

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Efectos del bazedoxifeno y del calcio más vitamina D sobre la
calidad ósea en ratas ovariectomizadas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Blanca Eugenia Torrubia Doderó

Directoras

Paz Recio Visado
Concepción de la Piedra Gordo

Madrid

©Blanca Eugenia Torrubia Doderó, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS DEL BAZEDOXIFENO Y DEL CALCIO MÁS VITAMINA D SOBRE LA
CALIDAD ÓSEA EN RATAS OVARIECTOMIZADAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Blanca Eugenia Torrubia Dodero

DIRECTORAS

Dra. Paz Recio Visedo

Dra. Concepción de la Piedra Gordo

Madrid, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



**EFECTOS DEL BAZEDOXIFENO Y DEL CALCIO MÁS
VITAMINA D SOBRE LA CALIDAD ÓSEA EN RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

TESIS DOCTORAL

Blanca Eugenia Torrubia Dodero

DIRECTORAS

Dra. Paz Recio Visedo
Dra. Concepción de la Piedra Gordo

Madrid, 2022



La Dra. Paz Recio Visedo, Profesora Titular Doctor de la Sección Departamental de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y la Dra. Concepción de la Piedra Gordo, Investigadora Emérita del Servicio de Traumatología del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICAN:

Que Dña. Blanca Eugenia Torrubia Dodero, Licenciada en Farmacia y especialista en Análisis Clínicos, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación titulado “EFECTOS DEL BACEDOXIFENO Y DEL CALCIO MÁS VITAMINA D SOBRE LA CALIDAD ÓSEA EN RATAS OVARIECTOMIZADAS” como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, enero de 2022

Dra. Recio Visedo

Dra. De la Piedra Gordo

A Sergio, Nico y Sofía

AGRADECIMIENTOS

Hace tan solo un par de años no habría pensado que este momento llegaría, pero aquí estoy escribiendo los agradecimientos de mi tesis y eso me hace inmensamente feliz. Ha sido un largo camino con mezcla de sentimientos y varios parones por el nacimiento de mis hijos, pero sin duda el resultado ha merecido la pena y estoy orgullosa de poder mostrarlo.

En primer lugar, quiero dar las gracias a la Dra. De la Piedra, directora de esta tesis, por haber confiado en mí desde el primer momento, por haberme enseñado tantísimo de la investigación y por su ayuda incondicional. Ha sido el mejor referente en lo profesional y en lo personal, animándome a seguir adelante cuando ya iba a tirar la toalla y guiándome de la mejor manera para que este proyecto viera la luz. Muchas gracias Concha por haber estado siempre disponible para mí.

A la Dra. Paz Recio, codirectora de esta tesis, por la ayuda que me ha brindado siempre tan amablemente, por haberme guiarme en este difícil camino y estar siempre dispuesta a echarme una mano en lo que necesitara.

A Marta Martín, por haberme enseñado a manejar a las ratitas del animalario y ayudarme con las técnicas de laboratorio. Gracias a ella me sentí como una más en el laboratorio de Reuma.

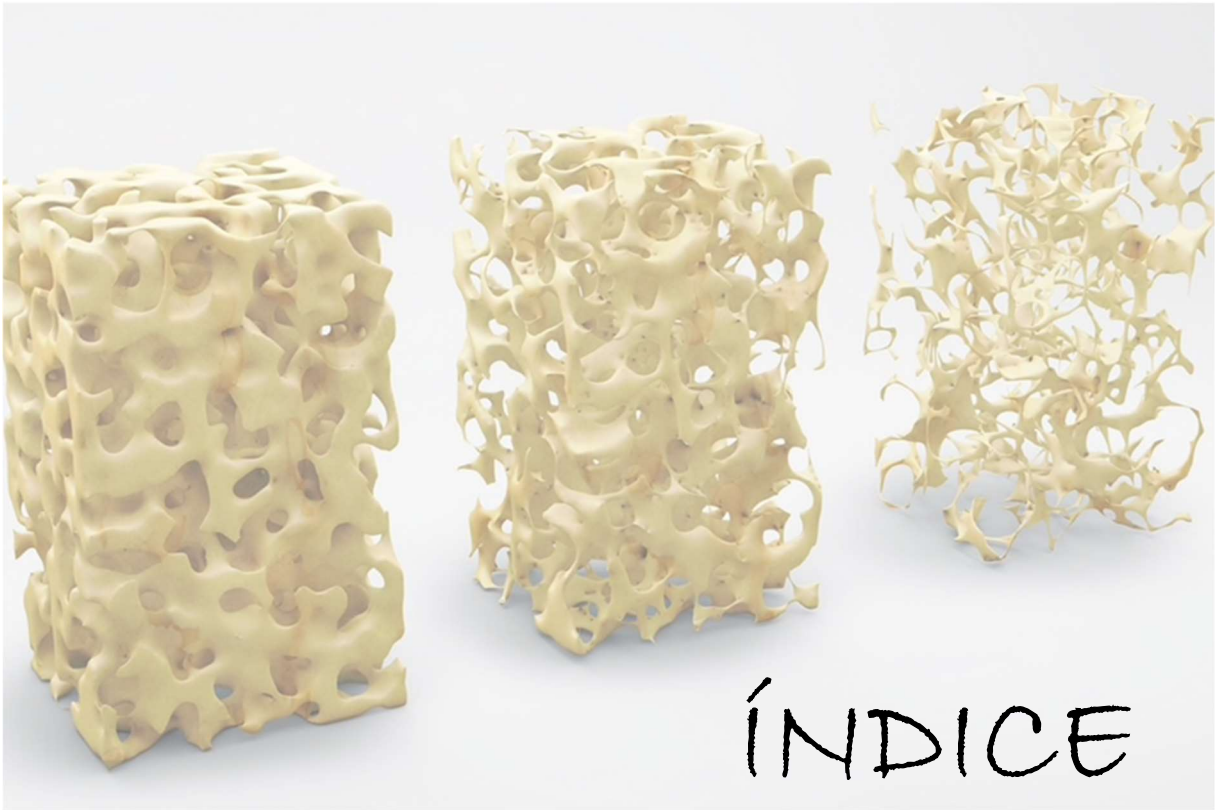
A Jairo y Oscar, por su amabilidad al dejarme formar parte de su laboratorio durante unos meses, por todo lo que me han enseñado y aconsejado.

A Luis, por su amabilidad ayudándome a estructurar este trabajo y por sus buenos consejos. A Marina, por toda su ayuda y por asesorarme para realizar esta tesis. A mis amigos y compis del laboratorio, por interesarse por mi trabajo y darme ánimos siempre para continuar. A Amelia, por permitirme compaginar el trabajo asistencial con la investigación y animarme a seguir investigando.

A mis padres, por ser un pilar fundamental en mi vida, por enseñarme tanto y apoyarme en cada momento de mi vida.

A Sergio, Nico y Sofía porque sois la alegría de mi vida, los que me dais fuerzas para seguir adelante cada día y el apoyo necesario para terminar esta tesis. Espero que estéis tan orgullosos de mí como yo lo estoy de vosotros.

