



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Efectos de Polifenoles sobre un Modelo
Experimental de Osteoporosis

D. Manuel José Saura Pujante

2014



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**Efectos de polifenoles sobre un modelo
experimental de osteoporosis.**

D. Manuel José Saura Pujante

2014



**Instituto
Universitario
Investigación**
Envejecimiento

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN
EN ENVEJECIMIENTO**

**Efectos de polifenoles sobre un modelo
experimental de osteoporosis.**

D. Manuel José Saura Pujante

2014

D. VICENTE VICENTE ORTEGA, CATEDRÁTICO DE ANATOMÍA
PATOLÓGICA DEL DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA,
OPTOMETRÍA, OTORRINONARINGOLOGÍA Y ANATOMÍA
PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE MURCIA

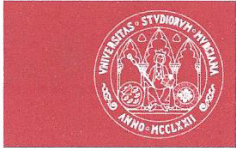
AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **“Efectos de polifenoles sobre un modelo experimental de osteoporosis”** realizada por D MANUEL JOSÉ SAURA PUJANTE, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 19 de septiembre de 2014



Fdo. Prof. Dr. D. Vicente Vicente Ortega



D. FRANCISCO JOSÉ GÓMEZ GARCÍA, PROFESOR ASOCIADO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA, OPTOMETRÍA, OTORRINONARINGOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **“Efectos de polifenoles sobre un modelo experimental de osteoporosis”** realizada por D MANUEL JOSÉ SAURA PUJANTE, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia..

En Murcia a 19 de septiembre de 2014

Fdo. Prof. Dr. D. Francisco José Gómez García



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. LUIS RAMÓN MESEGUER OLMO, PROFESOR ASOCIADO DE CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y TRAUMATOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, PEDIATRÍA, OBSTETRICIA, Y GINECOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **“Efectos de polifenoles sobre un modelo experimental de osteoporosis”** realizada por D MANUEL JOSÉ SAURA PUJANTE, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 19 de septiembre de 2014

Fdo. Prof. Dr. D. Luis Ramón Meseguer Olmo

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

METAS

*“Si caminas hacia metas
ocultas en la bruma
llegarás al abismo*

*Si caminas hacia metas
marcadas por otros
llegarás al desengaño*

*Si caminas hacia metas
elegidas por tí
llegarás a vivir tu propia vida.”*

Matilde Campos Aranda

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mis directores de tesis, al Dr. Vicente Vicente Ortega, por confiar en mí para realizar este estudio, por sus consejos, su seguimiento y supervisión del mismo, pero sobre todo por su amistad y por haber sido el gran motivador de este trabajo.

De igual modo me gustaría agradecer a los Doctores D. Francisco J. Gómez García y D. Luis R. Meseguer Olmo, como codirectores de esta investigación por ofrecerme sus conocimientos, su paciencia y sobre todo por el interés mostrado por este trabajo.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud al Dr. D. Manuel Canteras Jordana, por su ayuda en la interpretación estadística de este trabajo. Al Servicio de Animales de Laboratorio por el profesional cuidado de los animales y a los compañeros del Departamento de Anatomía Patológica, M^a Dolores, Ana, Enrique, Ester, Violeta, M^a José y sobre todo a D. José Víctor Bolarín Lucas, por su inestimable apoyo técnico.

Gracias también a Nutrafur. S..A. por su apuesta por la investigación aportando los productos y las características de los mismos, imprescindibles para llevar a cabo este estudio.

Gracias a la directiva del Instituto Universitario de Investigación en Envejecimiento que me motivo para formarme y ser parte activa del mismo.

Y por último, gracias a mi familia y amigos, por las horas que les he robado durante estos años, mil gracias Paqui, Pablo y Marta.

ÍNDICE

I.	Introducción.....	1
II.	Antecedentes.....	7
	A. Osteoporosis: 1) Historia	9
	2) Definición	21
	3) Clasificación	22
	4) Incidencia.....	25
	5) Patogenia	29
	6) Factores de riesgo	33
	7) Diagnóstico	42
	8) Tratamiento	49
	B. Modelos Experimentales.....	60
	C. Tratamientos experimentales: Comps. Fenólicos.....	68
	Antioxidantes y Flavonoides.....	68
	Flavonoides y Osteoporosis.....	76
III.	Objetivos.....	83
IV.	Material y métodos.....	87
	1. Material.....	89
	A. Animales.....	89
	B. Aparatos.....	91
	C. Agente.....	97
	D. Fármacos.....	103

2. Métodos.....	105
A. Procedimiento experimental.....	105
B. Procedimiento quirúrgico.....	106
C. Estudios de: 1) peso:.....	113
2) Bioquímica de la sangre.....	113
3) Microtomografía computerizada ósea.....	115
4) Anatomopatológico óseo.....	119
5) Ionómico del tejido óseo.....	120
6) Método estadístico.....	121
V. Resultados.....	123
a) Estudio del peso.....	125
b) Estudio bioquímico.....	127
c) Estudio mediante microtomografía computerizada ...	138
d) Estudio anatomopatológico e histomorfométrico óseo....	156
e) Estudio ionómico del tejido óseo.....	165
VI. Discusión.....	183
VII. Resumen.....	205
VIII. Conclusiones.....	211
IX. Bibliografía.....	215

I. INTRODUCCIÓN

El término osteoporosis (OP) del latín –oste- (hueso) y –porosis- (poroso); fue definido en 1940 por F. Albright como "disminución de la masa ósea" por unidad de volumen de hueso secundaria a la ausencia de estrógenos, siendo la mineralización del hueso normal"; aunque a comienzos del siglo XIX, el cirujano inglés Sir Astley Cooper, había señalado "que la porosidad y la disminución de la fuerza de los huesos se adquieren en los estados más avanzados de la vida" y que "este estado del hueso, favorece el aumento de fracturas" (Cooper, 1822). La última definición de la OP es del año 2001: "Enfermedad esquelética diseminada y caracterizada por una resistencia ósea disminuida, que incrementa el riesgo de padecer fracturas" (NIH, 2001).

Aproximadamente hasta los 30 años existe un aumento progresivo de masa ósea, tras un período de estabilidad, ésta comienza a declinar, pudiendo perderse hasta un 35% de hueso cortical y un 50% de hueso trabecular a nivel sistémico en mujeres. En hombres estos descensos son menores en un tercio de lo señalado en mujeres, (Carrascosa, 1995).

La osteoporosis supone un problema sanitario global cuya importancia va en aumento con el envejecimiento de la población; se trata de un proceso prevenible y tratable, pero la falta de signos de alerta previos a la aparición de fracturas, conlleva que pocos pacientes sean diagnosticados en fases tempranas y tratados de forma efectiva, (Muñoz-Torres, 2010).

Las previsiones para nuestro país, señalan que una de cada tres mujeres y uno de cada cinco hombres van a padecer osteoporosis y que actualmente la padecen más de 3,5 millones de personas, siendo la causa de alrededor de 90.000 fracturas de cadera y 500.000 fracturas vertebrales al año (Del Pino Montés, 2012). El riesgo de fractura de cadera aumenta exponencialmente a partir de los 50 años, de forma que a los 80 se produce el 50% de las mismas, el 95% debidas a una caída (Cummings, 2002). Asimismo, se estima que el 1% de las mujeres mayores

de 65 años han sufrido alguna fractura vertebral, al igual que el 3% de las mayores de 85 años (Díaz Curiel, 2001).

La principal causa de la aparición de osteoporosis es la deprivación estrogénica característica de la postmenopáusia, al disminuir sus niveles circulantes en sangre, se produce el desequilibrio en el proceso de remodelación ósea a favor del proceso de destrucción del hueso (Seeman, 2002). Aunque también existen otras causas como el envejecimiento, carencias hormonales y nutritivas, inmovilización prolongada, fármacos, etc. (Cooper, 1992).

La pérdida progresiva de la masa ósea es debida al desequilibrio en el remodelado óseo, que comienza por la pérdida de los minerales que otorgan las características de dureza y densidad del hueso normal. Esto está estrechamente relacionado con las alteraciones de la microestructura lo que va a favorecer la producción de microfracturas, que a largo o corto plazo, provocarán una fractura ósea (González-Macias, 2004).

Para su diagnóstico la Organización Mundial de Salud (OMS), estableció en 1994 unas definiciones basadas en mediciones de masa ósea en columna lumbar, cadera o antebrazo en mujeres postmenopáusicas de raza blanca, estableciendo los valores de densidad mineral ósea (DMO).

El principal problema de la osteoporosis corresponde a que es una enfermedad silenciosa, pues no se suele diagnosticar hasta que aparece la primera fractura, por lo que los tratamientos, suelen estar dirigidos a ralentizar la destrucción de masa ósea una vez detectado el problema. Sin duda, la mejor opción siempre es la prevención. Por tanto una vez alcanzado el pico máximo de masa ósea (23-25 años), hay que fortalecer el hueso para retrasar la aparición de la enfermedad, (Slemenda, 1991). Para ello es recomendable la adquisición de hábitos de vida saludables como el ejercicio

físico adaptado a la situación del individuo, exposición moderada al sol, evitar los tóxicos como el tabaco o el alcohol, además de mantener una buena alimentación rica en calcio y vitamina D, (*Bagur, 1992*).

En este sentido, se está considerando la inclusión de los flavonoides en la ingesta como suplemento alimenticio en la prevención de la enfermedad. Los flavonoides son antioxidantes muy abundantes en la naturaleza, sobre todo en frutas y verduras. Dentro de la gran variedad, hay una clase con una estructura química muy similar a los estrógenos, que son capaces de unirse a sus receptores, activándolos, por lo que pueden ejercer una función análoga (*Milligan, 2000; Schaefer, 2003*).

En nuestro estudio hemos desarrollado un modelo experimental de OP mediante deprivación hormonal en ratas Sprague-Dawley, para evaluar los efectos de los flavonoides: Naringenina Potásica, Citrolive® y Eriocitrina.

II. ANTECEDENTES

A. OSTEOPOROSIS

1. HISTORIA

La osteoporosis (OP) no es una patología moderna, pues parece haber convivido con la humanidad desde el principio de los tiempos como revelan los estudios de Paleopatología, cuyas bases fueron establecidas por Sir Marc Armand Ruffer, y que consisten en un conjunto de investigaciones y técnicas histórico-médicas adaptadas al estudio de la salud y la enfermedad en el pasado, haciendo referencia de un modo directo o indirectamente al término “degradación ósea”, dado que, el concepto de OP propiamente dicho no aparece recogido como tal en la documentación histórico-bibliográfica hasta mediados del siglo XX (*Isidro, 2003*).

Prehistoria

Esta etapa se caracteriza por la escasez de estudios referidos a la OP. No obstante, es sorprendente el cúmulo de datos que pueden deducirse del estudio de la estructura ósea, como demuestran los sofisticados planteamientos de biomecánica articular que surgen de yacimientos arqueológicos como el de Atapuerca. Igualmente destacables son los del Valle africano de Twyfelfontein (incluido en la Lista del Patrimonio Mundial), en el que ha llegado a establecerse en ciertos restos, degradaciones óseas compatibles con estados cercanos a la osteopenia.

La paleopatología ha permitido encontrar signos degenerativos articulares en restos óseos y momificados, entre ellos callos de fractura, tumores óseos, osteomielitis, etc., incluso en periodos como la Edad Paleolítica y la Neolítica se identificaron signos de artritis reumatoide, degradaciones óseas y malformaciones esqueléticas tanto en yacimientos de Europa como de África, (*Iglesias-Gamarra, 2006*).

Antiguo Egipto

El importante conocimiento científico del Antiguo Egipto aparece recogido en un buen número de papiros “médicos”: Ramesseum (1900 a.C.), Kahoum (1850 a.C.), Hearts (1550 a.C.), que incluye diversos casos clínicos con detalles sobre fracturas de miembros, etc. Los más importantes son, sin duda, el papiro de Ebers (1500 a.C.), en el que destaca su amplio estudio descriptivo sobre distintos tipos de reumatismos y el papiro de Edwin Smith, atribuido a Imhotep, médico del rey Zoser, reconocido sabio, médico, astrólogo, y el primer arquitecto conocido de la historia (aprox. 2690-2610 a.C.). (*Ballesteros, 2002*)

La Farmacopea egipcia para los tratamientos relacionados con los problemas óseos era sumamente amplia y diversa, con productos generados a partir de materiales muy variados, tanto animales, vegetales como minerales. Su presentación era en forma de jarabes, ungüentos, polvos, supositorios y enemas, y en su formulación empleaban excipientes como agua, miel, cerveza, vino, etc. Los ingredientes más empleados en los “tratamientos” de los huesos eran: aloe vera, cebolla, propóleo y aceite de lino, (*Navarro, 2011*).

Aztecas

La civilización de los aztecas supo desarrollar una medicina y una farmacopea eficaces basadas, en gran parte, en el conocimiento empírico. Los médicos aztecas utilizaban numerosas prácticas terapéuticas basadas en un conocimiento, muy avanzado para la época, de la anatomía y el funcionamiento del cuerpo humano y de las propiedades de las plantas y los minerales. La aportación azteca a considerar en este estudio es el desarrollo de dos productos de origen natural para la “protección” de la salud ósea por su riqueza en calcio: *Theobroma Cacao* y *Amaranthus hypochondriacus*, (Navarro, 2011).

Antigua China Imperial

En una de sus obras más antiguas (3000 a.C.), una especie de Canon de Medicina Interna, obra dividida en dos partes, en que se describe el yin y el yang, los cinco movimientos, se habla de los órganos y vísceras (zang-fu), de los meridianos y colaterales, del qi (energía) y de la sangre (xue), causas, enfermedades, métodos para diagnosticar, puntos de acupuntura, etc.), asimismo, se proponen de forma explícita tres factores o mecanismos generadores de deterioro óseo (osteoporosis) y sus potenciales tratamientos:

- Insuficiencia de riñón, cuyo remedio sería tonificar los riñones y fortalecer los huesos (plantas usadas para ello: *Eucomia ulmoides*, *Morinda officinalis* y *Psoralea corilifolia*).

- Insuficiencia de Bazo, que podría evitarse fortaleciendo el bazo y activar el Qi. En el caso de la OP en personas de edad, lo que se encuentra típicamente es una insuficiencia simultánea de bazo-riñón (plantas usadas para ello: Panax Ginseng, Codonopsis pilosula).
- Estasia de Sangre, que puede evitarse moviendo la sangre y activando la circulación (plantas usadas para ello: Rehmannia glutinosa, Angélica sinensis o Salvia milthiorriza).

También en la obra de Boddhidharma, llamado Damo, 36º Patriarca del Budismo Mahayana (siglo VI d.C.), se describe una serie de doce ejercicios denominada “Qigong Budista templo de Shaolin: Yi Jin Jing”. Las múltiples torsiones, crean fuerzas y contrafuerzas alrededor de los huesos, que activan y estimulan la médula ósea. Estos ejercicios estaban plenamente indicados para la prevención de los problemas de deterioro óseo (*Skopalik, 1993*).

Israel y el Antiguo Testamento

La historia del pueblo hebreo es la historia del libro Sagrado, La Biblia. Su lectura es un desafío ya que, por un lado se interpreta en parte como la palabra de Dios dirigida al hombre y por otra como una especie de diálogo de Dios con el hombre. Dentro de esta obra hay de forma indirecta ejemplos del tema que nos ocupa, en el versículo 12 del libro del Eclesiastés en relación a los achaques de la vejez.

"Antes que se oscurezca el sol, y la luz, y la luna y las estrellas, y vuelvan las nubes tras la lluvia; cuando temblarán los guardas de la casa, y se encorvarán los hombres fuertes (los huesos), y cesarán las muelas porque han disminuido, y se oscurecerán los que miran por las ventanas; y el polvo vuelva a la tierra, como era, y el espíritu vuelva a Dios que lo dio. Vanidad de vanidades, todo es vanidad." (Krivoy, 2002).

Antigua Grecia

Homero (800 a.C.), en su relato de la guerra de Troya, permite un acercamiento al conocimiento de las lesiones en esa época y su tratamiento. La *Ilíada* contiene referencias a varias deformidades músculo-esqueléticas. Homero utilizó un léxico anatómico de unas 150 palabras: esqueleto **óstea**, vértebras **sphondyloí**, clavícula **kleis**, cavidad cotiloidea **kotyle**, rodilla **gony**, tendón **tenenon**, espalda **rakhis**, etc).

Hipócrates (460-370 a.C.) uno de los padres de la medicina natural, es conocido por haber otorgado a la medicina una metodología sistemática y científica. Entre sus obras destacan: "Sobre las articulaciones" **peri arthron**, "Sobre las fracturas" **peri agmon** y "Palanca" **mokhlikós**.

En "Sobre fracturas" introdujo las técnicas de tracción continua, la inmovilización con férulas, la compresión progresiva con vendajes que permitían la extensión y contra-extensión de los miembros, Además, describió de forma específica distintos tipos de fracturas y su periodo de

consolidación. En "La Palanca" introduce ciertas bases anatómicas sobre huesos y articulaciones y repite las normas para reducir fracturas y luxaciones. El título del libro (La Palanca) hace referencia a la mesa utilizada para reducir las fracturas y deformaciones de la columna vertebral ("scamnum"). Aunque no existen referencias expresas al concepto de osteopenia-OP, en esta obra si que se recoge un amplio y relativamente profundo estudio de la "osteología", incluidas las ideas sobre la "estabilidad natural del hueso" (García, 2013).

Imperio Romano

Una de sus innovaciones más importantes fue la creación de la enseñanza reglamentada de la medicina, que hizo que en el siglo II tanto los médicos militares como los civiles debieran pasar por la Escuela de Medicina. El escritor e historiador Aulo Cornelio Celso (53 a.C. - 7 d.C) realizó un compendio enciclopédico titulado "Artes" sobre el conocimiento médico de su época. El libro VIII trata sobre los huesos.

Galeno (129-199 d.C.), médico de los gladiadores y padre de la Medicina occidental, realizó una excelente descripción del esqueleto, de los músculos y de la forma en que se envían señales desde el cerebro a los músculos a través de los nervios. Habla de la destrucción ósea, de los secuestros y de la reparación en la osteomielitis, llegando a realizar algunas resecciones en estos casos. Inició el conocimiento sistemático de la anatomía humana aplicada al diagnóstico y tratamiento de las enfermedades, conociendo la osteología por el estudio directo del esqueleto humano. Se considera que fue el primero que utilizó las palabras griegas,

cifosis, lordosis y escoliosis, para las deformidades descritas en los textos hipocráticos. Describió una gran variedad de ejercicios terapéuticos con sus parámetros de vigor, duración, frecuencia, uso de aparatos y partes del cuerpo intervinientes, así como gimnasia planificada del tronco y los pulmones para la corrección del tórax deformado cifótico o escoliótico. El enfoque principal de Galeno, desde el punto de vista de la "Medicina interna" perduró prácticamente hasta el Renacimiento, (Ballesteros, 2002).

Edad Media

La superstición imperante durante esta época, impidió la realización de estudios serios de anatomía y patología quirúrgica. No fue hasta el siglo XII cuando Europa comenzó a despertar gradualmente de esta edad oscura, y empezaron a fundarse universidades y hospitales; la disección humana se reanudó y los importantes textos griegos comenzaron a traducirse del árabe al latín.

Guy de Chauliac (1290-1368) podría ser el primer "cirujano medieval" destacable en el área de los problemas óseos. En su "*Gran Cirugía*" sigue a los clásicos, pero realiza una aportación novedosa en el campo de la Traumatología y Ortopedia, cual es la utilización de la tracción continua, mediante pesos y poleas, para la reducción y tratamiento de las fracturas femorales (Baud, 1994).

Antiguo Islam: árabes

La medicina árabe fue el nexo de unión entre la sabiduría del mundo clásico y la medicina del Renacimiento. Los antiguos textos clásicos, perdidos para los médicos occidentales, eran conocidos y fueron transmitidos por los árabes. Hunayn ibn Ishaq, médico y traductor, fue particularmente célebre por sus traducciones de Galeno.

Se atribuye a Rhazés (850-923 d.C.), médico persa, la utilización del yeso por primera vez en medicina, en su tratado médico "*Hawi*". Otro persa, Abu Mansur Muwaffak, describió la colocación de yesos para fracturas y otras lesiones óseas de los miembros.

Abulcasis (936-1013 d.C.), nacido en Al Zahra, a cinco kilómetros de Córdoba, es autor de un tratado de medicina en treinta tomos. En lo que se refiere a las fracturas y luxaciones, Abulcasis realiza algunas aportaciones propias, entre las que destaca un método novedoso para el tratamiento de las fracturas del pubis (*Ballesteros, 2002*).

Renacimiento

En este periodo coinciden numerosos observadores y científicos que rompen con la teoría galénica imperante hasta la fecha, y hacen que se

considere el conocimiento anatómico como el motor de la nueva medicina y cirugía.

La figura de Leonardo da Vinci (1452-1519) fue crucial en el desarrollo de la cultura occidental, siendo reconocido como el padre del alto Renacimiento. Sus estudios anatómicos, recogidos en el "*Manuscrito Anatómico A*" (1510-1511), se centran en la osteología y la miología y en sus láminas se plasman los intentos de comprender el funcionamiento humano.

Paracelso (1493-1541) nacido en Einsiedlen (Suiza), se opuso a las autoridades académicas de la época, sometiendo a crítica a los clásicos. Su principal obra fue "*Opera Omnia Médico-Chemico-Chirurgica*", aunque también escribió un tratado de cirugía, "*Magna Chirurgia*", en el que se recogen los criterios quirúrgico-traumatológicos más importantes.

El belga Andrés Vesalio (1514-1564) es, sin duda, el mejor anatomista de todos los tiempos. También otros autores contribuyeron con su iconografía a la riqueza anatómica de la época: Charles Estiène (1504-1564), Eustaquio (1500-1574) y Cannano (1515-1579). En la misma época, Fernel en su obra "*Medicina*", introduce el término *Physiologia* (1542).

Se considera a Ambrosio Paré (1510-1590) como la principal figura quirúrgica del siglo XVI, así como el padre de la cirugía francesa. Las aportaciones de Paré a la Traumatología y Ortopedia son importantes. Fue el primero en describir la fractura de cuello femoral y los desprendimientos epifisarios en niños. Además describió un nuevo método para la reducción

de la luxación glenohumeral. Paré fue el primero en describir una fractura abierta, tratada con éxito sin necesidad de amputación (*Ballesteros, 2002*).

Siglo XIX

En este siglo se produce la fusión entre la medicina y la cirugía, pasando ésta a ser considerada como una ciencia. Las aportaciones científicas en el siglo XIX se producen a gran velocidad y saltando de escenario en los diversos países europeos. En España, inmersa en importantes convulsiones políticas, el desarrollo de la medicina osteoarticular fue siempre a remolque de las aportaciones de los autores europeos.

Inglaterra tuvo grandes figuras quirúrgicas, que realizaron importantes aportaciones al conocimiento de la patología músculo-esquelética: Abraham Colles (1773-1843) y sobre todo, Sir Benjamin Brodie (1786-1862), cirujano del Hospital St. George de Londres, que publicó en 1818 su libro "*Sobre las Enfermedades de las Articulaciones*" en el que correlaciona aspectos patológicos y clínicos de las enfermedades osteoarticulares.

Sir James Paget (1814-1899) cirujano en el Hospital San Bartolomé de Londres fue pionero en la investigación anatomopatológica de las enfermedades esqueléticas. Describe y caracteriza varias enfermedades primarias del hueso y, sobre todo, la que lleva su nombre: "enfermedad de Paget" (*Ballesteros, 2002*).

En este siglo se establecieron las bases de la osteopatía, tal y como hoy la conocemos, por el médico Americano, Andrew Taylor Still, quien en 1872 considera esta disciplina como un mecanismo para estimular la capacidad de auto-sanación del cuerpo humano. El tratamiento, que se denomina manipulación osteopática, consistía en un sistema de técnicas prácticas orientadas a aliviar el dolor, restaurar funciones y promover la salud y el bienestar (Navarro, 2011).

Siglo XX

El descubrimiento de los rayos X fue tan importante para la medicina osteoarticular, que no se concibe la una sin los otros. La posibilidad de ver la anatomía del hueso antes (o en lugar) de la cirugía, abrió un increíble abanico de posibilidades que los cirujanos de la época se apresuraron a explotar. De hecho, a las pocas semanas del descubrimiento de los rayos X empezaron a usarse en medicina. Wilhelm K. von Röntgen (1845-1923), profesor de física en Wurzburg, obtuvo la primera radiografía de la mano de su esposa el 22 de diciembre de 1895. Recibió el Premio Nobel por su descubrimiento en 1901. Su hallazgo no solamente dio origen a una nueva especialidad, el radiodiagnóstico, sino que con respecto a la patología ósea constituye un punto de inflexión que se considera como el origen de la Traumatología y Cirugía Ortopédica tal y como se concibe en la actualidad (Ballesteros, 2002).

Antecedentes



Imagen 1. La primera radiografía: mano de Anna la esposa del Prof. Wilhelm K. von Röntgen. (<http://www.medicinajoven.com/2010/04/la-primera-radiografia-de-la-historia.htm>)

2. DEFINICIÓN

La primera definición de Osteoporosis (OP) la formuló el Dr. Fuller Albright en 1940, considerándola como "la disminución de la masa ósea por unidad de volumen de hueso, siendo la mineralización del hueso normal". Una segunda definición procede del "Consenso para la prevención y tratamiento de la Osteoporosis" que, en 1993, detalla que se trata de una enfermedad difusa del esqueleto, caracterizada por una disminución de la masa ósea y alteraciones en la micro-arquitectura del tejido óseo, como consecuencia de la cual aumenta la fragilidad ósea y la susceptibilidad para las fracturas.

La última definición de la OP es del año 2001: "Enfermedad esquelética diseminada y caracterizada por una resistencia ósea disminuida, que incrementa el riesgo de padecer fracturas" (NIH, 2001).

Imagen 2. Hueso normal.
(Meseguer, 2013)

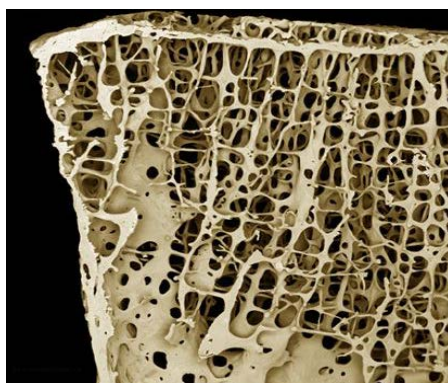
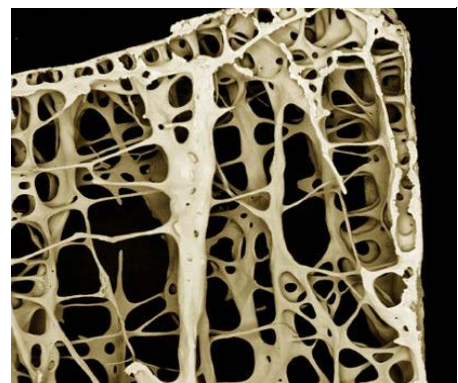


Imagen 3. Hueso osteoporótico.
(Meseguer, 2013)



3. CLASIFICACIÓN

La OP, ha sido clasificada de diferentes formas: *según la edad de comienzo, la extensión de enfermedad, etc.* Pero la más aceptada y extendida es la clasificación según su etiología (Riggs y Melton, 1998).

a) CONGÉNITAS

- Osteogénesis imperfecta
- Cromosomopatías
- Disgenesia gonadal
- Progeria
- Síndrome de Ehlers-Danlos, etc.

b) ADQUIRIDAS:

A) Primaria: Se caracteriza por presentar formas comunes de OP, de causa desconocida, no asociadas a otras enfermedades. A su vez se divide en:

- **Osteoporosis idiopática** (juvenil y adulta): Es poco frecuente y afecta a niños de entre 8 y 14 años y adultos jóvenes de ambos sexos con función gonadal normal. Se presenta con dolor óseo de aparición repentina y con fracturas tras mínimos traumatismos. Es una enfermedad autolimitada, remitiendo en el plazo de 4 a 5 años. En la Densitometría Mineral Ósea (DMO) se observa disminución del hueso trabecular, que puede permanecer baja durante muchos años.
- **Osteoporosis tipo I:** Es la llamada **osteoporosis posmenopáusica** en la mujer, por su relación con el déficit de estrógenos. Se manifiesta entre los 51 y los 70 años y se caracteriza por la pérdida ósea (principalmente de hueso trabecular). Se sabe que la función del

factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OPG) está inducida por los estrógenos; por eso, con la menopausia y el declive de las hormonas sexuales, se alteran los reguladores naturales de la masa ósea y se produce un aumento de la pérdida del tejido óseo.

La forma que afecta a los hombres está vinculada al descenso de los niveles sanguíneos de andrógenos.

- **Osteoporosis tipo II:** También llamada **senil**. Es el resultado de una deficiencia de calcio relacionada con la edad y de un desequilibrio entre la velocidad de degradación y de la regeneración ósea.

B) Secundaria: Está determinada por agentes etiológicos conocidos: tales como causas endocrinometabólicas, nutricionales, digestivas, por agentes físicos y tóxicos (radioterapia, ultrasonidos, intoxicación metálica, alcoholismo, etc.), por fármacos (heparina, corticoides, barbitúricos, hidantoínas, etc.), enfermedades del tejido conectivo, enfermedades hematológicas y por el desuso, como en el caso de inmovilizaciones prolongadas, la falta de ejercicio y las caídas.

Además de estas dos clasificaciones existen otras menos utilizadas para especificar el tipo de OP diagnosticado:

Según la extensión de la enfermedad:

- ❖ Generalizada
- ❖ Localizada

Según la edad de comienzo:

- ❖ Juvenil
- ❖ Del adulto joven
- ❖ Presenil
- ❖ Senil

Según los criterios clínicos:

- ❖ Activa
- ❖ Pasiva

Una vez diagnosticada la enfermedad, el objetivo médico consiste en mejorar la calidad de vida del paciente mediante tratamiento, tanto farmacológico como no farmacológico, además de intentar frenar la pérdida de masa ósea y/o fomentar su formación, reducir el dolor crónico y prevenir o tratar las fracturas.

4. INCIDENCIA

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

En 1995, Melton y cols. estimaron la prevalencia de la OP, según los criterios de la OMS en alrededor del 15 % en mujeres de raza blanca mayores de 50 años (cuando se mide en una de las tres localizaciones habituales: columna, cadera o muñeca) y del 30 % (cuando se mide en todas ellas). Además, la prevalencia aumenta con la edad, desde el 15 % para las edades comprendidas entre 50 y 59 años, hasta una prevalencia mayor al 80% para mujeres con una edad superior a 80 años.

Según los datos del estudio NHANES III en varones mayores de 50 años, la prevalencia de OP es de un 8%.

Por otra parte, según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia se estima en un 35% de las mujeres mayores de 50 años, elevándose a un 52% en las mayores de 70, (*Hermoso de Mendoza, 2003*).

Uno de los problemas de esta patología crónica, que no suele presentar síntomas hasta el momento en el que se producen las complicaciones: acortamiento de la columna vertebral debido a las fracturas, etc., lo que dificulta el cálculo exacto de su prevalencia. A pesar de esto, es calificada

por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el quinto problema de salud a nivel global.

En los últimos 50 años, la OP ha alcanzado especial relevancia por la elevada magnitud del problema a nivel poblacional; de modo que actualmente se estima que es la patología crónica con más prevalencia en todo el mundo (afecta a más de 200 millones de personas, especialmente a mujeres mayores de 65 años) (*Del Pino Montes, 2010*).

En nuestro país la OP es también la patología ósea más prevalente, afectando a un 35% de mujeres españolas de más de 50 años, porcentaje que se eleva a un 52% en las mayores de 70 años. Además, una de cada cinco mujeres con edad superior a los 50 años tiene al menos una fractura vertebral debida a la OP, que se asocia a un deterioro de la calidad de vida relacionada con la salud y a un riesgo aumentado de sufrir otras fracturas. Por otra parte, se ha señalado que la incidencia anual de fractura de fémur en mujeres de edad superior a 50 años es de 3%, mientras que la incidencia de fractura de antebrazo distal es de casi el doble, (*SEIOMM, 2003*).

En cuanto a las complicaciones la incidencia de fractura de cadera en España oscila, según la región estudiada, entre 34,9 y 83 fracturas por 100.000 habitantes. Es una enfermedad crónica en la que cada año se contabilizan en España, más de 100.000 fracturas osteoporóticas. La fractura vertebral es la más frecuente, constituyendo el 44% del total de fracturas producidas por la osteoporosis. A esta le siguen la fractura de cabeza de fémur (20%) y la fractura distal de antebrazo (14%) (*Del Pino Montes, 2012*). Se calcula que se producen 90.000 fracturas de cadera y 500.000 fracturas vertebrales al año ligadas a la osteoporosis, según indica la Actualización 2011 del consenso Sociedad Española de Reumatología.

Este tipo de fracturas puede provocar discapacidad y dolor, y muchas veces son ignoradas, o diagnosticadas erróneamente como dolor de espalda debido a distensión muscular o artritis. Las previsiones son que, en nuestro país, una de cada tres mujeres y uno de cada cinco hombres mayores de 50 años sufrirán al menos una fractura osteoporótica en su vida restante (Caamaño, 2014).



Imagen 4. Síntomas de fractura vertebral osteoporótica. (Meseguer, 2013)

La OP, además de reducir considerablemente la calidad de vida de quien la padece y predisponer a un estado de dependencia, que en muchos casos se convierte en definitivo, tiene importantes consecuencias económicas. Las fracturas por OP se tradujeron en el aumento de los costos por la discapacidad y la muerte prematura, es uno de los principales gastos sanitarios. Cada año en Europa ocasionan un gasto de 37.000 millones de euros, y se estima que crezca hasta los 76.700 millones en los próximos 50

años, conforme aumente también la media de edad poblacional (*International Osteoporosis Foundation (IOF); 2010*).

Estos datos ponen de manifiesto la importancia de que se establezcan y pongan en marcha medidas y estrategias de prevención. Pero antes, es necesario conocer los factores que aumentan el riesgo de padecer OP, así como distinguir de entre todos ellos, los que pueden ser modificados.

5. PATOGENIA

La OP es una patología caracterizada por disminución de la masa ósea y alteraciones de la microarquitectura del tejido del hueso, que conducen a un incremento de la fragilidad y, consecuentemente, a un riesgo elevado de presentar fracturas, (Díaz Curiel, 2001). Estas, constituyen casi siempre el primer signo y el motivo principal de consulta y por tanto de diagnóstico, pues hasta ese momento el proceso suele pasar desapercibido, por lo que ha sido también denominado como "epidemia silenciosa". Las fracturas pueden darse en cualquier zona del esqueleto, aunque los lugares más afectados son la columna vertebral, el radio distal (fractura de Colles) y la cadera. Se ha estimado que una mujer de 50 años tiene un riesgo del 40% de sufrir una fractura en algún momento del resto de su vida, mientras que en los varones el riesgo alcanza el 13% (Cummins, 2002).

