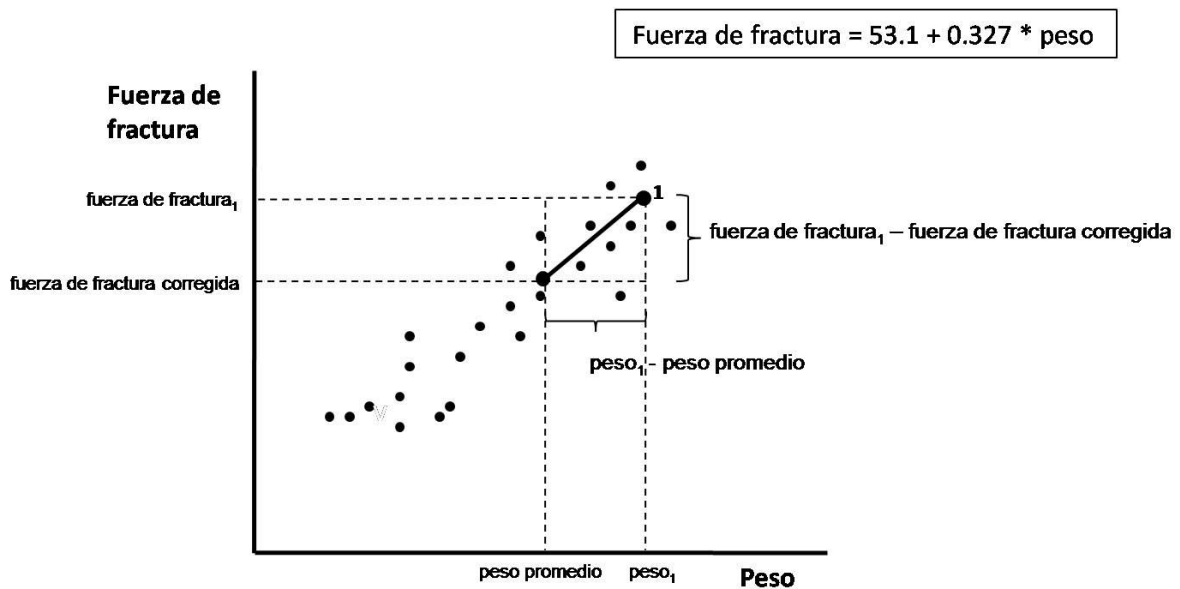


Figura 28. Ejemplo del procedimiento seguido para la corrección de las variables biomecánicas. En este caso se muestra fuerza de fractura del ensayo de flexión.

Pendiente = $\text{fuerza de fractura}_1 - \text{fuerza de fractura corregida} / (\text{peso}_1 - \text{peso promedio})$

Fuerza de fractura corregida = $\text{fuerza de fractura}_1 - \text{pendiente} * (\text{peso}_1 - \text{peso promedio})$

ABREVIATURAS

8 ABREVIATURAS

ADN	Ácido dexoxirribonucleico
Ag	Plata
AgCl	Cloruro de plata
AM	Alfa-macroglobulinas
AM-MFP	Complejo alfa-macroglobulina-monofluorofosfato de sodio
ATP	Adenosín trifosfato
BMP	<i>Bone morphogenetic proteins</i> - Proteínas óseas morfogenéticas
BMU	<i>Basic multicellular unit</i> - Unidad básica multicelular
BS	Perímetro óseo
BV	Área ocupada por hueso
BV/TV	Porcentaje de tejido óseo
Cl⁻	Cloruro
Ca	Calcio
Cbfa1	<i>Core-binding factor alpha-1</i> - Factor de unión al core alfa-1
cm	Centímetro
CMO	Contenido mineral óseo
CO₃²⁻	Carbonato
CSMI	Momento de inercia de sección transversal
CTx	<i>C-Telopeptides of type I collagen</i> – C-telopéptido del colágeno tipo I
CV	Coeficiente de variación
Dkk 1	Dickkopf 1
DMO	Densidad mineral ósea
Dpd	Deoxipiridinolina
DXA	<i>Dual X ray energy absorptiometry</i> - Absorciometría de rayos X de doble energía
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> - Ácido etilendiaminotetraacético
ES/BS	Porcentaje de superficie erodada
F	Fluor
F⁻	Fluoruro
FA	Fluorapatita
FAt	Fosfatasa alcalina total
FAo	Fosfatasa alcalina ósea
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> - Factor de crecimiento fibroblástico