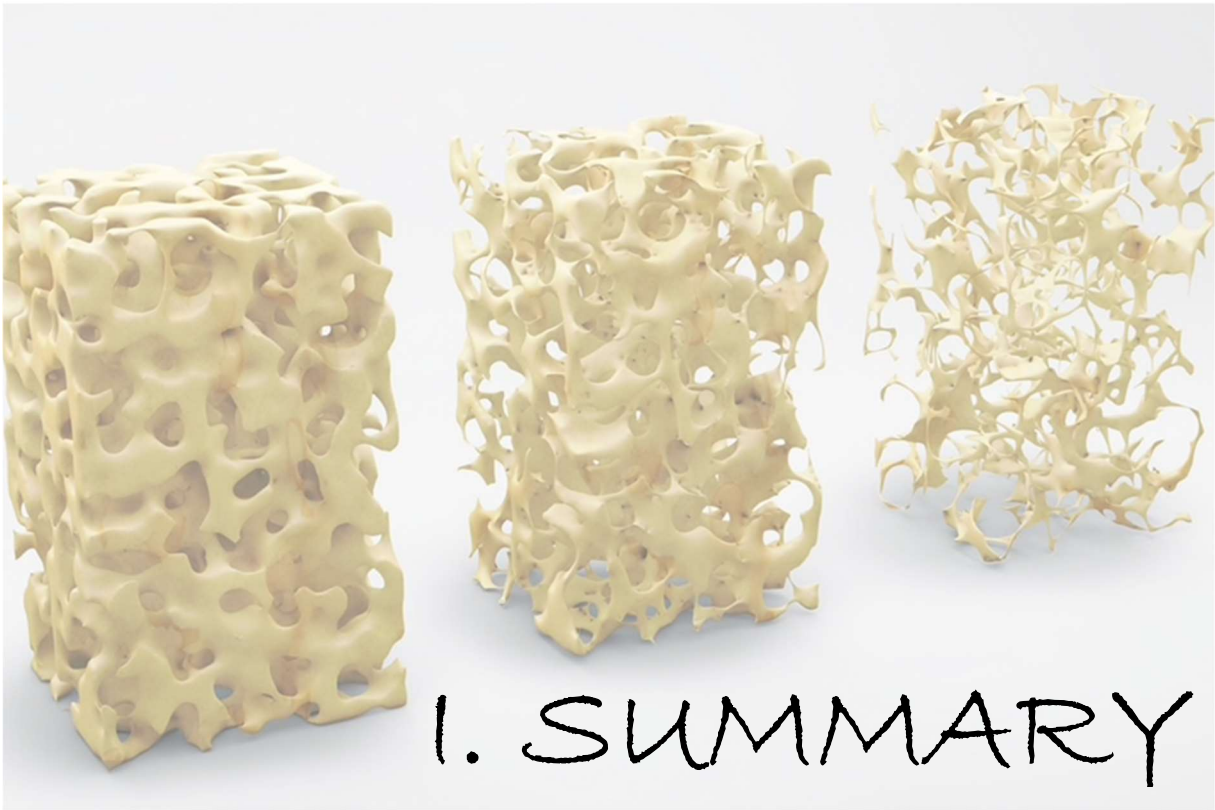
**Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III,
ayuda PI12/01472, FEDER.**



ÍNDICE	1
I. SUMMARY	1
II. Resumen	5
III. INTRODUCCIÓN	15
III.1. EL HUESO:	16
III.1.1 COMPOSICIÓN DEL HUESO	16
A. MATRIZ ÓSEA EXTRACELULAR	16
B. COMPONENTES CELULARES	18
III.1.2 TEJIDO ÓSEO	22
III.2. REMODELADO ÓSEO:	24
III.2.1 FASES DEL REMODELADO ÓSEO	25
III.2.2 REGULACIÓN DEL REMODELADO ÓSEO	27
III.2.3 MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO	33
III.2.3.1 MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA	33
III.2.3.2 MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA	37
III.3. LA OSTEOPOROSIS:	41
III.3.1 FISIOPATOLOGÍA:	43
III.3.2 CLÍNICA Y DIAGNÓSTIC	44
III.3.3 OSTEOPOROSIS POSTMENOPAÚSICA	47
III.3.4 CLASIFICACIÓN DE LA OSTEOPOROSIS	49
III.3.5 TRATAMIENTOS FRENTE A LA OSTEOPOROSIS	50
III.3.5.1 MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS (SERMs). BAZEDOXIFENO	53
III.3.5.2 SUPLEMENTACIÓN CON CALCIO Y VITAMINA D	57
III.4 LA RATA OVARIECTOMIZADA COMO MODELO DE OSTEOPOROSIS POSTMENOPAÚSICA	59
III.5 COMENTARIOS FINALES A LA INTRODUCCIÓN	60
IV. OBJETIVOS	62

V. MATERIALES Y MÉTODOS	64
V.1 ACCIÓN DEL BAZEDOXIFENO (BZD)	65
V.1.1 DISEÑO DEL EXPERIMENTO	65
V.1.2 OVARIECTOMÍA, SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	67
V.1.3 DENSITOMETRÍAS ÓSEAS	69
V.1.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO	71
V.1.4.1 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE FORMACIÓN ÓSEA	71
V.1.4.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE RESORCIÓN ÓSEA	73
V.1.5 MICROTOMOGRFÍA COMPUTARIZADA (MICRO-CT)	74
V.1.5.1 PARÁMETROS MORFÓMETRICOS HUESO TRABECULAR	77
V.1.5.2 PARÁMETROS MORFÓMETRICOS HUESO CORTICAL	79
V.1.6 BIOMECÁNICA	80
V.1.6.1. PARÁMETROS BIOMECÁNICOS ANALIZADOS	82
V.2 ACCIÓN DEL CALCIO + VITAMINA D	82
V.2.1 DISEÑO DEL EXPERIMENTO	82
V.2.2 OVARIECTOMÍA, SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	85
V.2.3 DENSITOMETRÍAS ÓSEAS	85
V.2.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO	85
V.2.5 MICROTOMOGRFÍA COMPUTARIZADA (MICRO-CT)	86
V.2.5.1 PARÁMETROS MORFÓMETRICOS HUESO TRABECULAR	87
V.2.6 TEST BIOMECÁNICO	88
V.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	89
VI. RESULTADOS	90
VI.1 ACCIÓN DEL BAZEDOXIFENO	91
VI.1.1 DENSIDAD MINERAL ÓSEA	91
VI.1.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO	92
VI.1.3 MICROARQUITECTURA ÓSEA	92
VI.1.3.1 PARÁMETROS MORFÓMETRICOS HUESO TRABECULAR	92
VI.1.3.2 PARÁMETROS MORFÓMETRICOS HUESO CORTICAL	96
VI.1.4 BIOMECÁNICA ÓSEA	99

VI.1.5 EVOLUCIÓN DEL PESO _____	103
VI.2 ACCIÓN DEL CALCIO + VITAMINA D _____	104
VI.2.1 DENSIDAD MINERAL ÓSEA _____	104
VI.2.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO _____	105
VI.2.3 MICROARQUITECTURA ÓSEA _____	105
VI.2.4 BIOMECÁNICA ÓSEA _____	109
VI.2.5 EVOLUCIÓN DEL PESO _____	111
VII. DISCUSIÓN _____	112
VII.1 ACCIÓN DEL BAZEDOXIFENO _____	113
VII.2 ACCIÓN DEL CALCIO + VITAMINA D _____	116
VIII. CONCLUSIONES _____	121
IX. BIBLIOGRAFÍA _____	124
X. PUBLICACIONES _____	139



Effects of bazedoxifene and calcium plus vitamin D on bone quality in ovariectomized rats

Osteoporosis is currently the most common metabolic bone disease and one of the most pressing health problems worldwide due to its enormous social and economic burden. Its treatment is multidisciplinary and includes both non-pharmacological, public health measures, applicable to the entire population, and pharmacological measures, mostly antiresorptive therapies.

Estrogen deficiency is a key factor in the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis, therefore, estrogen replacement hormone therapy has been a first-line treatment to prevent vertebral and hip fractures. However, the cardiovascular complications that were associated with the treatment, as well as the increased risk of developing breast cancer, discouraged its use.

A great discovery was the appearance of selective estrogen receptor modulators (SERMs) that avoid many of these side effects. SERMs are non-steroidal synthetic agents that bind to the estrogen receptor and exhibit estrogen agonist or antagonist activity depending on the type of tissue. Among them, bazedoxifene is a 3rd generation SERM with agonist effects on bone and additional favorable effects on lipids, uterus and breast tissue. Bazedoxifene has been shown to reduce the incidence of new vertebral fractures in patients with osteoporosis and also the incidence of non-vertebral fractures in high-risk patients. In addition, it is a very well tolerated drug, without harmful effects on the endometrium or breast tissue.

On the other hand, the knowledge of the important implication of calcium and vitamin D in bone metabolism makes calcium and vitamin D supplements widely used in osteopenic or osteoporotic patients. They are used, for economic reasons, as a preventive or therapeutic regimen in order to avoid the development of the disease and future fractures. In addition, it must be taken into account that, in all clinical trials on postmenopausal osteoporosis treatments, calcium plus vitamin D was administered to the placebo group.