La resistencia ósea depende de componentes cualitativos y cuantitativos: la disminución de masa ósea, relacionada con las unidades de remodelado óseo, así como el deterioro de la arquitectura microscópica del hueso, que hacen referencia a la desaparición de trabéculas y conexiones entre las mismas, condicionan una importante disminución en la competencia mecánica del hueso.

El principal factor responsable de la resistencia del hueso a las fracturas es la masa ósea, pero también contribuyen otros factores como:

- **Características geométricas del hueso.**
- **Interconexión trabecular:** Las trabéculas se apoyan unas en otras, distribuyéndose la carga que soportan. La desaparición de algunas de ellas, y la consiguiente pérdida de conexión en el entramado trabecular, supone una sobrecarga para las demás, y por tanto, una mayor propensión a las fracturas.
- **Calidad del hueso.**
- **Grosor de las partes blandas.**
- **Pérdida ósea y deficiencia estrogénica.**

En el caso de las mujeres, la pérdida ósea experimenta una fuerte caída tras la menopausia, debido a la disminución en los niveles de estrógenos, afectando principalmente al hueso trabecular y desencadenando así la aparición de la OP posmenopáusica y un aumento del riesgo de fractura. La disminución de la DMO, que se produce con la deficiencia estrogénica en la menopausia (natural o quirúrgica), el efecto protector de los estrógenos sobre la pérdida de masa ósea y la incidencia de fracturas, demuestran claramente la relación que existe entre la deficiencia estrogénica y la pérdida ósea.

El descubrimiento de receptores de estrógenos en las células del hueso (osteoblastos y osteoclastos), sugirió una posible vía de actuación directa de los estrógenos sobre el hueso. La deficiencia estrogénica provoca un desequilibrio en el remodelado óseo, con un predominio de la resorción ósea. Las imágenes mediante micro tomografía computarizada (micro-CT) consiguen gran resolución, incluso en espesores de 5 μm , permitiendo la detección de pequeñas lesiones óseas y signos incipientes de remodelado. Además, la reconstrucción tridimensional de la imagen, permite un estudio detallado de la microarquitectura ósea, mejorando en este sentido a la histomorfometría. Con estos estudios se obtiene una visión completa, tanto

cualitativa como cuantitativa, del hueso analizado. Debido a que se trata de una técnica relativamente nueva, no existen valores estandarizados, como ocurre en el caso de la densitometría ósea (DXA), (Seeman, 2002).

En la última década se ha propuesto que, los efectos directos que ejerce la deficiencia de estrógenos sobre el hueso, se deben a cambios en la síntesis de determinadas citoquinas y factores reguladores por las propias células del hueso.

6. FACTORES DE RIESGO

Pueden definirse como todos aquellos factores, estados o condiciones, asociados a un riesgo mayor de padecer esta patología, y sobre todo sus consecuencias, las fracturas. La probabilidad individual de padecer una fractura osteoporótica está condicionada por múltiples factores. De hecho, cada localización específica de fractura tiene un perfil de factores de riesgo determinado. Generalmente no actúan de forma aislada, sino que corresponden a la combinación de varios de ellos, lo que aumenta significativamente el riesgo de fractura y puede ser útil para seleccionar a los individuos a los que realizar determinadas pruebas, como la densitometría ósea, e incluso para decidir la instauración del tratamiento farmacológico.

Entre los factores de riesgo clínicos relacionados con la OP y las fracturas se encuentran:

Osteoporosis: factores de riesgo	
Individuales (no modificables)	Ambientales/Régimen de vida
<ul style="list-style-type: none"> - Sexo femenino - Raza blanca y amarilla - Factores genéticos - Edad avanzada - Edad de menarquia - Menopausia precoz - Constitución física - Fracturas previas 	<ul style="list-style-type: none"> - Dieta baja en calcio y vitamina D - Tabaquismo, cafeína, alcohol... - Sedentarismo - Inmovilización - Clima y horas de luz solar - Ambiente socio-económico - Residencia urbana - Tratamientos (corticoides, anticoagulantes, inmunosupresores)

Imagen 5. Factores de riesgo. (Meseguer, 2013)

FACTORES DE RIESGO NO MODIFICABLES:

El sexo, la etnia, constitución física, edad, existencia o no de fracturas anteriores, los antecedentes familiares y enfermedades y patologías que condicionan la constitución física y función hormonal de cada individuo. De modo que ocurre una incidencia mayor en mujeres, sobre todo posmenopáusicas, de raza blanca y constitución delgada. A mayor edad, mayor prevalencia.

Genéticos o constitucionales:

- **Sexo, edad y etnia:**

La mujer es el grupo poblacional más susceptible de padecer OP, principalmente en los años cercanos y posteriores a la menopausia. La prevalencia es de 15-20: 1 respecto al hombre.

A partir de los 50 años, la tasa de incidencia de fractura de cadera es en las mujeres de 3:1 respecto a los hombres.

La OP y las fracturas osteoporóticas son más frecuentes en la etnia blanca, seguida de la asiática, respecto a la negros y los hispanoamericanos.

- **Fractura osteoporótica previa:**

La presencia de una fractura previa por fragilidad, aumenta el riesgo de nuevas fracturas entre 1,5 y 9,5 veces, dependiendo de la edad, el número de fracturas previas y su localización. De forma global y para cualquier localización, el riesgo de fractura de un individuo con una fractura osteoporótica previa, es de 2,2 veces mayor que la de un individuo sin ese antecedente.

- **Antecedente familiar de fractura:**

Dado que la influencia genética sobre el riesgo de OP es multifactorial, no sólo debe considerarse el antecedente de fractura de cadera en familiares de sexo femenino (madre y abuela), sino también en familiares varones de 1º y 2º grado de consanguinidad.

B. FACTORES DE RIESGO MODIFICABLES:

- **Clima:** Esta patología es más frecuente en las zonas geográficas con menos horas de sol, ya que éste es necesario para activar la síntesis de vitamina D, que mejora la absorción intestinal del calcio. De ahí que, en los países nórdicos, sea más alta la incidencia de la fractura de fémur.
- **Fármacos:** El uso prolongado de algunos medicamentos, como glucocorticoides, hormonas tiroideas y medicamentos anti-convulsivos, aumenta la incidencia de fracturas osteoporóticas.
- **Dieta:** Las dietas bajas en calcio, hiperproteicas o con alto contenido en fosfatos, así como el consumo elevado de cafeína y los hábitos tóxicos (fumar o abusar del alcohol) perjudican la remodelación ósea.
- **Sedentarismo:** Las personas que realizan una actividad física moderada tienen un menor riesgo de padecer OP.
- **Nivel socio-económico:** Un bajo nivel socio-económico se asocia con una dieta insuficiente y una mayor morbilidad osteoporótica. Este factor cobra mayor importancia en las zonas urbanas que en las rurales.

C. ESTILO DE VIDA Y NUTRICIÓN:

- **Baja ingesta de calcio:** El consumo de calcio en las edades críticas de la vida es importante, y la infancia y la adolescencia son el momento clave para asegurar una adecuada ingesta y facilitar la formación de un buen pico de masa ósea. En la época posmenopáusica y en la etapa senil, los suplementos de calcio pueden ayudar a disminuir la pérdida de masa ósea y por tanto facilitan la prevención de fracturas. En los 5 años siguientes a la menopausia existe una pérdida acelerada de la masa ósea, siendo del 3-5% anual mientras la pérdida relacionada con la edad es de aproximadamente un 1% anual. Las recomendaciones sobre la ingesta de calcio del Consensus Conference in Osteoporosis de EE.UU (Consensus Development Conference, 1994) son de 1.200 mg/día en adolescentes, 1.000 mg/día en adultos y 1.500 mg/día en mujeres posmenopáusicas y ancianos.
- **Déficit de Vitamina D:** Produce aumento de la hormona paratiroidea, con aumento en el recambio óseo y disminución de la masa ósea, en ausencia de alteraciones significativas de la mineralización. Las deficiencias severas y prolongadas de vitamina D producen raquitismo en el niño y osteomalacia en el adulto. La vitamina D ayuda a absorber calcio, por lo que se recomienda la ingesta de 200 a 600 u.i. de vitamina D diaria.

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

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

- **Variables antropométricas:** El bajo peso ($IMC < 19 \text{ kg/m}^2$) y la talla pequeña se asocian a mayor riesgo de OP. A igualdad de densidad ósea, tiene menos resistencia un hueso pequeño que un hueso grande.
- **Tóxicos: Tabaquismo, alcohol y café:** Los fumadores tienen menor densidad mineral ósea, mayor susceptibilidad a la fractura vertebral y de cadera y mayor probabilidad de presentar fracturas recurrentes.

El consumo crónico de **alcohol** tiene un efecto depresor sobre la proliferación de los osteoblastos, e interfiere en la absorción intestinal del calcio, además de asociarse a un proceso global de malnutrición. **La cafeína** aumenta la eliminación urinaria de calcio, por lo que el uso excesivo favorece la OP.

- **Nutrición no equilibrada:** La baja ingesta proteica es más frecuente a medida que avanza la edad y se asocia con baja densidad ósea y sedentarismo. La alta ingesta de bebidas gaseosas, especialmente bebidas tipo cola, cada vez más frecuente en jóvenes, parece relacionarse también con baja densidad ósea, aunque no se ha demostrado en estudios

experimentales y algunos estudios postulan que su efecto negativo se debería al desplazamiento del consumo de lácteos en la dieta.

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

E. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CRÓNICO: El consumo de Glucocorticoides y ACTH, litio, tirosina sobredosificada, anticonvulsivantes, heparina, quimioterapia, antiandrógenos, tamoxifeno, antiácidos con fosfato o aluminio, etc.

F. OTRAS ENFERMEDADES: Mala absorción intestinal y hepatopatías crónicas, enfermedades endocrinas, enfermedades renales, etc.

G. OTROS FACTORES DE RIESGO :

Factores de riesgo de caídas

- ✓ Tener más de 65 años en mujeres
- ✓ En el exterior: clima, tráfico, transportes, obstáculos,...
- ✓ Deterioro relacionado con el envejecimiento
- ✓ Trastornos de la marcha, equilibrio y movilidad
- ✓ Déficit visual, cognitivo o depresión
- ✓ Pérdida de conocimiento súbita
- ✓ Riesgos personalizados: calzado inapropiado, vestido inapropiado
- ✓ Multiterapia: sedantes, antihipertensivos
- ✓ Factores ambientales
- ✓ El interior de la casa (luz, suelo, cables, mascotas)

Factores de riesgo de fractura osteoporótica

- ✓ Baja masa ósea patológica: osteopenia y OP
- ✓ Mayor de 65 años
- ✓ Fractura osteoporótica previa
- ✓ OP en familiar de primer grado
- ✓ Bajo peso
- ✓ Riesgo aumentado de caídas

No obstante, en los mecanismos de producción de las lesiones de la OP, hay que tener en cuenta que el pico de masa ósea se produce entre los 25 y los 30 años de edad, estando este condicionado, además de por los antecedentes familiares y niveles hormonales, por la nutrición y el ejercicio, que son los encargados de la remodelación del hueso hasta los 40 años.

El tejido óseo es un sistema dinámico sometido a una serie de procesos fisiológicos, entre ellos, el remodelado. En éste, el tejido más antiguo es sustituido por otro nuevo y en condiciones normales existe un equilibrio entre la formación y la resorción ósea. Este fenómeno se denomina remodelado óseo, hecho que hace que la misma cantidad de tejido óseo que se ha destruido se deposite de nuevo durante la posterior formación.

El remodelado óseo es un proceso complejo, en el que se involucran un gran número de funciones celulares que coordinan la formación y resorción, está regulado por la acción de hormonas sistémicas y factores locales, que afectan a las células de la línea osteoblástica y osteoclástica, ejerciendo sus acciones sobre la replicación de células indiferenciadas, el reclutamiento y la diferenciación celular, lo que hace posible que el hueso se adapte a las necesidades metabólicas y mecánicas del organismo.

El ciclo de remodelado óseo consta de las siguientes fases con una duración aproximada de tres meses:

- 1) **Quiescencia:** Las células están en reposo.
- 2) **Activación:** Se inicia la diferenciación y maduración del osteoclasto, que es atraído hacia la superficie expuesta del hueso.
- 3) **Resorción:** Los osteoclastos, en contacto con el hueso, inician la erosión, generando la formación de una cavidad.
- 4) **Inversión o cementación:** Fase que separa el final de la resorción y el inicio de la formación para una zona determinada, en la que los osteoclastos son sustituidos por los osteoblastos.
- 5) **Formación:** Los osteoblastos emigran hasta la superficie resorbida y producen un nuevo tejido no mineralizado que sustituye al que se perdió por la resorción.

6) **Mineralización:** Finalmente toda la matriz sintetizada sufre el proceso de mineralización.

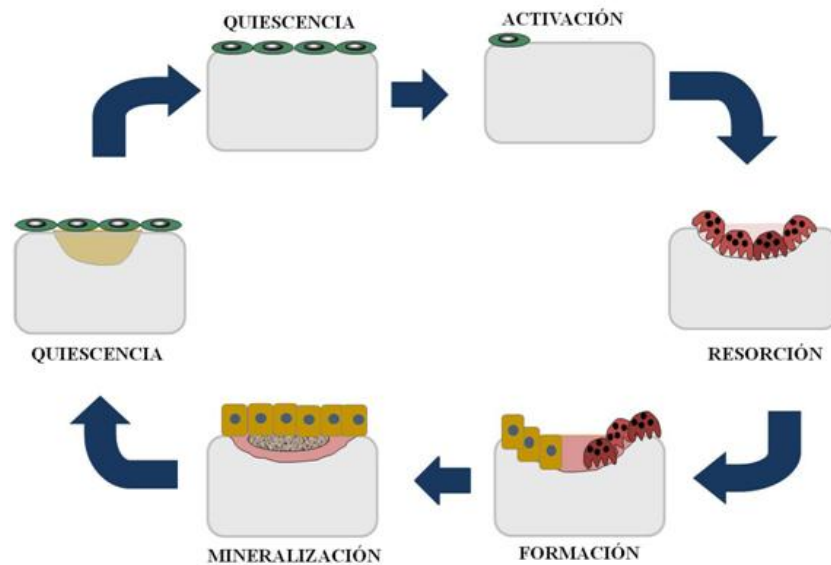


Imagen 6. Ciclo de remodelado óseo. (Compston, 2001)

En los pacientes osteoporóticos, la cavidad generada durante la resorción no es totalmente rellena por la acción de los osteoblastos, lo que conduce a un adelgazamiento intenso de las trabéculas. (Compston, 2001).

7. DIAGNOSTICO

En la actualidad para el diagnóstico de la OP se cuenta con numerosos métodos. Además de la exploración física y una buena anamnesis, los procedimientos para diagnosticar la osteoporosis pueden incluir los siguientes:

1. Historial médico radiológico familiar.
2. Estudio Bioquímico: examen de sangre (para medir los niveles de calcio y de potasio).
3. Rayos X (esqueléticos).
4. Examen de la densidad ósea. También llamada **Densitometría ósea**, consiste en la medición de la masa ósea en relación con su volumen para determinar las probabilidades de desarrollar OP.
5. Micro tomografía axial computarizada.

1.- HISTORIAL MÉDICO RADIOLÓGICO FAMILIAR. Es necesario recopilar todo el historial médico radiológico para una correcta evaluación de la enfermedad.

2. - ESTUDIO BIOQUÍMICO.

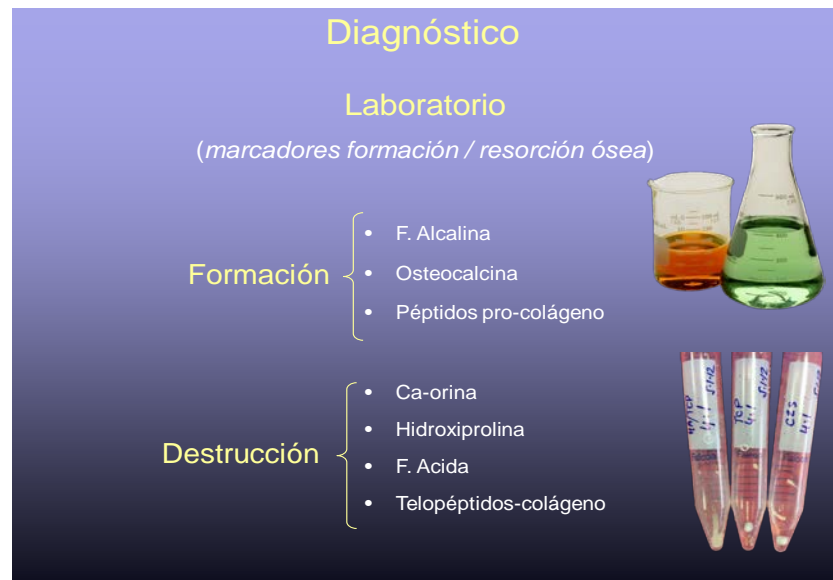


Imagen 7. Diagnóstico. (Meseguer, 2013).

Marcadores de formación ósea:

Estos marcadores son reflejo de la actividad osteoblástica de formación de hueso nuevo. Entre éstos cabe mencionar la **fosfatasa alcalina total (ALP)**, un enzima localizado en la parte exterior de la membrana celular de los osteoblastos. Aunque se expresa en varios tejidos, su actividad total sérica representa fundamentalmente la suma de las actividades del hueso, del hígado y, en menor medida, del intestino. Hay varios factores que afectan a la ALP total, como el sexo, la edad y el estado hormonal. Si no hay incremento en la isoenzima hepática a causa de un proceso patológico, la ALP total mantiene un valor aceptable para evaluar el recambio óseo

(*Minisola, 1998*), existiendo una alta correlación entre la ALP total y la específica de hueso, (*Takahashi, 1997*).

Calcio (Ca²⁺). Se encuentra estrechamente relacionado con el sistema esquelético. Los niveles plasmáticos de calcio no suelen verse muy alterados tras la menopausia, se mantienen estables o ligeramente elevados. La alteración de los niveles plasmáticos de calcio se debe a que, por falta de estrógenos, disminuyen los niveles de hormonas reguladoras del calcio como la calcitonina y el calcitriol (vitamina D).

Fósforo (P). Su mayor concentración está en los dientes y en los huesos. Colabora en estrecha relación con el calcio para la formación de hueso. Si hay unos niveles elevados, se forma fosfato de calcio, que es insoluble y no reabsorbible y se acaba por eliminar, disminuyendo también los niveles de calcio en sangre. Por el contrario, una disminución de los niveles de fósforo impide que el calcio se asimile.

Los datos bioquímicos y hematológicos tampoco son de gran utilidad para el diagnóstico, pues suelen presentar cifras normales.

3. Rayos X

Otros procedimientos diagnósticos como la radiografía no son tan precisos, ya que solo muestran signos característicos cuando hay rotura o una pérdida de más del 30 % del hueso. Las manifestaciones radiológicas son: una disminución de la masa ósea (se ve transparente el hueso), un adelgazamiento de la cortical con ensanchamiento de la medular y fracturas.

4.- La tomografía axial computerizada (TAC), es un método de diagnóstico mediante imagen, que permite observar el interior del cuerpo humano a través de cortes milimétricos transversales al eje céfalo-caudal, mediante la utilización de los rayos X. Para aumentar la definición, de por sí alta, se puede recurrir a distintos medios de contraste. El principal inconveniente es la radiación que absorbe el paciente, mayor cuanto más cortes se hagan.

Densidad mineral ósea (DMO): Además de los marcadores bioquímicos utilizados para evaluar el estado del metabolismo óseo, el estudio de la densidad mineral ósea (DMO) ayuda a evaluar el estado de la masa ósea. Se trata del parámetro que refleja la cantidad de masa ósea por volumen de un individuo. La DMO está determinada por el pico de masa ósea, alcanzado sobre la tercera década de vida y por la tasa de pérdida ósea. Actualmente se considera como el estándar de oro para el diagnóstico de la OP y el riesgo de fractura, ya que una masa ósea baja es uno de los factores más importantes para la aparición de fracturas por fragilidad del hueso. También es útil para la monitorización de un tratamiento y evaluar su eficacia en la ganancia de masa ósea (Cauley, 2005).

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

Normalmente la radiación utilizada son los rayos X y los distintos tipos son la densitometría radiológica simple (SXA), la dual (DXA) y la tomografía computerizada cuantitativa (QCT). Esta última es, actualmente, la única que

Antecedentes

puede diferenciar el hueso trabecular o esponjoso del hueso cortical, tanto en el esqueleto axial como en el periférico, y además puede indicar, de forma más exacta y precoz, cambios óseos por su mayor actividad metabólica en relación con el hueso cortical.

En 1994 la OMS estableció los siguientes criterios densitométricos para el diagnóstico de la osteoporosis:

Normal: DMO entre +1 y -1 DE del promedio de población adulta joven.

Osteopenia: DMO entre -1 y -2,5 DE.

Osteoporosis: DMO bajo -2,5 DE del promedio de población adulta joven.

Osteoporosis grave: DMO bajo -2,5 DE del promedio de población adulta joven y una o más fracturas de tipo osteoporótico.

5.- Micro-Tomografía Computerizada para el estudio de la arquitectura ósea (micro-CT)

La micro-tomografía computerizada es una técnica emergente para el estudio tridimensional no invasivo de la estructura trabecular del hueso. Hasta ahora, las técnicas existentes solamente daban información en dos dimensiones. Es un método no destructivo mediante imágenes en dos y tres dimensiones, que permite el análisis microestructural del hueso trabecular y cortical. Entre sus principales ventajas se encuentran la adquisición de imágenes en dos y tres dimensiones, que no es necesario ningún pretratamiento de la muestra, se obtiene una gran resolución, capacidad de calcular medidas en tres dimensiones sin necesidad de asumir ningún modelo, etc.

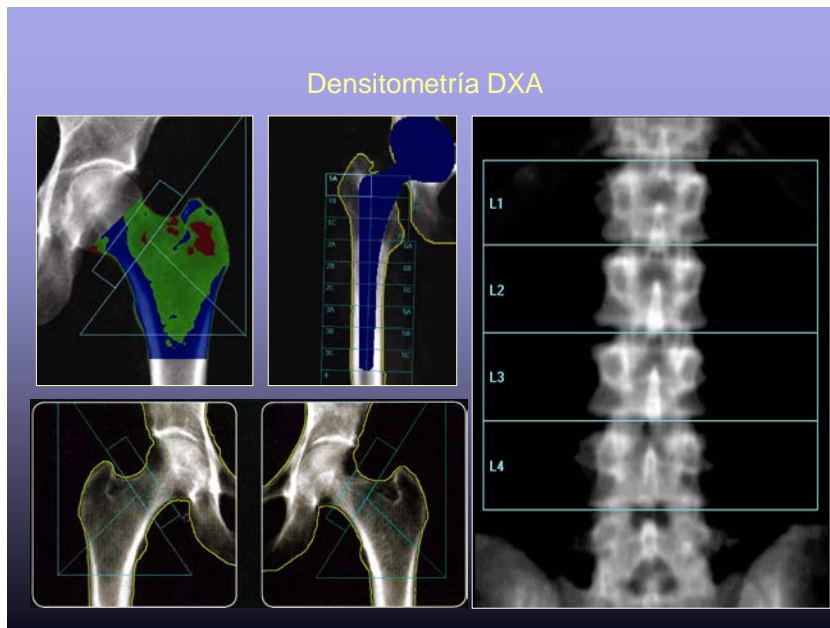


Imagen 8. Densitometría DXA. (Meseguer, 2013)

Otros métodos de diagnósticos:



Imagen 9. Diagnóstico por imagen. (Meseguer, 2013)

8. TRATAMIENTO

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

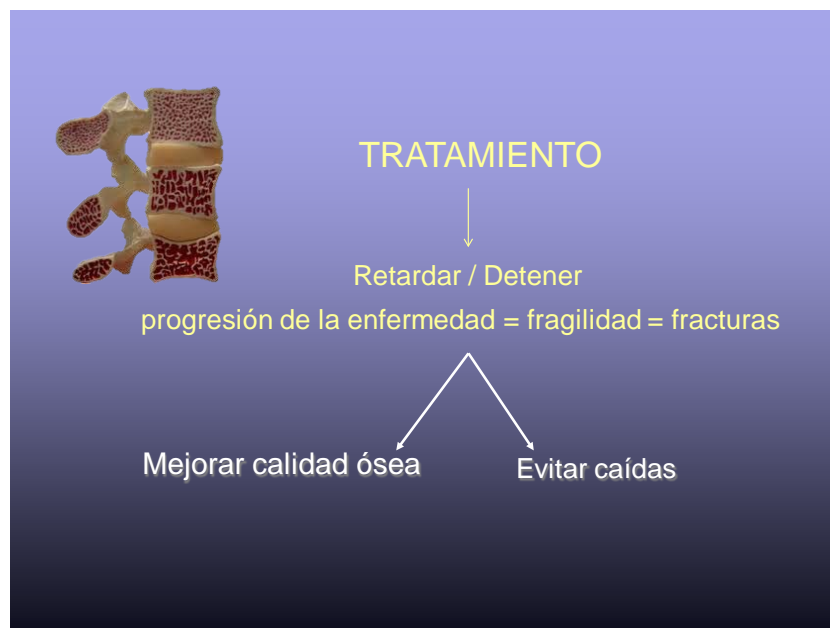


Imagen 10. Tratamiento. (Mesequer, 2013).

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

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

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

PREVENCIÓN:



Imagen 11. Medidas de Prevención (Meseguer, 2013)

- ✓ **A.- Prevención de caídas:** La intervención más efectiva en la prevención de las caídas es la valoración multifactorial de los riesgos.
- ✓ **B.- Ejercicio físico: Realizado** con asiduidad, produce incremento en la DMO y potencia la musculatura. Por ello, es aconsejable que los pacientes con osteoporosis realicen aquel ejercicio físico que sea adecuado a su estado de salud. Cuando una persona queda inmovilizada durante mucho tiempo por una enfermedad o traumatismo, la densidad del hueso disminuye rápidamente.
- ✓ **C.- Calcio y vitamina D:** Después de la menopausia la disminución brusca de estrógenos puede acelerar la destrucción ósea, con la alteración consiguiente del metabolismo del calcio. Existe un acuerdo universal que recomienda a la mujer, que incremente la ingestión de calcio y realice un cálculo de su exposición al sol. Es sabido que una ingesta adecuada de calcio a través del consumo de lácteos, reduce el riesgo de osteoporosis (Tabla 1).
- ✓ **D.- Otros factores dietéticos:** Es importante asegurar un buen aporte proteico (1 gramo de proteínas/kg/día) y de otros nutrientes (vitaminas y minerales).

Vitamina K: Necesaria para la síntesis de osteocalcina y se ha sugerido que su déficit estaría involucrado en el aumento del riesgo de fracturas en adultos mayores.

Vitamina A: Estudios poblacionales sugieren que el exceso de vitamina A puede aumentar el riesgo de fractura.

- ✓ **E.- Supresión de tóxicos:** El tabaco acelera la excreción urinaria de calcio y produce una absorción menos eficiente de este mineral. Además, el tabaquismo se asocia a situaciones de bajo peso corporal, menor ejercicio físico y peores hábitos alimentarios, con menor consumo de productos lácteos.

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

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

Tabla 1. Ingesta de Calcio y Vitamina D (FAO/WHO, 2002)

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

Tabla 2. Medidas aplicables para reducir el riesgo

Tratamiento farmacológico:

La decisión de inicio de tratamiento y elección del fármaco, estará basado en la necesidad de reducir el riesgo de fractura, teniéndose en cuenta respecto al paciente, además de la edad, el sexo, función renal, alergias a drogas, otras comorbilidades, tratamientos anteriores, contraindicaciones, costos, etc. Los pacientes a los que es recomendable el inicio de tratamiento para OP se encuentran comprendidos en alguna de las siguientes características:

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

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

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

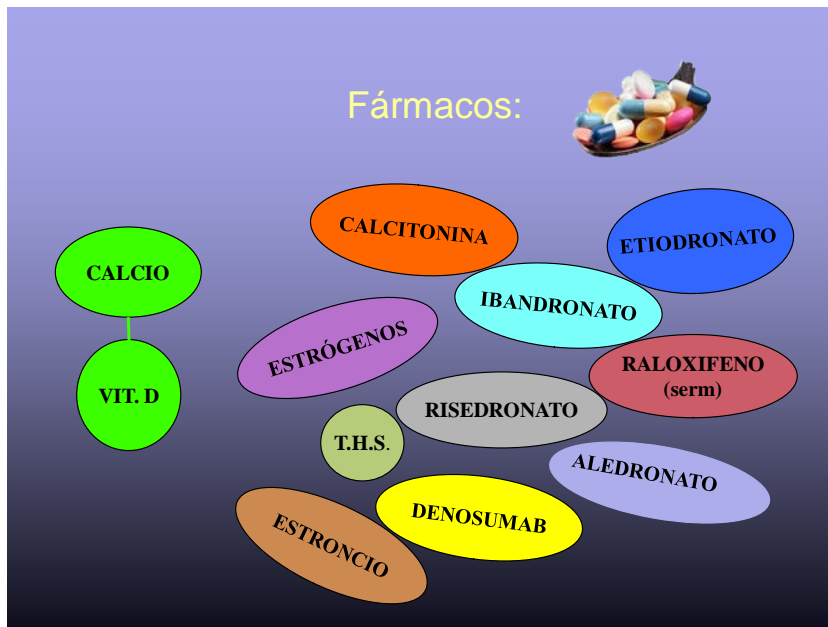


Imagen 12. Fármacos. (Meseguer, 2013).

a) Fármacos anticatabólicos o antiresortivos: Están destinados a frenar en forma directa o indirecta la actividad resortiva de los osteoclastos. Estas drogas disminuyen el remodelado óseo, lo que determina un incremento de la resistencia, preservan la micro-arquitectura, e inducen un balance positivo en la unidad de remodelación, incrementado la formación y mineralización primaria y secundaria. Corresponden a:

Bifosfonatos: Su afinidad al tejido mineral óseo es la base de su utilidad como antiresortivo. Ejercen un efecto celular inhibiendo la formación y el reclutamiento de los osteoclastos, ya que impiden su diferenciación, disminuyen la adhesión de los mismos a la matriz ósea y aumentan la apoptosis. También se ha descrito una reducción de la resorción ósea debido a la inhibición del factor activador de osteoclastos. Se administran principalmente por vía oral, aunque también puede hacerse por vía endovenosa.

Calcitonina: La calcitonina reduce la actividad osteoclástica “*in vitro*”, actuando directamente sobre los receptores específicos de superficie de los osteoclastos. Como resultado de su efecto antiresortivo, la calcitonina produce aumento de la DMO, efecto menor que el inducido por los estrógenos o los bifosfonatos. Se presenta en aerosol nasal e inyección.

Calcio: La administración de suplementos de calcio constituye una de las intervenciones farmacológicas de mayor importancia en el manejo de la OP. Se han publicado varios estudios controlados, que han demostrado que las dosis farmacológicas de calcio disminuyen la pérdida ósea trabecular y cortical.

Esto se debe probablemente al incremento de calcio sérico y a la consecuente disminución en los niveles de hormona paratiroidea (PTH) y, por ende, de la resorción ósea. Estudios clínicos aleatorios han demostrado que la ingesta adecuada de calcio en la dieta, o en suplementos, aumenta la densidad mineral ósea (DMO) y reduce la tasa de fracturas. (Uzcátegui, 2004).

Vitamina D: Juega un papel importante en la absorción de calcio y en la mineralización normal del hueso; aumenta la absorción

intestinal del calcio, mejora la reabsorción tubular renal de calcio y estimula la síntesis de osteocalcina por parte del osteoblasto.

La vitamina D también tiene efectos adicionales en pacientes ancianos, ya que incrementa la fuerza muscular, lo cual puede disminuir el número de caídas y por ende la posibilidad de fracturas. La vitamina D y el calcio en combinación están aceptados como tratamiento de base en la OP, particularmente en pacientes ancianos. Las dosis recomendadas son 400 a 1000 IU/día de vitamina D y un suplemento de calcio de 1000 a 1500 mg/día

Raloxifeno: Existe una nueva clase de fármacos conocidos con Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógeno (SERMs); son compuestos con efecto agonista estrogénico en uno o más tejidos, y antagonista en otros. Interactúan con el receptor estrogénico por una vía diferente a los estrógenos, resultando en efectos mixtos en diferentes tejidos.

Raloxifeno es el primer SERMs aprobado para la prevención y tratamiento de la OP, tiene un perfil de selectividad único, que lo hace adecuado para la prevención y el tratamiento de complicaciones de la menopausia, como la OP, sin generar estímulo en el tejido mamario ni en el útero.

Estrógenos: Se administran solos o combinados para combatir la menopausia, uno de los principales factores de riesgo de la OP. Detienen la actividad de los osteoclastos y estimulan la de calcitonina. Es un tratamiento que no se debe administrar después de los 60 años y además, se deben valorar en la paciente: su utilidad, hacer controles periódicos así como las ventajas e inconvenientes antes de administrarlo.

b) Fármacos anabólicos u osteoformadores: Son drogas terapéuticas de reciente aprobación internacional y nacional. Estas actúan en la progenie osteoblástica y en los osteoblastos maduros, promoviendo la formación de hueso “nuevo” y logrando resistencia ósea con la ganancia de masa ósea. Se incluyen en este grupo: Teriparatida, PTH (1-34), PTH 1-84, Ranelato de estroncio.

B. MODELOS EXPERIMENTALES

A. Inducción de OP

Las dificultades metodológicas y fundamentalmente las limitaciones éticas que conlleva el desarrollo de modelos experimentales de OP en humanos, explican el enorme interés del desarrollo de modelos experimentales en animales. Una de las ventajas más destacadas de los mismos respecto de los ensayos clínicos es que permiten valorar un campo más amplio sobre posibles cambios en la calidad y cantidad de hueso. De ahí que los modelos experimentales de OP en animales constituyan el primer método de elección a la hora de ensayar nuevos fármacos.

Para seleccionar el animal hay que considerar los aspectos destacados por Davidson en 1987:

- a) Analogía entre el modelo a utilizar y el problema a investigar**, para que los resultados sean extrapolables y generalizados a sistemas afines.

- b) Homogenidad genética** del organismo animal que garantice la reproducibilidad de los resultados.

- c) Características biológicas** del modelo experimental para establecer las condiciones que garanticen la validez del diseño experimental, la racionalidad de su selección, así como la

factibilidad de la realización del estudio respecto al objetivo de la investigación.

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

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

f) Aspectos éticos: usar el menor número posible de animales, siempre que se logre el objetivo planteado con el nivel de certidumbre estadística y garantizar el mínimo sufrimiento.

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

Ningún modelo animal puede satisfacer todos los criterios a tener en cuenta, por lo que deben analizarse todas las posibilidades y escoger la mejor. La especie animal deberá seleccionarse de acuerdo con el proceso, bien con predominio de la resorción o bien de la remodelación ósea.

Actualmente, no existe un modelo que reproduzca totalmente la patofisiología de la enfermedad. Existen diversos factores de riesgo, la deficiencia de estrógenos es uno de los más importantes, sobre todo, al reproducir la OP inducida por la menopausia. Por tanto, los animales ovariectomizados (OVX) son los modelos preferidos en la evaluación preclínica de sustancias que ofrezcan un mayor interés para el manejo de esta enfermedad.