FGF23	<i>Fibroblast growth factor 23</i> - Factor de crecimiento fibroblástico 23
g	Gramos
GC	Glucocorticoides
GGHYL	Glucosil-galactosil-hidroxilisina
GHYL	Galactosil hidroxilisina
GKS3	<i>Glycogen synthase kinase 3β</i> - glucógeno sintetasa kinasa 3
HA	Hidroxiapatita
HCO₃⁻	Bicarbonato
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> – Cromatografía líquida de alta performance
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor I</i> - Factor de crecimiento similar a la insulina I
IGF-II	<i>Insulin-like growth factor II</i> - Factor de crecimiento similar a la insulina II
IL-1	Interleuquina-1
IL-6	Interleuquina-6
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
KCl	Cloruro de potasio
kDa	KDaltons
LRP	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein</i> - Proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad
MAPK	<i>Mitogen activated kinase-like protein</i> - Proteína kinasa activada por mitógenos
M-CSF	<i>Monocyte colony-stimulating factor</i> – Factor estimulante de colonias de monocitos
MFP	Monofluorofosfato de sodio
NaF	Fluoruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NF-κB	<i>Nuclear Factor κB</i> - Factor nuclear κB
NFATc1	<i>Nuclear factor of activated T cells</i> – Factor nuclear de células T activadas
N.OC/mm²	Número de osteoclastos
NTx	<i>N-Telopeptides of type I collagen</i> – N-telopéptido del colágeno tipo I
OBA	Osteoblasto activo
OBI	Osteoblasto inactivo
Ob.S/BS	Porcentaje de superficie cubierta por osteoblastos
OC	Osteoclasto
OMS	Organización mundial de la salud

OPG	Osteoprotegerina
Osx	Osterix
OVX	Ovariectomía
P	Fosfato
PDGF	<i>Platelet-derived growth factors</i> - Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PINP	<i>Amino-terminal propeptide of type I procollagen</i> - Propéptido aminoterminal del colágeno tipo I
PICP	<i>Carboxi-terminal propeptide of type I procollagen</i> - Propéptido carboxiterminal del colágeno tipo I
PTH	<i>Parathyroid hormone</i> - Hormona paratiroidea
PTHrp	Péptido relacionado a la hormona paratiroidea
PTH1R	Receptor tipo 1 para PTH
PYD	<i>Pyridinium</i> - Piridinolina
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB</i> -Receptor activador del factor nuclear κ B
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i> - Ligando del receptor activador del factor nuclear κ B
RIA	Radioinmunoanálisis
RI-RII	Receptores predimerizados tipo I y II
ROI	Región de interés
Runx2	<i>Runt related transcription factor 2</i> – Factor de transcripción 2 relacionado al gen runt
SC	Subcutáneo
SOG	Sonda orogástrica
SrCl₂	Cloruro de estroncio
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separación trabecular
Tb.Th	Grosor trabecular
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i> - Factor de crecimiento β transformante
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> - Factor de crecimiento tumoral α
TRAF-6	<i>TNF receptor-associated factor</i> – Factor asociado al receptor de TNF
TRAP	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i> - Fosfatasa tartrato ácido resistente
TV	Área total de tejido óseo analizado
Wnt	<i>Wingless</i> - gen en drosófila
Z	Ácido zoledrónico

RESULTADOS PUBLICADOS

9 RESULTADOS PUBLICADOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis han dado a lugar a:

TRABAJO PUBLICADO

Brance ML, Brun LR, Di Loreto V, Lupo M, Rigalli A. Sequential treatment with monofluorophosphate and zoledronic acid in osteoporotic rats. *Climacteric* 2014; 17(4):478-85.

ABSTRACTS

Brance ML, Brun LR, Arias L, Rigalli A. Effect of a sequential therapy with monofluorophosphate and zoledronate on the cortical bone. *Biocell* 2012. ISSN 0327-9545

Brance ML, Brun LR, Moreno H, Rigalli A. Análisis biomecánica de hueso trabecular y cortical de ratas ovariectomizadas tratadas secuencialmente con monofluorofosfato y ácido zoledrónico. *Actual Osteol* 2012. ISSN 1669-8975.

Brance ML, Brun LR, Arias L, Rigalli A. Effect of a therapy with monofluorophosphate (MFP) and zoledronate on cortical bone in rats. *Biocell* 2011; 35(2). A175. ISSN 0327-9545

Brance ML, Brun LR, Arias L, Lupo M, Vicente D, Rigalli A. Sequential treatment with monofluorophosphate (MFP) and zoledronate (Z) leads to increased bone mass in rats with modified bone remodeling. *Bone* 2011. 49(6).1380. ISSN 8756-3282

Brance ML, Lupo M, Arias L Brun LR, Rigalli A. Effect of monofluorophosphate (MFP) and zoledronate (Z) on bone mass of rats with modified bone remodelling. *Bone* 2011. 48(6). S290. ISSN 8756-3282.

Brance ML, Maela L, García B, Arias L, Vicente D, Rigalli A. Resultados preliminares de la utilización de dietas con diferente contenido de calcio con fines de modificar la remodelación ósea y el efecto de drogas osteotrópicas. *Biocell*. 2009. ISSN 0327-9545

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

Brance ML, Brun LR, Moreno H, Rigalli A. Análisis biomecánico de hueso trabecular y cortical de ratas ovariectomizadas tratadas secuencialmente con monofluorofosfato y ácido zoledrónico. Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Buenos Aires. 2012.