AIM

The aim of this work was to study the effects of bazedoxifene and calcium plus vitamin D supplements on bone quality using an experimental model of ovariectomized rats and a long-term treatment (8 months).

MATERIAL AND METHODS

- In the first experiment, 3 groups of 15 6-month-old female Wistar rats were used: SHAM, sham intervention control group; OVX, ovariectomized rats; and OVX + BZD, a third group of ovariectomized rats treated with bazedoxifene (0.33 mg / kg / day).
- In the second experiment, 3 groups of 15 6-month-old female Wistar rats were used: SHAM, sham intervention control group; OVX, ovariectomized; and OVX + (Ca + Vitamin D) ovariectomized treated with calcium and vitamin D (10 mg of calcium and 6.7 IU of vitamin D / kg / day orally).

In both experiments, after 8 months of treatment, the bone mineral density (BMD) of the left femur and of the spine was studied at the level of L2, L3 and L4 by double-energy X-ray absorptiometry (DEXA), the photomicrographic parameters from the computed microtomography images acquired in the bone samples, the biochemical markers of remodeling by ELISA immunoassay and the biomechanical parameters of the bone. Biomechanics were determined by a 3-point bending test in the first experiment and, in the second experiment, by a mechanical compression test based on the finite element method.

RESULTS

- In the first experiment, ovariectomy decreased DMOF and DMOL. DMOL was partially recovered with bazedoxifene. Bone remodeling increased, with bazedoxifene recovering the basal levels of the formation markers (BGP and PINP). This drug recovered the bone volume fraction (BV / TV), the bone surface density (BS / TV), the increase in trabecular separation (Tb.Sp), the decrease in the number of trabeculae (Tb.N), the increase in the

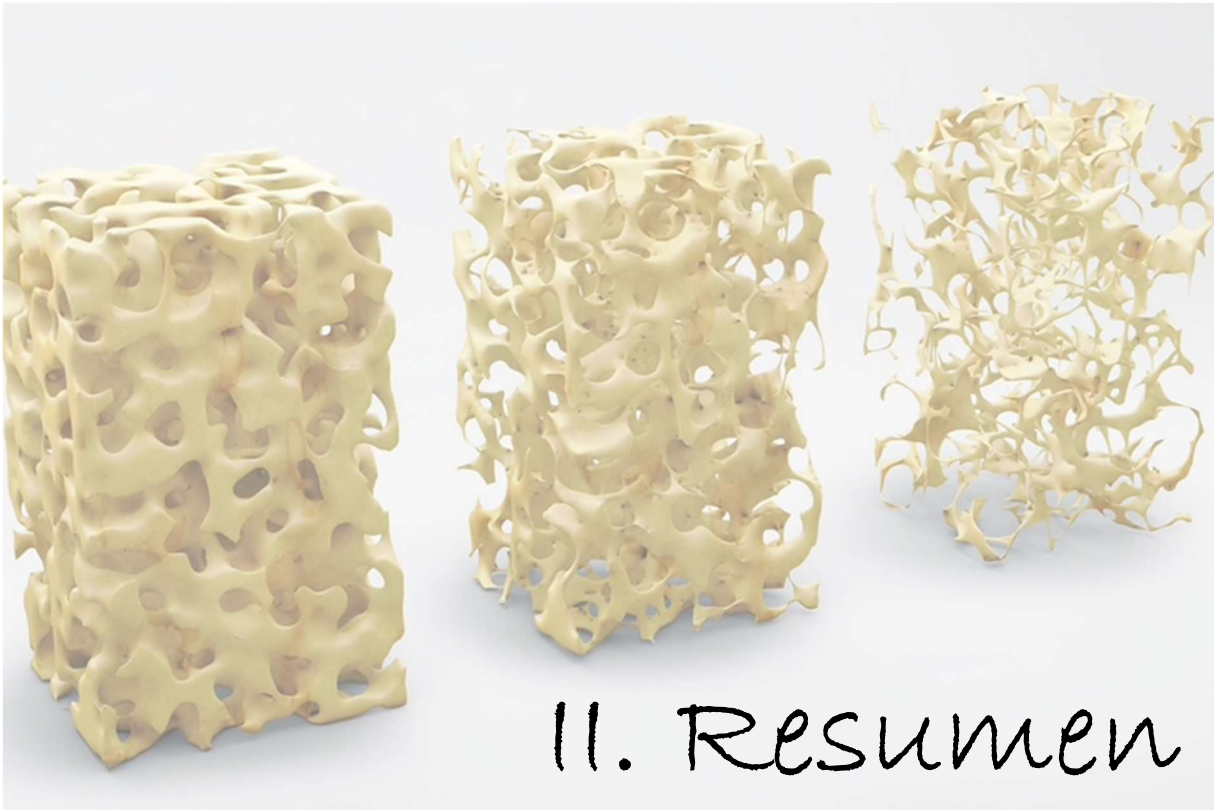
trabecular pattern factor (Tb.Pf) and the structural model index (SMI). The relative cortical surface increased after ovariectomy, normalizing with bazedoxifene. It also recovered the maximum deformation before the rupture produced by the oophorectomy, and partially avoided the weight gain of the ovariectomized rats.

- In the second experiment, DMOF and DMOL decreased in OVX rats, unchanged in treated rats. Oophorectomy produced an increase in BGP and CTX / TRAP values, without generating differences in PINP values. These variations did not change after treatment. Oophorectomy worsened the bone microstructural parameters that were maintained after treatment with calcium and vitamin D. Ovariectomy worsened the bone microstructural parameters that were maintained after treatment with calcium and vitamin D. D2D significantly decreased in the OVX group, while no changes were evidenced in D3D; no variations were observed after treatment with calcium and vitamin D. The apparent elastic modulus in the x, y and z direction was significantly reduced in the OVX group, with no differences after treatment. Oophorectomy significantly increased the rats' weight, and calcium and vitamin D supplementation prevented this increase.

CONCLUSIONS

Analyzing our results, long-term treatment with bazedoxifene, at the doses used in this study, had a positive effect on bone quality in our experimental group of rats, largely reversing the alterations that oophorectomy produced on said quality.

In contrast, long-term treatment with calcium and vitamin D supplements was not able to reverse the alterations in bone quality caused by surgery, only avoided weight gain in ovariectomized rats.



11. RESUMEN

Efectos del bazedoxifeno y del calcio más vitamina D sobre la calidad ósea en ratas ovariectomizadas

La osteoporosis es actualmente la enfermedad metabólica ósea más común y uno de los problemas de salud más apremiantes a nivel mundial debido a su enorme carga social y económica. Su tratamiento es multidisciplinar e incluye tanto medidas no farmacológicas, de salud pública aplicables a toda la población, como medidas farmacológicas, mayoritariamente terapias antirresortivas.

El déficit de estrógenos es un factor clave de la patogenia de la osteoporosis postmenopáusica, por ello, la terapia hormonal sustitutiva con estrógenos ha sido un tratamiento de primera elección para prevenir las fracturas vertebrales y de cadera. Sin embargo, las complicaciones cardiovasculares que se asociaron al tratamiento, así como el aumento del riesgo de padecer cáncer de mama desaconsejaron su uso.

Un gran descubrimiento fue la aparición de los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs) que evitan muchos de estos efectos secundarios. Los SERMs son agentes sintéticos no esteroideos que se unen al receptor estrogénico y presentan actividad agonista o antagonista estrogénica según el tipo de tejido. Dentro de ellos, el bazedoxifeno, es un SERM de 3ª generación con efectos agonistas sobre el hueso y efectos favorables adicionales sobre los lípidos, el útero y el tejido mamario. Se ha demostrado que el bazedoxifeno reduce la incidencia de nuevas fracturas vertebrales en pacientes con osteoporosis y también la incidencia de fracturas no vertebrales en pacientes de alto riesgo. Además, es un medicamento muy bien tolerado, sin efectos nocivos sobre el endometrio o el tejido mamario.