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

- a) Crecimiento y madurez esquelética definidos:** Toda especie animal tiene un período de crecimiento, pero no todas alcanzan una verdadera “madurez esquelética”, entendida ésta como el cierre de la placa fisaria. La importancia radica en que los procesos de modelado y remodelado óseo son radicalmente diferentes, predominando el modelado durante la fase de crecimiento y el remodelado en la madurez. La mayoría de razas de ratas y ratones, por ejemplo, no alcanza plena madurez, o lo hacen sólo parcial y tardíamente. Un modelo ideal de OP debería contener ambos periodos (crecimiento y madurez).

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

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

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

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

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

Existen diversos modelos animales en los que ha sido estudiada la OP in vivo:

- **Primates no humanos:** Es un modelo ideal para estudiar la OP por su gran similitud en los sistemas digestivo, endocrino y metabolismo óseo. Además son los únicos que presentan una menopausia natural con pérdida espontánea de masa ósea. Pero

tienen numerosos inconvenientes: elevado coste, media de vida larga, agresividad, difícil manejo, pueden transmitir enfermedades a los humanos y ser reservorio de agentes peligrosos, además de conllevar problemas éticos y legislativos.

- **Cerdos:** La ventaja de este modelo es que su aparato reproductor, periodo endometrial y el remodelado óseo es similar al humano. Sus inconvenientes son el elevado coste, agresividad y el tamaño.
- **Ovejas:** Su perfil hormonal es similar al de la mujer. Es un animal de fácil manejo y con un coste no muy elevado. Es un modelo útil para biopsias e implantes. Sus inconvenientes parten de su naturaleza herbívora, pues hay una gran variación en los niveles de los minerales necesarios para estudiar la OP (fosforo).
- **Perros:** No es un modelo muy útil, ya que solo tienen dos ovulaciones al año y la supresión estrogénica no afecta demasiado al sistema esquelético.
- **Gatos:** Puede ser útil si se induce la OP por inmovilización o mediante dietas bajas en calcio o elevadas en fosforo.
- **Conejos:** Se les induce la OP por ovariectomía bilateral o glucocorticoides. Se caracterizan por un rápido remodelado óseo en comparación. Además presenta numerosas ventajas, como su fácil uso por: su tamaño, bajo coste y por el gran número de razas genéticamente homogéneas.
- **Ratones:** Es uno de los animales principales por su pérdida de masa ósea relacionada con la edad. Se suele inducir OP por ovariectomía bilateral. También existen razas modificadas

genéticamente para que envejecan con más rapidez y que presentan fracturas espontáneas por fragilidad.

- **Ratas:** Es el modelo favorito para el estudio de la OP menopáusica por tener una excelente respuesta al tratamiento estrogénico sustitutorio. También es útil para estudiar los factores nutricionales, endocrinos y ambientales y existen numerosos estudios de marcadores bioquímicos, histomorfometría, metodología densito-métrica y evaluación biomecánica. Entre estas ventajas también se encuentran su pequeño tamaño, fácil manipulación y bajo coste. Pero presenta grandes inconvenientes, como no poder tomar biopsias repetidas (para estudios longitudinales) y su esqueleto no llega a alcanzar una verdadera madurez esquelética.

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

OP posmenopáusica:

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

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

Otro modelo de rata osteoporótica es el de inducción mediante glucocorticoides, pero aún está en desarrollo. Algunos estudios demuestran que, efectivamente, las ratas maduras pierden hueso, aunque otros señalan que no se detecta apenas pérdida ósea.

OP por inmovilización:

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

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

Otros métodos:

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

En nuestro trabajo tras valorar los diferentes modelos animales y los métodos de inducción de OP elegimos la rata **Sprague-Dawley** como modelo animal y la **ovariectomía** para provocar la deprivación estrogénica, teniendo en cuenta la facilidad y rapidez de inducción de la enfermedad, por su bajo coste económico y por la facilidad de manejo del animal a lo largo de la fase experimental y de mantenimiento.

C. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES:

Compuestos fenólicos

Los modelos apropiados para la evaluación de los efectos de un fármaco o suplemento nutricional sobre la OP, han de ser capaces de brindar información -que no se puede obtener en los ensayos clínicos- tales como: datos sobre posibles cambios en la calidad y estructura del hueso obtenidos a partir del análisis de la masa ósea, la arquitectura y la fortaleza del hueso. Por ello, los modelos animales de OP son primordiales para predecir la eficacia y la seguridad del tratamiento y evaluar su influencia sobre la calidad del hueso.

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

Para una indicación preventiva, deben existir datos previos de estudios preventivos en animales, y para una indicación terapéutica, deben existir estudios preclínicos del efecto del agente en el tratamiento de la enfermedad.

Antioxidantes y flavonoides

Para entender el concepto de antioxidante hay que tener en cuenta que, en el metabolismo de los organismos vivos, se producen constantemente reacciones de oxidación y reducción de las que se obtienen

metabolitos y radicales libres. Los metabolitos (transportadores, enzimas, etc.) colaboran en las funciones del organismo y los radicales libres son subproductos altamente reactivos que, en concentraciones normales, actúan como mediadores y reguladores y que, sin embargo, a concentraciones elevadas son tóxicos para las células, por su acción como potentes oxidantes. El organismo mantiene un equilibrio entre la producción y eliminación de los radicales libres, derivados del oxígeno (ROS: peróxido de hidrógeno, hidroxilo, anión superóxido), o bien derivados de moléculas nitrogenadas (RNS: NO, NO₂). (*Havsteen, 2002*)

Los ROS proceden de la cadena de transporte de electrones de la membrana interna mitocondrial, que tras una serie de reacciones en la cadena se genera como producto final ATP (adenosín trifosfato), molécula fundamental para la mayoría de las reacciones metabólicas. En esta cadena de transporte de electrones, se reduce un átomo de oxígeno hasta formar una molécula de agua. Para que esto suceda durante el proceso, se liberan moléculas con electrones desapareados, como el anión de superóxido (O₂⁻). Esta molécula es un radical libre muy inestable y por tanto muy reactivo, que actúa como un potente oxidante en sustancias orgánicas e inorgánicas. También pueden proceder del sistema inmunitario, donde son generados por los macrófagos y los neutrófilos en la primera línea de defensa de la respuesta primaria y los mecanismos de inflamación para preservar el organismo frente a bacterias, virus y otras amenazas externas.

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

Pero el organismo ha ideado sus propios mecanismos para inactivar los radicales libres, antioxidantes propios del organismo (ubiquinol, tocoferol, ácido ascórbico, glutatión y ácido úrico) y enzimas y sistemas enzimáticos

(peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, glucati3n reductasa). Por tanto, los antioxidantes son mol3culas con capacidad de evitar las reacciones de oxidaci3n en las c3lulas, bien inhibiendo esa oxidaci3n, o quitando intermediarios del radical libre durante su metabolizaci3n. Por ello, los antioxidantes se consideran agentes reductores.

No obstante, en los 3ltimos a3os se est3 dando una importancia creciente al uso de productos naturales con capacidad antioxidante, por sus probados efectos beneficiosos para la salud. Dentro de la variedad de sustancias con propiedades antioxidantes destacan los compuestos polifen3licos.

Polifenoles en la naturaleza: A lo largo de la evoluci3n las plantas vasculares han adquirido la capacidad de sintetizar una serie de sustancias qu3micas derivadas de su metabolismo secundario que les confieren ventajas adaptativas frente a sus depredadores, parásitos u otras agresiones del entorno. En dichas sustancias, destaca su funci3n como pigmentos atractivos de animales para la dispersi3n de polen y semillas (*Havsteen, 2002*), capacidad por el enzima polifenol oxidasa en zonas da3adas evitando la entrada de pat3genos y parásitos (*Stevenson, 2007*).

Adem3s, otorgan a la planta cierto nivel de protecci3n frente a sus depredadores bien por su sabor amargo bien por la capacidad de algunos polifenoles de insolubilizar y precipitar prote3nas en el sistema digestivo de mam3feros dificultando la digesti3n. Tambi3n juegan un papel fundamental para su supervivencia en el metabolismo del nitr3geno de leguminosas para el cual la planta debe establecer una estrecha simbiosis con determinadas especies bacterianas presentes en el suelo. En esta relaci3n, los flavonoides sintetizados en la planta se liberan al suelo por las ra3ces donde actúan como atractivos espec3ficos de las bacterias simbi3ticas (*Srivastava, 1999*)

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

Asimismo, actúan como quelantes de metales pesados y como antioxidantes protegiendo a estructuras subcelulares de los radicales libres generados durante la fotosíntesis (*Gould, 2009*).

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

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

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

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

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

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

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

Sin embargo, en los últimos años la evidencia del papel fundamental de la estructura molecular de los flavonoides junto con detalladas investigaciones sobre biodisponibilidad, absorción y metabolismo de estas moléculas aportadas en la alimentación modificó la estrategia de abordar los distintos modos de acción en el organismo. De este modo los estudios del papel beneficioso para la salud de los flavonoides no se limitan a la capacidad antioxidante directa sobre radicales libres, sino que además buscan otros mecanismos de acción indirecta muy importantes sobre los sistemas antioxidantes propios del organismo regulando la actividad y la expresión de enzimas endógenas encargadas de la reducción de ROS a moléculas menos reactivas (*Myhrstad, 2006*).

Los **flavonoides** son un grupo de polifenoles muy heterogéneo y abundante en la naturaleza, habiéndose localizado hasta el momento más de 8000 especies diferentes en frutas, verduras, semillas, tallos, cereales y cebada, siendo por lo tanto integrantes significativos de la dieta humana (*Álvarez, 2010*).

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

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

Estos son un grupo de compuestos muy heterogéneo, por su estructura molecular y por sus características químicas. En su estructura molecular poseen una forma básica benzo-y-pirona, formada por 15 carbonos, con dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos,

es decir: C6-C3-C6, a los que se unen uno o más grupos hidroxilo, cetona y/o metilo, lo que les permite formar un gran número de configuraciones estructurales. La glicosilación de la estructura posibilita una inmensa cantidad de formas estructurales en la familia de los flavonoides.

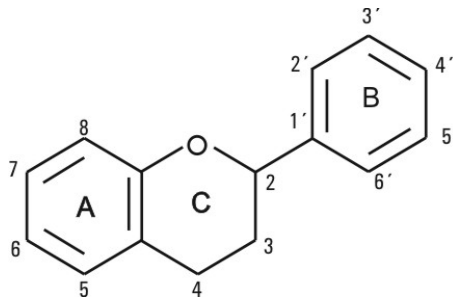


Imagen 13. Estructura básica de los flavonoides.

Diversos estudios sobre su estructura química y biodisponibilidad, absorción y metabolismo, han hecho que las investigaciones se enfoquen en otras finalidades, además de su capacidad antioxidante directa sobre los radicales libres, como su acción antioxidante indirecta, muy importantes por regular la actividad y expresión de enzimas endógenas encargadas de la reducción de los ROS (Leung, 2006; Myhrstad, 2006), sus efectos como antiinflamatorios, antialérgicos, anticancerígenos o antivirales (Duthie, 2000; Aherne, 2002; Ren et al, 2003), lo que ha llevado a las industrias a crear productos para los sectores alimentarios o médicos (Moyano et al, 1996).

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

Las **isoflavonas** son un tipo de flavonoides que se encuentra presente en los alimentos leguminosos, como la soja y otros como el lúpulo,

que tienen una estructura similar a los fitoestrógenos y que han demostrado un efecto protector en los cánceres de próstata y mama, además de una disminución de la resorción ósea. Las **flavononas** se encuentran en cantidades considerables en el tomate, aceitunas, cítricos y en ciertas plantas aromáticas como la menta. También en uvas, manzanas, legumbres, cacao (manufacturado como chocolate negro), café, té negro y verde, y en bebidas como el vino y la cerveza (*Merken, 2000; Manach, 2004; Crozier, 2009*).

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

Flavonoides y osteoporosis

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

La afinidad por el receptor es muy inferior, y el reciente descubrimiento de dos tipos de receptor estrogénico, el alfa y el beta, ha permitido encontrar que hay una afinidad preferencial por la forma beta. Evidentemente, esto ha abierto un campo nuevo de enormes esperanzas, donde se trata de investigar qué puede traducirse de esta acción más selectiva hacia este subtipo de receptor cuyo papel diferencial está aún caracterizado parcialmente. Datos preliminares ponen de manifiesto que esta acción se traduce en escasa capacidad proliferativa sobre el endometrio o la mama, de donde se concluye que pueda derivarse una acción menos dudosa en cuanto a potencial oncogénico. Sin embargo, la bibliografía sobre estudios clínicos y experimentales comienza ya a ser insistente, evidenciando un efecto protector de los fitoestrógenos. Así, un estudio italiano de 24 meses de evolución ha demostrado que la ipriflavona mantiene masa ósea frente a la pérdida observada en el grupo control no tratado. Sin duda, estamos sólo en los inicios, pero todo parece indicar que la participación en la vía de los estrógenos confiere a estas sustancias también un efecto protector (*Gennari, 1998*).

La estructura de algunos flavonoides es muy similar a la estructura de los estrógenos, esto significa que los **fitoestrógenos** pueden unirse a los receptores de estrógenos y activarlos, ejerciendo una función igual o similar. Por ello su estudio sobre la posibilidad de su utilización como tratamiento sustitutivo o complementario a los fármacos en pacientes con OP, pues tienen la ventaja de no presentar efectos adversos (*Kawakita, 2009*).

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

Otros estudios han demostrado que ejercen un efecto sobre el hueso, como estimulador osteoblástico y por lo tanto, un incremento de la masa ósea. Un ejemplo son la genisteína y la daidzeína, que al proteger contra la oxidación de radicales libres, ejercen un efecto preventivo ante la hipercolesterolemia y la aterosclerosis. Esto convierte a este tipo de flavonoides en un tratamiento perfecto para la OP en pacientes con problemas para ser tratados con terapia hormonal sustitutiva y, además, sin los efectos adversos de éstos como el sangrado o los trombos.

Por otro lado, la existencia de datos significativos, como los reportados por (*Chiechi, 2002*) en favor de la terapia con flavonoides como agentes de estímulo osteoblástico en la masa ósea, determinan su consideración como una herramienta terapéutica más para el abordaje de la complicación más temida de la menopausia, la afectación ósea. Del mismo modo, la consecución de mejoras en el incremento de la densidad mineral ósea, en grado similar a la proporcionada por otras alternativas terapéuticas, determina el interés por seguir analizando y profundizando en sus efectos y mecanismos de actuación a éste nivel. Se ha demostrado que la genisteína y la daidzeína inhiben la formación de radicales libres, peróxido de hidrógeno y aniones superóxido.

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

El empleo de fitoestrógenos en los últimos años ha desarrollado un creciente interés en los estudios relacionados con las enfermedades típicas del envejecimiento. Algunos autores, (*Krizt-Silverstein, 2002*) no dudan en clasificarlas como bloqueadoras o moduladoras naturales selectivas del receptor estrogénico, (SERMs selective estrogen receptor modulators) por estas razones, las isoflavonas realizan su acción sobre hueso, cerebro, sistema cardiovascular y ovario, lo que explica su utilidad para: 1.- mejorar los síntomas vasomotores; 2.-prevenir la OP; 3.- aparentemente, reducir el riesgo de cáncer de mama; 4.- inducir patrón lipídico antiaterogénico

(disminución del colesterol total, LDL y triglicéridos y ligero aumento del HDL).

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

Actualmente se están llevando a cabo investigaciones, cuyo objetivo es probar la eficacia de algunos de los flavonoides pertenecientes al grupo de las flavonas (apigenina y luteolina) y de los flavonoles (quercetina y kaempferol) en relación a la osteoporosis.

En nuestro trabajo hemos utilizado los siguientes:

Naringenina: es un flavonoide presente en los cítricos. Se considera que tiene un efecto bioactivo en la salud humana como antioxidante, como modulador del sistema inmune y como promotor del metabolismo de los hidratos de carbono.

También ha demostrado efectos en la prevención de ACV (*Knekt, 2002*) y en el asma, así como en la disminución de los síntomas asociados a la menopausia: aumentando la densidad ósea, mejorando los marcadores de resorción ósea en orina (*Alekel,2000; Morabito,2002; Yamori,2002*). Por otra parte, ha sido descrita su acción antiproliferativa sobre la carcinogénesis oral en cobayas (*Miller,2008*).

Eriocitrina: Es muy abundante en los cítricos: limones y limas. Hasta la fecha la Eriocitrina no se comercializa en forma pura sino como mezclas de flavonoides, debido a que su separación y purificación es costosa y complicada. En el limón, es el flavonoide glicósido con mayor poder antioxidante como han demostrado diversos estudios (*Miyake,1998; Minato, 2003*). También se encuentra en las hojas de la menta, en las que constituye el compuesto fenólico más abundante (*Dorman, 2009*).

Su uso ha estado relacionado tradicionalmente con trastornos digestivos, respiratorios, urinarios, diabetes, hipertensión arterial, fiebre dolor, etc. (*Baliga, 2006*), así como en el mantenimiento de la integridad de la circulación periférica (*Rodríguez-Mateos, 2014*).

Por otra parte, también se ha demostrado capacidad antiproliferativa sobre diversas líneas celulares e inducción de apoptosis en leucemias (*Middleton, 2000*).

Citrolive®: es un extracto combinado de cítricos y hojas de olivo desarrollado exclusivamente por Nutrafur que combina el efecto antioxidante

con propiedades hipolipemiantes y antiaterogénicos de los ingredientes activos en estas plantas.

III. OBJETIVOS

1. Desarrollar en ratas Spague Dawley un modelo experimental de osteoporosis, mediante deprivación estrogénica por ovariectomía bilateral.

2. Analizar los efectos de los polifenoles: Naringenina Potásica, Eriocitrina y Citrolive® sobre los animales ovariectomizados por medio de los estudios:
 - Bioquímico.
 - Anatomopatológico.
 - Microtomografía computarizada.
 - Ionómico.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

A. ANIMALES:

Para este estudio hemos utilizado 50 ratas hembras Sprague–Dawley, de 12 semanas de edad y 250 g de peso al inicio del experimento, que fueron alojadas en jaulas de 48x27x20 cm, en grupos de 3 ó 4 animales por jaula, con un sistema estéril de *rack* ventilado.

Se mantuvieron en el Servicio de Animales de Laboratorio, perteneciente al Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia (nº REGAES 300305440012), en condiciones ambientales constantes de 12 horas de luz/oscuridad, a una temperatura de 22-24°C, y una humedad del 55% \pm 10% y con acceso libre a agua y comida comercial (Panlab S.L.U. Barcelona, España) para ratas.



Imagen 14. Estabulación. Jaula de 48x27x20 cm.

B. APARATOS:

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



Imagen 16. Analizador de bioquímica.

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

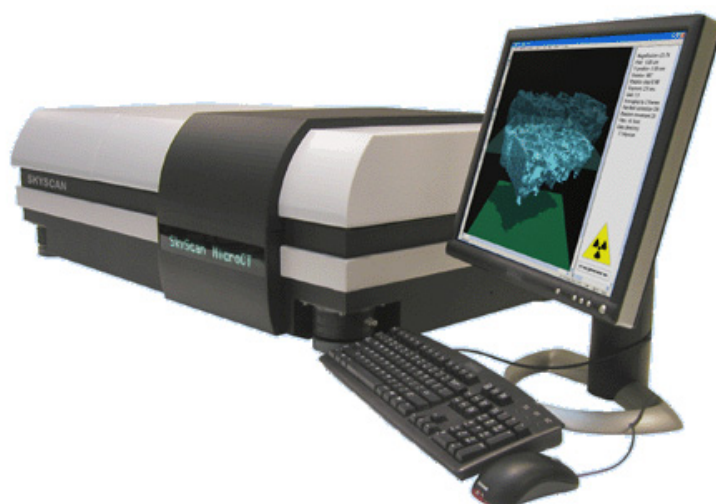


Imagen 17. Microtomógrafo computerizado.

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

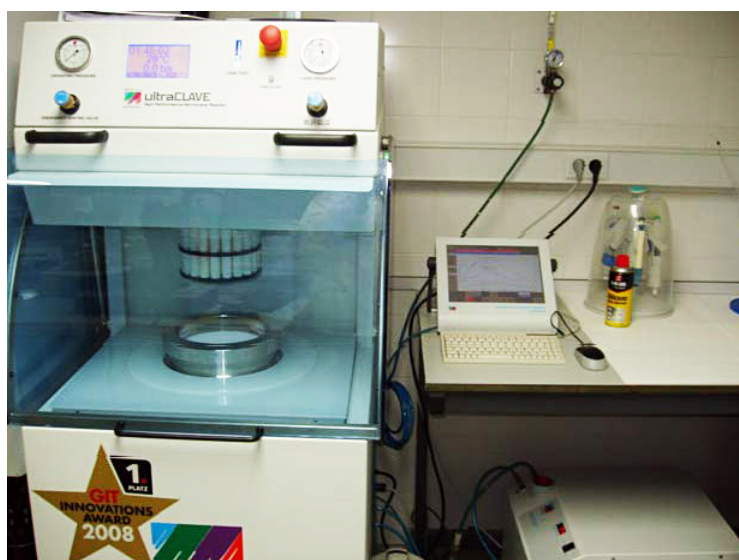


Imagen 18. Microondas-ultraclave.

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



Imagen 19. Espectrofotómetro.

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

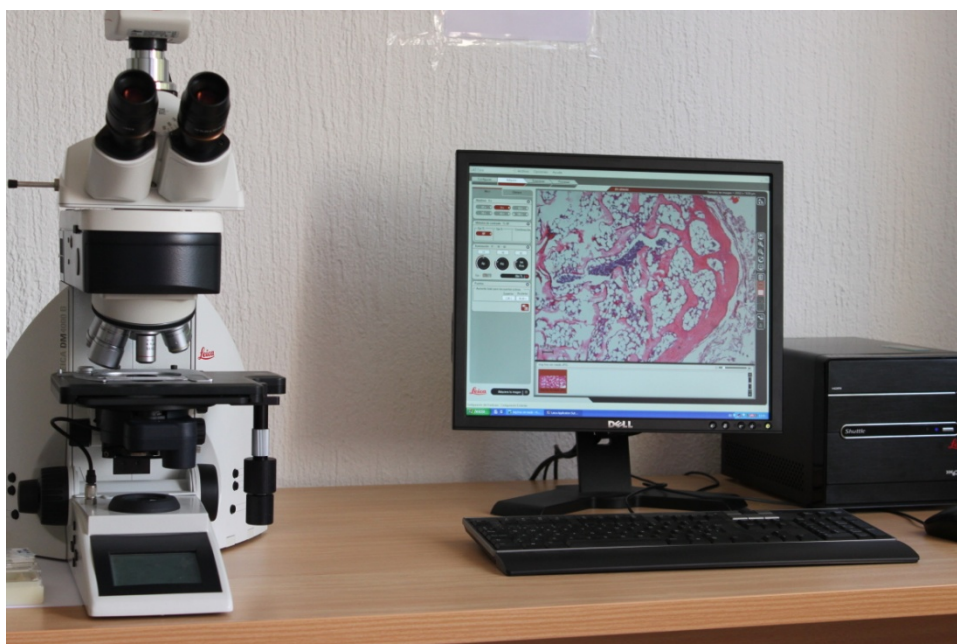


Imagen 20. Microscopio óptico.

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



Imagen 21. Escáner de portas microscópicos.

C. AGENTES:

Los tres agentes utilizados en el estudio fueron suministrados por Nutrafur, S.A. Alcantarilla (Murcia)-España.

1. NARINGENINA POTÁSICA (NK)

La Naringenina (5, 7, 4 trihidroxiflavanona) es un flavonoide presente en los cítricos, pero especialmente en el pomelo, Nutrafur obtiene la naringenina utilizada en este estudio a partir de naringina mediante tecnología propia y con una elevada pureza, y ha sido utilizada en el estudio en forma de sal potásica. Naringenina potásica (NK), *Patente: (sol: 04380155.4-1216 /20.07.2004/Ref.: PXEP00416/2004.

Características:

Apariencia: Polvo beige

Solubilidad: soluble en agua al 1% peso/volumen

Humedad: Menos de 5% (Karl Fisher)

Ash: Menos del 0,5% (3 horas, a 800 ° C)

Metales pesados: A menos de 20 pp

Ensayo: K: 92% HPLC

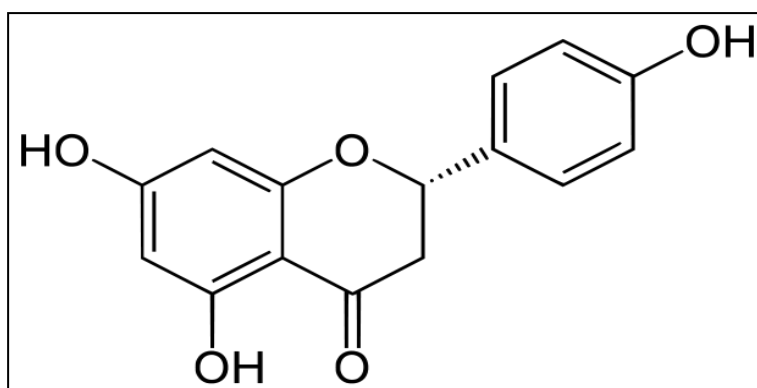


Imagen 22. Estructura química de la naringenina en su forma no salina



Imagen 23. Imagen de pomelo.

2. ERIOCITRINA

La eriocitrina es una flavanona que se encuentra en forma glicosilada en el hidroxilo situado en el C-7, esta glicosilación es de la estructura β -rutinosido (eriodictyol 7-O-rutinoside).

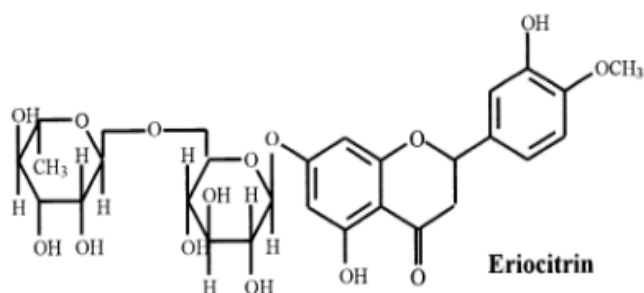


Imagen 24. Estructura química de la eriocitrina.



Imagen 25. Lima y Limón

3. CITROLIVE®

Este agente está constituido por cuatro grupos de compuestos, principalmente: 16,36% **oleuropeosides** (oleuropeína y verbascósido), 7% **flavonas** (luteolina-7-glucósido, apigenina-7-glucósido, diosmetina-7-glucósido, luteolina y diosmetina), 1,84% **flavanonas** (naringina, neohesperidina, neoeriocitrina y hesperidina), y 1,65% **fenoles sustituidos** (tirosoles, hidroxitirosoles, ácido vinílico y ácido cafeico).

Para la cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto de Citrolive®, el compuesto fue disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO) en una proporción de 5 mg/ml, esta solución se filtró a través de una membrana de nylon de 0,45 μ . El contenido absoluto de los compuestos principales en Citrolive® fue determinado por HPLC.

Principales compuestos fenólicos presentes en el extracto Citrolive®

<i>Fenoles</i>	<i>% Absoluto</i>
<i>Hidroxitirosol</i>	<i>0.84</i>
<i>Tirosol</i>	<i>0.24</i>
<i>Ácido cafeico</i>	<i>0.21</i>
<i>Ácido vinílico</i>	<i>0.35</i>
<i>Neoeriocitrina</i>	<i>0.41</i>
<i>Luteolina 7-O-glucósido</i>	<i>0.52</i>
<i>Verbascosido</i>	<i>0.62</i>
<i>Naringina</i>	<i>3.89</i>
<i>Hesperidina</i>	<i>0.61</i>
<i>Neohesperidina</i>	<i>1.93</i>
<i>Apigenina 7-O-glucósido</i>	<i>0.82</i>
<i>Diosmetina 7-O-glucósido</i>	<i>0.31</i>
<i>Oleuropeina</i>	<i>15.74</i>
<i>Luteolina</i>	<i>0.15</i>
<i>Diosmetina</i>	<i>0.04</i>

Tabla 3. Principales compuestos fenólicos del extracto Citrolive®

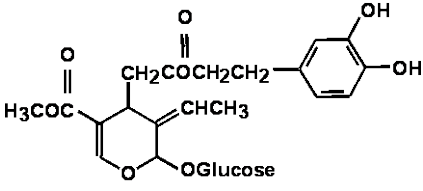
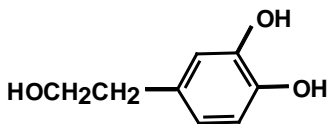
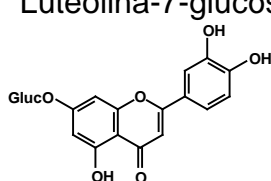
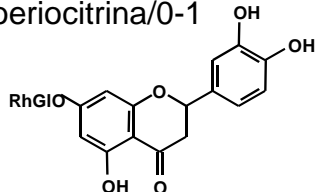
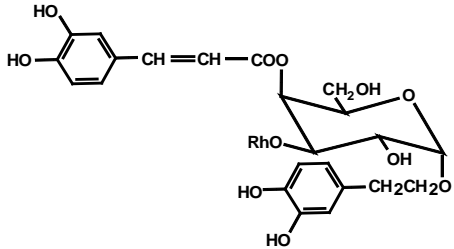
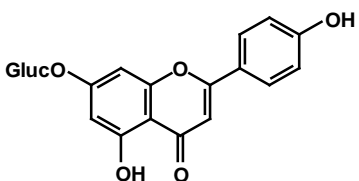
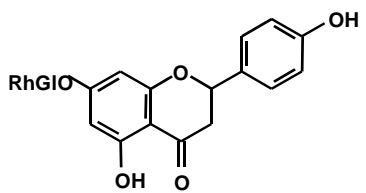
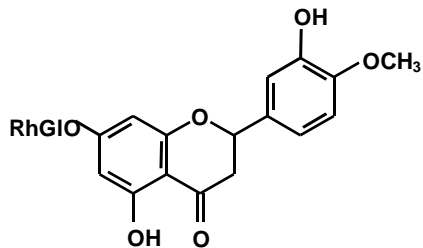
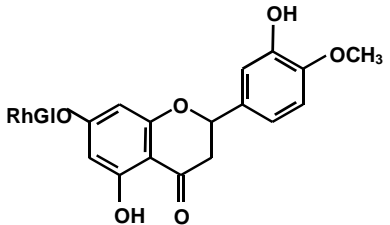
Estructura química de los compuestos polifenólicos del Citrolive®	
<p>Oleuropeína/12-16</p> 	<p>Hidroxitirosol/0-1</p> 
<p>Luteolina-7-glucósido/0-1</p> 	<p>Neoeriocitrina/0-1</p> 
<p>Verbascosido/0-1</p> 	<p>Apigenina-7-glucósido/0-1</p> 
<p>Naringina/2-4</p> 	<p>Neohesperidina (G-R: 1-2)/1-2</p> 
	<p>Hesperidina (G-R: 1-6)/0-1</p> 

Tabla 4. Estructura química de los compuestos polifenólicos del Citrolive®

D. FÁRMACOS:

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

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

- **Anestésicos:**
 - **Isoba[®]** vet 100% p/p de isoflurano. Schering-Plough, S.A. Madrid (España).
 - **Imalgène[®]** 1000 (solución inyectable). Merial Laboratorios, S.A. Lyon (Francia).

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

2. MÉTODOS

A. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los 50 animales fueron divididos en cinco grupos:

- **Grupo I.** (Control): Ratas sanas (n=10).
- **Grupo II.** (Control OVX): Ratas OVX, sin tratamiento (n=10).
- **Grupo III.** OVX + Naringenina Potásica (n=10).
- **Grupo IV.** OVX + Eriocitrina (n=10).
- **Grupo V.** OVX + Citrolive® (n=10).

En los grupos **II, III, IV y V** realizamos la ovariectomía bilateral cuando los animales alcanzaron los 250 gramos de peso (aproximadamente con 12 semanas de vida).

Los animales de los grupos **III, IV y V** recibieron tratamiento de Naringenina Potásica, Eriocitrina y Citrolive® respectivamente, en el agua de bebida en dosis de 1 mg/kg día. El tratamiento se administró desde 10 días antes de la ovariectomía y los animales lo consumían *ad libitum* durante todo el experimento (4 meses). Los biberones con el tratamiento se cambiaban cada 48 h para evitar la oxidación de los compuestos.

Durante el estudio, se cuantificó el peso de cada animal (una vez al mes) hasta cinco veces, incluyendo el peso inicial y final. También se obtuvieron muestras de sangre en tres ocasiones para su análisis bioquímico.

Después de cuatro meses de tratamiento, los animales fueron sacrificados siguiendo el protocolo de eutanasia establecido mediante cámara de CO₂. Seguidamente se procedió a la recogida de las diferentes muestras:

1. Sangre, para el análisis bioquímico.
2. Tejido óseo: fémur y tibia de ambas patas para realizar los siguientes estudios:
 - a) De imagen por microtomografía computerizada en las patas izquierdas.
 - b) Histomorfométrico en patas izquierdas.
 - c) Ionómico de la composición química mediante espectrofotometría en patas derechas.

B. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

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

Preoperatorio:

- I. Antes de proceder a la intervención quirúrgica administramos analgésico hidrocloreto de buprenorfina (Buprecare[®]) en dosis de 0,01-0,02 mg/kg de peso y antibiótico enrofloxacino (Alsir[®]) en dosis de 0,2 ml/kg de peso por vía intramuscular (fig. 26). tanto la antibioterapia como la analgesia y se prolongo durante tres días después de la intervención.

- II. Una vez preparado el campo estéril sobre el que realizar la intervención, colocamos al animal en la cámara cerrada para inducirle el sueño, utilizando isoflurano inhalado (*Isoba*[®]) al 5% durante 2 minutos. Para mantener el estado de anestesia durante la intervención mantuvimos al animal inhalando isoflurano a concentración 2,5-3%.
- III. Se colocó el animal en decúbito supino, y se le rasuró el abdomen (fig. 27) seguidamente se le vació la vejiga mediante compresión manual para evitar que estuviera distendida y se le pudiera dañar accidentalmente durante el abordaje quirúrgico. Para finalizar la fase r el preoperatoria, se lavo el campo quirúrgico con clorhexidina y se aplico un antiséptico del tipo povidona yodada (*Betadine*[®]).

Intraoperatorio:

- IV. Realizamos una incisión centrada en la zona inferior de la pared abdominal, entre las mamas más caudales, a la altura de la vejiga (fig. 28). A continuación procedimos a explorar la cavidad abdominal para localizar el útero. A partir de él extrajimos las trompas de Falopio hasta llegar a ambos ovarios (fig. 29).
- V. Realizamos la ligadura de ambas trompas con una hebra de sutura con aguja atraumática por la sección más caudal de las trompas de Falopio, anudamos y cortamos ambas trompas con los ovarios, dejando un muñón uterino (fig. 30).
- VI. Finalmente procedimos al cierre de la pared abdominal por planos: el interno mediante una sutura tradicional con hilos sintéticos reabsorbible (fig. 31) y el plano externo se cerró con grapas (fig. 32).