Brance ML, Brun LR, Arias L, Rigalli A. Efecto sobre la cortical ósea de una terapéutica secuencial con monofluorofosfato (MFP) y ácido zoledrónico (Z). XXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. 2011.

Brance ML, Brun LR, Arias L, Lupo M, Vicente D, Rigalli A. El tratamiento secuencial con monofluorofosfato (MFP) y ácido zoledrónico (Z) produce aumento de la masa ósea en ratas con modificación del estado de remodelación ósea. XXVIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Buenos Aires, 2011.

Brance ML, Brun LR, Arias L, Rigalli A. Efecto de una terapéutica secuencial con monofluorofosfato (MFP) y ácido zoledrónico (Z) sobre el tejido cortical en ratas. Reunión Anual, Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. 2010.

Arias L, Brance ML, Brun LR. Evaluación del tejido óseo trabecular en ratas con diferente estado de remodelación ósea tratadas con monofluorofosfato de sodio y ácido zoledrónico. XXI Jornadas Científicas Anuales de ACREM. Rosario, 2010.

Brance ML, Lupo M, Arias L, Brun LR, Rigalli A. Efecto sobre la masa ósea de una terapéutica secuencial con monofluorofosfato (MFP) y ácido zoledrónico (Z) en ratas con diferente estado de remodelación ósea. AAOMM. XXVII Reunión anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Córdoba, 2010.

Arias L, Brance ML, Rigalli A. Cambios histomorfométricos en ratas con diferente estado de remodelación ósea tratadas con MFP como tratamiento osteogénico, y con ácido zoledrónico como antorresortivo. XXI COCAEM, 2010.

Garcia B, Arias L, Vicente D, Lupo M, Brance ML, Rigalli A. Resultados preliminares de la utilización de dietas con diferente contenido de calcio con fines de modificar la remodelación ósea y el efecto de drogas osteotrópicas. XX COCAEM. Córdoba, 2009.

Garcia B, Arias L, Vicente D, Lupo M, Brance ML, Rigalli A. Efecto de un tratamiento osteogénico y anti-resortivo en ratas alimentadas con dietas con contenido cálcico variable. Resultados preliminares. XX Jornadas Científica ACREM. Rosario, 2009.

Brance ML. Estudio del mecanismo de acción del monofluorofosfato de sodio y los bisfosfonatos sobre la remodelación y masa ósea en modelos de osteoporosis en la rata. III Jornada de Divulgación de la Investigación Científica en la UNR. Rosario, 2009.

Brance ML, Lupo M, Garcia B, Arias L, Vicente D, Rigalli A. Resultados preliminares de la utilización de dietas con diferente contenido de calcio (Ca) con fines de modificar la remodelación ósea (RMO) y el efecto de drogas osteotrópicas. XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 2009.

AGRADECIMIENTOS

10 AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Rigalli por la dirección de esta tesis doctoral, sus enseñanzas en investigación y su calidez humana.

Al Dr. Lucas Brun, mi compañero en el trabajo y en la vida, que estuvo siempre presente a lo largo de esta tesis.

A los becarios Daniela Vicente, Bárbara García, Lucas Arias y Cielo Maher por su colaboración en cada etapa.

A Maela Lupo y a Hilda Moreno, en la asistencia técnica, como también a Verónica Di Loreto, Mercedes Lombarte y Brenda Fina, integrantes del laboratorio por compartir y colaborar en las dificultades cotidianas.

REFERENCIAS

11 REFERENCIAS

- 1 Caverzasio J, Palmer G, Bonjour JP. Fluoride: mode of action. *Bone* 1998; 22:585-9.
- 2 Rigalli A, Ballina JC, Beinlich A, Alloatti R, Puche RC. Pharmacokinetics differences between sodium fluoride and sodium monofluorophosphate and comparative bone mass increasing activity of both compounds, in the rat. *Arzneimittelforschung* 1994; 44(1):762-6.
- 3 Lau KH, Farley JR, Freeman TK, Baylink DJ. A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. *Metabolism* 1989; 38:858-68.
- 4 Rigalli A, Esteban L, Pera L, Puche RC. Binding of monofluorophosphate to α 2-macroglobulina y C3. *Calcif Tissue Int* 1997; 60:86-9.
- 5 Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(9):1032-45.
- 6 Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999; 104:1363-74.
- 7 Hill PA, Orth M. Bone remodelling. *British J Orthodon* 1998; 25:101-7.
- 8 Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423:337-42.
- 9 Aubin JE, Lian JB, Stein Gs. Bone formation: Maturation and functional activities of osteoblast lineage cells. Cap 5. Pag 20-29. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 6^o Edición. 2006.
- 10 Dempster DW, Hughes-Begos CE, Plavetic-Chee K, et al. Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *J Cell Biochem* 2005; 95(1):139-48.
- 11 Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 1988; 175(2):266-76.
- 12 Teitelbaum SL. RANKing c-Jun in osteoclast development. *J Clin Invest*. 2004;114(4):463-5.
- 13 Ross FP, Teitelbaum SL. α v β 3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* 2005; 208:88-105.
- 14 Ross P. Osteoclast Biology and Bone Resorption. Cap 5. Pag 30-35. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 6^o Edición. 2006.
- 15 Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000; 113(3):377-81.
- 16 Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 2008; 42:606-15.