Por otra parte, el conocimiento de la importante implicación del calcio y la vitamina D en el metabolismo óseo hace que los suplementos de calcio y vitamina D sean ampliamente utilizados en pacientes osteopénicos o con osteoporosis. Se emplean, por motivos económicos, como régimen preventivo o terapéutico con el fin de evitar el desarrollo de la enfermedad y futuras fracturas. Además, hay que tener en cuenta que, en todos los ensayos

clínicos sobre los tratamientos de la osteoporosis postmenopáusica se administra calcio más vitamina D al grupo placebo.

OBJETIVOS

El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar los efectos del bazedoxifeno y de los suplementos de calcio más vitamina D sobre la calidad ósea utilizando un modelo experimental de ratas ovariectomizadas y un tratamiento a largo plazo (8 meses).

MATERIAL Y MÉTODOS

- En el primer experimento se utilizaron 3 grupos de 15 ratas Wistar hembras de 6 meses de edad: SHAM, grupo control de intervención simulada; OVX, grupo de ratas ovariectomizadas; y OVX + BZD, un tercer grupo de ratas ovariectomizadas tratadas con bazedoxifeno (0,33 mg/kg/día).
- En el segundo experimento se utilizaron 3 grupos de 15 ratas Wistar hembras de 6 meses de edad: SHAM, grupo control de intervención simulada; OVX, ovariectomizadas; y OVX+ (Ca+ Vitamina D) (n=15), ovariectomizadas tratadas con calcio y vitamina D (10 mg de calcio y 6,7 UI de vitamina D/kg/día vía oral).

En ambos experimentos, tras 8 meses de tratamiento, se estudió la densidad mineral ósea del fémur izquierdo (DMOF) y de la columna vertebral (DMOL) a nivel de L2, L3 y L4 por absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA), los parámetros microfotográficos a partir de las imágenes de microtomografía computarizada adquiridas en las muestras de hueso, los marcadores bioquímicos de remodelado por inmunoensayo ELISA y los parámetros biomecánicos del hueso. La biomecánica se determinó mediante un ensayo de flexión a 3 puntos en el primer experimento y, en el segundo experimento, mediante un ensayo mecánico de compresión basado en el método de los elementos finitos.

RESULTADOS

- En el primer experimento, la ovariectomía descendió la DMOF y DMOL. La última se recuperó parcialmente con bazedoxifeno. El remodelado óseo aumentó, recuperando el bazedoxifeno los niveles basales de los marcadores de formación (BGP y PINP). Dicho fármaco, recuperó la fracción volumétrica ósea (BV/TV), la densidad de superficie ósea (BS/TV), el aumento en la separación trabecular (Tb.Sp), la disminución en el número de trabéculas (Tb.N), el aumento del factor de patrón trabecular (Tb.Pf) y el índice de modelo estructural (SMI). La superficie relativa cortical aumentó tras la ovariectomía, normalizándose con bazedoxifeno. También recuperó la deformación máxima antes de la rotura producida por la ovariectomía, y amortiguó parcialmente la ganancia de peso de las ratas ovariectomizadas.
- En el segundo experimento, la DMOF y la DMOL disminuyeron en las ratas OVX, sin cambios en las ratas tratadas. La ovariectomía produjo un aumento en los valores BGP y CTX/TRAP, sin generar diferencias en los valores PINP. Estas variaciones no cambiaron después del tratamiento. La ovariectomía empeoró los parámetros microestructurales óseos que se mantuvieron tras el tratamiento con calcio y vitamina D. D2D disminuyó significativamente en el grupo OVX, mientras que no se evidenciaron cambios en D3D; no se observaron variaciones después del tratamiento con calcio y vitamina D. El módulo elástico aparente en la dirección x, y y z se redujo significativamente en el grupo OVX, sin diferencias después del tratamiento. La ovariectomía aumentó significativamente el peso de las ratas y los suplementos con calcio y vitamina D evitaron este aumento.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos deducir que el tratamiento a largo plazo con bazedoxifeno, en las dosis empleadas en este trabajo, tuvo un efecto positivo sobre la calidad ósea de nuestro grupo experimental de ratas, revirtiendo en gran parte las alteraciones que produjo la ovariectomía sobre dicha calidad.

Al contrario, el tratamiento a largo plazo con suplementos de calcio y vitamina D no fue capaz de revertir las alteraciones en la calidad ósea causadas por la cirugía, únicamente amortiguó la ganancia de peso en las ratas ovariectomizadas.

ABREVIATURAS

Arg: Arginina.

ASBMR: American Society for Bone and Mineral Reserach.

Asp: Ácido aspártico.

BGP: Osteocalcina, "Bone –Gla Protein".

BMPs: Proteínas morfogenéticas óseas.

BS: Superficie total del hueso trabecular.

BSP: Sialoproteína ósea.

BV: Volumen óseo.

BV/TV: Fracción volumétrica ósea.

BZD: Bazedoxifeno.

Ca + Vit D: Suplemento de calcio más vitamina D.

CaSR: Receptor sensor de calcio.

CFU-F: Unidad formadora de colonias de fibroblastos.

Conn.D: Densidad de conectividad.

CSF-1: Factor estimulante de colonias 1.

Ct.B.Po: Porosidad del hueso cortical.

Ct.BS/BV: Cociente entre la superficie cortical y el volumen del hueso cortical sin poros.

Ct.BV: Volumen de hueso cortical.

Ct.Po.Dm: Diámetro del poro.

Ct.Th: Grosor cortical.

CTX: Telopéptido C-terminal de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I (CrossLaps).

CV: Coeficiente de variación.

DA: Grado de anisotropía.

DE: Desviación estándar.

DEXA: Absorciometría de rayos X de doble energía.

DMO: Densidad mineral ósea.

DMOF: Densidad mineral ósea femoral.

DMOL: Densidad mineral ósea lumbar.

δ_{ult} : Desplazamiento máximo hasta la fractura.

E: Módulo de Young.

EGF: Factor de crecimiento epidermoide.

ELISA: Enzimoimmunoensayo.

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

ϵ_{ult} : Deformación máxima.

FATR/ TRAP: Fosfatasa Ácida Tartrato Resistente.

FATR-5b/ TRAP-5b: Isoenzima 5b de la Fosfatasa Acida Tartrato Resistente.

FDA: Food and Drug Administration (USA).

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos.

F_{ult} : Fuerza máxima hasta la fractura.

σ_{ult} : Esfuerzo máximo.

Gla: Gamma-carboxiglutamato.

GH: Hormona de crecimiento.

Gly: Glicina.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos.

HA: Hidroxiapatita.

ICTP: Telopéptidos carboxiterminales del colágeno I unidos por puentes de piridinolina.

IFN γ : Interferón gamma.

IGF-1: Factor de crecimiento análogo a la insulina tipo I.

IGF-2: Factor de crecimiento análogo a la insulina tipo II.

IL: Interleucina.

IOF: International Osteoporosis Foundation.

Md.V: Volumen medular.

M-CSF: Factor estimulante de las colonias de macrófagos.

Micro-CT: Microtomografía computarizada.

NIH: Instituto Nacional de la Salud.

NTX: Telopéptidos aminoterminales del colágeno I unidos por puentes de piridinolina.

OMS (WHO): Organización Mundial de la Salud.

OP: Osteoporosis.

OPG: Osteoprotegerina.

OVX: Ovariectomía.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PGE₂: Prostaglandina E₂.

PICP: Propéptido carboxiterminal del procolágeno I.

PINP: Propéptido aminoterminal del procolágeno I.

PNC: Proteínas no colágenas.

PTH: Hormona paratiroidea.

RANK: Receptor activador del factor nuclear kappa B.

RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B.

ROI: Región de interés.

SHAM: Grupo de ratas control.

S: Rigidez extrínseca.

SMI: Índice de modelo estructural.

SERMs: Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos.

Tb.N: Número de trabéculas.

Tb.Pf: Factor de patrón trabecular.

Tb.Sp: Separación trabecular.

Tb.Th: Grosor trabecular.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β .

THS: Terapia hormonal sustitutiva.

TMB: Tetrametilbencidina.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TV: Volumen tisular.

URO: Unidad de remodelado óseo.