Postoperatorio:

- VII. Finalizado el acto quirúrgico, se lavo la herida con suero linocopico y se aplico povidona yodada. Se retiró al animal del aparato de anestesia y lo dejamos en reposo unos minutos para que se reanimara espontaneamente.
- VIII. Quince días después de la intervención (figura 33), procedimos a la retirada de las grapas, administrando previamente *Imalgène®* en dosis de 0,1-0,2 ml/kg de peso, junto con *Xilagesic®* 3 mg/kg por vía intramuscular para sedar al animal.



Imagen 26. Administración intramuscular del antibiótico y analgésico.



Imagen 27. Rasurado del abdomen mediante maquinilla eléctrica.



Imagen 28. Incisión media en la zona inferior de la pared abdominal.

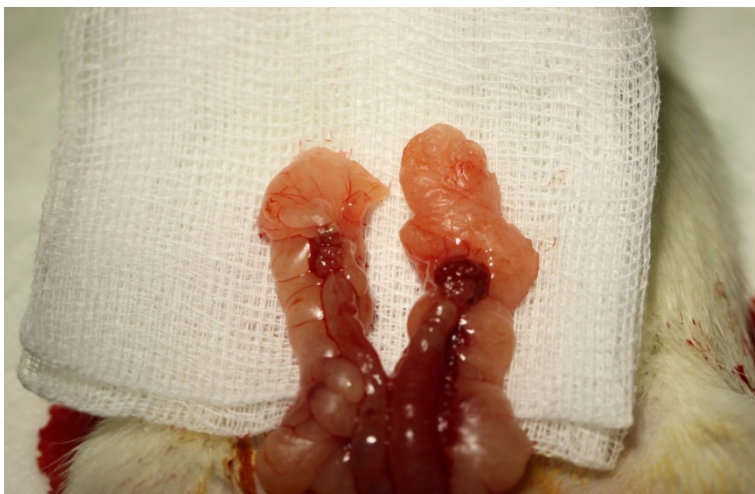


Imagen 29. Identificación y extracción del útero, cuellos uterinos y ovarios.

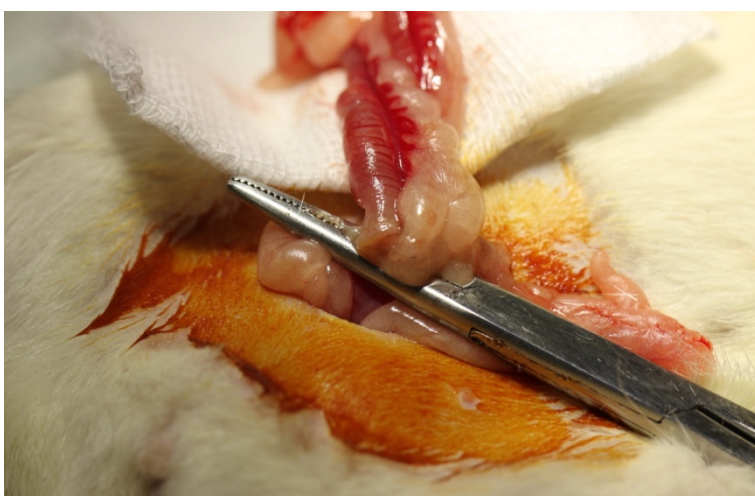


Imagen 30. Clampaje y ligadura de las trompas uterinas.

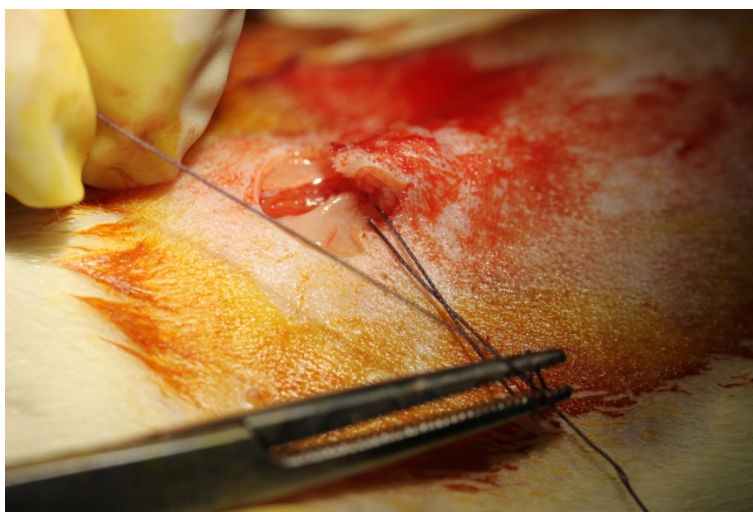


Imagen 31. Sutura del plano muscular de la pared abdominal.



Imagen 32. Cierre cutáneo con grapas.



Imagen 33. Aspecto de la herida quirúrgica 15 días tras la intervención.

C. Estudio de: 1. Peso:

Hemos realizado un seguimiento del peso de los animales de todos los grupos desde el inicio del experimento hasta el final, hasta un total de cinco determinaciones.

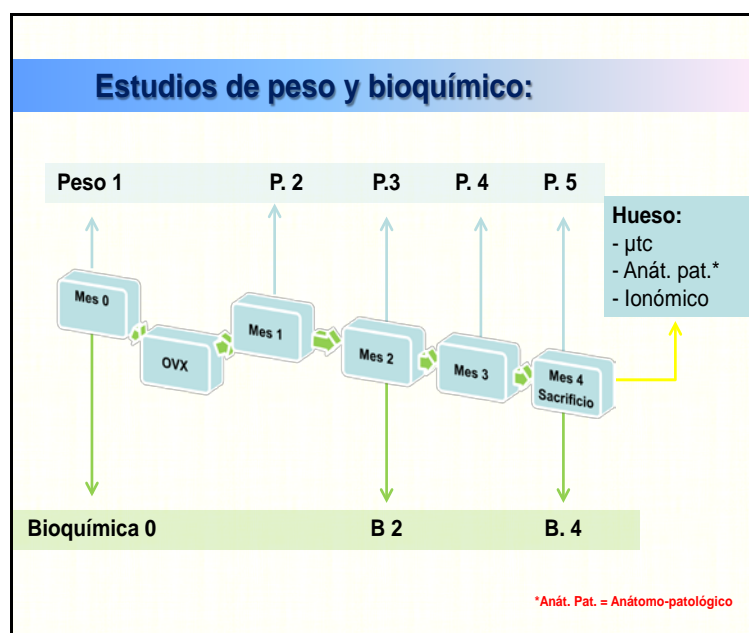


Imagen 34. Estudios de peso y bioquímico.

2.- Estudio bioquímico:

Realizamos tres extracciones de sangre a lo largo del estudio. La primera tuvo lugar cuando las ratas alcanzaron el peso y la edad adecuados (el hueso ha alcanzado un pico de masa ósea elevado, aproximadamente con 250 g de peso y 12 semanas de edad) y antes de administrar el pretratamiento y de realizarles la ovariectomía.

La segunda y la tercera muestra se tomaron a los dos y a los cuatro meses tras la intervención respectivamente.

La extracción de sangre se realizó seccionando superficialmente con un bisturí la zona más proximal de la cola, siendo el corte de las extracciones del primer mes más distales que las del segundo. Una vez realizada la pequeña incisión, se absorbió la sangre con tubos capilares (*Microvette*[®] CB 300 μ l). Posteriormente detuvimos la hemorragia ejerciendo presión con una gasa impregnada de *Betadine*[®].

La última extracción de sangre se realizó el día de la eutanasia de los animales, pinchando directamente en el ventrículo de forma perpendicular a través de las costillas, lo que nos permitió extraer un volumen de sangre mayor.

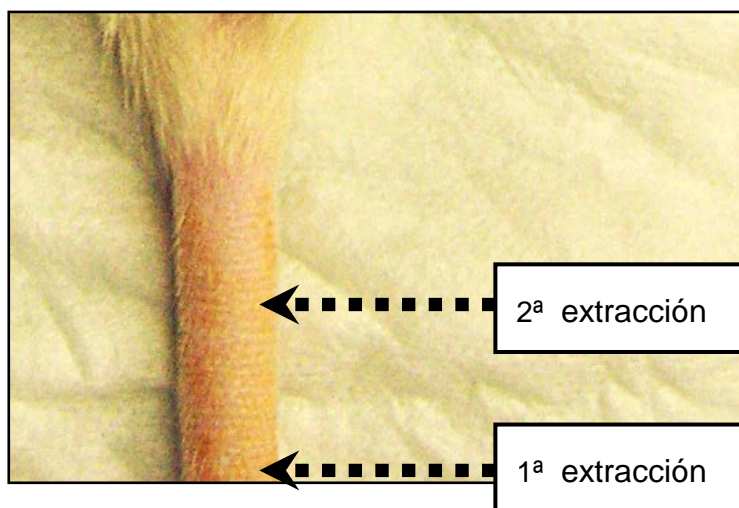


Imagen 35. Esquema de los cortes de la primera y segunda extracción de sangre.

Los parámetros analizados fueron:

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

Tabla 5. Parámetros bioquímicos.

3.- Estudio con microtomografía computerizada (μ TC):

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

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

Para el análisis de los parámetros microestructurales del hueso trabecular y cortical se seleccionaron dos volúmenes de interés (VOI) distintos:

En el caso del hueso trabecular se seleccionó un VOI comenzando a 1,0 mm del plato de crecimiento de la metáfisis distal del fémur, ocupando 3,6 mm en dirección proximal y excluyendo para el análisis el hueso cortical.

Para el análisis de hueso cortical, el VOI comienza a una distancia de 6,0 mm del plato de crecimiento y se extiende 1,2 mm, excluyendo el hueso trabecular (Figura 36). La selección de los correspondientes VOI se lleva a cabo con la aplicación comercial proporcionada con el equipo (*SkyScan CT-Analyzer versión 1.10.0.2*).

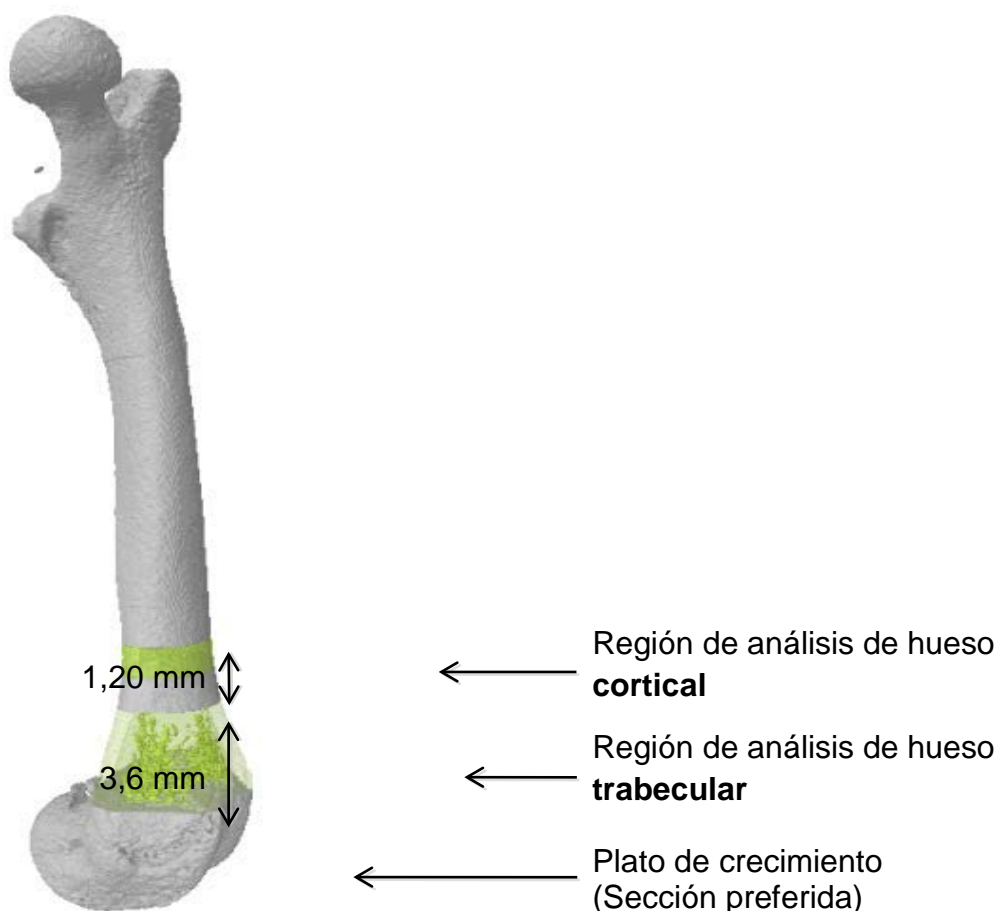


Imagen 36. Esquema de los volúmenes de interés a analizar en fémur.

Parámetros analizados:

1. *Parámetros morfométricos del hueso trabecular:*

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

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

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

2. *Variables microestructurales corticales:*

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

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

4. Estudio anatomopatológico óseo:

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

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

Análisis histomorfométrico del hueso:

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

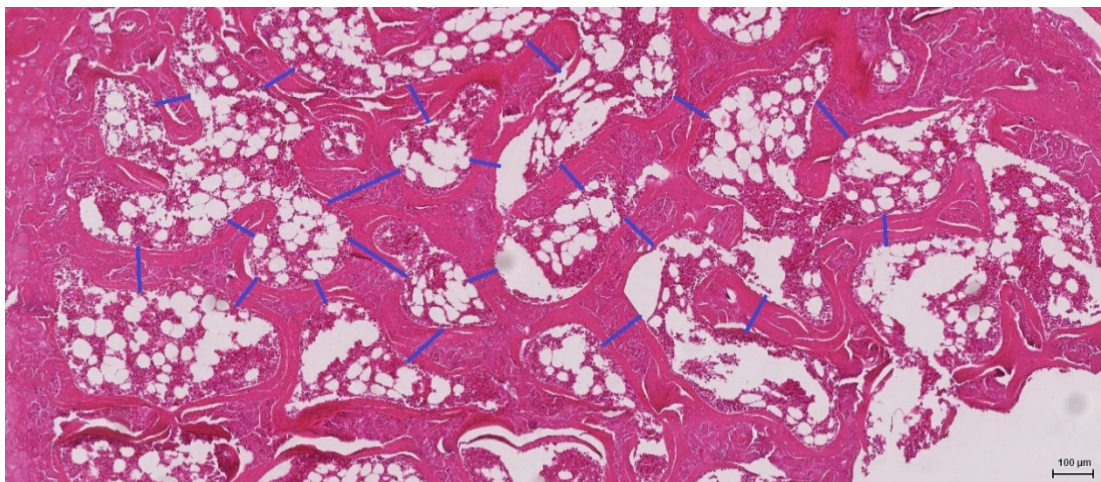


Imagen 37. Medida de las trabéculas del fémur. H.E. 200X

5. Estudio ionómico del tejido óseo:

Realizado en colaboración con el CEBAS-CESIC. Campus de Espinardo, Murcia (España).

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

El proceso que seguimos fue el siguiente: extrajimos las patas derechas de todos los animales para posteriormente separar y limpiar el fémur y la tibia. Para hacer el análisis por espectrofotometría es necesario que las muestras sólidas se muelan y se sequen. Para ello machacamos los huesos hasta reducirlos a polvo y los secamos en la estufa a 80°C durante 24h.

Las muestras fueron pesadas para obtener el peso en seco, ya que este valor lo utilizamos al final del análisis para calcular los resultados. Después de obtener el peso en seco, llevamos cada muestra (mínimo 0,1 g) a un volumen conocido de 4 ml de ácido nítrico (HNO₃ PA-ISO 69 %) en un tubo de teflón que, tras taponarlo, colocamos en el microondas a una temperatura de 220°C durante 20 min.

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

multiplicados por 10 y divididos por el peso seco nos dio el resultado deseado.

6. Método estadístico:

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

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

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

V. RESULTADOS

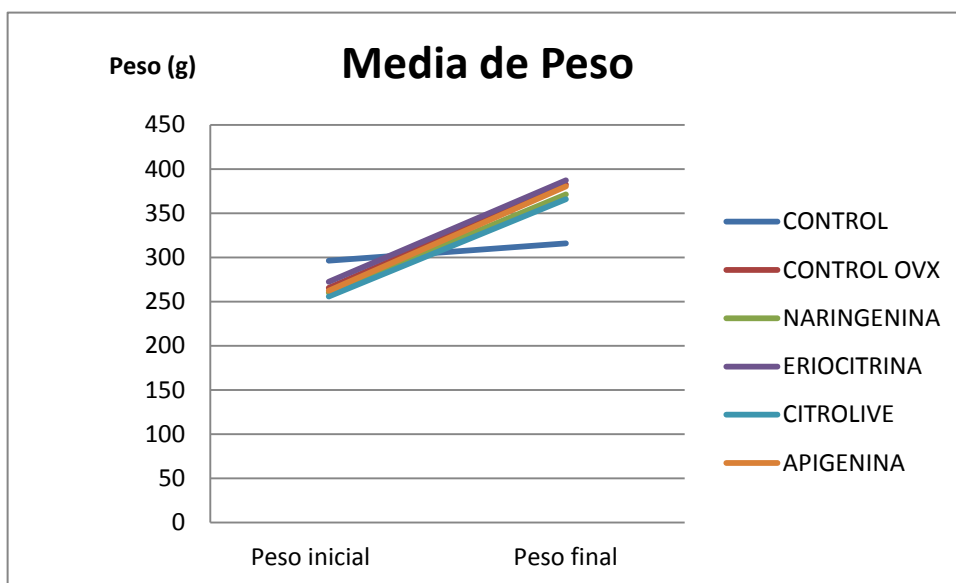
ESTUDIO DEL PESO

Observamos que los animales del **Grupo (I) Control**, mantuvieron el peso más o menos estable durante el tiempo del experimento, con un incremento final medio de $19,37 \pm 12,1$ g respecto al peso inicial. Sin embargo, todos los animales de los Grupos Ovariectomizados: **Control (II) OVX, (III) Naringenina, (IV) Eriocitrina y (V) Citrolive®**, experimentaron un gran incremento de peso durante el estudio, con valores superiores a los 100 gramos.

El Grupo con mayor peso al final del experimento fue el Control **(II) OVX** ($382,36 \pm 0,57$ g), mientras que el de menor peso era el Grupo **(I) Control** de animales sanos ($315,75 \pm 50,47$ g).

GRUPO	MEDIA PESO \pm Des Típ		
	Peso inicial	Peso final	Peso final-inicial
CONTROL	$296,38 \pm 0,64$	$315,75 \pm 50,47$	$19,37 \pm 12,1$
CONTROL OVX	$265,55 \pm 0,64$	$382,36 \pm 0,57$	$116,81 \pm 19,32$
NARINGENINA	$260,1 \pm 22,45$	$371,40 \pm 45,20$	$111,3 \pm 27,56$
ERIOCITRINA	$268,50 \pm 29,25$	$375,20 \pm 41,85$	$106,7 \pm 35,83$
CITROLIVE®	$255,90 \pm 32,65$	$365,74 \pm 59,15$	$109,84 \pm 18,43$

Tabla 6. Peso inicial (Pi), y al final del experimento, antes de la eutanasia (Pf). Incremento de peso durante el experimento (Pf-Pi).



Gráfica 1. Representación de las medias de los pesos.

ESTUDIO BIOQUÍMICO

A continuación se muestran los valores medios de los parámetros correspondientes al estudio bioquímico general (perfiles hepático, renal y pancreático): albúmina (ALB), alanina aminotransferasa (ALT), amilasa (AMY), bilirrubina total (TBIL) nitrógeno ureico sanguíneo (BUN), creatinina (CRE), glucosa (GLU), sodio (NA+), potasio (K+), proteína total (TP) y globulina (GLOB). No observamos desviaciones del rango de normalidad para la especie.

(I) CONTROL			
PARAMETROS	MES 0	MES 2	MES 4
ALB	5,67	5,87	5,1
ALT	59,32	57	63,57
AMY	735,67	743,33	630
TBIL	0,27	0,27	0,29
BUN	14,65	13,83	13,14
CRE	0,32	0,37	0,34
GLU	150,38	41,04	22,63
NA+	138,14	138	137
K+	5,83	5,95	5,64
TP	8,45	7,1	6,59
GLOB	1,66	1,57	1,47
(II) OVX			
ALB	6,54	5,43	4,24
ALT	55,73	53,67	47,67
AMY	876,10	837,67	1048
TBIL	0,16	0,2	0,24
BUN	19,76	18	13,5
CRE	0,35	0,33	0,9
GLU	113,33	100	128
NA+	137,81	139,67	135,67
K+	6,83	6,07	5,8
TP	7,61	7,43	6,12
GLOB	2,80	2,03	2,03

(III) NARINGENIA			
PARAMETROS	MES 0	MES 2	MES 4
ALB	5,05	5,22	4,83
ALT	61,92	59,6	74,9
AMY	796,46	876,7	744,8
TBIL	0,31	0,21	0,26
BUN	11,92	15,4	15,14
CRE	0,45	0,4	0,28
GLU	127,15	75,9	104,3
NA+	143,31	143,2	139,9
K+	6,85	7,6	8,25
TP	7,15	7,17	7,12
GLOB	2,08	1,83	2,31
(IV) ERIOCITRINA			
PARAMETROS	MES 0	MES 2	MES 4
ALB	5,58	5,2	4,48
ALT	50,5	81,6	70,8
AMY	868,33	735,6	590,4
TBIL	0,28	0,2	0,32
BUN	14,83	18,2	14,6
CRE	0,33	0,3	0,28
GLU	122,67	34,2	186,8
NA+	140	139,6	139,2
K+	6,85	7,48	4,82
TP	7,22	7,6	6,34
GLOB	1,6	2,2	1,84
(V) CITROLIVE®			
PARAMETROS	MES 0	MES 2	MES 4
ALB		5,28	4,64
ALT		49,38	63,13
AMY		768,63	705,13
TBIL		0,3	0,2
BUN		15,88	14,88
CRE		0,34	0,29
GLU		105,38	108
NA+		142,75	142,88
K+		6,3	8,5
TP		7,53	6,54
GLOB		2,25	1,87

Tabla 7. Media de los parámetros bioquímicos generales.

Los parámetros bioquímicos sanguíneos relacionados con el metabolismo del hueso fueron: **Calcio (Ca²⁺)**, **Fósforo (P)** y **Fosfatasa Alcalina total (ALP total)**

Calcio (Ca²⁺):

Los valores finales de Ca²⁺ en sangre en el Grupo **(I)** Control fueron de 10,97±0,21 mg/dl, de 9,77±1,82 mg/dl en el Grupo **(II)** OVX, de 10,75±0,51 mg/dl en el Grupo **(III)** Naringenina, de 10,38±0,73 mg/dl en el Grupo **(IV)** Eriocitrina y de 10,53±0,24 mg/dl en el Grupo **(V)** Citrolive®. No existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos en los distintos tiempos de estudio.

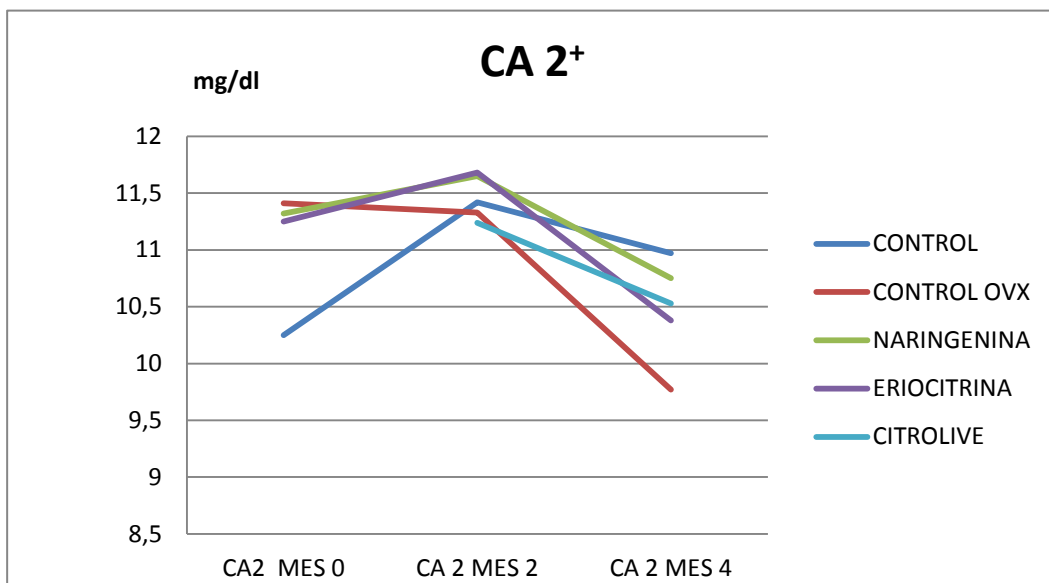
GRUPO	MEDIA Ca ²⁺ ± Des Típ		
	Ca ²⁺ MES 0	Ca ²⁺ MES 2	Ca ²⁺ MES 4
CONTROL	10,25 ± 0,64	11,42 ± 0,47	10,97 ± 0,21
CONTROL OVX	11,41 ± 0,22	11,33 ± 0,12	9,77 ± 1,82
NARINGENINA	11,32 ± 0,33	11,65 ± 0,39	10,75 ± 0,51
ERIOCITRINA	11,25 ± 0,23	11,68 ± 0,44	10,38 ± 0,73
CITROLIVE®.		11,24 ± 0,27	10,53 ± 0,24

Tabla 8. Media y desviación típica del calcio.

Resultados

(I)Grupo	(J)Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Sig. ^a
Control	OVX	,000	1,000
	Naringenina	-,315 [*]	,055
	Eriocitrina	-,212	,220
OVX	Control	,000	1,000
	Naringenina	-,315 [*]	,055
	Eriocitrina	-,212	,220
Naringenina	Control	,315 [*]	,055
	OVX	,315 [*]	,055
	Eriocitrina	,103	,457
Eriocitrina	Control	,212	,220
	OVX	,212	,220
	Naringenina	-,103	,457

Tabla 9. Basadas en las medias marginales estimadas. Ajuste para comparaciones múltiples. La diferencias de medias es significativa a nivel 0,05.



Gráfica 2. Representación de las medias de Ca²⁺ (mg/dl) en el tiempo.

Fósforo (FOS):

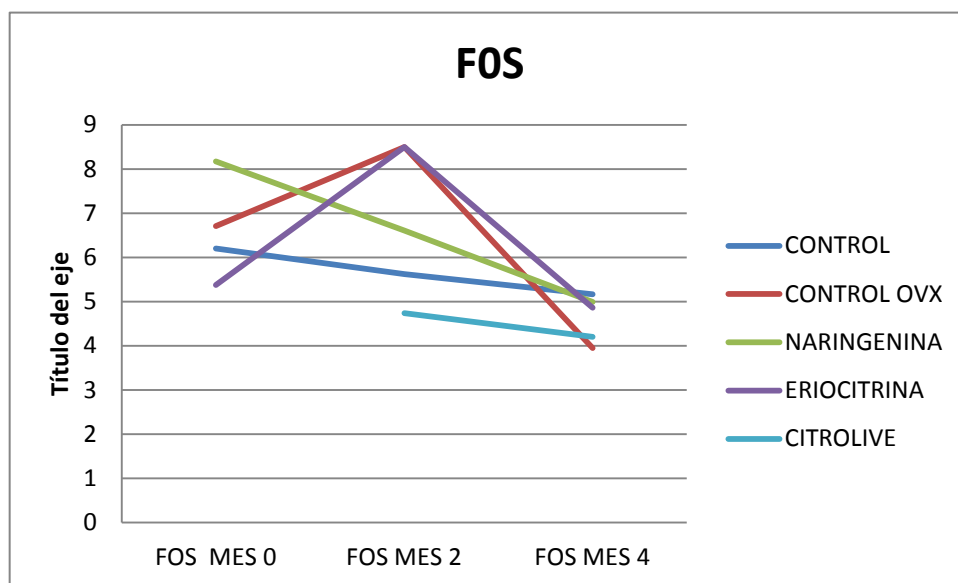
Los valores finales de **Fósforo** fueron de $5,8 \pm 0,87$ mg/dl en el Grupo **(I)** Control, de $3,95 \pm 0,54$ mg/dl, en el Grupo **(II)** OVX, de $4,99 \pm 1$ mg/dl en el Grupo **(III)** Naringenina, de $4,86 \pm 0,99$ mg/dl en el Grupo **(IV)** Eriocitrina y de $4,2 \pm 0,85$ mg/dl en el Grupo **(V)** Citrolive®. No existían diferencias estadísticamente significativas entre los Grupos.

GRUPO	MEDIA FOS \pm Des Típ		
	FOS MES 0	FOS MES 2	FOS MES 4
CONTROL	$6,20 \pm 0,38$	$5,62 \pm 0,37$	$5,8 \pm 0,87$
CONTROL OVX	$6,71 \pm 1,36$	$8,50 \pm 0$	$3,95 \pm 0,54$
NARINGENINA	$8,17 \pm 0,56$	$6,61 \pm 1,1$	$4,99 \pm 0,99$
ERIOCITRINA	$5,38 \pm 10,07$	$8,5 \pm 1,67$	$4,86 \pm 0,99$
CITROLIVE®.		$4,74 \pm 0,72$	$4,2 \pm 0,85$

Tabla 10. Media y desviación típica del fósforo.

(I)Grupo	(J)Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Sig. ^a
Control	OVX	,000	1,000
	Naringenina	-,683	,088
	Eriocitrina	-,447	,313
OVX	Control	,000	1,000
	Naringenina	-,683	,088
	Eriocitrina	-,447	,313
		,	
Naringenina	Control	-,683,	,088
	OVX	-,683,	,088
	Eriocitrina	,237,	,509
Eriocitrina	Control	-,447	,313
	OVX	-,447	,313
	Naringenina	,237	,509

Tabla11. Basadas en las medias marginales estimadas. Ajuste para comparaciones múltiples. La diferencias de medias es significativa a nivel 0,05.



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

Fosfatasa alcalina total (ALP total):

La **ALP total** disminuyó en todos los Grupos del estudio, siendo el Grupo **(I)** Control, el que presentaba los valores más estables, pues al principio del experimento la media de este Grupo fue de $184,75 \pm 17,17$ U/L y los valores medios finales fueron de $141,50 \pm 39,53$ U/L.

El Grupo **(II)** Control OVX, presentó una importante caída de los valores séricos de esta enzima, ya que partiendo de una media de $209,56 \pm 42,43$, los valores finales se redujeron hasta los $89,83 \pm 34,49$ U/L.

Los animales tratados con Naringenina, Grupo **(III)**; comenzaron el experimento con $257,54 \pm 30,98$ U/L y los valores finales fueron de $219,3 \pm 30,87$ U/L.

El Grupo **(IV)** de Eriocitrina, sufrió una mayor caída, con una media al comienzo del estudio $232,33 \pm 20,26$ U/L y de valores finales de $150,6 \pm 33,22$ U/L.

Los valores finales de la ALP oscilaron entre $219,3 \pm 30,87$ mg/dl en el Grupo **(III)** Naringenina y $89,83 \pm 34,49$ mg/dl en el Grupo **(II)** OVX.

El resto de Grupos tuvo valores finales similares: Grupo **(I)** Control $141,5 \pm 39,53$ mg/dl, Grupo **(IV)** Eriocitrina $150,6 \pm 33,22$ mg/dl y el Grupo **(V)** Citrolive®. $152,88 \pm 23,8$ mg/dl.

Existían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los Grupos **(I)** Control y **(II)** OVX con los Grupos **(III)** Naringenina y **(IV)** Eriocitrina.

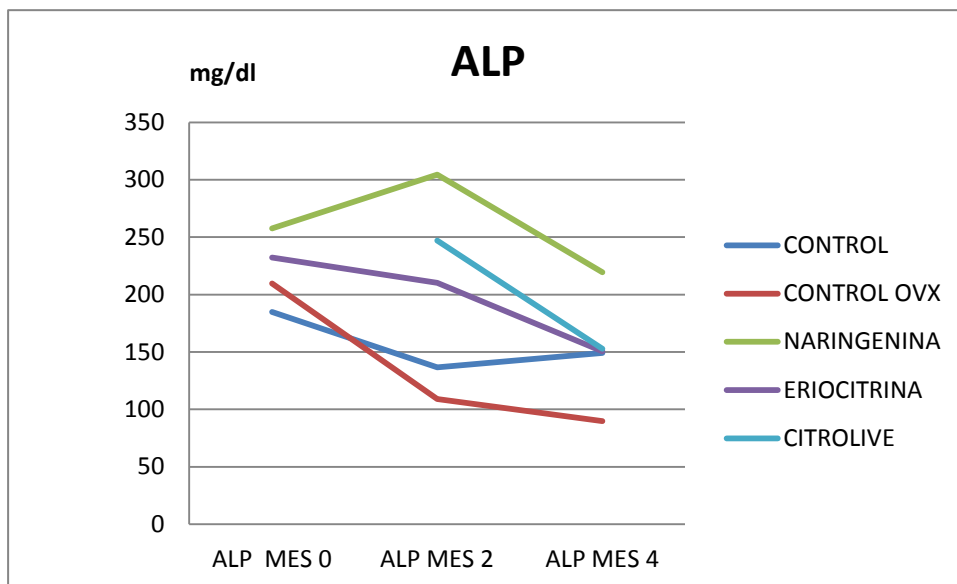
GRUPO	MEDIA ALP \pm Des Típ		
	ALP MES 0	ALP MES 2	ALP MES 4
CONTROL	$184,75 \pm 17,17$	$136,5 \pm 28,06$	$141,5 \pm 39,53$
CONTROL OVX	$209,56 \pm 17,17$	$109 \pm 15,01$	$89,83 \pm 34,49$
NARINGENINA	$257,54 \pm 30,98$	$304,4 \pm 46$	$219,3 \pm 30,87$
ERIOCITRINA	$232,33 \pm 20,26$	$210,2 \pm 35,97$	$150,6 \pm 33,22$
CITROLIVE®.		$247,13 \pm 32,71$	$152,88 \pm 23,8$

Tabla 12. Media y desviación típica de la Fosfatasa alcalina total.