-
- 17 Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(4):285-94.
- 18 Plotkin LI. Bisfosfonatos, conexas y apoptosis de osteoblastos y osteocitos: nuevo mecanismo de acción con implicancias terapéuticas. *Actual Osteol* 2010; 6(1):16-23.
- 19 Moses HL, Serra R. Regulation of differentiation by TGF-beta. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6:581-6.
- 20 Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22(4):233-41.
- 21 Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, Halstead LR, Ory DS, Avioli LV, Cheng SL. Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2001; 276(17):14443-50.
- 22 Globus RK, Moursi A, Zimmerman D, Lull J, Damsky C. Integrin-extracellular matrix interactions in connective tissue remodeling and osteoblast differentiation. *ASGSB Bull* 1995; 8(2):19-28.
- 23 Ericksen E, Mosekilde L, Melsen F. Trabecular bone remodelling and balance in primary hyperparathyroidism. *Bone* 1986; 7:213-221.
- 24 Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999; 27(8):1229-41.
- 25 Roodman GD. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068:100-9.
- 26 Parfitt AM, Drezner AK, Glorieux FH, et al. Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. *J Bone Miner Res* 1987; 2(6):595-609.
- 27 Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 1995; 136(8):3632-8.
- 28 Chow JW, Wilson AJ, Chambers TJ, Fox SW. Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J Bone Miner Res* 1998; 13(11):1760-7.
- 29 Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port* 2007; 32(2):103-10.
- 30 Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of Anabolic Therapies for Osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 357(9):905-16.
- 31 Krishnan V, Bryant HU, MacDougald A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006; 226(5):1202-9.
- 32 Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001; 107(4):513-23.
- 33 Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002; 346(20):1513-21.

-
- 34 Haÿ E, Laplantine E, Geoffroy V, Frain M, Kohler T, Müller R, Marie PJ. N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/beta-catenin signaling, osteoblast function, and bone formation. *Mol Cell Biol* 2009; 29(4):953-64.
- 35 Canalis E, Pash J, Gabbitas B, Rydziel S, Varghese S. Growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor-I in bone cell cultures. *Endocrinology* 1993; 133(1):33-8.
- 36 Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 2007; 40(2):251-64.
- 37 Grundt A, Grafe IA, Liegibel U, Sommer U, Nawroth P, Kasperk C. Direct effects of osteoprotegerin on human bone cell metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 389(3):550-5.
- 38 Lozano D, de Castro LF, Dapía S, Andrade-Zapata I, Manzarbeitia F, Alvarez-Arroyo MV, Gómez-Barrena E, Esbrit P. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. *Endocrinology* 2009; 150(5):2027-35.
- 39 Bisello A, Horwitz MJ, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein: an essential physiological regulator of adult bone mass. *Endocrinology* 2004; 145(8):3551-3.
- 40 Buttgerit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum* 2004; 50:3408-17.
- 41 Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 2000; 130:289-98.
- 42 Stellato C. Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1:255-63.
- 43 Huybers S, Naber TH, Bindels RJ, Hoenderop JG. Prednisolone-induced Ca²⁺ malabsorption is caused by diminished expression of the epithelial Ca channel TRPV6. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:G92-97.
- 44 Reid IR, Ibbertson HK. Evidence for decreased tubular reabsorption of calcium in glucocorticoid-treated asthmatics. *Horm Res* 1987; 27:200-4.
- 45 Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57:385-409.
- 46 Danneskiold-Samsøe B, Grimby G. The influence of prednisone on the muscle morphology and muscle enzymes in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Sci (Lond)* 1986; 71:693-701.
- 47 Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357(3):266-81.