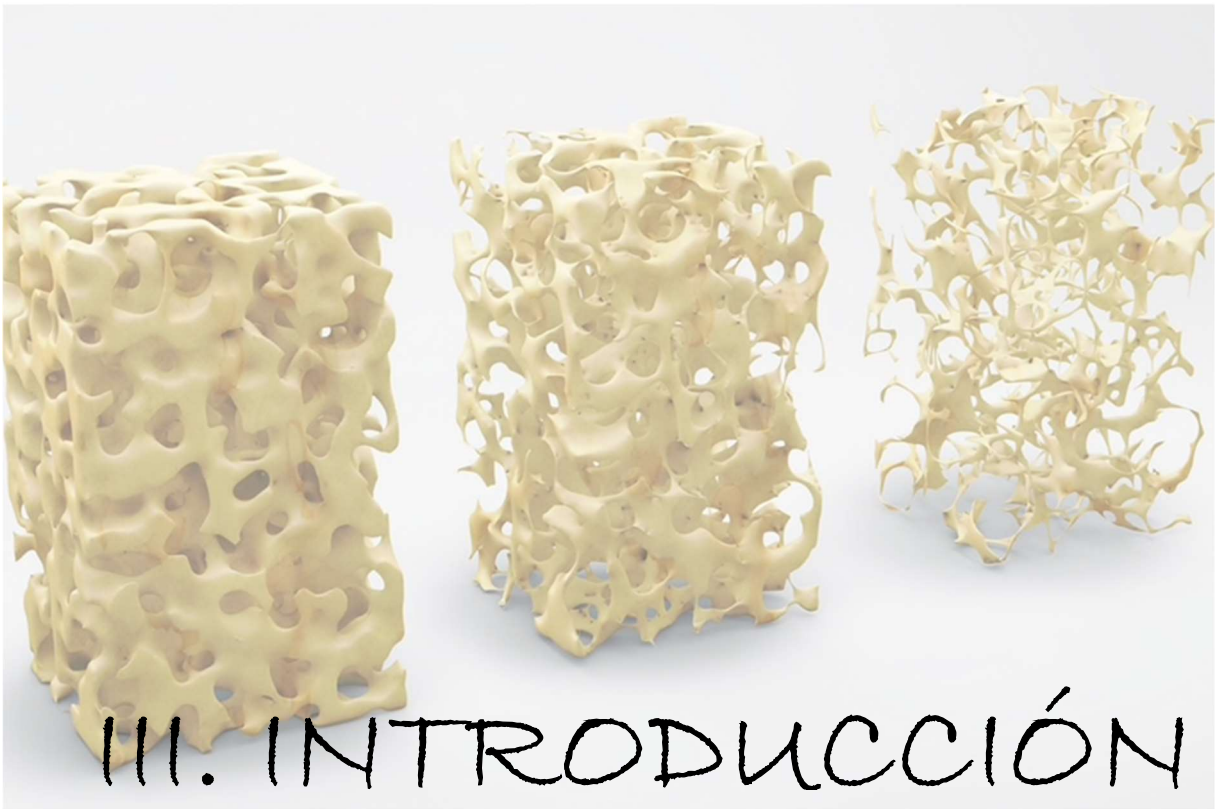
ν : Dureza.

U: Trabajo de rotura hasta la fractura.

VIP: Volumen total de la sección transversal dentro del periostio.

VOI: Volumen de interés.

WHI: Women's Health Initiative.



III. INTRODUCCIÓN

III.1. EL HUESO:

El conjunto de huesos que compone el esqueleto humano constituye un sistema vivo en continua actividad con una implicación fundamental en la homeostasis del organismo. Sus funciones principales son:

1. Función de protección: Protege los órganos vitales y la médula ósea.
2. Función locomotora y mecánica: Actúa como una estructura de soporte y de inserción muscular, permitiendo el movimiento y la locomoción del cuerpo humano.
3. Función metabólica, como depósito de iones calcio y fósforo [1].
4. Función hematopoyética y reguladora del sistema inmune.

III.1.1 COMPOSICIÓN DEL HUESO:

El tejido óseo, morfológicamente hablando, es un tejido conectivo altamente especializado, compuesto por una *matriz ósea extracelular* (formada por componentes orgánicos e inorgánicos) y un *componente celular*, en el que las distintas subpoblaciones celulares óseas (células de revestimiento, osteoclastos, osteoblastos, osteocitos y sus precursores) interactúan entre sí en diferentes procesos de formación, resorción y transformación del hueso [2].

A. MATRIZ ÓSEA EXTRACELULAR:

Compuesta por un componente orgánico que representa el 30% del peso seco y un componente inorgánico que abarca el 70% restante.

- **Componente orgánico:**

Está compuesto por proteínas colágenas y no colágenas.

- *Fibras colágenas*: Las fibras de colágeno son sintetizadas por los osteoblastos y constituyen el 90% de las proteínas que hay en el hueso. Estas fibras son las que dan al hueso resistencia a las fuerzas de tracción. La molécula de colágeno está formada por tres cadenas en espiral (cadenas α) que se disponen en una triple hélice. Dichas cadenas α del colágeno están formadas básicamente por glicina, prolina e hidroxiprolina.

De los tipos de colágeno que hay, el colágeno tipo I es el más abundante, pero también se ha encontrado en el hueso colágeno de tipo III y de tipo V [3].

Las alteraciones genéticas del colágeno dan lugar a enfermedades como la osteogénesis imperfecta o enfermedad de los huesos de cristal, que ocasiona que los huesos de los enfermos se rompan con mucha facilidad [2].

- *Proteínas no colágenas (PNC)*: Constituyen aproximadamente el 10% de las proteínas del hueso. A su vez se dividen en exógenas y endógenas [2]:

- Exógenas: La albúmina y la α -2-HS-glicoproteína. Ambas tienen carácter ácido. Se conoce que poseen afinidad por la hidroxiapatita e inhiben su crecimiento.

- Endógenas: Son sintetizadas por las células óseas y se dividen en 4 grupos:

- ❖ Proteoglicanos: Macromoléculas que contienen algún glucosaminoglicano en su composición unido a proteínas de alto peso molecular. Están formados por repeticiones de ácido hialurónico y leucina.

- ❖ Proteínas γ -carboxiladas: Contienen residuos carboxilados en el ácido glutámico. Entre ellas destacan la osteocalcina y la proteína Gla de la matriz. La *proteína Gla* de la matriz es sintetizada por condrocitos hipertróficos y es un marcador de condrogénesis.

La *osteocalcina* tiene gran afinidad por los cristales de hidroxiapatita e inhibe el crecimiento de cristales, por lo que se ha propuesto la hipótesis de que esta

proteína posea un papel fundamental en la regulación de los cristales óseos y en el crecimiento del hueso [4].

- ❖ **Proteínas glucosiladas:** Las más importantes son la osteonectina y la fosfatasa alcalina. Las *fosfatasas alcalinas* constituyen un sistema múltiple de formas moleculares. Las diferentes isoenzimas son codificadas por el mismo gen y sus diferencias se deben a diferentes grados de glucosilación. Se cree que la fosfatasa alcalina podría funcionar como una proteína fosfato transferasa. La *osteonectina* puede unirse al colágeno I, III y V, lo que sugiere que interviene en la organización de la matriz [3].

- ❖ **Proteínas RGD:** Son proteínas glucosiladas que tienen en su estructura una secuencia de tres aminoácidos Arg-Gly-Asp, que es la utilizada por las integrinas para posibilitar las interacciones célula- matriz. Las más importantes son osteopontina, vitronectina, sialoproteína, fibronectina y trombospondina [2,3].

- **Componente inorgánico:**

Formado por agua e iones entre los que destacan calcio y fosfato que dan lugar a cristales de fosfato cálcico o hidroxapatita (HA).

La matriz ósea aporta al hueso sus excelentes propiedades biomecánicas; las sales minerales le proporcionan dureza, rigidez y resistencia a la compresión y las fibras colágenas le dotan de flexibilidad y resistencia a la tensión [5].

B. COMPONENTES CELULARES:

Las células óseas son las responsables de los procesos de formación, transformación y resorción del esqueleto. Existen cuatro tipos de células óseas: los osteoblastos, osteocitos, las células de revestimiento (línea celular osteoblástica) y los osteoclastos (línea celular osteoclástica).