Resultados

(I)Grupo	(J)Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Sig. ^a
Control	OVX	,000	1,000
	Naringenina	-,683	,000
	Eriocitrina	-,447	,011
OVX	Control	,000	1,000
	Naringenina	-,683	,000
	Eriocitrina	-,447	,011
		,	
Naringenina	Control	-,683,	,000
	OVX	-,683,	,000
	Eriocitrina	,237,	,000
Eriocitrina	Control	-,447	,011
	OVX	-,447	,011
	Naringenina	,237	,000

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



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

ESTUDIO MEDIANTE MICROTOMOGRFÍA COMPUTERIZADA (μ TC)

1. Fémur: trabecular

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

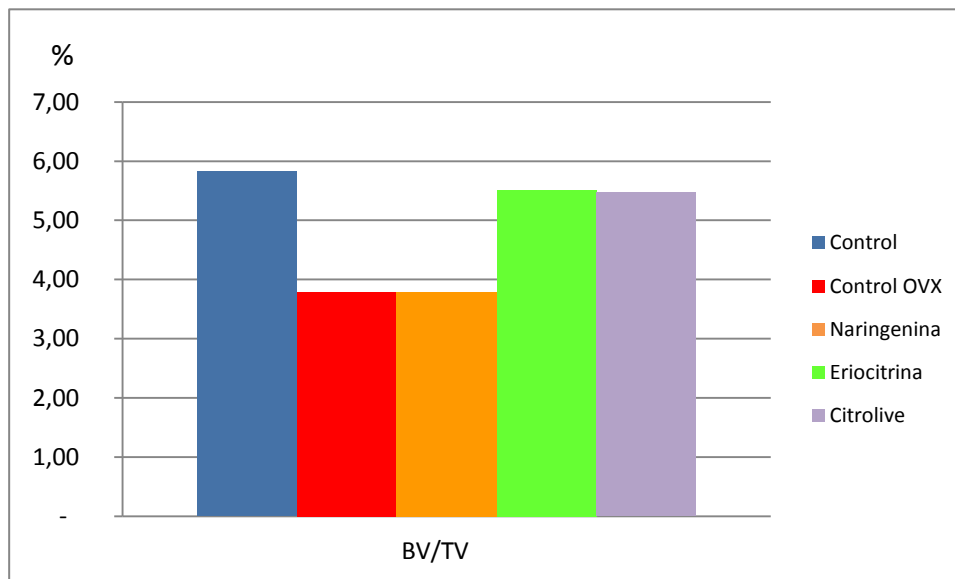
BV/TV	BS/TV	Tb.Th	Tb.Sp	Tb.N	Tb.Pf
%	mm ⁻¹	mm ⁻¹	mm ⁻¹	μm	mm ⁻¹
Porcentaje volumen del hueso	Densidad superficie ósea	Grosor de las trabéculas	Grosor del espacio entre trabéculas	Nº de trabéculas que atraviesan el espacio	Índice de conectividad de las trabéculas

Media	Control	C.OVX	Narigenina	Eriocitrina	Citrolive®.
BV/TV	5,82	3,79	3,78	5,51	5,47
BS/BV	46,65	67,93	52,38	47,42	50,44
BS/TV	2,75	2,57	1,98	2,61	2,76
Tb.Th	87,65	67,46	80,54	84,38	81,15
Tb.Sp	92,79	1.079,37	1059,99	1087,85	973,41
TbN	0,67	0,56	0,47	0,65	0,67
Tb.Pf	15,22	25,64	20,15	16,06	16,63
Ct.Th	312,93	142,76	466,45	541,04	281,46
Cs.Th	423,95	142,03	443,57	449,23	406,94
B.Ar	6,15	5,51	5,26	4,87	6,34

Tabla 14. Resultados estadísticos descriptivos.

- **BV/TV:**

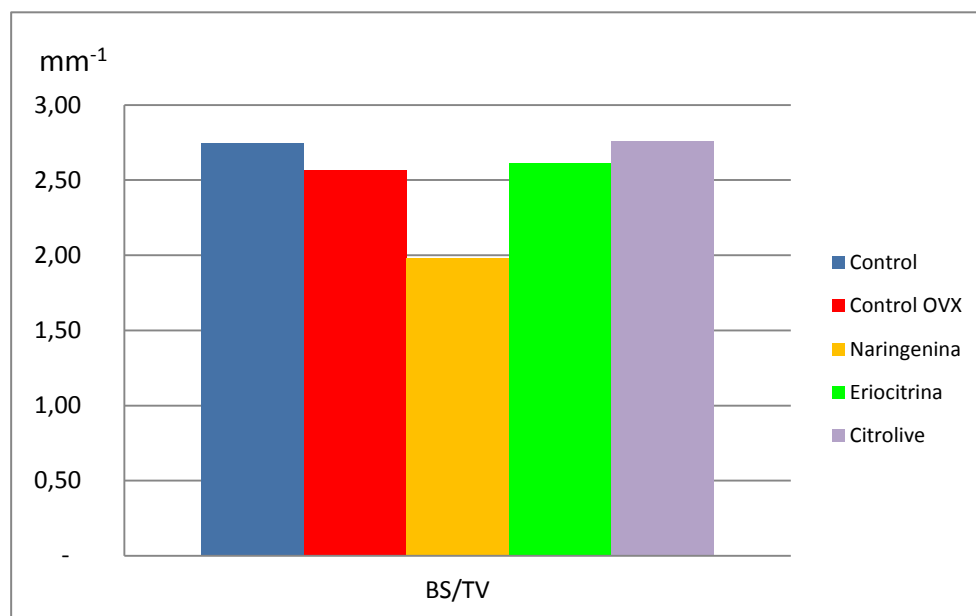
Este parámetro corresponde al porcentaje del volumen del hueso. El Grupo **(I)** Control con 5,82 %, seguidos por los Grupos **(IV)** Eriocitrina con 5,51% y **(V)** Citrolive® con 5,47% que presentaban un volumen muy similar entre ellos. El Grupo **(III)** Naringenina con valores de 3,78 % es casi igual al Grupo **(II)** OVX con 3,79 %. Sin diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 5. Representación de las medias \pm DE de BV/TV del fémur.

- **BS/TV:**

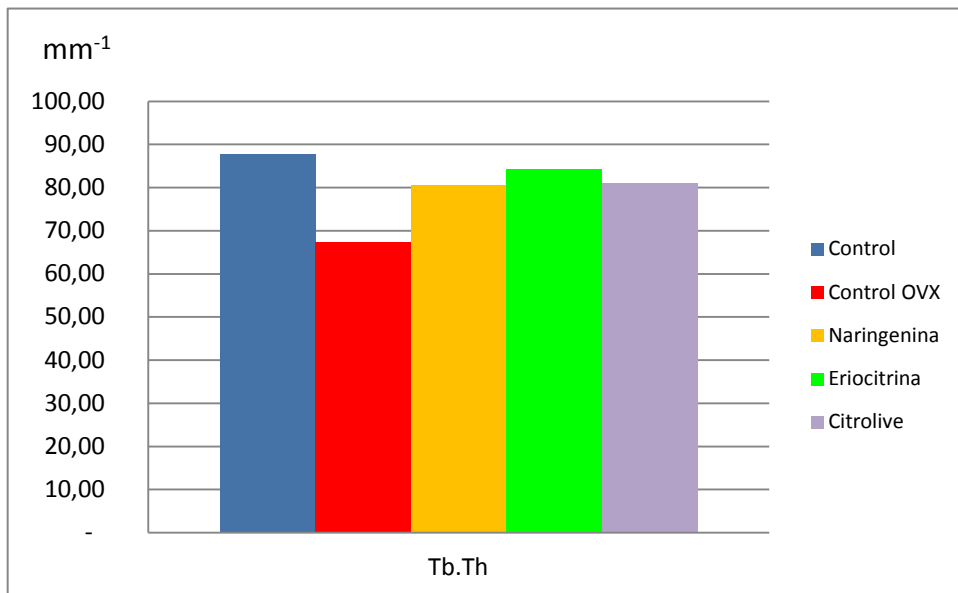
Los valores de densidad trabecular fueron similares en el Grupo **(V)** tratado con Citrolive®. 2.76 mm^{-1} , con respecto del Grupo **(I)** Control, $2,75 \text{ mm}^{-1}$, mientras que bajaba en los Grupos: **(IV)** Eriocitrina, $2,61 \text{ mm}^{-1}$, **(II)** OVX $2,57 \text{ mm}^{-1}$ y **(III)** Naringenina, con $1,98 \text{ mm}^{-1}$. Sin diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 6. Representación de las medias \pm DE de BS/TV del fémur.

- **Tb.Th:**

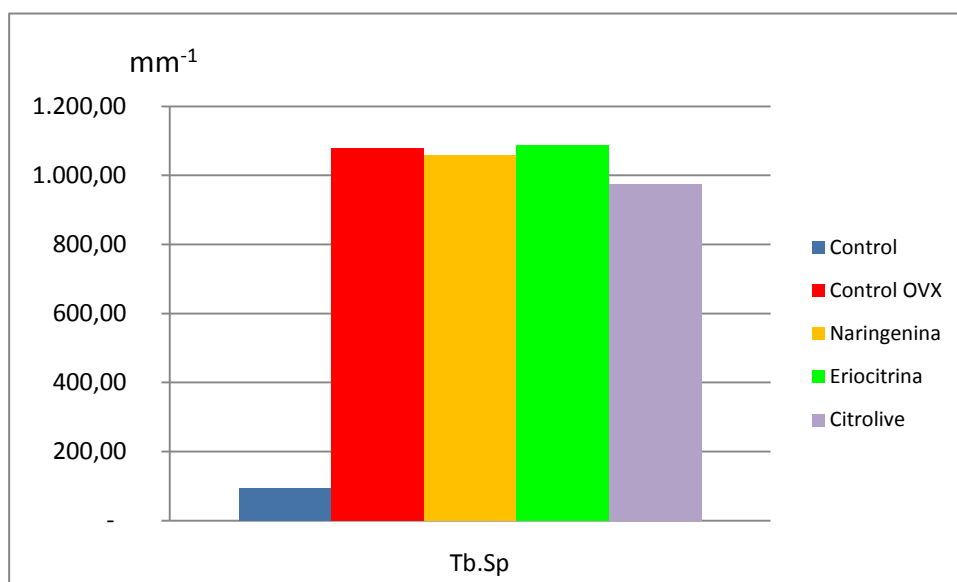
Indica el grosor de las trabéculas, el Grupo **(I)** Control fue el que presentaba mayor grosor trabecular $87,65 \pm 1,25 \text{ mm}^{-1}$. Mientras que los Grupos tratados mostraron valores superiores al Control **(II)** OVX, $67.46,17 \pm 2,56 \text{ mm}^{-1}$ con los siguientes resultados: **(IV)** Eriocitrina $84,38 \text{ mm}^{-1}$, **(V)** Citrolive® $81,15 \text{ mm}^{-1}$ y **(III)** Naringenina $80,54 \text{ mm}^{-1}$. Sin diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 7. Representación de las medias \pm DE de Tb.Th del fémur.

- **Tb.Sp:**

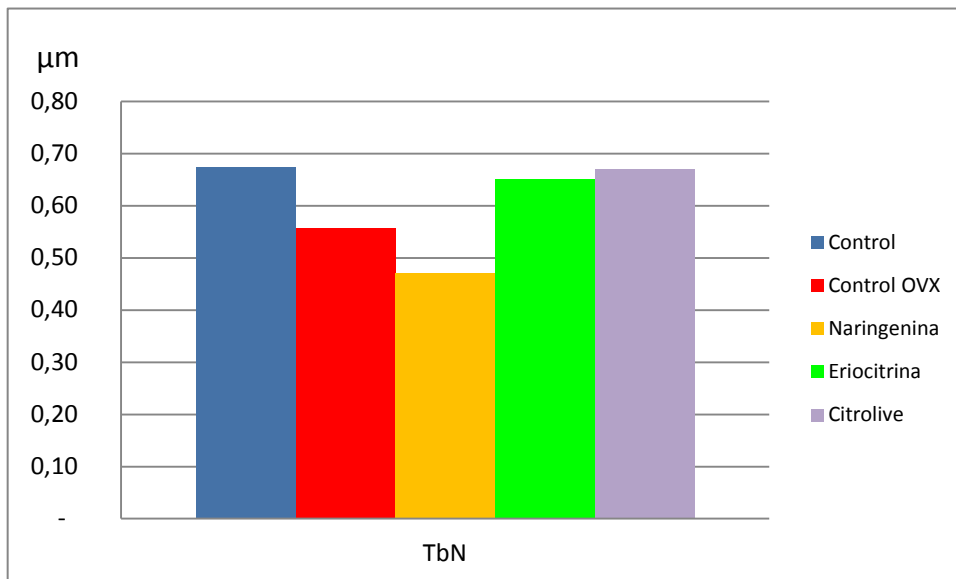
Con respecto al espacio intertrabecular, el Grupo **(I)** Control mostró un valor de $92,78 \pm 1,2 \text{ mm}^{-1}$, mientras que en los animales ovariectomizados, existía mayor espacio entre trabéculas con $1079,37 \pm 5,87 \text{ mm}^{-1}$ del Grupo **(II)** OVX, $973,41 \text{ mm}^{-1}$, en el Grupo **(V)** Citrolive®, $1059,99 \text{ mm}^{-1}$ en el Grupo **(III)** Naringenina y $1087,85 \text{ mm}^{-1}$ del Grupo **(IV)** Eriocitrina. Sin diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 8. Representación de las medias \pm DE de Tb.Sp del fémur.

- **Tb.N:**

Respecto al número de trabéculas que atraviesan el espacio analizado, el Grupo **(V)** Citrolive®. fue el que mostraba los valores más elevados 0,67 μ m, igualado al Grupo **(I)** Control 0,67 μ m, seguido por Grupo **(IV)** Eriocitrina (0,65 \pm 0,02 μ m). El Grupo Control **(II)** OVX, obtuvo unos valores de 0,56 \pm 0,02 μ m y por último el Grupo **(III)** Naringenina ofreció lo valores más bajos con 0,47 μ m. Sin diferencias estadísticamente significativas.

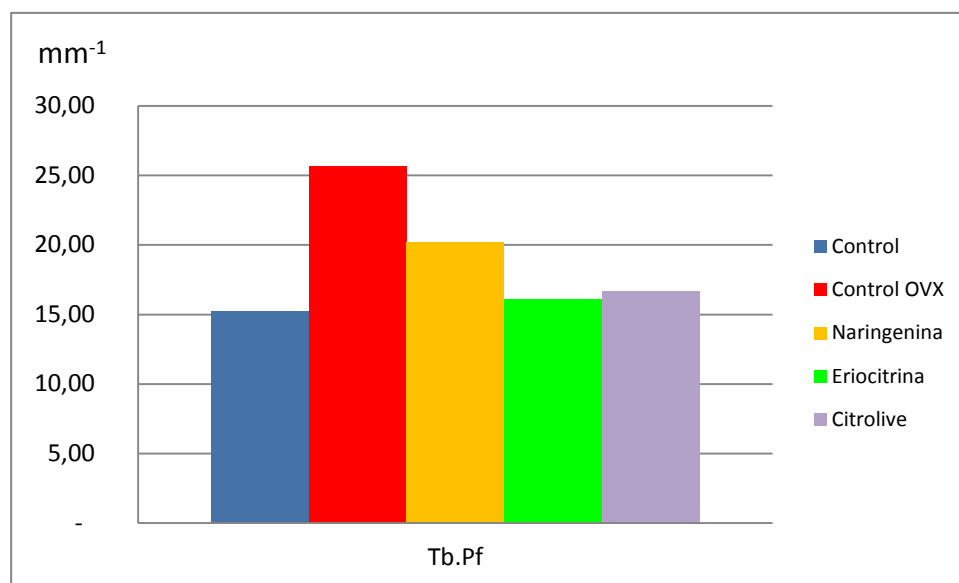


Gráfica 9. Representación de las medias \pm DE de Tb.N del fémur.

- **Tb.Pf**

Se trata de un índice inverso, por lo que cuanto mayor es el valor, menor conectividad intertrabecular existe.

Todos los Grupos presentaban valores superiores al Grupo **(I)** Control $15,22 \pm 0,67 \text{ mm}^{-1}$: Grupo OVX **(II)** $25,64 \text{ mm}^{-1}$, Grupo Naringenina **(III)** $20,15 \pm 1,41 \text{ mm}^{-1}$, Grupo Citrolive®. **(V)** $16,63 \text{ mm}^{-1}$ y Grupo Eriocitrina **(IV)** $16,06 \text{ mm}^{-1}$. Sin diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 10. Representación de las medias \pm DE de Tb.Pf del fémur.

2. Fémur: cortical

En la región cortical del fémur, el μ CT da información sobre el grosor medio de la pared en 2D y 3D (μm) y el área media del hueso (mm^2).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo fueron los siguientes:

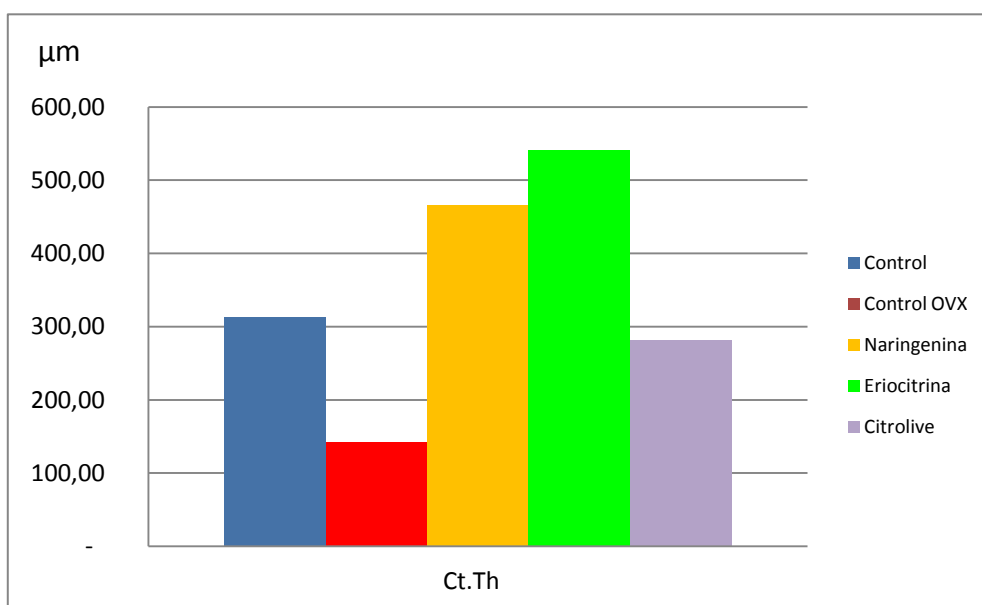
Ct.Th μm	Cs.Th μm	B.Ar mm^2
Grosor medio de la pared cortical en 2D	Grosor medio de la pared cortical en 3D	Área media del hueso

Media	Control	Control OVX	Naringenina	Eriocitrina	Citrolive®.
Ct.Th	312,93	142,76	466,45	541,04	281,46
Cs.Th	423,95	142,03	443,57	449,23	406,94
B.Ar	6,15	5,51	5,26	4,87	6,34

Tabla 15. Resultados estadísticos descriptivos.

- **Ct.Th:**

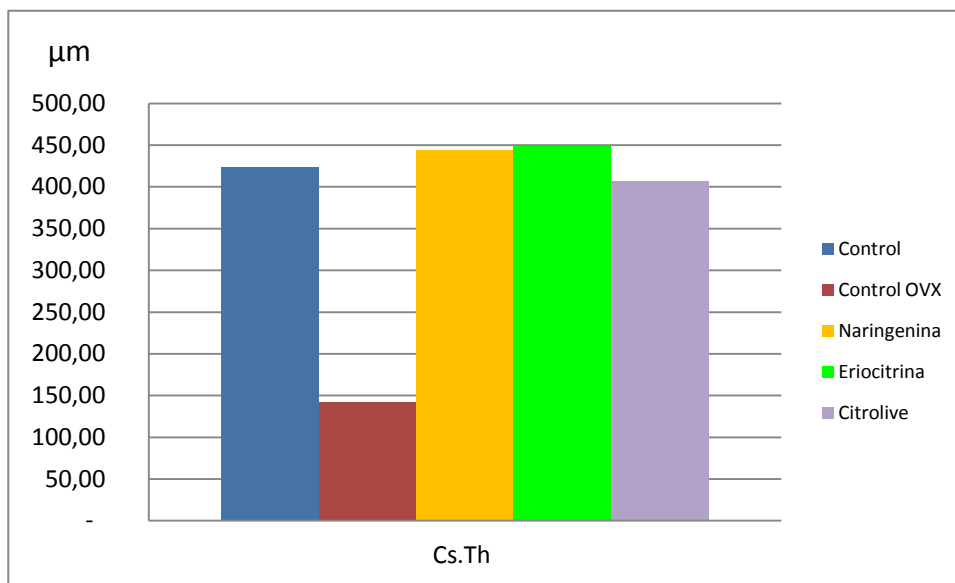
La pared cortical era más gruesa en los Grupos **(IV)** y **(III)** tratados respectivamente con Eriocitrina 541,04 μm y Naringenina 466 μm . El Grupo **(I)** Control obturo 312,93 μm , y por debajo el Grupo **(V)** Citrolive®. 281,46 μm ,. y el Grupo**(II)** OVX fue el que mostró una cortical más fina, con 142,757 μm solamente. Sin diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 11. Representación de las medias \pm DE de Ct.Th del fémur.

- **Cs.Th:**

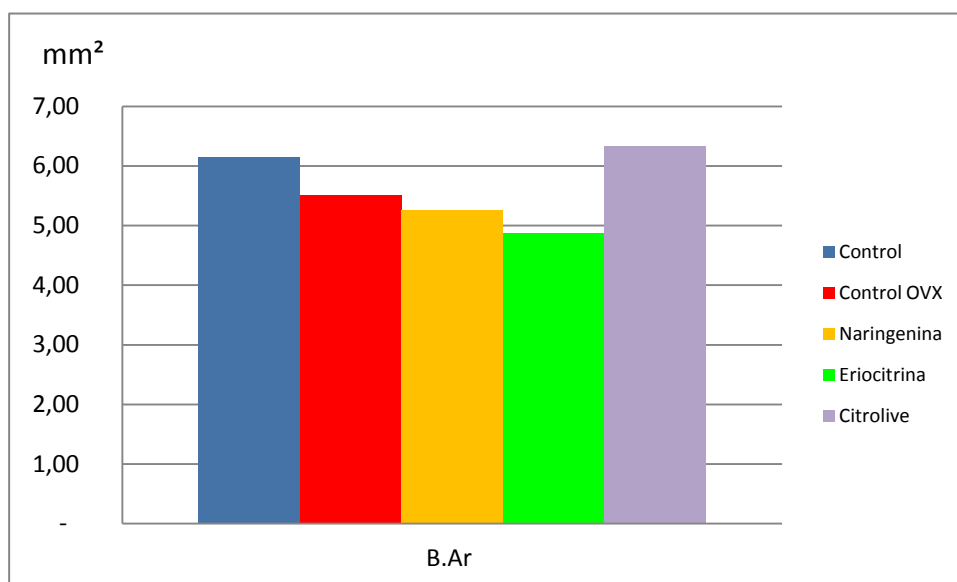
En el estudio tridimensional de la cortical ósea, los Grupos tratados así como el Grupo **(I)** Control estaban por encima de 400 μm de espesor: **(I)** Control 423,95 μm , **(IV)** Eriocitrina 449,23 μm , **(III)** Naringenina 443,57 μm , **(V)** Citrolive®. 406,94, mientras que el Grupo Control OVX **(II)** se encontraba muy por debajo de estos valores 142,03 μm . El Grupo que mostraba una cortical más gruesa según este parámetro de estudio fue el Grupo de Eriocitrina **(IV)** 449,23 μm . Sin diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 12. Representación de las medias \pm DE de Cs.Th del fémur.

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

En el estudio del área media del hueso cortical, observamos el valor más alto en el Grupo **(V)** Citrolive®. con $6,34\pm\text{mm}^2$ seguido por el Grupo **(I)**Control con $6,15\pm\text{mm}^2$. Los Grupos Control **(II)** OVX, Naringenina **(III)** y Eriocitrina **(IV)** mostraron los valores más alejados de los otros dos Grupos con $5,51\text{ mm}^2$, $5,26\text{mm}^2$ y $4,87\text{mm}^2$ respectivamente. Sin diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 13. Representación de las medias \pm DE de B.Ar del fémur.

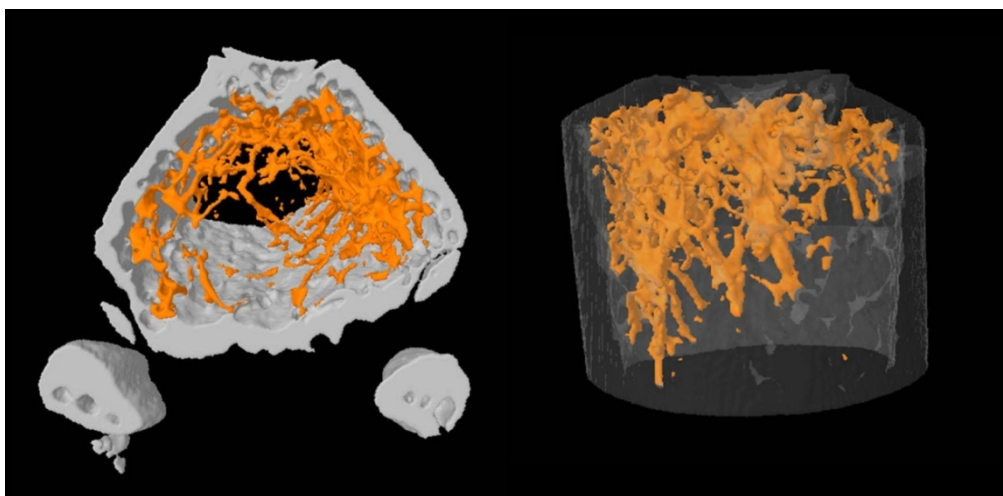


Imagen 38. Fémur, hueso trabecular. Grupo (I) Control.

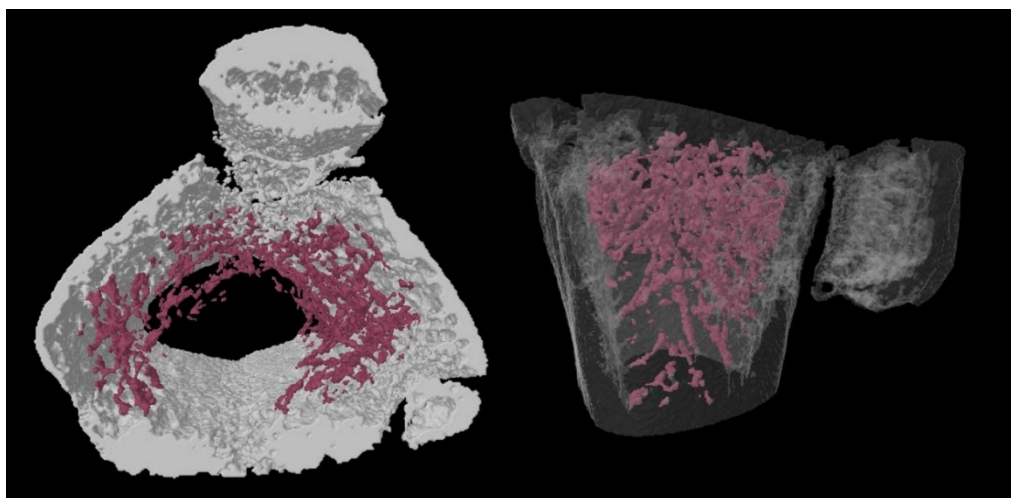


Imagen 39. Fémur, hueso trabecular. Grupo (II) OVX.

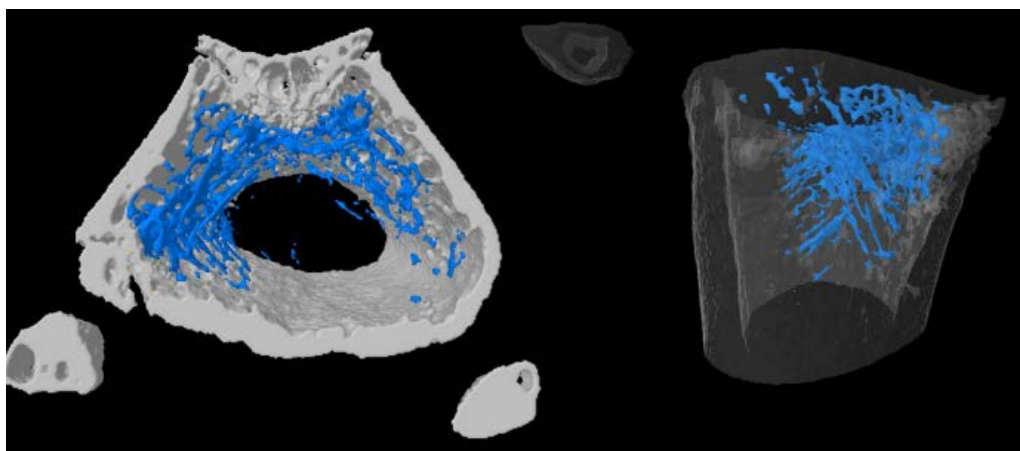


Imagen 40. Fémur, hueso trabecular. Grupo (III) Naringenina.

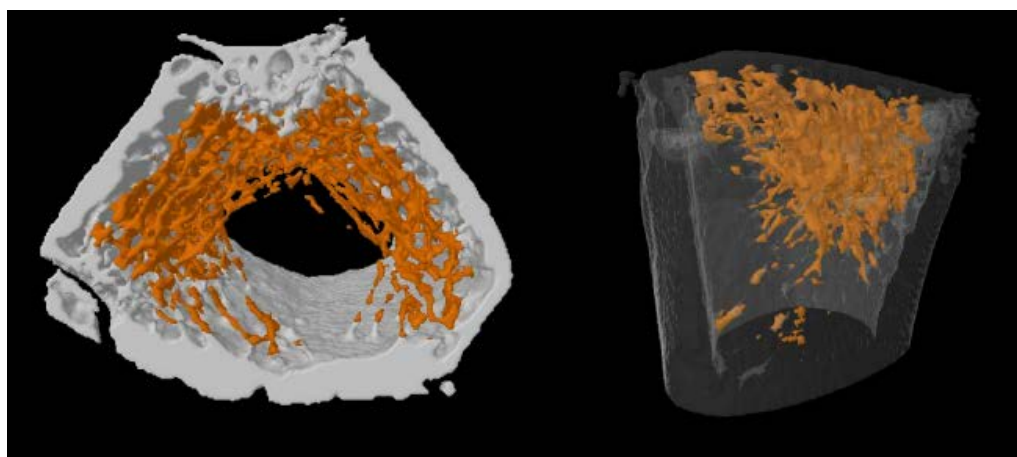


Imagen 41. Fémur, hueso trabecular. Grupo (IV) Eriocitrina.

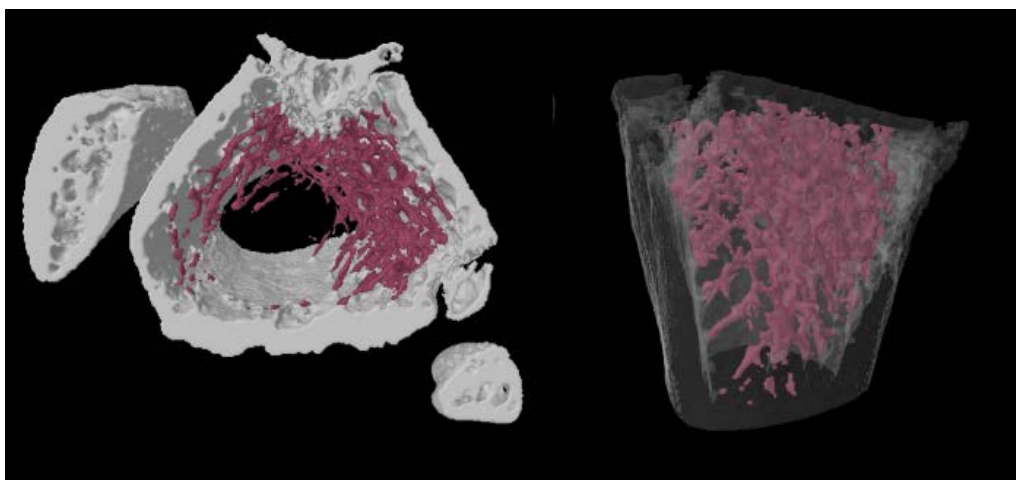


Imagen 42. Fémur, hueso trabecular. Grupo (V) Citrolive®.

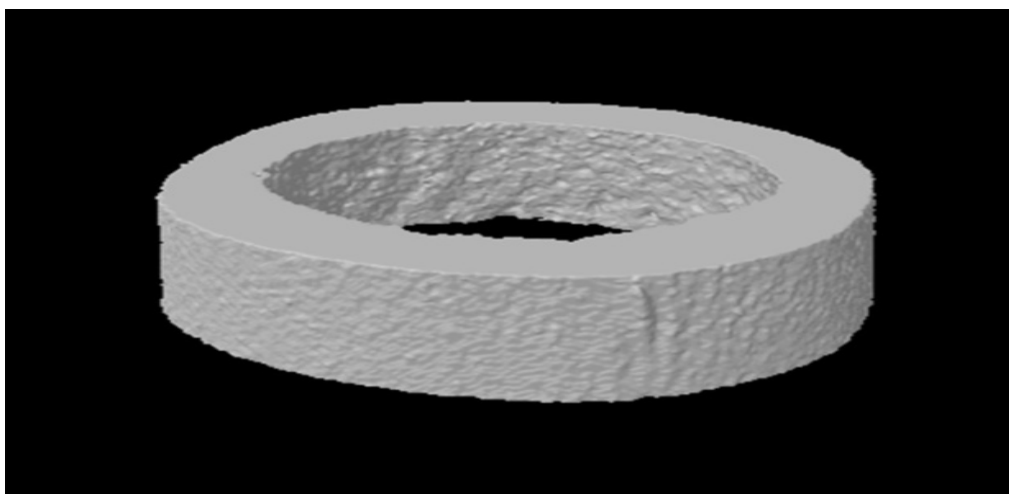


Imagen 43. Fémur, hueso cortical. Grupo (I) Control .