-
- 48 Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis and bone mass by androgens: the role of the androgen receptor. *J Clin Invest* 1995; 95:2886-89.
- 49 Zallone A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068:173-9.
- 50 Thomas T, Burguera B. Is leptin the link between fat and bone mass? *J Bone Miner Res* 2002; 17(9):1563-9.
- 51 Arsenault AL, Ottensmeyer FP. Visualization of early intramembranous ossification by electron microscopic and spectroscopic imaging. *J Cell Biol* 1984; 98(3):911-21.
- 52 Robey PG, Boskey AL. Extracellular matrix and biomineralization of bone. Cap 3. Pag 12-19. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 6^o Edición. 2006.
- 53 Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 2001; 313:95-105.
- 54 Woitge H, Markus JS. Biochemical Markers to Survey Bone Turnover. *Rheum Dis Clin North Am* 2001; 27(1):49-80.
- 55 Price CP, Mitchell CA, Moriarty J, Gray M, Noonan K. Mass versus activity: validation of an immunometric assay for bone alkaline phosphatase in serum. *Ann Clin Biochem* 1995; 32(4):405-12.
- 56 Braga V, Dorizzi R, Brocco G, Rossini M, Zamberlan N, Gatti D, Adami S. Clinical utility of a wheat-germ precipitation assay for determination of bone alkaline phosphatase concentrations in patients with different metabolic bone diseases. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33(7):433-9.
- 57 Díaz Diego EM, Díaz Martín MA, de la Piedra C, Rapado A. Lack of correlation between levels of osteocalcin and bone alkaline phosphatase in healthy control and postmenopausal osteoporotic women. *Horm Metab Res* 1995; 27(3):151-4.
- 58 Masters PW, Jones RG, Purves DA, Cooper EH, Cooney JM. Commercial assays for serum osteocalcin give clinically discordant results. *Clin Chem* 1994; 40(3):358-63.
- 59 Hassager C, Fabbri-Mabelli G, Christiansen C. The effect of the menopause and hormone replacement therapy on serum carboxyterminal propeptide of type I collagen. *Osteoporos Int*. 1993; 3(1):50-2.
- 60 Melkko J, Kauppila S, Niemi S, Risteli L, Haukipuro K, Jukkola A, Risteli J. Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem* 1996; 42:947-54.
- 61 Tähtelä R, Turpeinen M, Sorva R, Karonen SL. The aminoterminal propeptide of type I procollagen: evaluation of a commercial radioimmunoassay kit and values in healthy subjects. *Clin Biochem* 1997; 30(1):35-40.

-
- 62 Seibel MJ, Woitge HW, Pecherstorfer M, Karmatschek M, Horn E, Ludwig H, Armbruster FP, Ziegler R. Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(9):3289-94.
- 63 Lupo M, Brance ML, Fina BL, Brun LR, Rigalli A. Methodology developed for the simultaneous measurement of bone formation and bone resorption in rats based on the pharmacokinetics of fluoride. *J Bone Miner Metab*. In Press 2014.
- 64 Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Mönkkönen J, Väänänen HK. Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* 2000; 46(11):1751-4.
- 65 Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; 15(7):1337-45.
- 66 Nakanishi M, Yoh K, Miura T, Ohasi T, Rai SK, Uchida K. Development of a kinetic assay for band 5b tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 2000; 46(4):469-73.
- 67 Lau KH, Onishi T, Wergedal JE, Singer FR, Baylink DJ. Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption. *Clin Chem* 1987; 33(4):458-62.
- 68 Watts NB. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin Chem* 1999; 45(8):1359-68.
- 69 Colwell A, Russell RG, Eastell R. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. *Eur J Clin Invest* 1993; 23(6):341-9.
- 70 Eastell R, Robins SP, Colwell T, Assiri AM, Riggs BL, Russell RG. Evaluation of bone turnover in type I osteoporosis using biochemical markers specific for both bone formation and bone resorption. *Osteoporos Int* 1993; 3(5):255-60.
- 71 Garnero P, Gineyts E, Riou JP, Delmas PD. Assessment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:780-5.
- 72 Fledelius C, Johnsen AH, Cloos PA, Bonde M, Qvist P. Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the C-terminal telopeptide (alpha1) region. *J Biol Chem* 1997; 272(15):9755-63.
- 73 Garnero P, Gineyts E, Schaffer AV, Seaman J, Delmas PD. Measurement of urinary excretion of nonisomerized and beta-isomerized forms of type I collagen breakdown products to monitor the effects of the bisphosphonate zoledronate in Paget's disease. *Arthritis Rheum* 1998; 41(2):354-60.
- 74 Gough AK, Peel NF, Eastell R, et al. Excretion of pyridinium crosslinks correlates with disease activity and appendicular bone loss in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53(1):14-7.