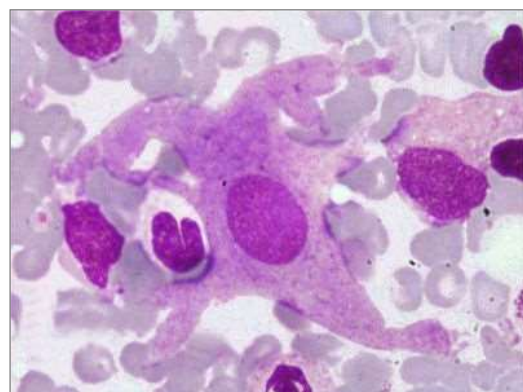
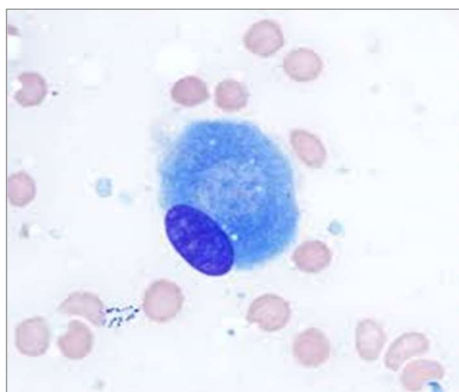
➤ *Osteoblastos:*

Los osteoblastos son las células responsables de la formación ósea. Sintetizan matriz orgánica extracelular que luego será mineralizada por depósito de cristales y, además, son los responsables de la activación de los osteoclastos. Se originan a partir de células mesenquimales (células madre de la médula ósea y del tejido conjuntivo). Estas células madre pueden diferenciarse en varias estirpes celulares según los reguladores de transcripción a los que se vean sometidas. De esta forma, una célula madre pluripotencial como la unidad formadora de colonias de fibroblastos (CFU-F) puede diferenciarse en un osteoblasto, un adipocito, un condroblasto, un mioblasto o un fibroblasto.

A nivel histológico, los osteoblastos son células mononucleares con citoplasma basófilo (**Figura 1**). Poseen retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi bien desarrollados, lo que muestra la alta capacidad secretora de la célula. La membrana plasmática es rica en la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina.

La mayoría de los osteoblastos desaparecen por un proceso de apoptosis una vez ejercida su función. Sin embargo, una parte de ellos quedan englobados en la propia matriz que han sintetizado, acabando su actividad anabólica y convirtiéndose en osteocitos [2]. Otros osteoblastos, en cambio, quedan retenidos en la superficie ósea, convirtiéndose en células de revestimiento planas (lining cells) [6,2].

Figura 1: *Imágenes de un osteoblasto obtenidas con microscopio óptico. Tomado de <http://atlas.qechem.org/>*



➤ *Osteocitos:*

Los osteocitos son las células más abundantes del hueso. Constituyen el último estadio de diferenciación y se forman cuando el tejido mineralizado envuelve al osteoblasto (**Figura 2**).

Se conectan entre sí a través de proyecciones citoplasmáticas generando una red de conexiones célula- célula que incluye a los osteoblastos en la superficie. Se les conoce como los sensores de carga mecánica que participan en la regulación de los procesos de modelación y remodelación óseas adaptativas [2]. De esta manera, los osteocitos actúan como mecano sensores del hueso detectando los estímulos mecánicos, los transducen a señales bioquímicas y, a través de la liberación de diversos factores, comunican el estímulo a los osteoblastos y osteoclastos. Tienen un papel fundamental en el sistema de comunicación en el hueso. Ante un estrés mecánico se produciría una deformación del tejido óseo, estimulando el flujo de líquidos intersticiales. Los mediadores de la respuesta al estrés del tejido óseo serían las prostaglandinas y el óxido nítrico. Los osteoblastos y osteoclastos responden a estos mediadores generando diferentes respuestas metabólicas.

Figura 2: *Microtomografía de osteoblastos y osteocitos. Tomado de <http://anatpat.unicamp.br/lamosso1.html>.*



➤ *Osteoclastos:*

Los osteoclastos son células gigantes y multinucleadas con capacidad de resorción ósea, es decir, de remover tejidos mineralizados. Proviene de células hematopoyéticas de la línea monocito- macrófago y son los precursores de las células formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos. Para su formación necesitan ser estimulados por el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) para diferenciarse hacia la estirpe monocítica y asegurar su proliferación y la expresión del receptor de RANK (receptor activador del factor nuclear Kappa B). La unión de RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear Kappa B) mediante el receptor RANK dará lugar a la diferenciación del osteoclasto.

Son células grandes con varios núcleos, ricas en mitocondrias y lisosomas, que presentan un borde en cepillo en la zona de contacto con el hueso (zona de sellado), permitiendo la resorción de la matriz ósea calcificada (**Figura 3 y Figura 4**). Suelen encontrarse en contacto con las superficies óseas calcificadas y dentro de las llamadas lagunas de Howship, que son el resultado de la resorción de dichas superficies óseas. Poseen una vida muy corta que finaliza por apoptosis o muerte celular programada. La enzima característica de los osteoclastos es la fosfatasa ácida resistente al tartrato [2].

Figura 3: *Imágenes de un osteoclasto obtenidas con microscopio óptico. Tomado de <http://atlas.gechem.org/>.*

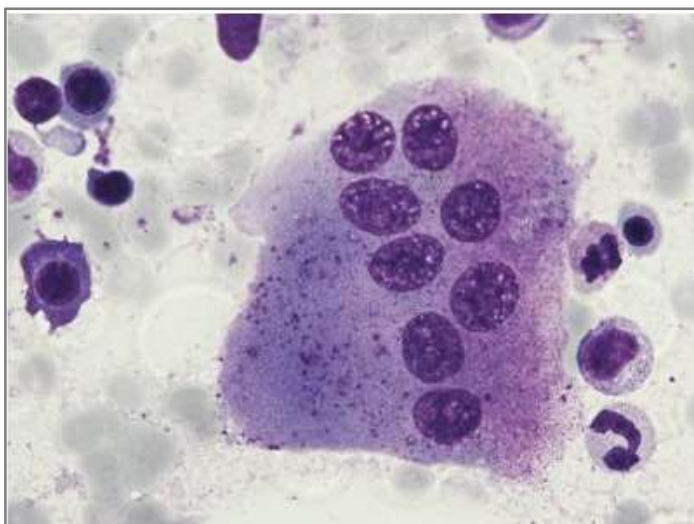
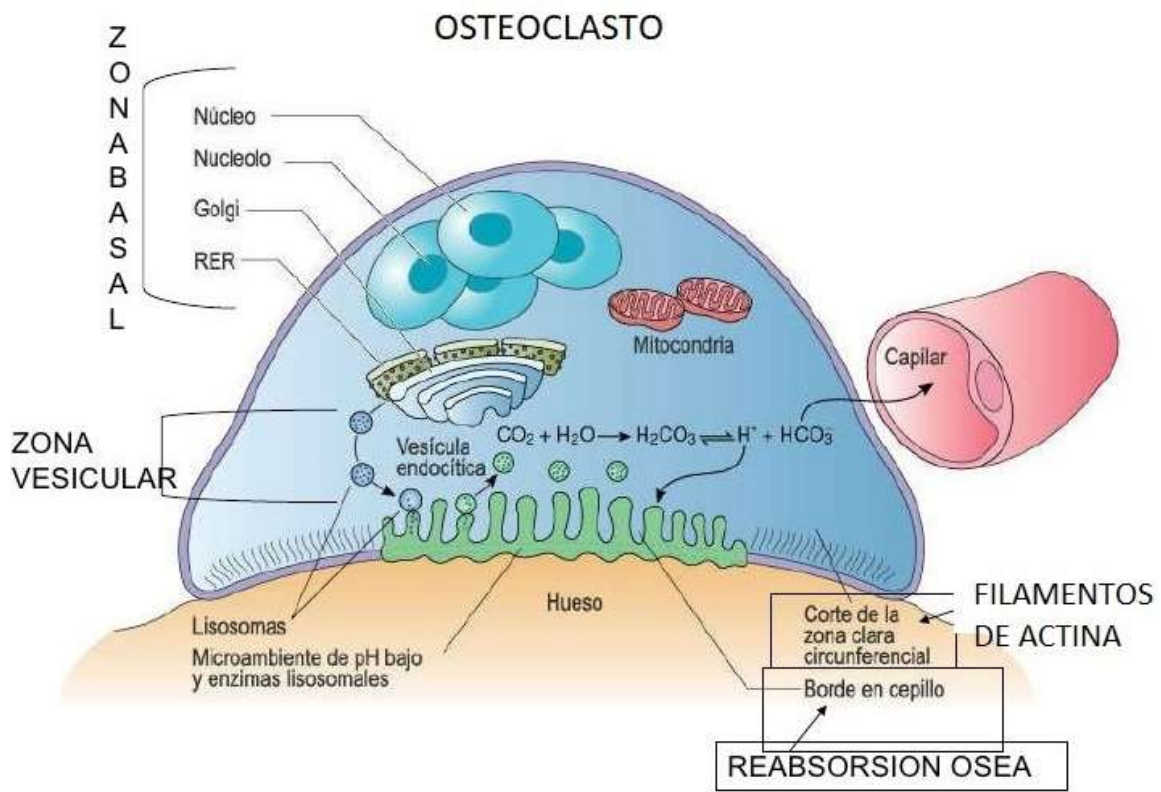