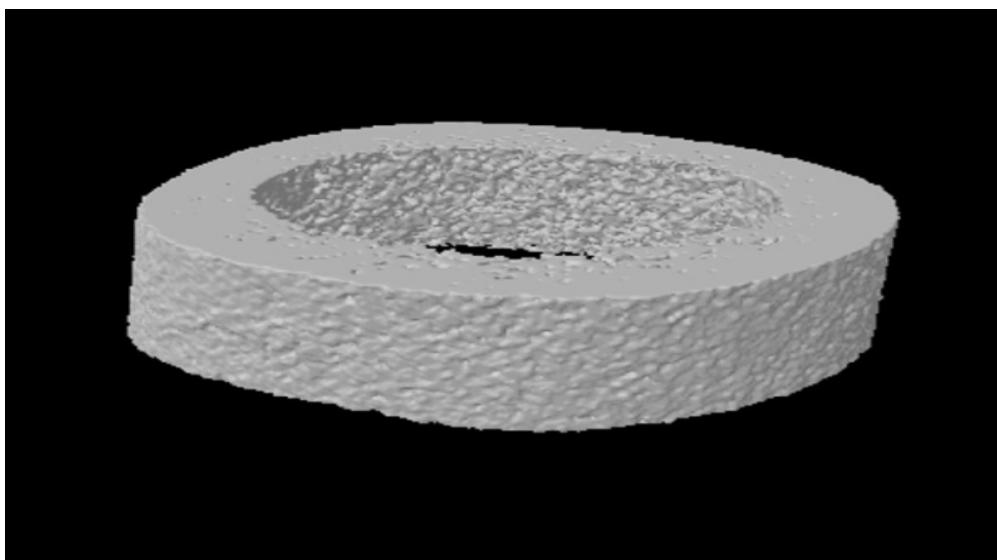


Imagen 44. Fémur, hueso cortical. Grupo (II) OVX

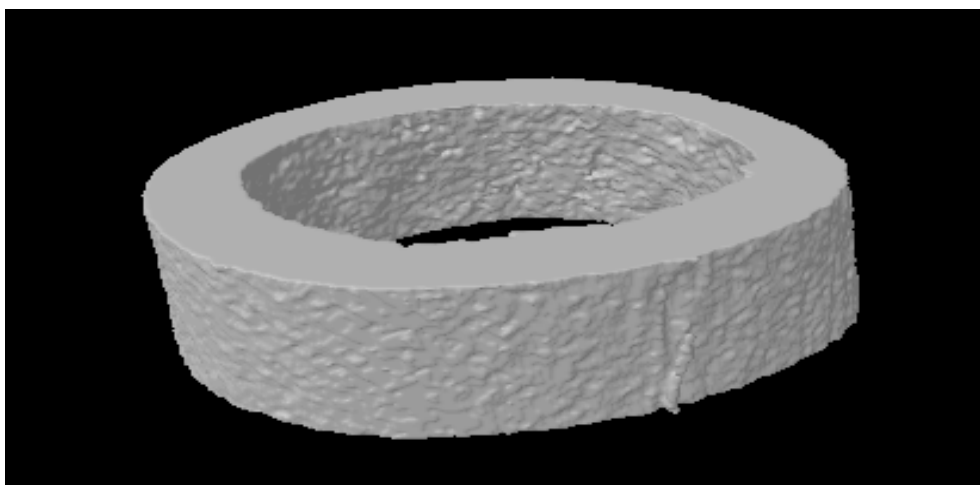


Imagen 45. Fémur, hueso cortical. Grupo (III) Naringenina.

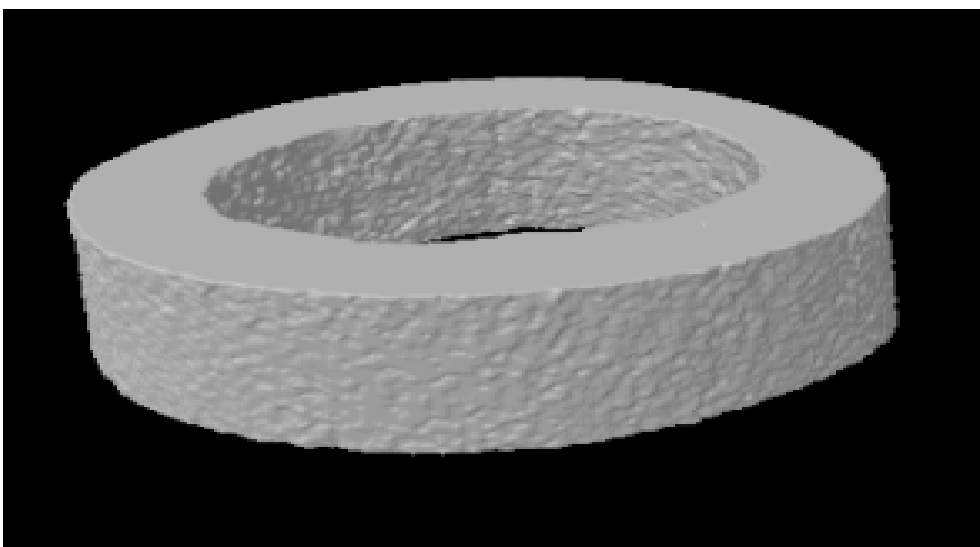


Imagen 46. Fémur, hueso cortical. Grupo (IV).Eriocitrina.

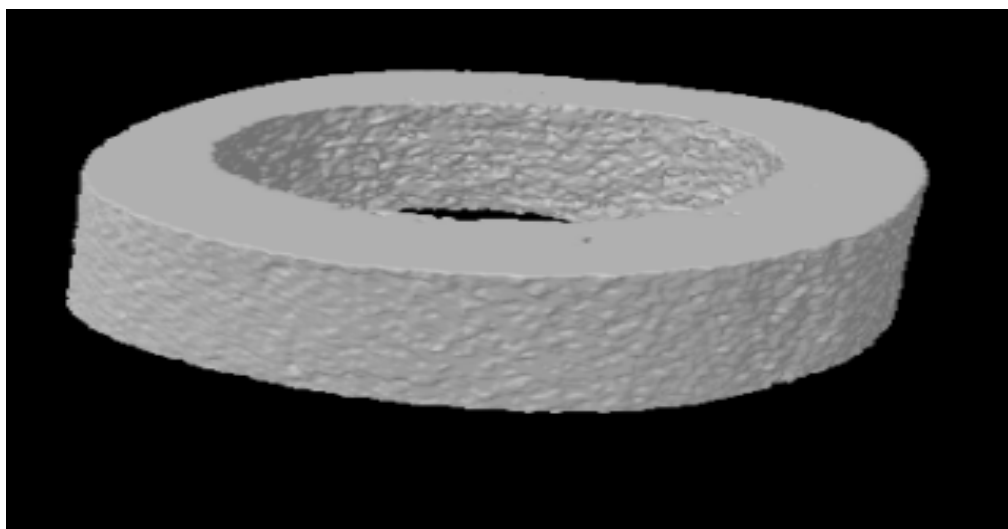


Imagen 47. Fémur, hueso cortical. Grupo (V) Citrolive®.

ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO ÓSEO

Los resultados más relevantes del estudio histopatológico realizado sobre los fémures, a nivel de las zonas epifisiarias trabecular, correspondían a:

En el modelo de osteoporosis experimental desarrollado en animales sanos Grupo **(II)** (ovariectomizado), destacaba, respecto a los animales sanos, Grupo **(I)** Control, la disminución de la masa ósea, que se caracterizaba fundamentalmente por la reducción del número y tamaño de las trabéculas óseas; en estas existían alteración de las conexiones entre las trabéculas, así como mayor expansión de los espacios intertrabeculares. Estos con frecuencia mostraban imágenes de perforación trabecular por resorción osteoclástica así como el ensanchamiento de los canales de Havers. Esta falta de conexión trabecular daba en algunas zonas a imágenes de aislamiento de las trabéculas individualizadas.

En los Grupos tratados destacaba la menor disminución de la masa ósea así como de la desconexión entre las trabéculas en distinto grado; era muy llamativo el aumento de grosor de las mismas, con valores cercanos a los del Grupo **(I)** Control, así como los fenómenos de regeneración ósea. También se caracterizaban por áreas laminales de depósitos de material osteoide que se disponían de forma superpuesta, de modo semejante al característico de la remodelación de las trabéculas óseas, respecto al Grupo **(I)** Control.

Grupo (I) Control:

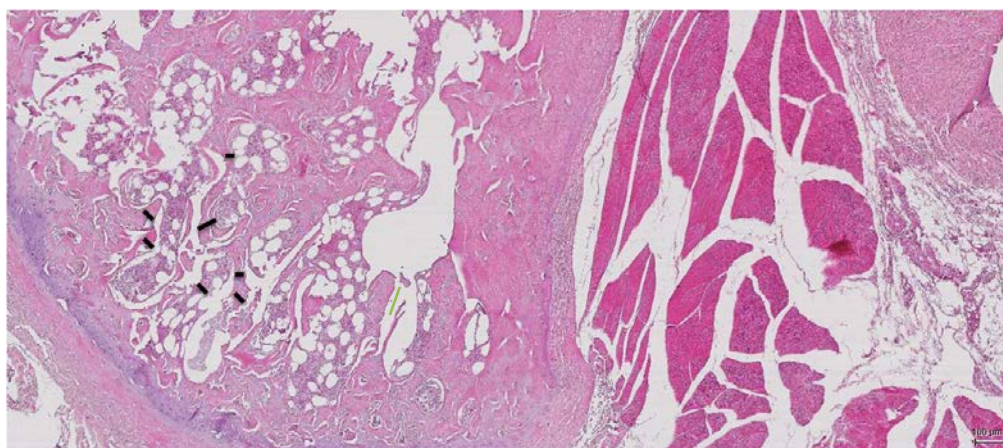
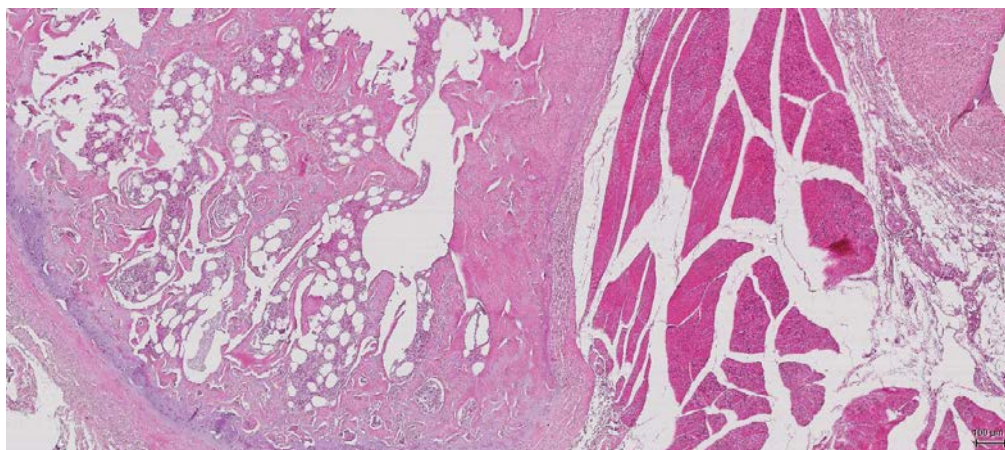


Imagen 48. Sección histológica: fémur, Grupo (I) (Control). H.E. 200x

Grupo (II) OVX:

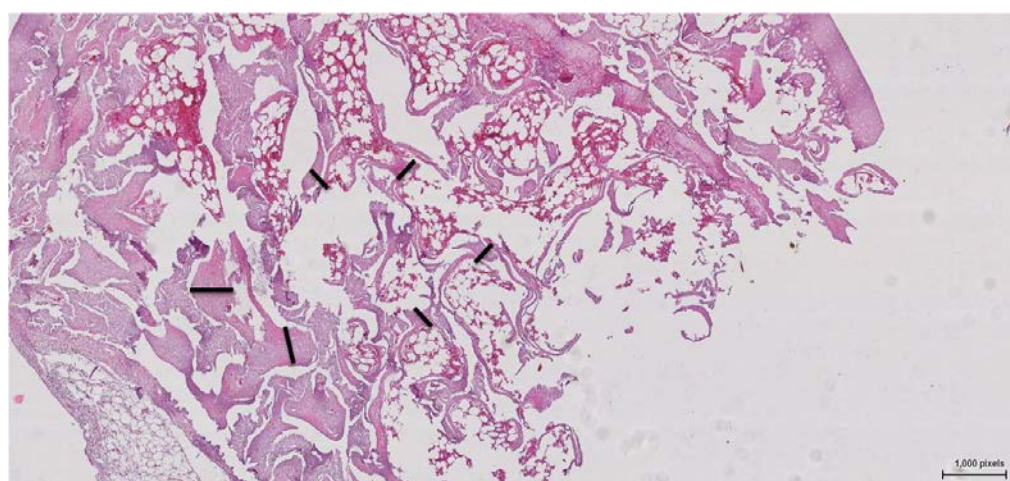
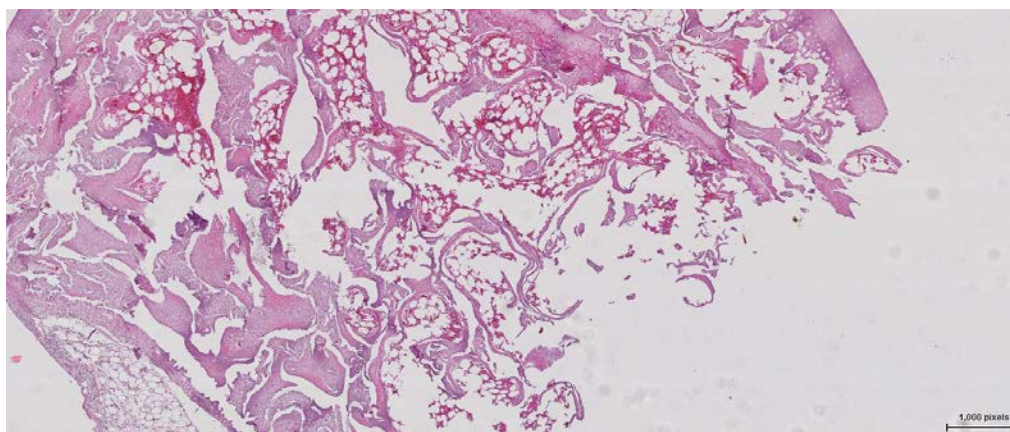


Imagen 49. Sección histológica: fémur, Grupo (II) OVX. H.E. 200x

Grupo (III) Naringenina:

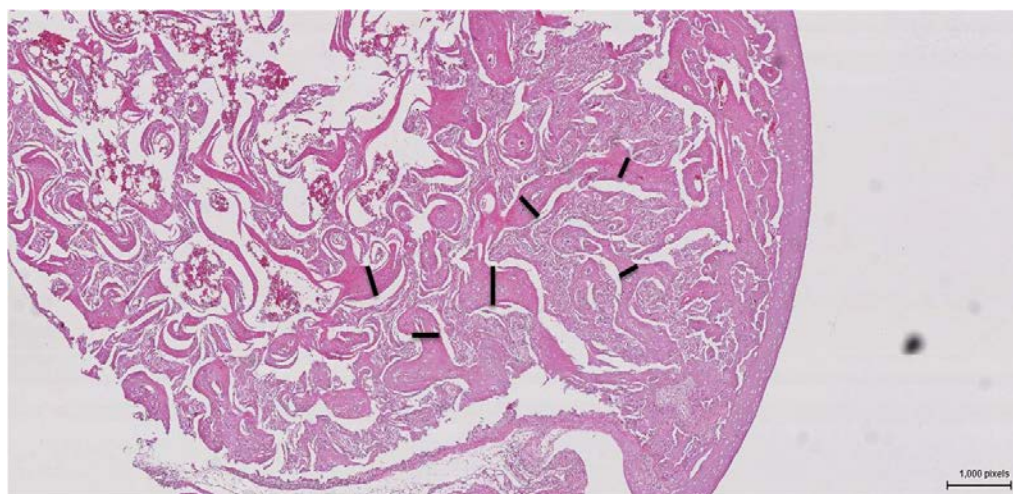
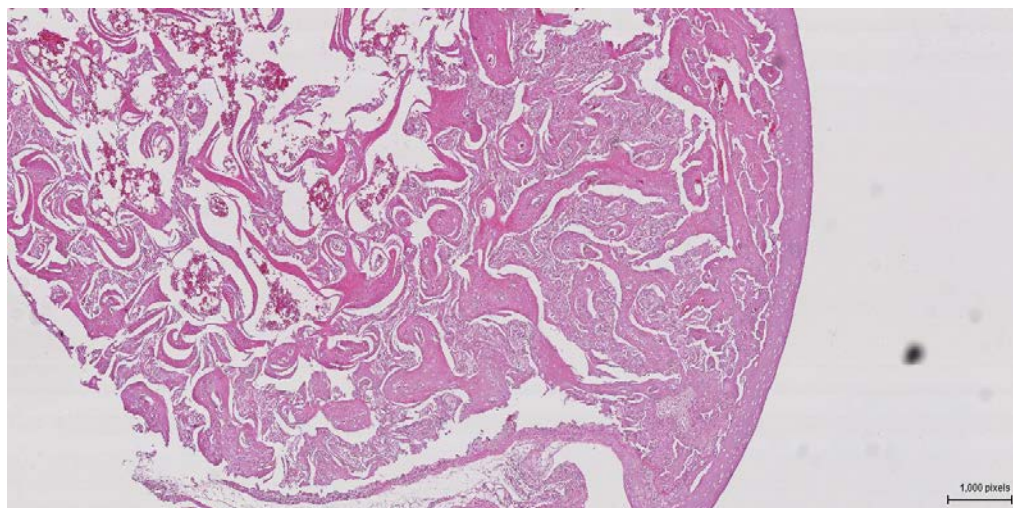


Imagen 50. Sección histológica: fémur, Grupo (III) Naringenina. H.E. 200x

Grupo (IV) Eriocitrina:

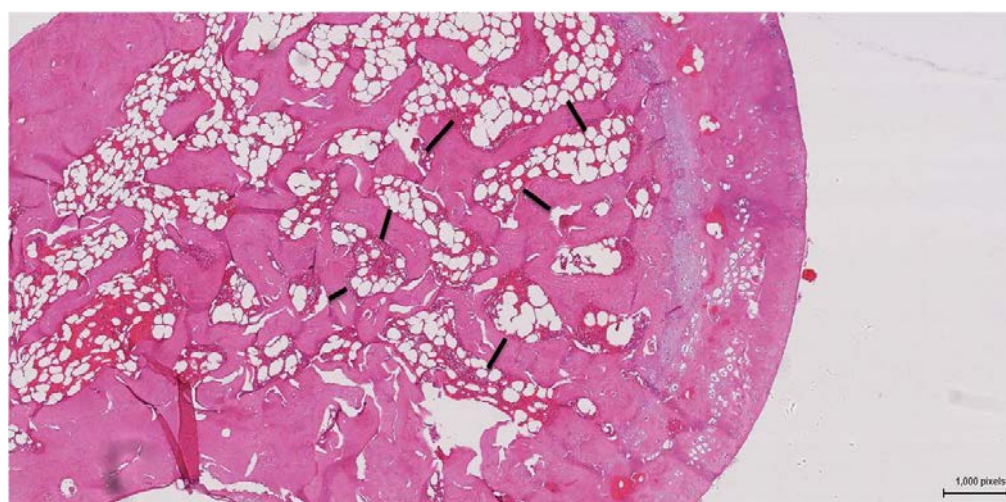
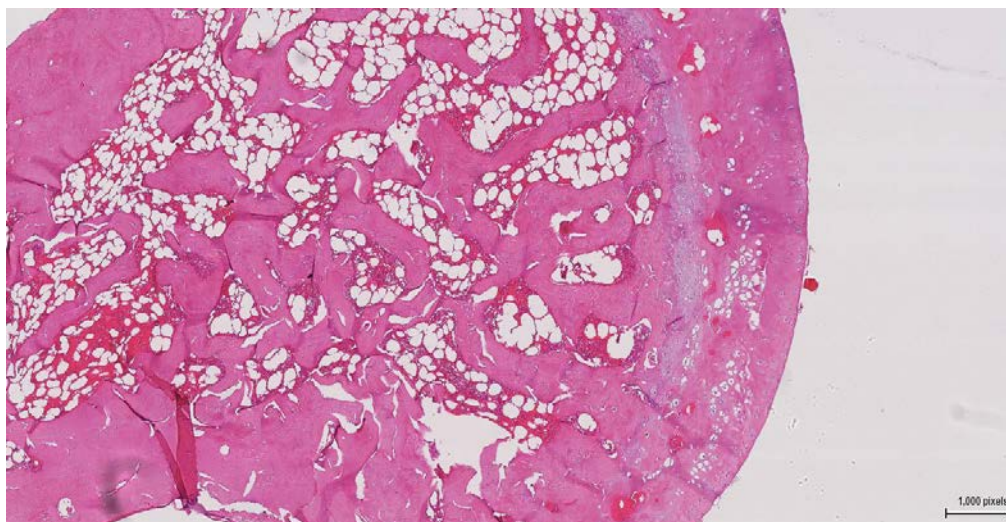


Imagen 51. Sección histológica: fémur, Grupo (IV) Eriocitrina. H.E. 200x

Grupo (V) Citrolive®:

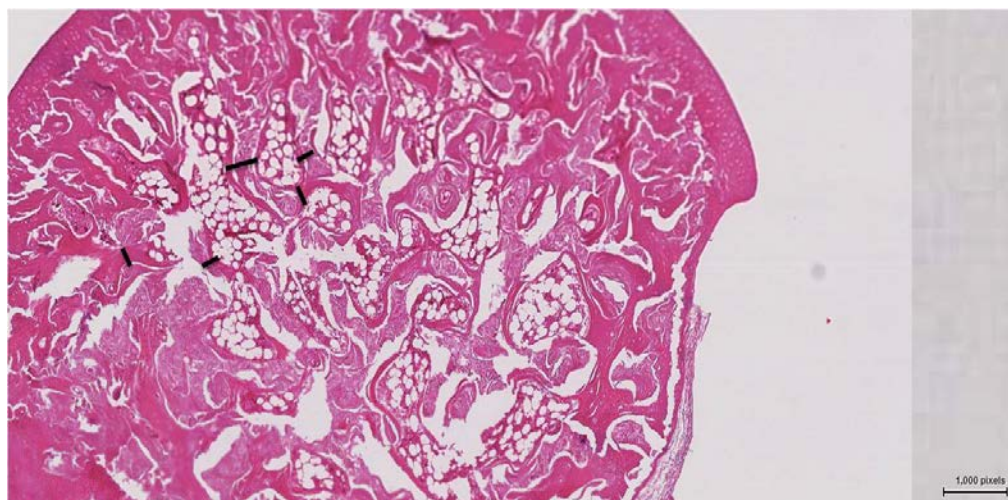
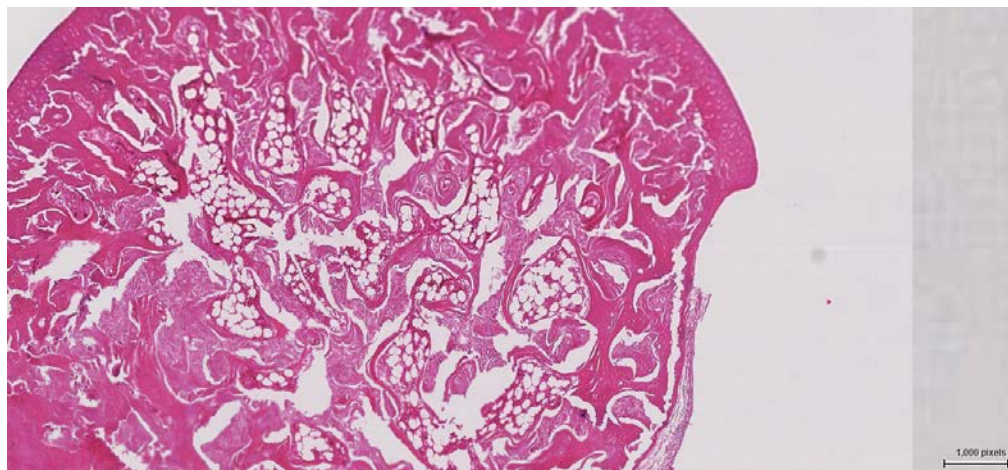


Imagen 52. Sección histológica: fémur, Grupo (V) Citrolive®. H.E. 200x

Estudio histomorfométrico

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

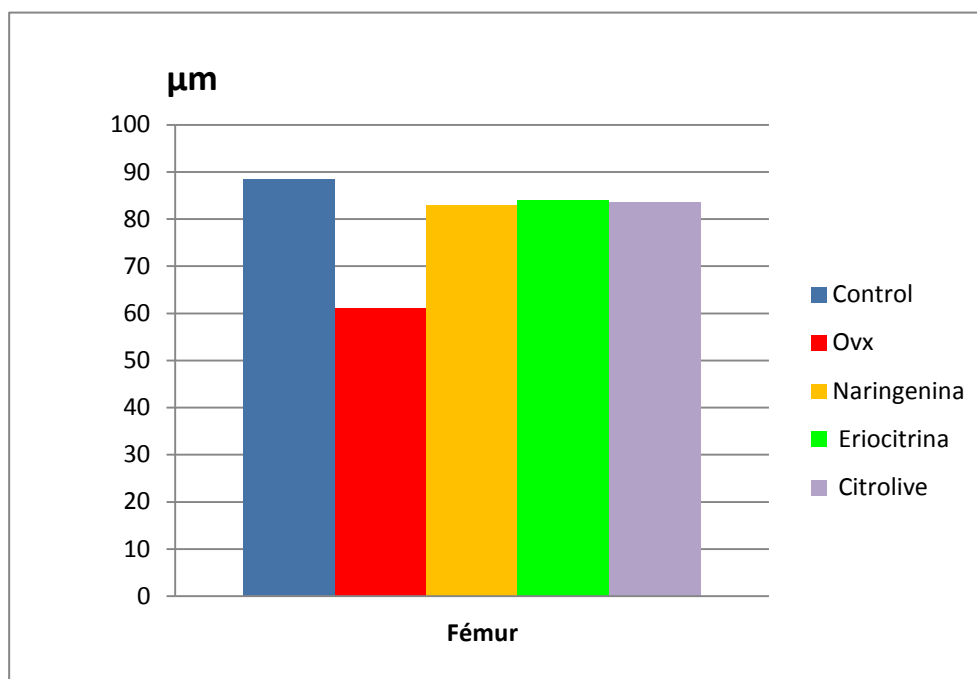
FÉMUR		
Grupos:	Media	Error típico
1 Control	88,399*	5,887
2 OVX	61,114	4,807
3 Naringenina	82,881*	3,308
4 Eriocitrina	83,929*	3,075
5 Citrolive®.	83,472*	3,399

Tabla 16. Resultados estadísticos descriptivos.

* Los valores son estadísticamente significativos respecto al Grupo **(II)** OVX.

Observamos que en el fémur, el grosor de las trabéculas era superior en el Grupo **(I)** Control sano, con una media de $88,40 \pm 5,89 \mu\text{m}$, frente a los $61,15 \pm 4,80 \mu\text{m}$ que mostraba el Grupo **(II)** OVX. Con valores cercanos al Grupo Control **(I)** tenemos los Grupos: **(IV)** Eriocitrina con $83,93 \pm 3,07 \mu\text{m}$, **(V)** Citrolive®. $83,47 \pm 3,40 \mu\text{m}$, y **(III)** Naringenina $82,88 \pm 3,30 \mu\text{m}$.

Observamos diferencias estadísticamente significativa entre el Grupo **(II)** OVX y el resto de Grupos ($P < 0,05$).



Gráfica 14. Media \pm DE del grosor (μm) de las trabéculas en fémur. Entre los valores que presentan asterisco, existe diferencia significativa respecto al Grupo (II): Control OVX ($p < 0,05$).

Medidas histomorfométricas fémur

(I)TRATAMIENTO	(J)TRATAMIENTO	Diferencia de medias (I-J)	Sig. ^a
1 Control	2 OVX	27,285 [*]	,001
	3 Naringenina	5,518	,416
	4Eriocitrina	4,470	,503
	5 Citrolive®.	4,927	,471
2 OVX	1 Control	-27,285 [*]	,001
	3 Naringenina	-21,767 [*]	,000
	4Eriocitrina	-22,815 [*]	,000
	5 Citrolive®.	-22,358 [*]	,000
3 Naringenina	1 Control	-5,518	,416
	2 OVX	21,767 [*]	,000
	4Eriocitrina	-1,047	,817
	5 Citrolive®.	-,591	,901
4 Eriocitrina	1 Control	-4,470	,503
	2 OVX	22,815 [*]	,000
	3 Naringenina	1,047	,817
	5 Citrolive®.	,457	,921
5 Citrolive®.	1 Control	-4,927	,471
	2 OVX	22,358 [*]	,000
	3 Naringenina	,591	,901
	4Eriocitrina	-,457	,921

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

ESTUDIO IONÓMICO ÓSEO

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

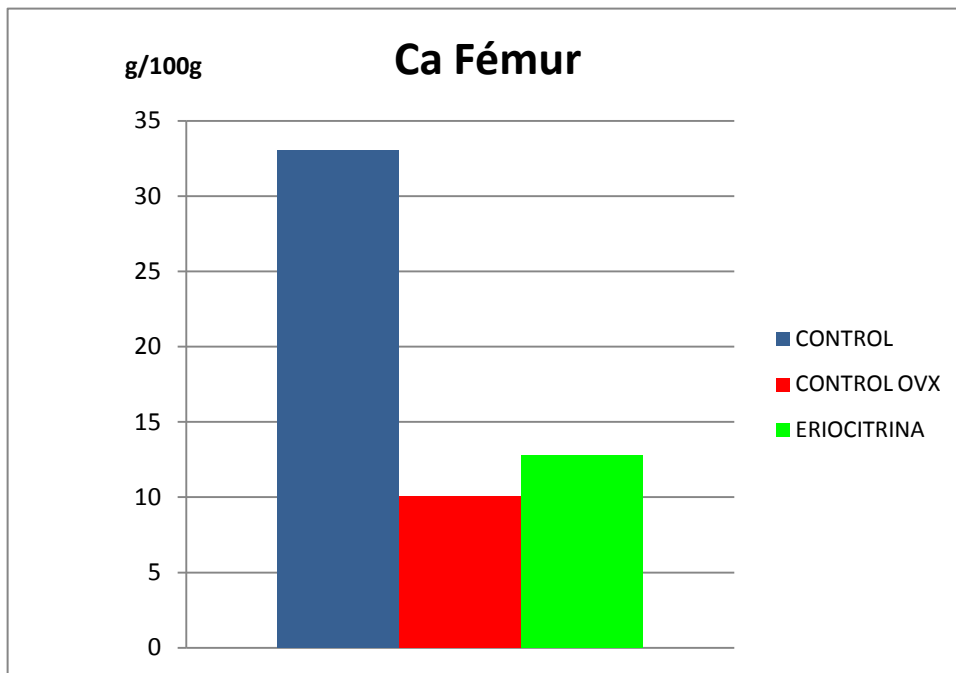
1. Calcio:

GRUPO	MEDIA Ca \pm Des Típ	
	Fémur	Tibia
CONTROL	33,05 \pm 6,56	28,79 \pm 2,42
OVX	10,03 \pm 4,90	10,52 \pm 3,70
ERIOCITRINA	12,82 \pm 10,60	9,59 \pm 4,67

Tabla 18. Media del calcio (g/100g) y desviación típica clasificado por hueso.

Fémur:

En el fémur encontramos que el valor medio de calcio más alto correspondía al Grupo **(I)** Control: 33,05 \pm 6,56 g/100g, y el más bajo al Grupo **(II)** OVX con 10,03 \pm 4,90 g/100g. El Grupo **(IV)** Eriocitrina obtiene unos valores de 12,82 \pm 10,60 g/100g ligeramente superiores al Grupo **(II)** OVX. Encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el Grupo **(I)** Control y los Grupos **(II)** OVX y **(IV)** Eriocitrina.



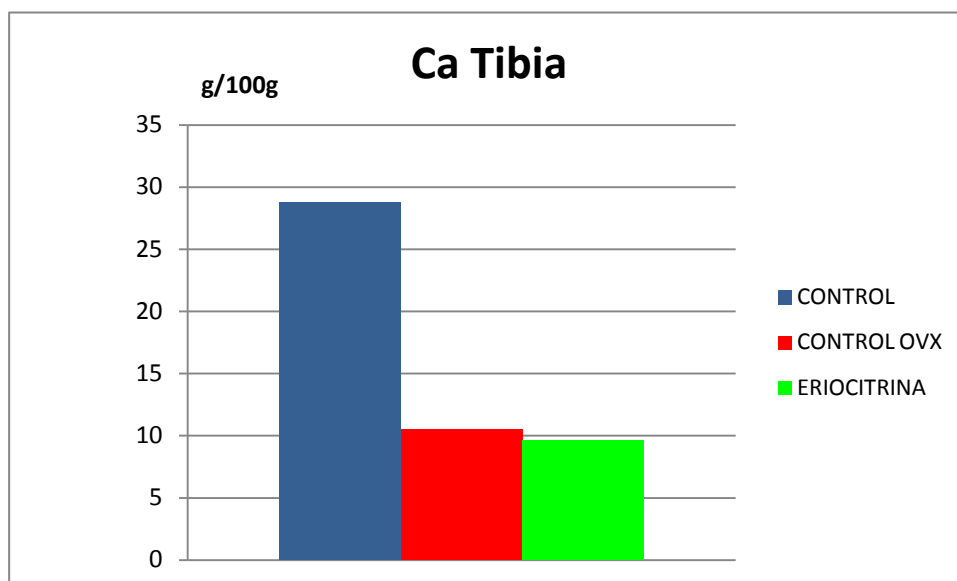
Gráfica 15. Representación de la media \pm DE de calcio en fémur por Grupos.

Calcio Fémur			
(I)Grupo	(J)Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Sig. ^a
Control	Control OVX	23,025	0,000
	Eriocitrina	20,234	0,000
Control OVX	Control	23,025	0,000
	Eriocitrina	2,790	0,454
Eriocitrina	Control	20,234	0,000
	Control OVX	2,790	0,454

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

Tibia:

El valor medio más alto lo encontramos en las tibias del Grupo **(I)** Control, con $28,79 \pm 2,42$ g/100g., el Grupo **(II)** Control OVX obtuvo el valor más bajo: $10,52 \pm 3,70$ g/100g. El Grupo **(IV)** de Eriocitrina ofrece valores inferiores al Grupo **(II)** OVX con $9,59 \pm 4,67$ g/100g. Encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el Grupo **(I)** Control y los Grupos **(II)** OVX y **(IV)** Eriocitrina.



Gráfica 16. Representación de la media \pm DE de calcio en tibia por Grupos.

Calcio Tibia			
(I)Grupo	(J)Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Sig. ^a
Control	Control OVX	18,272	0,000
	Eriocitrina	19,206	0,000
Control OVX	Control	18,272	0,000
	Eriocitrina	0,933	0,597
Eriocitrina	Control	19,206	0,000
	OVX	0,933	0,597

Tabla 20. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

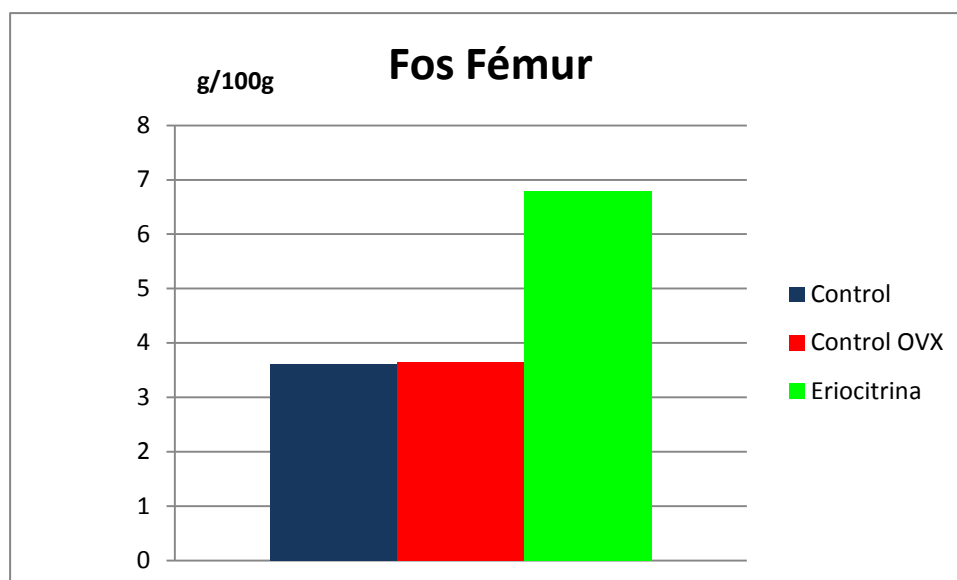
2. Fósforo:

GRUPO	MEDIA P ± Des Típ	
	Fémur	Tibia
CONTROL	3,61 ± 1,26	3,83 ± 0,83
CONTROL OVX	3,64 ± 0,74	4,44 ± 1,26
ERIOCITRINA	6,80 ± 5,22	5,80 ± 3,24

Tabla 21. Media y desviación típica del fósforo (g/100g) clasificado por hueso.