-
- 75 Hochberg MC, Silverman SL, Barr CE, Miller PD. The utility of changes in serum levels of C-terminal telopeptide of type I collagen in predicting patient response to oral monthly ibandronate therapy. *J Clin Densitom* 2010; 13(2):181-9.
- 76 Bjarnason NH, Christiansen C. Early response in biochemical markers predicts long-term response in bone mass during hormone replacement therapy in early postmenopausal women. *Bone* 2000; 26(6):561-9.
- 77 Delmas PD, Hardy P, Garnero P, Dain M. Monitoring individual response to hormone replacement therapy with bone markers. *Bone* 2000; 26(6):553-60.
- 78 Aoshima H, Kushida K, Takahashi M, Ohishi T, Hoshino H, Suzuki M, Inoue T. Circadian variation of urinary type I collagen crosslinked C-telopeptide and free and peptide-bound forms of pyridinium crosslinks. *Bone* 1998; 22(1):73-8.
- 79 AACE Osteoporosis Task Force. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: 2001 edition, with selected updates for 2003. *Endocr Pract* 2003; 9:544-64.
- 80 Schurman L, Bagur A, Claus-Hermberg H y col. Guías para diagnóstico, prevención y tratamiento de la osteoporosis 2007. Consenso SAO-AAOMM. *Actual Osteol.* 2007; 3:120-35.
- 81 Bonjour JP, Amman P, Rizzolo R. Importance of preclinical studies in the development of drugs for treatment of osteoporosis: a review related to the 1998 WHO guidelines. *Osteoporos Int* 1999; 9:379-93.
- 82 Faibish D, Ott SM, Boskey AL. Mineral changes in osteoporosis. A review. *Clin Orthop Relat Res.* 2006; 443:28-38.
- 83 Consenso Iberoamericano de Osteoporosis SIBOMM 2009. Osteoporosis: Diagnóstico, prevención y tratamiento. *Rev Arg Osteol.* 2010;9(1):4-44.
- 84 Gordon CM, Baim S, Bianchi ML, et al. Special Report on the 2007 Pediatric Position Development Conference of the International Society for Clinical Densitometry. *South Med J* 2008; 101(7):740-3.
- 85 Giardino R, Fini M, Giavaresi G, Mongiorni R, Gnudi S, Zati A. Experimental surgical model in osteoporosis study. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1993; 69:453-60.
- 86 Kalu DN. The ovariectomized rat model for postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15:175-92.
- 87 Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 1995; 17:125S-133S.
- 88 Matsuo T, Nozaki T, Okamura K, Matsumoto K, Doi T, Gohtani S, Suzuki M. Effects of voluntary resistance exercise and high-protein snack on bone mass, composition, and strength in rats given glucocorticoid injections. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67(12):2518-23.

-
- 89 Prentice RL, Pettinger MB, Jackson RD, et al. Health risks and benefits from calcium and vitamin D supplementation: Women's Health Initiative clinical trial and cohort study. *Osteoporos Int* 2013; 24(2):567-80.
- 90 Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int* 2007; 18:1319-28.
- 91 Oliveri B, Plantalech L, Bagur A, et al. Elevada Incidencia de insuficiencia de vitamina D en los adultos sanos mayores de 65 Años en diferentes regiones de la Argentina. *Actual Osteol* 2005; 1:40-6.
- 92 Plantalech L. Mapa de hipovitaminosis D en argentina. *Actual Osteol* 2005; 1:11-5.
- 93 Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, Wesolowski G, Russell RG, Rodan GA, Reszka AA. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(1):133-8.
- 94 Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998; 13(4):581-9.
- 95 van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Lawik C, Papapoulos S. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase-farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.*1999; 255(2):491-4.
- 96 van Beek E, Lawik C, van der Pluijm G, Papapoulos S. The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 1999; 14(5):722-9.
- 97 Plotkin LI, Lezcano V, Thostenson J, Weinstein RS, Manolagas SC, Bellido T. Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts in vivo. *J Bone Miner Res* 2008; 23(11):1712-21.
- 98 Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem* 2002; 277(10):8648-57.
- 99 Liberman UA, Stuart RW, Broll J, et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1995; 333:1437-43.

-
- 100 Harris ST, Watts NB, Genant HK, et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *JAMA* 1999; 282(14):1344-52.
- 101 Chesnut III CH, Skag A, Christiansen C, Recker R, Stakkestad JA, Hoiseth A, Felsenberg D, Huss H, Gilbride J, Schimmer RC, Delmas PD. Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2004; 19(8):1241-9.
- 102 McClung MR, Geusens P, et al. Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly women. Hip Intervention Program Study Group. *N Engl J Med* 2001; 344(5):333-40.
- 103 Black DM, Delmas PD, Eastell R, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 356(18):1809-22.
- 104 Whitford GM. Monographs in oral Science. The metabolism and toxicity of fluoride. Ed. Howard M. Myers. Karger. San Francisco Calif. 1989.
- 105 Farley JR, Tarbaux N, Hall S, Baylink DJ. Mitogenic action(s) of fluoride on osteoblast line cells; Determinants of the response in vitro. *J Bone Miner Res* 1990; 5(1):S107-13.
- 106 Ausset C, Mary D, Peyron JF, Pelassy C, Ferua B, Fehlmann M. Inhibition and activation of interleukin 2 synthesis by direct modification of guanosine triphosphate binding proteins. *J Immunology* 1988; 140(1):215-20.
- 107 Anderson NG, Kilgour E, Sturgill TW. Activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) in bc3h1 myocytes by fluoroaluminate. *J Biol Chem* 1991; 266:10131-35.
- 108 Setnikar I, Maurer H. Bioequivalence of sodium monofluorophosphate with sodium fluoride and compatibility with calcium. *Arzneimittelforschung* 1990; 40:994-9.
- 109 Kopp JB, Robey G. Sodium fluoride does not increase human bone cell proliferation or protein synthesis in vitro. *Calcif Tissue Int* 1990; 47:221-9.
- 110 Aloia JF, Zange I, Vaswarri A, Ellis D, Cohn SH. Combination therapy for osteoporosis with estrogen, fluorides and calcium. *J Am Geriatr Soc* 1982; 30:13-7.
- 111 Briancon D, Meunier PJ. Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium and vitamin D. *Orthop Clin North Am* 1981; 12:629-48.
- 112 Kraenzlin ME, Kraenzlin C, Farley SM, Fitzsimmons RJ, Baylink DJ.. Fluoride pharmacokinetics in good and poor responders to fluoride therapy. *J Bone Miner Res* 1990; 5:S49-52.
- 113 Resch H, Libanati C, Talbot J, Tabuenca M, Farley S, Bettica P, Tritthart W, Baylink DJ. Pharmacokinetic profile of a new fluoride preparation: sustained-release monofluorophosphate. *Calcif Tissue Int* 1994; 54:7-11.