Figura 4: Representación de un osteoclasto activo. Tomado de Atlas de Histología de Gartner, 2001.



III.1.2 TEJIDO ÓSEO:

El tejido óseo está formado por hueso compacto y hueso trabecular (**Figura 5**).

➤ **Hueso compacto o cortical:**

El hueso compacto o cortical forma la capa externa del hueso, de carácter duro, resistente y compacto. Tiene fundamentalmente labor de sostén y protección. Constituye el 80% del esqueleto humano [2]. Se encuentra en la diáfisis de los huesos largos.

Tiene una estructura en forma de anillos concéntricos alrededor de canales centrales (canales de Havers) que se disponen longitudinalmente y por donde transitan los vasos sanguíneos y linfáticos. Los canales de Havers están conectados, a su vez, perpendicularmente por los canales de Volkmann. Entre los anillos concéntricos de matriz

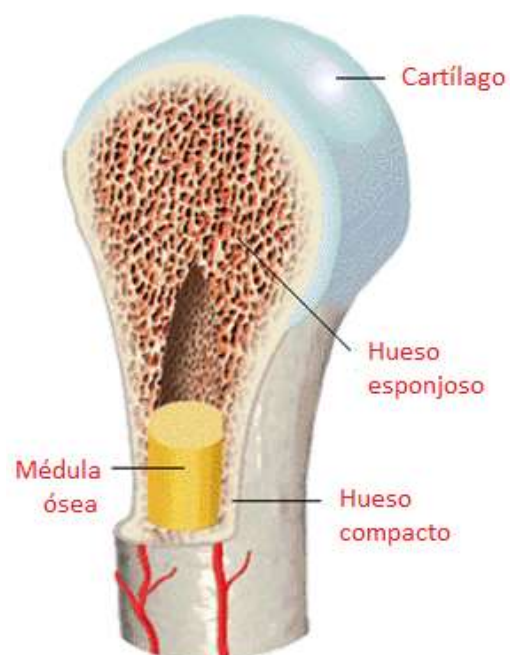
mineralizada hay pequeñas lagunas donde se encuentran los osteocitos. Desde cada laguna irradian unos canalículos que las comunican entre sí y permiten el intercambio celular. El conjunto del canal central con los anillos concéntricos que lo rodean, las lagunas, canalículos y osteocitos se denomina osteona.

➤ **Hueso trabecular o esponjoso:**

El hueso trabecular es la capa interna esponjosa del hueso, menos densa que el hueso compacto pero resistente. Constituye el 20% del esqueleto humano. Se encuentra principalmente en la epífisis de los huesos largos, el diploe de los huesos planos y entre las vértebras.

Está formado por láminas intersticiales dispuestas irregularmente formando unas placas llamadas trabéculas. Estas trabéculas forman una estructura esponjosa en la que se intercalan huecos que contienen tejido hematopoyético. Dentro de las trabéculas se encuentran los osteocitos. Los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso permitiendo el intercambio de nutrientes y oxígeno con los osteocitos.

Figura 5: Imagen hueso cortical y esponjoso.



III.2. REMODELADO ÓSEO:

El hueso es un tejido dinámico que se encuentra sometido a un proceso constante de formación y destrucción (resorción). La formación la llevan a cabo las células formadoras del hueso, los osteoblastos. La resorción la llevan a cabo las células destructoras, los osteoclastos [7,8].

En condiciones normales, este proceso de restructuración del hueso existente está equilibrado y la tasa de renovación es de un 5- 10% del hueso total al año. Se produce en las unidades básicas multicelulares o unidades de remodelado óseo (URO), donde los osteoclastos resorben una cantidad determinada de hueso y los osteoblastos se encargan de formar la matriz osteoide y mineralizarla rellenando la cavidad que se había creado previamente [9]. Anualmente, se renueva el 5% del hueso cortical y el 20% del hueso trabecular de los adultos, permitiendo el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfocálcico. De esta manera, el hueso se está formando continuamente gracias a los osteoblastos y a su vez, está siendo resorbido en las zonas donde están activos los osteoclastos. Los osteoblastos se encuentran en las superficies externas de los huesos y en las cavidades óseas internas. Aproximadamente, en todos los huesos vivos existe un 4% actividad osteoblástica, de manera que algo de hueso nuevo se está formando continuamente. Por el contrario, el hueso también está siendo continuamente resorbido por los osteoclastos, normalmente activos en menos del 1% de las superficies óseas del adulto.

Es importante resaltar que la resorción siempre precede a la formación de hueso y en condiciones normales el proceso está balanceado, manteniéndose un equilibrio entre las cantidades de hueso resorbidas y las formadas.

En cuanto a la histología, la resorción de hueso se produce cuando los osteoclastos emiten proyecciones análogas a vellosidades hacia el hueso, formando un borde rugoso con el hueso.

Las vellosidades secretan dos tipos de sustancias:

1. Enzimas proteolíticas liberadas por los lisosomas
2. Diferentes ácidos (cítrico, láctico), liberados por las mitocondrias y las vesículas secretoras.

Las enzimas digieren la matriz orgánica del hueso y los ácidos disuelven las sales óseas. Las células osteoclasticas también ingieren por fagocitosis diminutas partículas de matriz ósea y de cristales, terminando también por disolverlas y liberando los productos hacia la sangre.

Los osteoclastos habitualmente se agrupan formando masas pequeñas y, una vez activados, fagocitan hueso durante unas tres semanas, excavando pequeños túneles. Al cabo de este tiempo, los osteoclastos desaparecen y los túneles son invadidos por osteoblastos, para comenzar a desarrollar hueso nuevo. El depósito de hueso nuevo continúa durante varios meses en forma de capas concéntricas (laminillas) en las superficies internas de la cavidad, hasta que se rellena el túnel y cesa cuando el hueso comienza a invadir los vasos sanguíneos que riegan el área. Cada nueva área de hueso formada es una osteona, ya nombrada anteriormente.