Fémur:

El valor más alto de la media de fósforo en el fémur lo encontramos en el Grupo **(IV)** tratado con Eriocitrina que presentaba $6,80 \pm 5,22$ g/100g, y con valores muy similares los Grupos: **(I)** Control y **(II)** OVX con $3,61 \pm 1,26$ g/100g y $3,64 \pm 0,74$ g/100g respectivamente. Encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el Grupo **(IV)** Eriocitrina y los Grupos **(I)** y **(II)** Control y OVX respectivamente.



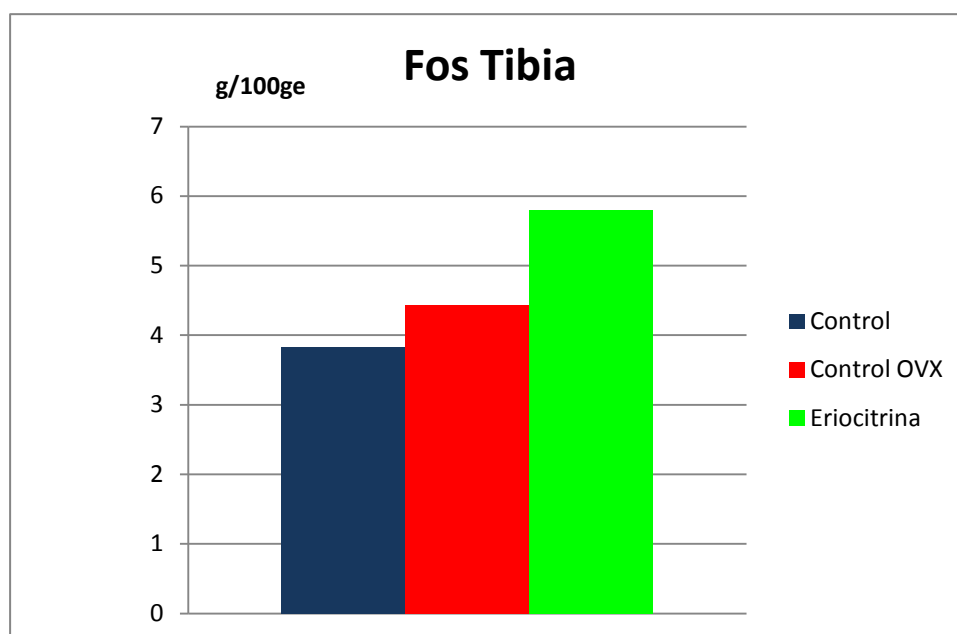
Gráfica 17. Representación de la media \pm DE de fósforo en fémur por Grupos.

Fósforo Fémur			
(I)Grupo	(J)Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Sig. ^a
Control	Control OVX	0,023	0,983
	Eriocitrina	3,185	0,022
Control OVX	Control	0,023	0,983
	Eriocitrina	3,162	0,025
Eriocitrina	Control	3,185	0,022
	Control OVX	3,162	0,025

Tabla 22. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tibia:

El valor más alto lo encontramos en el Grupo **(IV)** tratado con Eriocitrina, siendo $5,80 \pm 3,24$ g/100g, seguidos por el Grupo **(II)** OVX, que mostraba un valor más alto que el del Grupo **(I)** Control: $4,44 \pm 1,26$ g/100g frente a $3,83 \pm 0,83$ g/100g. Encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el Grupo **(I)** Control y el Grupo **(IV)** Eriocitrina.



Gráfica 18. Representación de la media \pm DE de fósforo en tibia por Grupos.

Fósforo Tibia			
(I)Grupo	(J)Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Sig.^a
Control	Control OVX	0,613	0,436
	Eriocitrina	1,970	0,034
Control OVX	Control	0,613	0,436
	Eriocitrina	1,356	0,135
Eriocitrina	Control	1,970	0,034
	Control OVX	1,356	0,135

Tabla 23. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

3. Boro, magnesio y zinc:

MEDIA	Boro		Magnesio		Zinc	
	Fémur	Tibia	Fémur	Tibia	Fémur	Tibia
Grupo:	Fémur	Tibia	Fémur	Tibia	Fémur	Tibia
Control	11,65	11,23	0,33	0,33	140,56	165,17
Control OVX	8,33	5,99	0,26	0,17	165,95	141,65
Eriocitrina	7,34	5,40	0,25	0,18	245,54	148,63
Desv. Tip.	Boro		Magnesio		Zinc	
Grupo:	Fémur	Tibia	Fémur	Tibia	Fémur	Tibia
Control	5,18	2,98	0,07	0,04	10,63	17,42
Control OVX	8,80	1,16	0,30	0,04	43,65	35,57
Eriocitrina	3,99	1,76	0,13	0,05	128,82	24,23

Tabla 24. Medias y desviación típica del boro (mg/kg), magnesio (g/100g) y zinc (mg/kg), clasificados por hueso.

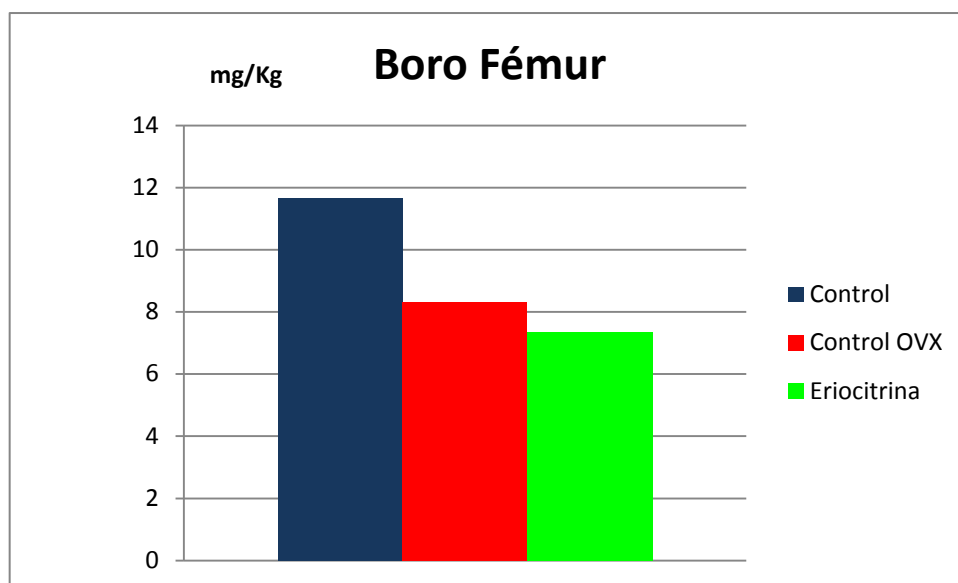
Fémur:

Respecto al boro, los valores más elevados los observamos en el Grupo **(I)** Control y **(II)** OVX con $11,65 \pm 5,18$ y $8,33 \pm 8,80$ mg/kg respectivamente, y siendo el más bajo el del Grupo **(IV)** Eriocitrina con valores de: $7,34 \pm 3,99$ mg/kg. No existían diferencias estadísticamente significativas.

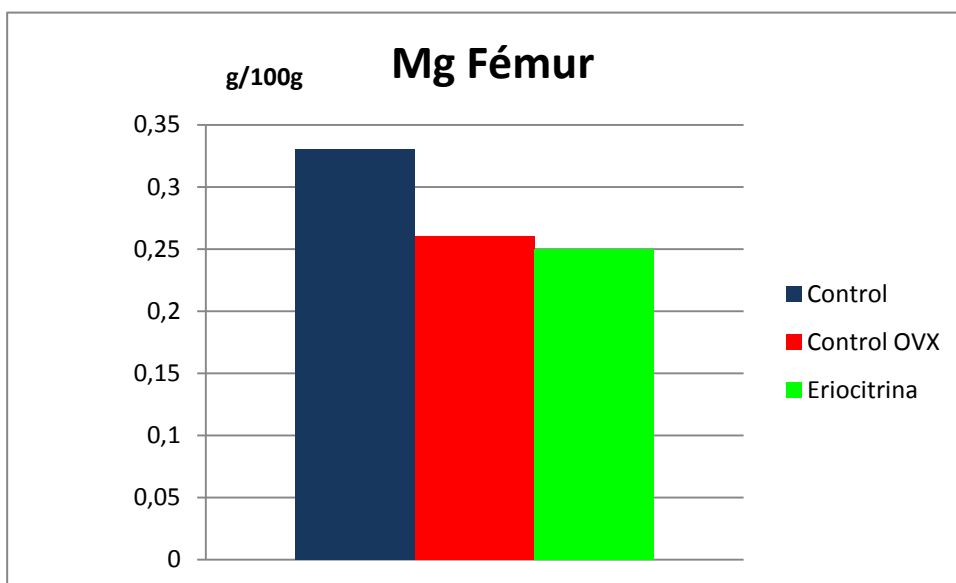
Resultados

En el magnesio, los valores son muy similares entre los Grupos, siendo el más alto el del Grupo **(I)** Control con $0,33\pm 0,07$ g/100, seguido por el Grupo **(II)** OVX con $0,26\pm 0,30$ g/100g. y por último el Grupo **(IV)** de Eriocitrina con $0,25\pm 0,13$ g/100g. No existían diferencias estadísticamente significativas.

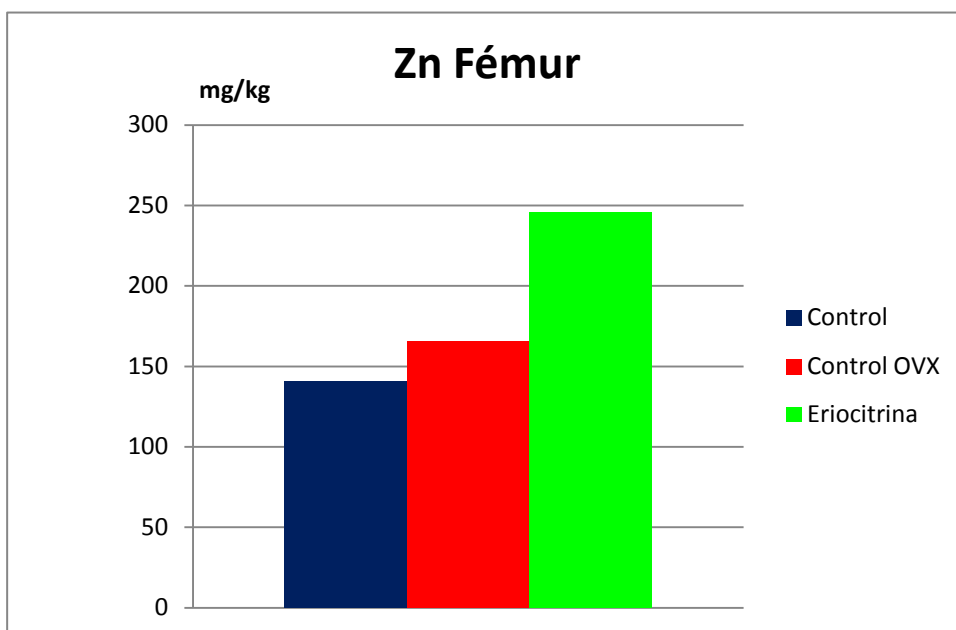
Por último, respecto al zinc, el Grupo **(IV)** Eriocitrina mostró los niveles más elevados $245,54\pm 128,82$ g/100g seguido por el Grupo Control **(II)** OVX con $165,95\pm 43,65$ mg/kg, y por último el Grupo **(I)** Control obtuvo un valor de $140,56\pm 10,63$ mg/kg. Con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el Grupo **(I)** Control y Grupo **(IV)** Eriocitrina.



Gráfica 19. Representación de la media \pm DE de boro en fémur por Grupos.



Gráfica 20. Representación de la media \pm DE de magnesio en fémur por Grupos.



Gráfica 21. Representación de la media \pm DE de zinc en fémur por Grupos.

Fémur			
(I)Grupo	(J)Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Sig.^a
Boro			
Control	Control OVX	3,316	0,303
	Eriocitrina	4,308	0,379
Control OVX	Control	-3,316	0,303
	Eriocitrina	0,992	0,838
Eriocitrina	Control	-4,308	0,379
	Control OVX	-0,992	0,838
Magnesio			
Control	Control OVX	0,061	0,529
	Eriocitrina	0,079	0,592
Control OVX	Control	-0,061	0,529
	Eriocitrina	0,018	0,902
Eriocitrina	Control	-0,079	0,592
	Control OVX	-0,018	0,902
Zinc			
Control	Control OVX	-25,389	0,416
	Eriocitrina	- 104,977	0,027
Control OVX	Control	25,389	0,416
	Eriocitrina	-79,588	0,068
Eriocitrina	Control	104,97	0,027
	Control OVX	79,588	0,068

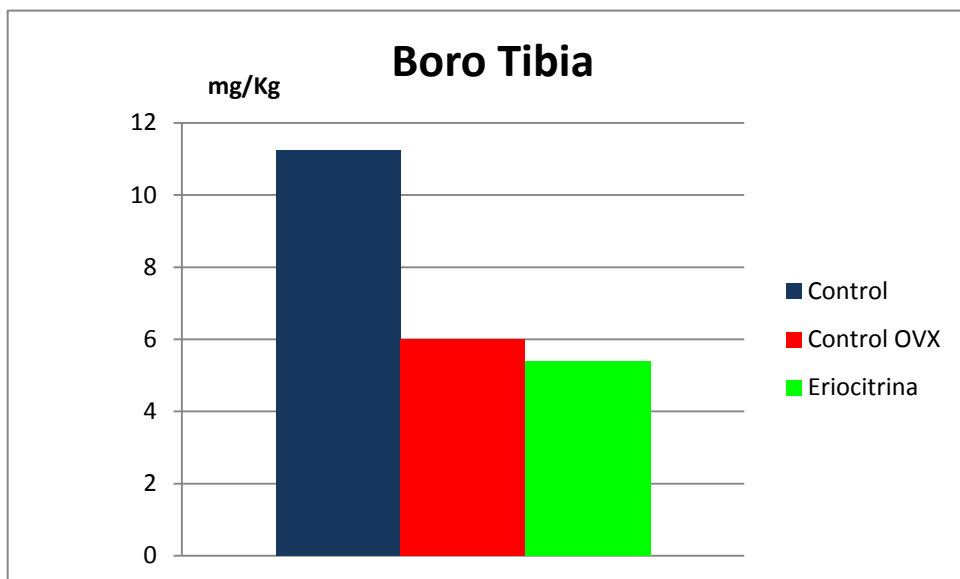
Tabla 25. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel ($p < 0,05$).

Tibia:

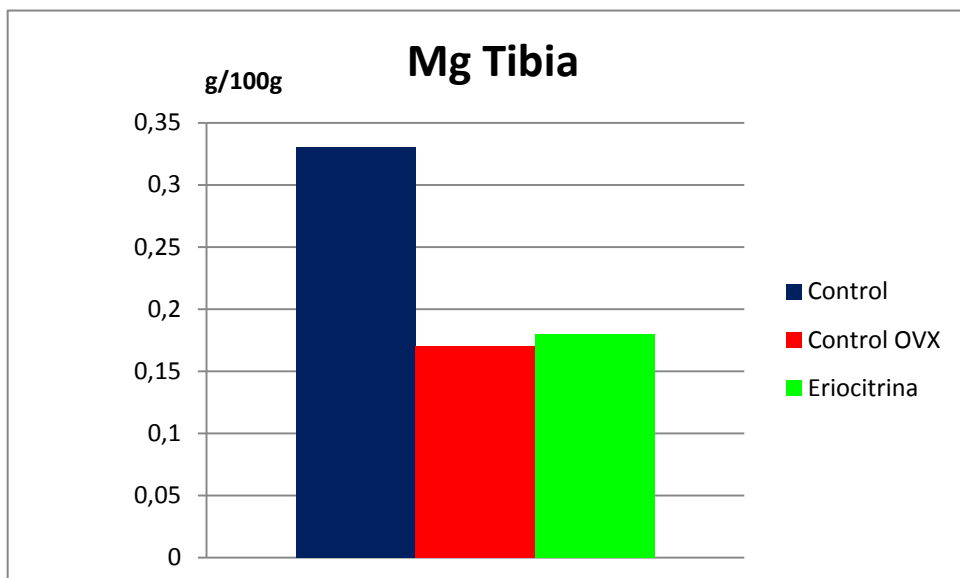
Respecto al boro, el Grupo **(I)** Control obtuvo valores más elevados que el resto de los Grupos ($11,22 \pm 2,98$ mg/kg), con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Le seguía el Grupo **(II)** OVX ($5,99 \pm 1,16$ mg/kg) y el Grupo **(IV)** Eriocitrina con $5,40 \pm 1,76$ mg/kg. Encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el Grupo **(I)** Control y los Grupos **(II)** Control OVX y el Grupo **(IV)** Eriocitrina.

En el caso del magnesio, había diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre todos los Grupos y el Grupo **(II)** OVX, que presentaba los niveles más bajos de este elemento: $0,17 \pm 0,04$ g/100g, seguido por muy poca diferencia por el Grupo **(IV)** tratado con Eriocitrina con $0,18 \pm 0,05$ g/100g y obteniendo los valores más altos el Grupo **(I)** Control: $0,33 \pm 0,04$ g/100g,. Encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el Grupo **(I)** Control y los Grupos **(II)** Control OVX y el Grupo **(IV)** Eriocitrina.

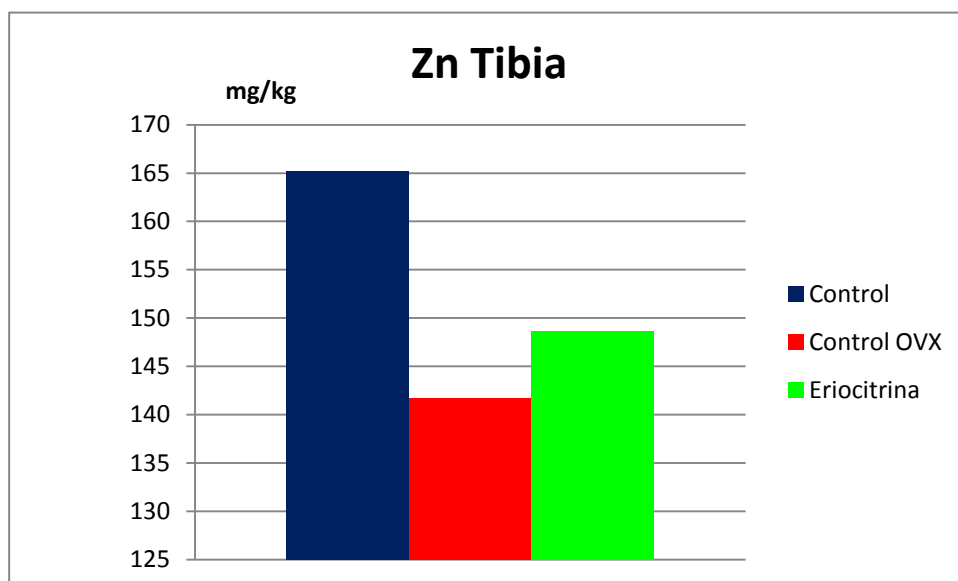
Por último, en el caso del zinc, el valor más bajo lo presentaba el Grupo **(II)** OVX con $141,65 \pm 35,57$ mg/kg, seguido por el Grupo **(IV)** de Eriocitrina con $148,63 \pm 24,24$ mg/kg, y con el valor más alto el Grupo **(I)** Control con $165,17 \pm 17,42$ mg/kg. No existen diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 22. Representación de la media \pm DE de boro en tibia por Grupos.



Gráfica 23. Representación de la media \pm DE de magnesio en tibia por Grupos.



Gráfica 24. Representación de la media \pm DE de zinc en tibia por Grupos.

Tibia			
(I)Grupo	(J)Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Sig.^a
Boro			
Control	Control OVX	5,236	0,000
	Eriocitrina	5,822	0,000
Control OVX	Control	-5,236	0,000
	Eriocitrina	0,586	0,680
Eriocitrina	Control	-5,822	0,000
	Control OVX	0,586	0,680
Magnesio			
Control	Control OVX	0,155	0,000
	Eriocitrina	0,150	0,000
Control OVX	Control	-0,155	0,000
	Eriocitrina	-0,005	0,831
Eriocitrina	Control	-0,150	0,000
	Control OVX	0,005	0,831
Zinc			
Control	Control OVX	23,519	0,097
	Eriocitrina	16,539	0,410
Control OVX	Control	-23,519	0,097
	Eriocitrina	-6,979	0,716
Eriocitrina	Control	-16,539	0,410
	Control OVX	6,979	0,716

Tabla 26. Pruebas post hoc. Comparaciones múltiples. La diferencia de medias es significativa al nivel ($p < 0,05$).

RESUMEN:			Grupo I:	Grupo II:	Grupo III:	Grupo IV:	Grupo V	
			Control	OVX	Naringenina	Eriocitrina	Citrolive®.	
Peso (incremento)		g	19,37	116,81	111,30	106,70	109,84	
Bioquímica	Ca ²	mg/dl	10,97	9,77	10,75	10,38	10,53	
	FOS	mg/dl	5,80	3,95	4,99	4,86	4,20	
	ALPt	U/L	141,50	89,83	219,30	150,60	152,88	
μTC	BV/TV	%	5,82	3,79	3,78	5,51	5,47	
	BS/TV	mm ⁻¹	46,65	67,93	52,38	47,42	50,44	
	Tb.N	μm	0,67	0,56	0,47	0,65	0,67	
	Tb.Pf	mm ⁻¹	15,22	25,64	20,15	16,06	16,63	
	Ct.Th	μm	312,93	142,76	466,45	541,04	281,46	
	B.Ar	Mm ²	6,15	5,51	5,26	4,87	6,34	
Histo. ósea	Fémur	μm	88,399	61,114	82,881	83,929	83,472	
Est. Ionómico	Ca	Fémur	g/100g	33,05	10,03	--	12,82	--
		Tibia		28,79	10,52	--	9,59	--
	Fos	Fémur	g/100g	3,61	3,64	--	6,80	--
		Tibia		3,83	4,44	--	5,80	--
	B	Fémur	mg/kg	11,65	8,33	--	7,34	--
		Tibia		11,23	5,99	--	5,40	--
	Mg	Fémur	g/100g	0,33	0,26	--	0,25	--
		Tibia		0,33	0,17	--	0,18	--
	Zn	Fémur	mg/kg	140,56	165,95	--	245,54	--
		Tibia		165,16	141,64	--	148,63	--

Tabla 27. Resumen con los parámetros más relevantes obtenidos mediante los diferentes métodos empleados.

VI. DISCUSIÓN

La osteoporosis se define como "una *enfermedad esquelética diseminada y caracterizada por una resistencia ósea disminuida que incrementa el riesgo de padecer fracturas*" (NIH, 2001). Esta pérdida progresiva de la masa ósea es debida a un desequilibrio en el remodelado óseo, que comienza por la pérdida de los minerales que otorgan las características de dureza y densidad propias de un hueso normal (osteopenia) y se considera que existe osteoporosis cuando la pérdida de masa ósea es tan importante que causa fragilidad ósea y por tanto fracturas.

Dicho desequilibrio está influenciado por numerosos factores de riesgo, entre los que destacan: antecedentes familiares, sedentarismo, enfermedades relacionadas con las hormonas, fármacos como los glucocorticoides, falta de ingesta de calcio, delgadez extrema, etc., no obstante, la causa principal corresponde a la deprivación hormonal característica del envejecimiento natural, sobre todo en la mujer, de modo que la prevalencia es de 52% en las mujeres mayores de 70 años (SEIOMM, 2003) y como consecuencia del envejecimiento de la población mundial, se estima que el riesgo de padecerla aumente hasta un 280% en el año 2050 (IOF, 2010).

La osteoporosis se considera como una enfermedad silenciosa, pues normalmente es diagnosticada por sus complicaciones, es decir después de presentarse la primera fractura, por lo que los tratamientos suelen estar dirigidos a ralentizar la destrucción de la masa ósea una vez detectado el problema. Entre los fármacos más utilizados, se encuentran los bifosfonatos, que corresponden al tratamiento de primera elección por su acción inhibitoria de los osteoclastos, seguidos de los tratamientos hormonales con calcitonina. El raloxifeno es un fármaco cuya función es similar a la terapia sustitutiva con estrógenos, pero no causa los efectos secundarios provocados por ésta. Y por último, los tratamientos menos usados son los

osteoformadores como la hormona paratiroidea y el ranelato de estroncio, que aumentan la actividad de los osteoblastos.

El objetivo principal de la medicina consiste en prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad. En la prevención de la osteoporosis además del ahorro económico del sistema sanitario; el hecho de tomar las medidas adecuadas una vez alcanzado el pico máximo de masa ósea (lo que ocurre hacia los 23-25 años), lograría retrasar la aparición de la enfermedad y por tanto una evolución más lenta del proceso, que pretende mejorar la calidad de vida del paciente. Para ello se ha recomendado la instauración de hábitos de vida saludables, tales como hacer una actividad física moderada pero constante, evitar las conductas nocivas como el exceso del tabaco y alcohol, y sobre todo mantener una buena alimentación rica en calcio y vitamina D.

En nuestro trabajo nos planteamos como primer objetivo, desarrollar un modelo experimental de inducción de osteoporosis mediante la deprivación estrogénica por ovariectomía utilizando como modelo animal la rata hembra Sprague–Dawley.

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

Analogía entre el modelo y el sistema a investigar, con el fin de conseguir resultados extrapolables.

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

Características biológicas del modelo que garanticen la validez del diseño experimental.

Aspectos de disponibilidad, costo y facilidad de manipulación que garanticen seleccionar el modelo que permita lograr el objetivo.

Aspectos ecológicos, por su impacto sobre el medio ambiente.

Aspectos éticos, con la utilización del mínimo número de animales, que pueda lograr el objetivo con el nivel adecuado de certidumbre estadística y biológica.

Así como que el modelo seleccionado no introduzca variables que interfieran con las que serán evaluadas.

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

Para nuestro trabajo, tras valorar diferentes modelos animales y los métodos de inducción de la osteoporosis, elegimos el modelo de osteoporosis secundaria a ovariectomía bilateral por deprivación estrogénica

en ratas Sprague-Dawley. Los motivos fueron, principalmente, la facilidad y rapidez para inducir la enfermedad mediante ovariectomía, y de forma secundaria: su bajo coste económico y la facilidad de manejo del animal tanto en el mantenimiento como a la hora de realizar pruebas analíticas como la extracción de sangre o la medición del peso.

En la bibliografía consultada hay recogidas otras formas de inducir la osteoporosis de manera más rápida, como es la combinación de ovariectomía y el tratamiento con glucocorticoides, ya que la pérdida de hueso trabecular y cortical que se consigue es significativa y se obtiene en cortos periodos de tiempo (*Castañeda, 2006*). Sin embargo, las dosis óptimas de corticoides para inducir pérdidas significativas de la masa ósea en esta especie no están bien estandarizadas y además, la pérdida inducida por glucocorticoides se caracteriza por una disminución rápida de la masa ósea del hueso trabecular y cortical (*Grardel, 1994; Chavassieux, 1997*), por lo que al comparar los resultados obtenidos con ambos métodos, los datos son controvertidos e incluso discordantes (*Gardel, 1994*).

Asimismo, los corticoides producen un incremento en la resorción osteoclástica y una disminución de la formación ósea a nivel del hueso subarticular (*Eberhardt, 2001*). Estos pueden, además, ocasionar una parada en la maduración del linaje osteoblástico, así como inducir la muerte celular por apoptosis en fases tempranas (*Canalis, 2004*). Por otro lado, las dosis elevadas producen con frecuencia necrosis del hueso subcondral e incluso una alta mortalidad en el conejo (*Miyaniishi, 2005*). Por lo que no suele ser un método recomendable.

Por todo lo anterior, en nuestro trabajo experimental decidimos establecer el mecanismo de inducción de la osteoporosis realizando exclusivamente la ovariectomía sin administración de corticoides. Aunque parece que este método de ovariectomía precisa un mayor tiempo de

evolución para obtener los resultados deseados, consideramos relevante evitar la presentación de los posibles efectos adversos derivados del uso de corticoides.

En nuestro estudio el modelo experimental de inducción de osteoporosis desarrollado ha demostrado, por un lado, que la utilización aislada de la ovariectomía en la rata **Sprague-Dawley** fue totalmente eficaz para provocar la osteoporosis como demuestran los resultados de los distintos métodos de estudio utilizados: determinación del peso corporal, bioquímico, morfología ósea mediante microtomografía computerizada, anatomopatológico óseo e ionómico óseo.

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

En nuestro estudio también pudimos comprobar este hecho, ya que observamos un aumento de peso mayor de 100 g en las ratas que fueron ovariectomizadas, mientras que los animales del Grupo **(I)** Control aumentaron alrededor de 20 g solamente. El aumento de peso fue brusco un mes después de la ovariectomía, sobre todo en el Grupo **(II)** OVX, para continuar ganando peso de manera más lenta hasta el final del experimento.

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

Los niveles séricos de calcio de los animales de nuestro estudio, tanto sanos como ovariectomizados, no se alteraron de forma significativa a lo largo del experimento, como también ocurre en los pacientes osteoporóticos. Los valores del fósforo fueron más variables, pero tampoco mostraron diferencias significativas.

En el caso de la fosfatasa alcalina total, mientras que en el grupo control **(I)** se mantuvo estable, en el grupo control OVX **(II)** fue decreciendo a lo largo del experimento, existiendo entre ambos grupos una diferencia considerable. La fosfatasa alcalina total (ALPt) es un marcador de formación ósea en suero. Existen 4 isoenzimas diferentes: ALP placentaria, ALP intestinal, ALP de las células germinales y la más común que se encuentra en el hígado, riñón y hueso (*Cons, 2003*). Habitualmente, en los pacientes con osteoporosis se ven incrementados los niveles de ALPt y hasta el doble de los valores normales por el aumento de la actividad osteoblástica en el remodelado óseo. También incrementa su nivel con la presencia de fracturas u alteraciones del metabolismo óseo como en la enfermedad de Paget o en la osteomalacia (*Delmas, 1990; Watkins, 2005; Zhang, 2007*). Sin embargo, para muchos autores, se trata de un marcador de dudosa fiabilidad (*Zacarías, 2006*). De hecho, en nuestro estudio hemos observado la situación contraria (descenso de ALPt) en los animales control OVX **(II)** y valores muy variables en los de los grupos tratados **(III, IV y V)**.

En la bibliografía consultada, en ratas sometidas a ovariectomía, también suele observarse un aumento de la ALP_t y en relación a los grupos sin operar (*Zeni, 1997; Shirwaikar, 2003*). Sin embargo, algunos autores han descrito niveles similares de estas enzimas en animales ovariectomizados y no ovariectomizados (*Arjmahti, 1996; Brem, 2005*), e incluso, la situación contraria, es decir, niveles inferiores de ALP_t y en los animales ovariectomizados respecto a los Control (*Chang, 2013*), lo que coincide con nuestros resultados.

Diversos estudios han demostrado que medir la densidad ósea es insuficiente para valorar el riesgo de fractura (*Damilakis, 2007*), por ello el estudio de la microarquitectura ósea es una prueba complementaria que ha ido ganando importancia en los últimos años (*Nieto, 2008*). Por este motivo, en nuestro trabajo, además del estudio bioquímico, hemos realizado el análisis de la calidad del hueso a través de la microtomografía computerizada (μ TC), que nos ha permitido la visualización del hueso en dos y tres dimensiones y el análisis microestructural cuantitativo del hueso trabecular y cortical con una alta resolución en las imágenes (*Shuller, 1992*).

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

En nuestro estudio, el análisis de las imágenes obtenidas mediante este método, demostró un deterioro de la estructura ósea respecto al Control, con adelgazamiento y distribución irregular de las trabéculas óseas y la existencia de amplios espacios inter-trabeculares, fundamentalmente a nivel del hueso trabecular, que mostraba una estructura menos densa y por consiguiente, un notable aumento de la fragilidad y predisposición a la

fractura. Destacaba el estudio del área trabecular del fémur, en el que los animales del grupo **(II)** OVX, mostraron menor porcentaje del volumen de hueso (BV/TV), menor densidad y grosor trabecular (BS/TV y Tb.Th), mucho mayor espacio intertrabecular (Tb.Sp), menor número de trabéculas (Tb.N) y menor conectividad entre las mismas (Tb.Pf), respecto a los controles sanos.

Asimismo, el estudio anatomopatológico de los fémures de las ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas, demostró también la disminución de la masa ósea, que estaba caracterizada fundamentalmente por la reducción del número y tamaño de las trabéculas óseas así como la alteración de las conexiones entre ellas y la expansión de los espacios intertrabeculares, que mostraban además imágenes de perforación por resorción osteoclástica, confirmando lo descrito en los resultados del método anterior.

El calcio y el fósforo contenidos en el hueso son marcadores fenotípicos de la formación ósea ampliamente aceptados. La determinación de la cantidad presente de estos iones es importante por formar parte de los componentes minerales principales de la matriz del hueso. Los niveles de calcio y de fósforo están relacionados entre sí; el aumento o la disminución de uno conlleva la alteración en los niveles del otro. En nuestro estudio, la presencia de calcio fue menor tanto en el fémur como en la tibia de los animales control OVX **(II)** respecto a los controles sanos (I), mostrando diferencias estadísticamente significativas.

También hemos estudiado las cantidades de magnesio, boro y zinc presentes en nuestras muestras, por encontrarse éstos en el interior de las células que forman parte de la matriz. Debido a que estos elementos son intracelulares, su regulación no depende directamente de las hormonas.

Las mayores concentraciones de boro se encuentran en el hueso (Murray, 1998), y en menor cantidad en el riñón, pulmón, ganglios linfáticos,

hígado, testículo y cerebro (Nielsen, 1986). No se conoce con exactitud su función en el organismo, pero sí se sabe que es un componente esencial de la matriz ósea, otorgándole fuerza y consistencia. Su concentración está relacionada con las concentraciones de Ca, P, Mg y Zn, equilibrando las deficiencias cuando hay una disminución de los niveles de alguno de estos elementos (Nielsen, 1992).

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

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

En nuestro estudio, observamos una disminución significativa en los niveles de boro y magnesio en los animales del grupo control **(II)** OVX respecto a los del control sano **(I)**.