-
- 114 Hallsworth AS, Weatherell JA, Deutsch D. Determination of subnanogram amounts of fluoride with the fluoride electrode. *Anal Chem* 1976; 48:1660-4.
- 115 Fry BW, Taves DR. Serum fluoride analysis with the fluoride electrode. *J Lab Clin Med* 1970; 75:1020-5.
- 116 Fuchs C, Dorn D, Fuchs CA, et al. Fluoride determination in plasma by ion selective electrodes: a simplified method for the clinical laboratory. *Clin Chim Acta* 1975; 60:157-67.
- 117 Rigalli A, Cabrerizo M, Beinlich A, Puche RC. Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. *Arzneimittelforschung*. 1994; 44:651-5.
- 118 Taves D. Determination of submicromolar concentrations of fluoride biological samples. *Talanta* 1968; 15:1015-23.
- 119 Rigalli A, Alloatti R, Puche RC. Measurement of total and diffusible serum fluoride. *J Clin Lab Anal* 1999; 13:151-7.
- 120 Rigalli A, Pera L, Di Loreto V, Brun LR. Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. 1° Ed. Ed. de la Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Argentina. 2007. ISBN 978-950-673-616-3.
- 121 Pera LI, Brun LR, Rigalli A, Puche RC. Identificación de proteínas derivadas de la α 2-macroglobulina en el hueso de ratas tratadas con monofluorofosfato de sodio. Rol de estas proteínas en la biodisponibilidad de flúor. *Rev Med Rosario* 2003; 69:36-43.
- 122 Pera L, Puche RC, Rigalli A. Potentiometric measurement of ionic, acid labile and covalently bound fluorine. *J Fluor Chem* 2007; 128:1428-1428.
- 123 Whitford GM. Acute and chronic fluoride toxicity. *J Dent Res* 1992; 71(5):1249-54.
- 124 Rigalli A, Morosano M, Puche RC. Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or sodium monofluorophosphate to human volunteers. *Arzneimittelforschung* 1996; 46(1):531-3.
- 125 Beinlich A, Brun LR, Rigalli A, Puche RC. Intestinal absorption of disodium monofluorophosphate in rat as affected by concurrent administration of calcium. *Arzneimittelforschung* 2003; 53(8):584-89.
- 126 Rigalli A, Pera L, Morosano M, Masoni A, Bocanera R, Tozzini R, Puche RC. In postmenopausal osteoporosis the bone increasing effect of monofluorophosphate is not depending of serum fluoride. *Medicina (B Aires)* 1999; 59:157-161.
- 127 Rigalli A, Ballina JC, Roveri E, Puche RC. Inhibitory effect of fluoride on the secretion of insulin. *Calcif Tissue Int* 1990; 46:333-38.
- 128 Rigalli A, Ballina JC, Puche RC. Bone mass increase and glucose tolerance in rats chronically treated with sodium fluoride. *Bone and Mineral* 1992; 16:101-8.

-
- 129 de la Sota M, Puche RC, Rigalli A, Fernandez LM, Benassati S, Boland R. Modificaciones en la masa ósea y en la homeostasis de la glucosa en residentes de la zona de Bahía Blanca con alta ingesta espontanea de flúor. *Medicina (B Aires)*1997; 57:417-20.
- 130 Rigalli A, Alloatti R, Menoyo I, Puche RC. Comparative study of the effect of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate on glucose homeostasis in the rat. *Arzneimittelforschung* 1995; 45:289-92.
- 131 Esteban L, Rigalli A, Puche RC. Metabolism of the complex monofluorophosphate-a2-macroglobulin in the rat. *Medicina (B Aires)* 1999; 59:151-6.
- 132 Brun LR, Pera LI, Rigalli A. Bone morphometry and differences in bone fluorine containing compounds in rats treated with NaF and MFP. *Biomed Pharmacother* 2010; 64(1):1-6.
- 133 Ringe JD, Kipshoven C, Cöster A, Umbach R. Therapy of established postmenopausal osteoporosis with monofluorophosphate plus calcium: dose-related effects on bone density and fracture rate. *Osteoporos Int* 1999; 9(2):171-8.
- 134 Ringe JD, Setnikar I. Monofluorophosphate combined with hormone replacement therapy in postmenopausal osteoporosis. An open-label efficacy and safety study. *Rheumatol Int* 2002; 22:27-32.
- 135 Meunier PJ, Sebert JL, Reginster JY, et al. Fluoride salts are no better at preventing new vertebral fractures than calcium-vitamin D in postmenopausal osteoporosis: the FAVOStudy. *Osteoporos Int* 1998; 8(1):4-12.
- 136 Reginster JY, Felsenberg D, Pavo I, et al. Effect of raloxifene combined with monofluorophosphate as compared with monofluorophosphate alone in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, controlled trial. *Osteoporos Int* 2003; 14(9):741-9.
- 137 Ringe JD, Dorst A, Faber H, Kipshoven C, Rovati LC, Setnikar I. Efficacy of etidronate and sequential monofluorophosphate in severe postmenopausal osteoporosis: a pilot study. *Rheumatol Int* 2005; 25(4):296-300.
- 138 US Department of Health and Human Services. NIH Publication N° 86-23, revised 1985, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.
- 139 Canadian Council on animal care Guidelines. Guide to the care and use of experimental animal. www.ccac.ca.
- 140 Di Loreto V, Pera L, Rigalli A. Ovariectomy. En *Experimental Surgical Models in the Laboratory rat*. Rigalli A, Di Loreto V Eds. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Ratón. USA. 2009. Pag 149-153.
- 141 De Candia F, Rigalli A, Di Loreto V. Anesthesia and Analgesia. En *Experimental Surgical Models in the Laboratory rat*. Rigalli A, Di Loreto V Eds. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Ratón. USA. 2009. Pag 21-30.

-
- 142 Landoni MF. Anesthesia and Analgesia. En *Experimental Surgical Models in the Laboratory rat*. Rigalli A, Di Loreto V Eds. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Ratón. USA. 2009. Pag 17-20.
- 143 Rigalli A. Euthanasia. En *Experimental Surgical Models in the Laboratory rat*. Rigalli A, Di Loreto V Eds. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Ratón. USA. 2009. Pag. 31
- 144 Farley JR, Chesnut CJ, Baylink DJ. Improved method for quantitative determination in serum alkaline phosphatase of skeletal origin. *Clin Chem* 1981; 27:2002-7.
- 145 Brance ML, Brun LR. Histological procedures. En Rigalli A, Di Loreto V. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Editorial Taylor and Francis Group. CRC Press. Boca Ratón, USA. pp. 221-7. 2009.
- 146 Stürmer EK, Seidlová-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stürmer KM. Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene. *J Bone Miner Res* 2006; 21(1):89-96.
- 147 Hogan HA, Ruhmann SP, Sampson HW. The mechanical properties of cancellous bone in the proximal tibia of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2000; 15(2):284-92.
- 148 R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- 149 Bagi CM, Ammann P, Rizzoli R, Miller SC. Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. *Calcif Tissue Int* 1997; 61:336-44.
- 150 Ohta H, Masuzawa T, Ikeda T, Suda Y, Makita K, Nozawa S. Which is more osteoporosis-inducing, menopause or oophorectomy? *Bone Miner* 1992; 19:273-85.
- 151 Bone HG, Greenspan SL, McKeever C, et al. Alendronate and estrogen effects in postmenopausal women with low bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:720-6.
- 152 Greenspan SL, Resnick NM, Parker RA. Combination therapy with hormone replacement and alendronate for prevention of bone loss in elderly women: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 289:2525-33.
- 153 Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, et al. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2003;349:1207-15.
- 154 Reid IR, Cundy T, Grey AB, et al. Addition of monofluorophosphate to estrogen therapy in postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:2446-52.
- 155 Reginster JY, Meurmans L, Zegels B, et al. The effect of sodium monofluorophosphate plus calcium on vertebral fracture rate in postmenopausal women with moderate osteoporosis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1998; 129:1-8.

156 Parfitt AM, Mundy GR, Roodman GD, Hughes DE, Boyce BF. A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 1996; 11:150-9.

157 Pataki A, Müller K, Green JR, Ma YF, Li QN, Jee WS. Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during, and after treatment. *Anat Rec* 1997; 249:458-68.

158 Glatt M, Pataki A, Evans GP, Hornby SB, Green JR. Loss of vertebral bone and mechanical strength in estrogen-deficient rats is prevented by long-term administration of zoledronic acid. *Osteoporos Int* 2004; 15:707-15.

159 Reeves PG. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76 Diet. *J Nutr* 1997; 127:838S-41S.