Por todo lo comentado con anterioridad, consideramos que el modelo animal fue correctamente seleccionado y manipulado, consiguiendo el establecimiento de la osteoporosis en un periodo corto de tiempo y de una forma sencilla y eficaz, que lo hace idóneo para el estudio de sustancias que pudieran prevenir el desarrollo de la enfermedad, como ha sido el propósito de nuestro segundo objetivo.

El **segundo objetivo** de nuestro estudio, consistió en estudiar los efectos de los polifenoles: Naringenina Potásica, Eriocitrina y Citrolive®. Para ello, utilizamos el modelo de osteoporosis secundaria a ovariectomía explicado previamente. Utilizamos 30 animales más, que repartimos en los grupos **III, IV y V**, y que recibieron tratamiento con Naringenina Potásica, Eriocitrina y Citrolive®, en el agua de bebida en dosis de 1mg/kg día respectivamente. El tratamiento se administró desde 10 días antes de la ovariectomía y los animales lo consumían *ad libitum* durante todo el experimento (4 meses).

Como en los grupos control sano (**I**) y control ovariectomía (**II**), para valorar el estado del hueso de los animales tras la deprivación estrogénica, realizamos los siguientes estudios: determinación del peso corporal, bioquímico, morfología ósea mediante microtomografía computerizada, anatomopatológico óseo e ionómico óseo.

Son muchas las evidencias epidemiológicas que indican que existe una asociación entre la ingesta diaria de antioxidantes en la dieta y la salud ósea. Las frutas y verduras son importantes fuentes de antioxidantes fitoquímicos que juegan un papel fundamental en el metabolismo óseo. Un mayor consumo de frutas y verduras se ha asociado con la reducción del riesgo de padecer osteoporosis (Sánchez-Rodríguez, 2007).

De entre los miles de agentes antioxidantes presentes en la dieta, el motivo de la elección de la Naringenina, Eriocitrina y Citrolive® para este modelo de osteoporosis es que forman parte de un proyecto general de nuestro Grupo de Investigación, sobre compuestos fenólicos de acción antioxidante utilizados en diversas patologías experimentales. Los productos fueron seleccionados en base a resultados previos del Grupo de investigación en estudios in vitro e in vivo y a la bibliografía consultada.

De los flavonoides ensayados en nuestro trabajo, la estructura más sencilla es la de la **Naringenina** (5, 7, 4 trihidroxiflavonona), que utilizamos en forma de sal potásica para facilitar su solubilidad en agua. Precisamente se trata de la primera estructura básica en la cadena biosintética de las plantas, siendo un compuesto de naturaleza aglicón (sin restos azucarados en su molécula) y con un esqueleto molecular que muestra una estructura plana (Castillo, 1997; Alvarez, 2010).

La **Eriocitrina** es una flavanona que se encuentra en forma glicosilada en el hidroxilo situado en el C-7. Esta glicosilación es de la estructura β -rutinosido (eriodictyol 7-O-rutinoside). Es abundante en el limón, siendo el flavonoide glucósido de mayor actividad antioxidante presente en esta fruta, pero no en todas las frutas cítricas. Se obtiene a partir de la cáscara de la fruta y se utiliza en numerosos complejos multivitamínicos, en los que han demostrado actividad antioxidante, para mantener la integridad capilar y la circulación periférica. (Rodríguez-Mateos, 2014).

El **Citrolive**[®] está constituido por cuatro Grupos de compuestos, principalmente **oleuropeósidos** (oleuropeína y verbascósido), **flavanonas** (naringina, neohesperidina, neoeriocitrina y hesperidina), **flavonas** (luteolina-7-glucósido, apigenina-7-glucósido, diosmetina-7-glucósido, luteolina y diosmetina) y **fenoles sustituidos** (tirosoles, hidroxitirosoles, ácido vinílico y ácido cafeico). Se trata, por tanto, de una combinación de los principales flavonoides presentes en las frutas cítricas y los del aceite y hoja de olivo.

La información recogida en la literatura científica sugiere que un sistema antioxidante insuficiente contribuye a la patogenia de diversas alteraciones asociadas a la edad, entre ellas la osteoporosis. (Garret, 1990), propusieron que bajo condiciones fisiológicas, las especies reactivas del oxígeno (ROS) producidas por los osteoclastos estimulan y facilitan la resorción ósea. Cuando la producción de ROS sobrepasa la capacidad

antioxidante natural, el estrés oxidativo que se produce, puede provocar la pérdida ósea extensa y fragilidad esquelética características de la osteoporosis. En nuestro trabajo, el efecto antioxidante de los agentes empleados, ha ocasionado la mejoría de los animales tratados en algunos de los parámetros analizados, en relación a los animales ovariectomizados no tratados.

En el estudio del peso de los animales, al final del experimento, todos los animales de los Grupos ovariectomizados presentaron un incremento significativo del mismo respecto a los controles sanos, lo que coincide con lo descrito por otros autores. Sin embargo, en los animales de los grupos tratados, el aumento de peso no fue tan brusco como en el grupo control OVX **(II)**.

En el estudio bioquímico, los niveles séricos de calcio y fósforo se mantuvieron estables en todos los Grupos experimentales mientras que los niveles de fosfatasa alcalina total fueron variables. Así, en el caso de la Naringenina **(III)**, los valores de ALP_t se vieron incrementados tras la ovariectomía de forma significativa respecto al control sano, como suele ocurrir en humanos. Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, tanto el grupo control OVX **(II)**, como el resto de tratamientos **(IV y V)**, mostraron un comportamiento inverso, reduciéndose los niveles por debajo del control, por lo que consideramos poco fiables los resultados respecto a este marcador. Resultados similares fueron obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación (*Mostazo, 2013*), por lo que en dicha ocasión se decidió estudiar la forma aislada de la isoenzima ALP ósea. Los resultados obtenidos fueron similares (en proporción) a los de la fracción total de la enzima, por lo que en este estudio decidimos no realizar dicho método, que es más complejo y costoso.

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

En este sentido, la determinación del porcentaje medio del volumen del hueso trabecular total (BV/TV) y la densidad trabecular (BS/TV) son dos de los parámetros analizados por el μ TC que aportan mayor valor diagnóstico y pronóstico. En nuestro estudio, el BV/TV de la región estudiada, fue mayor en los Grupos: **(I)** Control 5,82%, **(IV)** Eriocitrina 5,51% y **(V)** Citrolive® 5,47%, que en el Grupo **(II)** Control OVX 3,79%. Además, el hueso trabecular era de una densidad mayor (BS/TV) en los Grupos **(IV y V)** tratados con Eriocitrina 2.61 mm^{-1} y Citrolive® $2,76 \text{ mm}^{-1}$ respectivamente, que en el Control **(II)** OVX $2,57 \text{ mm}^{-1}$ aunque no de forma significativa.

En cuanto a los parámetros relacionados con las trabéculas: el grosor trabecular (Tb.Th), todos Grupos tratados mostraron valores superiores al Grupo **(II)** OVX, $67,46 \text{ mm}^{-1}$, destacando el Grupo **(IV)** Eriocitrina, con $84,38 \text{ mm}^{-1}$, seguido por el Grupo **(V)** Citrolive con $81,15 \text{ mm}^{-1}$ y el Grupo **(III)** Naringenina, $80,54 \text{ mm}^{-1}$. En el espacio entre trabéculas (Tb.Sp), fue el Grupo **(IV)** Eriocitrina con $1087,85 \text{ mm}^{-1}$, el que presentó valores superiores al Grupo **(II)** Control OVX, $1079,37 \text{ mm}^{-1}$. El número de trabéculas que atravesaban el espacio (Tb.N), fueron superiores al Grupo **(II)** OVX $0,56 \mu\text{m}$, e incluso obtuvieron valores parecidos al Grupo **(I)** Control $0,67 \mu\text{m}$, los Grupos **(IV)** Eriocitrina y **(V)** Citrolive con valores de $0,65 \mu\text{m}$ y $0,67 \mu\text{m}$ respectivamente. En el índice de conectividad entre trabéculas (Tb.Pf), destacaron los Grupos **(V)** Citrolive $16,63 \text{ mm}^{-1}$ y **(IV)** Eriocitrina $16,06$

mm^{-1} sobre los resultados del Grupo **(II)** OVX, con $25,64 \text{ mm}^{-1}$. Los Grupos tratados con Eriocitrina y Citrolive® mostraron valores superiores al Grupo **(II)** OVX, sin diferencias estadísticamente significativas.

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

De hecho, en nuestro estudio, los parámetros que medían el hueso cortical tanto en 2D (Ct.Th) como en 3D (Cs.Th) evidenciaron una diferencia sustancial entre los Grupos **(I, III, IV y V)** y el Grupo **(II)** Control OVX. Así, observamos un grosor de la pared cortical de: $541,04 \mu\text{m}$ (Ct.Th) y $449,23 \mu\text{m}$ (Cs.Th) para el Grupo **(IV)** Eriocitrina, de $466,45 \mu\text{m}$ (Ct.Th) y $443,57 \mu\text{m}$ (Cs.Th) en el Grupo **(III)** Naringenina, de $281,46 \mu\text{m}$ (Ct.Th) y $406,94 \mu\text{m}$ (Cs.Th) para el Grupo **(V)** Citrolive y de $312,93 \pm 2,16 \mu\text{m}$ (Ct.Th) y $423,948 \pm 1,44 \mu\text{m}$ (Cs.Th) en el Grupo **(I)** Control; mientras que el grosor de la cortical en el Grupo **(II)** OVX fue solamente de $142,757 \pm 4,89 \mu\text{m}$ (Ct.Th) y $142,033 \pm 4,13 \mu\text{m}$ (Cs.Th).

Por tanto, mediante la microtomografía computerizada, hemos observado efectos beneficiosos de los tratamientos con Eriocitrina, Naringenina y Citrolive® tanto en la región trabecular como en la cortical del fémur.

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

En el estudio anatomopatológico del fémur de los dos Grupos tratados, destacaba fundamentalmente, la menor disminución de la masa ósea y de desconexión entre las trabéculas, respecto al Grupo **(II)** OVX. Así como el aumento del grosor de las mismas y los fenómenos de regeneración ósea, caracterizados por áreas laminales de depósitos de mineral osteoide que se disponían de forma superpuesta, de modo semejante al característico de la remodelación de las trabéculas óseas.

En el estudio histomorfométrico, el mayor grosor trabecular fue observado como era de esperar, en el Grupo **(I)** Control sano ($88,40 \pm 5,89 \mu\text{m}$), frente a los $61,11 \pm 4,80 \mu\text{m}$ que mostraba el Grupo **(II)** Control OVX. Los grupos tratados **(III, IV y V)** mostraron valores similares a los del control sano: $82,88 \pm 3,30$ (Naringenina), $83,93 \pm 3,07$ (Eriocitrina) y $83,47 \pm 3,40$ (Citrolive), con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo **(II)** OVX.

En el estudio ionómico, hemos determinado mediante espectrofotometría, la cantidad en gramos, por cada 100 gramos de muestra ósea, de los iones calcio (Ca), fósforo (P), boro (Br), magnesio (Mg) y zinc (Zn). Este estudio se realizó en los animales control **(I y II)** y en los tratados con Eriocitrina **(IV)**. Debido a que es un método caro y la Eriocitrina parecía haber mostrado los mejores resultados en los métodos previos, decidimos realizar este estudio sobre dichas muestras.

Respecto al calcio óseo, sus niveles fueron más elevados tanto en fémur como en tibia en el Grupo **(I)** Control, que en los grupos ovariectomizados **(II y IV)**. El grupo Eriocitrina **(IV)** obtuvo un incremento no significativo en el fémur y valores similares en la tibia, respecto al grupo ovariectomía **(II)**. Sin embargo el fósforo, aunque en la mayoría de los trabajos consultados presenta un comportamiento similar al calcio, en nuestro estudio observamos que el Grupo **(IV)** tratado con Eriocitrina

presentaba niveles superiores a los de los otros dos grupos (incluso por encima del control sano). En la bibliografía consultada, hemos encontrado un trabajo (Orsolic, 2014), en el que también observaron un incremento del fósforo óseo por encima de los controles sanos y osteoporóticos en ratas ovariectomizadas tratadas con flavonoides cítricos (entre ellos naringenina), pero ninguno con Eriocitrina.

El mecanismo íntimo por el que algunos polifenoles poseen efecto beneficioso sobre el metabolismo óseo, previniendo la osteoporosis, no está del todo aclarado, pero éstos podrían actuar a diferentes niveles. Entre los mecanismos de acción más plausibles parece que se encuentra, por ejemplo, la captación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por las sustancias antioxidantes, necesarias para la diferenciación celular de los osteoclastos; al verse reducido su número, se produciría una reducción de la resorción ósea in vivo (Garrett, 1990; Sánchez-Rodríguez, 2007; Altindag, 2008).

También ha sido descrito que los flavonoides son capaces de estimular la actividad osteogénica en los osteoblastos. En este sentido, la quercetina incrementó la actividad de la ALP en la línea celular MG-63 (osteoblastos) (Robaszkiewicz, 2007). Además, parece que el consumo de flavonoides podría mejorar la absorción de calcio en el intestino delgado y estimular la actividad del receptor de Vitamina D (VDR), que regula la expresión de genes involucrados en la homeostasis del calcio. La activación del VDR podría ser una diana terapéutica prometedora en el tratamiento de la osteoporosis (Inoue, 2010).

Otro de los mecanismos descritos tiene relación con la función antiinflamatoria, por su acción reguladora de algunos mediadores químicos (IL-8, MCP-1 y ICAM-1) (Youdim, 2002; Wang, 2002).

Algunos flavonoides poseen actividad estrogénica. Los principales Grupos de “fitoestrógenos” no esteroideos presentes en la dieta son: isoflavonas (genisteína), lignanos, cumestanos y lactonas del ácido resorcíclico. En 1993, Miksicek publicó que muchos de los flavonoides presentes en las plantas podían unirse y activar los receptores estrogénicos (chalconas, flavanonas y flavonas).

Una de las moléculas con actividad estrogénica más estudiadas es la 8-prenilnaringenina (8-PN), uno de los metabolitos secundarios que se detectan in vivo tras el consumo de Naringenina. (Wei, y cols. (2007), demostraron el efecto antiosteoporótico de la Naringenina en un modelo murino de osteoporosis inducida por ácido retinoico (13cRA).

Respecto a los polifenoles de la hoja del olivo/aceite de oliva, en un trabajo realizado por Hagiwara y cols. (2011) se estudiaron los efectos in vivo e in vitro de la oleuropeína y el hidroxitirosol en la formación y mantenimiento del hueso utilizando cultivos celulares y un modelo animal de ratón. Observaron que ambos agentes estimulaban el depósito de calcio e inhibían la formación de células multinucleadas osteoclasticas de forma dosis-dependiente. Además, en los ratones ovariectomizados inhibieron la pérdida ósea en fémur respecto a los controles. En el modelo in vivo, concluyeron que el hidroxitirosol fue el compuesto más efectivo.

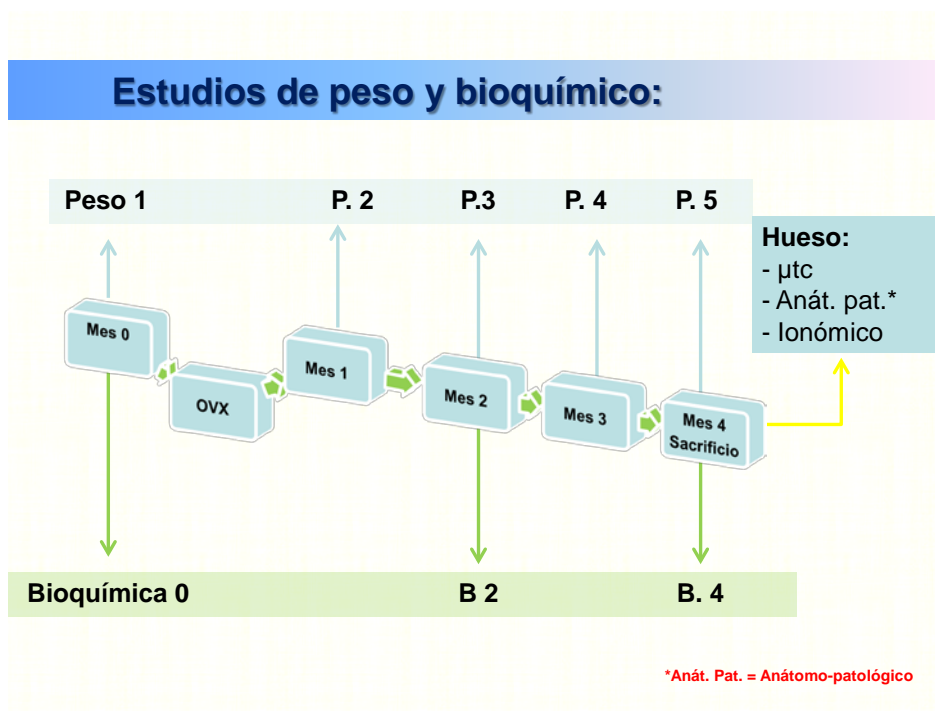
En nuestro estudio, el Citrolive combina estos dos compuestos (entre otros) con otros de origen cítrico. Aunque los resultados fueron favorables sobre el modelo desarrollado, esperábamos que la combinación de agentes produjera una sinergia terapéutica, combinando también los efectos beneficiosos de ambos grupos químicos. Con los resultados obtenidos, no podemos aseverar que haya tenido lugar ese efecto, pero en cualquier caso, son necesarios más estudios in vitro e in vivo para obtener conclusiones más fundamentadas.

Por todo ello, consideramos que los compuestos fenólicos, con su capacidad antioxidante, pueden jugar un papel importante en todas aquellas situaciones patológicas derivadas del estrés oxidativo, como la osteoporosis. La bibliografía existente a este respecto sustenta la idea de que estas sustancias pudieran, a medio plazo, utilizarse como una alternativa terapéutica válida a la terapia actual en la reducción de la pérdida ósea, evitando así los efectos indeseables de otras terapias.

VII. RESUMEN

Objetivos: El primer objetivo de nuestro trabajo fue desarrollar un modelo de osteoporosis secundaria a ovariectomía en ratas Sprague-Dawley. El segundo objetivo consistió en analizar el efecto de los compuestos fenólicos: Naringenina, Eriocitrina y Citrolive®, sobre el citado modelo.

Material y Métodos: Utilizamos 50 animales distribuidas en cinco Grupos (n=10): **(I)** Control; **(II)** Control ovariectomía; **(III)** Ovariectomía + Naringenina (1mg/kg día), **(IV)** Ovariectomía + Eriocitrina (1mg/kg día) y **(V)** Ovariectomía + Citrolive®. (1mg/kg día). La ovariectomía realizada a los Grupos **(II, III, IV y V)** fue bilateral y tras cuatro meses de tratamiento, los animales fueron sacrificados para extraer las muestras. Durante el experimento se pesó a los animales periódicamente y se les extrajo sangre para el estudio bioquímico. Realizamos las siguientes determinaciones: bioquímica general, distribución de la masa ósea y cuantificación de la densidad mineral mediante microtomografía computerizada, estudio anatómo-patológico del grosor de las trabéculas óseas e iónico de los componentes químicos del hueso mediante espectrofotometría.



Resultados: En el estudio bioquímico, los niveles séricos de calcio y fósforo se mantuvieron estables en todos los Grupos experimentales mientras que los niveles de fosfatasa alcalina total fueron superiores en el Grupo (III) Naringenina y con valores muy parecidos al Grupo (I) Control en el resto de Grupos tratados. No obstante, los resultados más relevantes fueron observados a nivel óseo. Así, tanto el grosor como el volumen de las trabéculas óseas de los animales tratados, eran mayores, que los de los animales ovariectomizados no tratados, Grupo (II). Además, los animales, de los tres Grupos tratados sufrieron menor pérdida de los minerales que conforman la matriz ósea que los del Grupo (II) según el estudio ionómico.

Conclusiones: Consideramos, que la administración de dichos compuestos ha demostrado efectividad, aunque de grado variable, sobre el modelo de osteoporosis desarrollado. No obstante, son necesarios futuros estudios que permitan clarificar su mecanismo de acción y seguir avanzando en su posible utilización en clínica humana.

VIII. CONCLUSIONES

1. La deprivación estrogénica por ovariectomía bilateral desarrolló el modelo de osteoporosis planteado.

2. Los efectos más relevantes de los polifenoles administrados consistieron en:

- La microtomografía computerizada demostró mayor volumen óseo cortical y trabecular en los animales tratados que en los controles ovariectomizados, como también observamos en el estudio anatómico-patológico.
- En el estudio ionómico, los fémures de los animales tratados con Eriocitrina mostraron mayores niveles de calcio, fósforo y zinc que los del control ovariectomizado.

IX. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

Alekel DL, Germain A.S, Peterson C.T, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. Isoflavone rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2000; 72(3):844-352.

Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int*. 2008; 28:317-321.

Álvarez N. Efectos saludables de flavonoides. Estudio experimental in vitro e in vivo. Universidad de Murcia 2010.

Arai Y, Watanabe S, Kimura M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinoshita N. Dietary Intakes of Flavonoids, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration. *J Nutr*; 2000; 130 (9): 2243-2250.

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

Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC. Dietary Soybean Protein Prevents Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis.1996.

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

Baliga MS, Katiyar SK. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. Photochem Photobiol Sci. 2006;5(2):243-53.

Ballesteros R; Gómez E; Delgado AD. Historia de la Traumatología y Cirugía Ortopédica. (monografía en Internet) Universidad de Jaén 2002. España Acceso 1 de julio 2013.

Disponible en: http://www.ujaen.es/investiga/cts380/historia/medicina_arabe.htm

Baud C-A, Kramar C. L'osteoporose post-ménopausique au Moyen Âge et à l'Epoque moderne. En: Buchet L. ed La femme pendant le Moyen Âge el l'Epoque moderne.Paris: CNSR Éditons.1994. 157-158.

Benavente-García, O., Castillo, J.: Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. J Agric Food Chem. 2008; 56(15): 6185-6205.

Boyce JR. Cuidado y uso de animales.Sondeo de cuatro puntos de vista de la utilización de animales. J Am Vet Med Assoc. 1990; 196 (9): 1368-1369.

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

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

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

Caamaño Freire M, Graña Gil J, Hernández Rodríguez I, Mosquera Martínez JA, Romero Yuste S. Osteoporosis. Documento Consenso del Grupo de Osteoporosis de la Sociedad Gallega de Reumatología. Galicia Clin 2014; 75 (Supl.1): S5-S23

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

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

Carrascosa A, Gussinyé M, Yeste D, et al. Bone mass acquisition during infancy, childhood and adolescence. Acta Paediatr. 1995, 411 (suppl):18-23.

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

Castillo J., et al.: Uses and properties of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem.* 1997; 45(12): 4505-4510

Cauley JA, Lui LY, Ensrud KE, Zmuda JM, Stone KL et al. Bone mineral density and the risk of incident nonspinal fractures in black and white women. *JAMA*, 2005; 293: 2102-2108.

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

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

Chiechi LM, Secreto G, D'Amore M, Fanelli M, Venturelli E, Cantatore F, Valerio T, Laselva G, Loizzi P.: Efficacy of a soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis. The Menfis randomized trial. *Maturitas.*2002; 42: 295-300.

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

Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol. Rev.* 2001; 81: 419-447.

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

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

Cooper A, Cooper BB.: A treatise on dislocation and on fractures of the joints. Churchill.London, 1822.

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

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural products reports*; 2009: 26(8): 1001-1043.

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

Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002; 359 (9319): 1761-1767.

Damilakis J, Maris TG, Karantanas AH. An update on the assessment of osteoporosis using radiology techniques. *Eur Radiol*. 2007; 17: 1591-1602.

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

Del Pino Montés J. Osteoporosis: Concepto e importancia. Cuadro clínico. *Rev Osteoporos Metab Miner*; 2010; 2(4): S15-S20.

Del Pino Montés J. et Al. Paciente con fractura por osteoporosis posmenopáusica en España: circuito de atención médica. *Rev Osteoporos Metab Miner*; 2012; 4(1):27-35.

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

Díaz Curiel M, García JJ, Carrasco JL, Honorato J, Pérez Cano R, Rapado A, Álvarez Sanz C. Prevalencia de osteoporosis determinada por densitometría en la población femenina española. *Barcelona: Med Clin*; 2001; 116: 86-88.

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

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

Dorman HJ, Koşar M, Başer KH, Hiltunen R. Phenolic profile and antioxidant evaluation of *Mentha x piperita* L. (peppermint) extracts. *Nat Prod Commun*. 2009; 4(4): 535-542.

Duthie T, A Crozier.. Antioxidantes fenólicos derivados de plantas. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2000; 3 (6): 447-451.

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

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

Ferraz-Carbonel AA, Santos-Simoes R, Barros-Rabelo-Santos RH, Pinheiro Baracat MC, Simoes MJ, Chada Baracat E, Soares JM. Effects of high-dose isoflavones on rat uterus. *Rev Assoc Med Bras*, 2011; 57(5): 524-529.

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

García C. La Medicina en la Grecia Antigua (monografía en Internet). *Historia National Geographic*: nº 110 Marzo 2013 Acceso 15 de julio 2013. Disponible:
http://www.nationalgeographic.com.es/articulo/historia/grandes_reportajes/8023/medicina_grecia_antigua.html

Garrett IR, Boyce Bf, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Investig*. 1990; 85: 632-639.

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

Gennari C, Agnusdei D, Crepaldi G, Isaia G, Mazzuoli G, Ortolani S et al.: Effect of ipriflavone, a synthetic derivative of natural isoflavones, on bone mass loss in the early years after menopause. *Menopause*. 1998; 5: 9-15.

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

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

Gould L, Constabel P, Mellway R, Rambeloarivony H. Condensed tannin intake in spiny-forest-dwelling Lemur catta at Berenty reserve, Madagascar, during reproductive periods. *Folia Primatol (Basel)*. 2009; 80(4): 249-263.

Grardel B, Sutter B, Flautre B, Viguier E, Lavaste F, Hardouin P.: Effects of glucocorticoids on skeletal growth in rabbits evaluated by dual-photon absorptiometry, microscopic connectivity and vertebral compressive strength. *Osteoporos Int*.1994; 4: 204-210.

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

Hagiwara K, Goto T, Araki M y cols. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur J Pharmacol*. 2011; 662; 78-84

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

Heijnen, C, Haenen, G. R., Oostveen, R. M., Stalpers, E. M., Bast,A.: Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radic Res*. 2002; 36(5): 575-581.

Hermoso de Mendoza, M T. Classification of osteoporosis. Risk factors. Clinical manifestations and differential diagnosis. *An Sist Sanit Navar*, 2003; 26 Suppl 3: 29-52.

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

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

Iglesias-Gamarra A, Gerardo L, Restrepo JL. Prehistoria, historia y arte de la Reumatología Gota y espondilitis anquilosante. *Revista Colombiana de Reumatología.*, 2006. Vol. 13 nº.21. SSN 0121-8123.

Inoue J, Choi JM, Yoshidomi T, Yashiro T, Sato R. Quercetin enhances VCR activity, leading to stimulation of its target gene expression in Caco-2 cells. *Nutr Sci Vitaminol.* 2010; 56; 326-330.

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

Isidro A, Malgosa, A. *Paleopatología: la enfermedad no escrita.* Barcelona: Masson. S.A; 2003. ISBN 84-458-1261-0.

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

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

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

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

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

Krivoy A, Krivoy J, Krivoy M. Aspectos neuroquirúrgicos parciales del papiro de Edwin Smith. *Ga.I Med. Caracas*: 2002: 110 (3): 386-391

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

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

Leung HW, Kuo CL, Yang WH, Lin CH, Lee HZ.: Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2006; 534 (1-3): 12–18.

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

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

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr. 2004; 79(5): 727-747.

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

Meli R, Pacilio M, Raso GM, Esposito E, Coppola A, Nasti A, et al. Estrogen and Raloxifene Modulate Leptin and Its Receptor in Hypothalamus and Adipose Tissue from Ovariectomized Rats. Endocrinology. 2004; 145 (7): 3115-3121.

Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. J Agric Food Chem. 2000; 48(3):577-599.

Meseguer L. Salud esquelética: osteoporosis. (monografía en Internet). Murcia. Instituto Universitario de Investigación en Envejecimiento, Universidad de Murcia: 2013. Acceso 15 de julio 2013.

Disponible en: <http://www.um.es/web/iuie/contenido/divulgacion/aula-divulgacion-medica/documentos>

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev 2000;54(4):673-751.

Miksicek RJ. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. Mol. Pharmacol. 1993; 44: 37-43.

Miller EG, Peacock JJ, Boularnd TC, y cols. Imbition of oral carcinogenesis by citrus flavonoids. *Nutr Cancer*. 2008; 60: 69-74.

Milewicz A, Tworowska U, Demissie M. Menopausal obesity -myth or fact? *Climateric* 2001; 4: 273-283.

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

Minato K, Miyake Y, Fukumoto S, Yamamoto K, Kato Y, Shimomura Y, Osawa T. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci*. 2003;72(14):1609-1616.

Minisola S, Pacitti MT, Ombricolo E, Costa G, et al. Bone turnover and its relationship with bone mineral density in pre- and postmenopausal women with or without fractures. *Maturitas*, 1998; 29: 265-270.

Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, Osawa T. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids*. 1998; 33(7): 689-695.

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

Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio, A, Lasco A, Frisin N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo M.A, Cincotta M, Altavilla D, Ientile R, Squadrito F. Effects of genistein and hormone replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo controlled study. *J Bone Miner Res*. 2002; 17 (10): 1904-1912.

Mostazo E. Estudio del efecto del extracto de *Humulus Lupulus L.* sobre un modelo de osteoporosis en ratas Sprague-Dawley. Universidad de Murcia 2013.

Moyano E, Martínez-García JF, Martín C. Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in *antirrhinum* flowers. *Plant Cell.* 1996 8(9):1519-1532.

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

Murray FJ. A comparative review of the pharmacokinetics of Boric Acid in rodents and humans. *Biol Trace Elem Res* 1998; 66: 331-341.

Muñoz-Torres M. Varsavsky M, Avilés Pérez MD. Osteoporosis. Definición. *Epidemiología. Rev. Osteoporos Metab Miner* 2010; 2(3): S5-S7

Myhrstad MC, Carlsen H, Dahl LI, Ebihara K, L Glemmestad, Haffner K, Moskaug Jo, Blomhoff R. Los extractos de arándano inducen la expresión de genes a través del elemento de respuesta electrófilo. *Cáncer Nutr* 2006; 54 (1): 94-101.

Navarro F. Aproximación histórica, al conocimiento de la osteoporosis (TFM) Murcia: Instituto Universitario de Investigación en Envejecimiento, Universidad de Murcia; 2011.

Nielsen FH, Schuler TR. Studies of the interaction between boron and calcium, and its modification by magnesium and potassium, in rats. *Biol Trace Element Reser* 1992; 35: 225-237.

Nielsen FH. Other elements. En: Mertz W, editor. Trace elements in human and animal nutrition, Fifth Edition. Orlando: Academic Press, Inc, 1986: 420-463.

Nieto L, Moratal D, Martí-Bonmatí L, Alberich A, Galant J. Caracterización morfológica de la estructura trabecular ósea mediante resonancia magnética de alta resolución. *Radiología* 2008; 50: 401-408.

NIH. Consensus development conference on Osteoporosis. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1993; 94: 646-650

NIH. Consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis y therapy. *JAMA;* 2001: 285; 785-795.

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

Orsolíc N, Gouz E, Djkie D, y cols. Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contensts in the retinoic acid-induced bone model of rat. *Eu J Nutr.* 2014; 53: 1217-1227.

Pandya S, Iyer P, Gaitonde V, Parekh T, Desai A. Chemotaxis of *Rhizobium* sp.S2 towards *Cajanus cajan* root exudate and its major components. *Curr Microbiol.* 1999: 38(4):205-209.

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

Puel C, Quintin A, Agalias A y cols. Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *Brit J Nutr.* 2004; 92: 119-127

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

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. 3rd. A unitary model for involutional osteoporosis: Estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J. Bone Miner. Res.* 1998; 13: 763–773.

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

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

Robaszkiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int.* 2007; 31: 1245-1250

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

Rodriguez-Mateos A, Vauzour D, Krueger CG, Shanmuganayagam D, Reed J, Calani L, Mena P, Del Rio D, Crozier A. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch Toxicol.* 2014 Sep 3.

Ruiz, R. De la magia a la medicina moderna. MEXICO: FONDO DE CULTURA ECONOMICA; 1997. ISBN 9789681669485

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

Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Correa-Muñoz E, Mendoza-Nuñez VM. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007; 8: 124-131

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

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

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

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

Shuller H, Frentzen M, Jervoe-Storm ZA, Brings ZA, Nolden R. La tomografía computarizada de alta resolución en parodontología. Comparación con el procedimiento radiológico convencional (1). *Quintessence* 1992; 43: 651-666.

Skopalik C, Marmori, F. Curso de Medicina Tradicional China. Edita: Fundación Europea de Medicina Tradicional China:Tomo 1. Págs. 25-47. 1993. ISBN: 84-88597-01-0.

Slemenda CW, Miller JZ, Hui SL, et al. Role of physical activity in the development of skeletal bone mass in children. *J Bone Miner Res* 1991; 6: 1227-1233.

Srivastava P, Sharma PK, Dogra RC. Inducers of nod genes of *Rhizobium ciceri*. *Microbiol Res.* 1999 May;154(1):49-55.

Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more?. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(22):2900-2916

Swarnkar G, Sharan K, Siddiqui JA, Chakravarti B, Rawat P, Kumar M, et al. A novel flavonoid isolated from the stem-bark of *Ulmus Wallichiana* Planchon stimulates osteoblast function and inhibits osteoclast and adipocyte differentiation. *European Journal of Pharmacology* 2011; 698: 65–73.

Takahashi M, Kushida H, Hoshino M, Miura T, et al. Comparison of bone and total alkaline phosphatase activity on bone turnover during menopause and in patients with established osteoporosis. *Clin Endocrinol*, 1997; 47: 177-183.

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

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

Uzcátegui B, Avila D, Suárez-Roca H, Quintero L, Ortega. Anti inflamatorios, antinociceptivas y antipiréticas efectos de *Lantana trifolia* Linnaeus en animales de experimentación. *Invest Clin* 2004; 45 (4): 317-322.

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

Wang P, Hassager C, Ravn P, Wang S, Christiansen C. Total and regional body-composition changes in early postmenopausal women: age related or menopausal related? *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 843-848.

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

Wei M, Yang Z, Li P, Zhang Y, Sse WC. Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model. *Am J Chin Med*. 2007; 35; 663-667

Yamori Y, Moriguchi, E.H., Teramoto, T., Miura, A., Fukui, Y., Honda, K.I., Fukui, M., Nara, Y., Taira, K., Moriguchi, Y.: Soybeanisoflavones reduce postmenopausal bone resorption infemale Japanese immigrants in Brazil: a ten week study. *J Am Coll Nutr*. 2002; 21(6):560-563.

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

Zacarías R, Reza A. Osteoporosis en la menopausia: Consideraciones fisiopatológicas. *Rev Endocrinol Nutr.* 2006; 14(3); 156-158

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

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