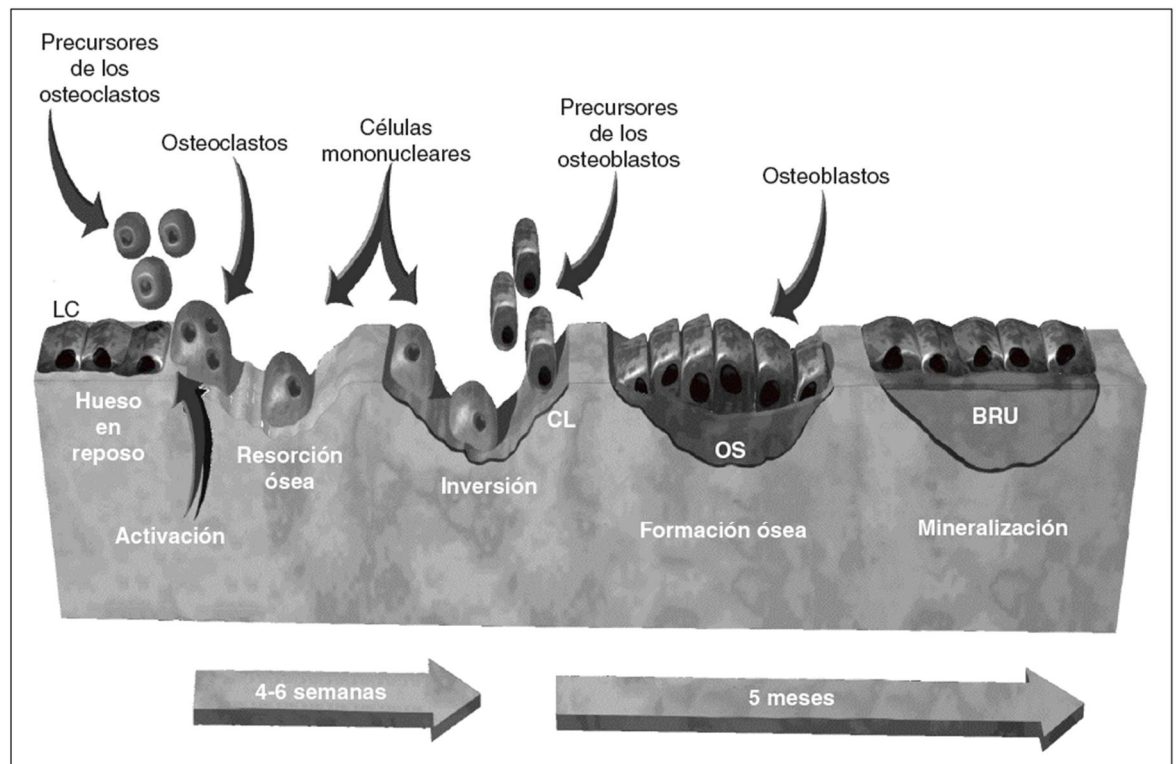
III.2.1 FASES DEL REMODELADO ÓSEO:

Las fases del remodelado óseo son las siguientes (**Figura 6**):

1. **Activación:** Tiene lugar en una superficie ósea, en la que las células de revestimiento, a partir de la secreción de colagenasas, preparan la zona que se va a remodelar y mediante señales quimiotácticas atraen a los preosteoclastos que se diferenciarán en osteoclastos.
2. **Resorción:** Los osteoclastos disuelven la matriz mineral y descomponen la matriz osteoide, siendo finalizado el proceso por los macrófagos, que permiten la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz.

3. **Inversión:** Es una etapa de supuesta inactividad que dura aproximadamente 2 semanas.
4. **Formación:** En las zonas de resorción se produce un fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por factores de crecimiento. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación. Días después, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las cavidades que se habían creado.
5. **Mineralización:** A los 30 días del depósito osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a los 90 días en el trabecular.

Figura 6: Fases del remodelado óseo. Tomada de Mellibovsky, 2006.



El depósito y la resorción de hueso que se producen continuamente durante las fases del remodelado óseo tienen importantes funciones fisiológicas:

- El hueso adapta su resistencia proporcionalmente al grado de tensión al que se le somete. En consecuencia, el hueso aumenta de espesor cuando está sometido a cargas importantes.
- La forma del hueso puede cambiar su disposición para soportar adecuadamente las fuerzas mecánicas, adaptando el depósito y la resorción ósea de acuerdo con los patrones de sobrecarga.
- El hueso viejo se vuelve relativamente frágil y débil y necesita nueva matriz orgánica a medida que esta se va degenerando. De esta forma, la dureza normal del hueso se mantiene. De hecho, los huesos de los niños, en los que las tasas de depósito y resorción son rápidas, son poco frágiles en comparación con los huesos de las personas de edad avanzada, en quienes las tasas de depósito y resorción son bajas.

III.2.2 REGULACIÓN DEL REMODELADO ÓSEO:

El remodelado óseo se encuentra regulado por múltiples factores tanto a nivel local como sistémico, que controlan el reclutamiento, replicación, diferenciación y actividad de los osteoblastos y los osteoclastos [10,11]. Además, estímulos mecánicos participan en el proceso de remodelado óseo [12].

Existen diversas hormonas involucradas en el remodelado óseo como son la hormona paratiroidea (PTH), la calcitonina y el 1,25-dihidroxicolecalciferol (forma activa de la vitamina D3), reguladas por las concentraciones de calcio extracelular. Otras, sin embargo, son independientes de las concentraciones de calcio, como son los andrógenos, estrógenos, glucocorticoides, hormonas tiroideas y hormona del crecimiento (GH) [10,13].

- La PTH producida en las glándulas paratiroideas es la hormona hipercalcemiante por excelencia. Realiza su acción a tres niveles: directamente sobre el hueso, estimulando los osteoclastos y favoreciendo la resorción ósea, una acción ligada a la presencia de

vitamina D; en el riñón, incrementando la reabsorción tubular distal de calcio; e indirectamente sobre el intestino, estimulando la síntesis de 1,25-dihidroxicolecalciferol que, a su vez, aumenta la absorción de calcio.

- La calcitonina, actúa directamente sobre receptores de los osteoclastos. Su papel fisiológico es controvertido. Se ha demostrado que situaciones en las que hay un aumento en su secreción (carcinoma medular del tiroides) o en las que hay ausencia de células C (tiroidectomía total) la calcemia se mantiene en niveles normales y no hay alteraciones óseas. Sin embargo, a dosis farmacológicas, la calcitonina posee una actividad inhibidora de la resorción ósea al reducir el número y actividad de los osteoclastos, por lo que se puede considerar una hormona protectora del tejido óseo.
- La vitamina D₃ realiza su acción principal en el intestino delgado, favoreciendo la absorción del calcio de la dieta. En el hueso actúa, en presencia de PTH, estimulando la diferenciación de los osteoclastos y, por tanto, la resorción ósea, posibilitando una mineralización adecuada. En el riñón aumenta la reabsorción tubular proximal de calcio. El déficit o la insuficiencia de vitamina D₃, como ocurre en mujeres postmenopáusicas, conllevan un riesgo aumentado de hiperparatiroidismo secundario con objeto de mantener la normocalcemia y una pérdida asociada de masa ósea.
- La GH se sintetiza además de en la hipófisis en otras células del organismo, entre ellas los osteoblastos. Actúa directamente sobre receptores de los osteoblastos, estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina. También actúa de forma indirecta con el aumento de la síntesis de los factores de crecimiento análogos a la insulina I y II (IGF-I e IGF- II) por los osteoblastos, lo que favorece su proliferación y diferenciación.
- Las hormonas tiroideas son esencialmente hipercalcemiantes. A nivel de hueso actúan estimulando a los osteoclastos que aceleran la velocidad del recambio óseo. Así, el hipertiroidismo condiciona riesgo de osteoporosis.

- Los glucocorticoides de forma fisiológica actúan como moduladores del remodelado óseo. A dosis farmacológicas disminuyen la actividad de los osteoblastos e inducen una pérdida ósea condicionando una osteoporosis secundaria. Esta acción está mediada en parte por la PTH y el 1,25-dihidroxicolecalciferol.
- Las hormonas sexuales juegan un papel importante sobre el hueso. Los estrógenos inhiben la resorción ósea y estimulan la formación del hueso. Actúan sobre los osteoblastos directamente, modulando su proliferación y diferenciación, y aumentando la secreción de citoquinas que, a su vez, actuarían de forma paracrina estimulando o inhibiendo la actividad de los osteoclastos. También tienen acción directa sobre los osteoclastos modulando su actividad. Más recientemente se ha comprobado que los estrógenos pueden aumentar los niveles de osteoprotegerina (OPG), proteína inhibidora de la resorción producida por los osteoblastos, por lo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis. Esta actividad explicaría la pérdida de hueso ligada al hipoestrogenismo tras la menopausia. Por su parte, los andrógenos tienen un efecto fundamentalmente anabólico, de forma que facilitan la acción osteoblástica e inhiben la resorción ósea al disminuir la secreción de citoquinas como las interleuquinas 6 y 8 (IL-6 y 8).

Entre los factores locales involucrados en el remodelado óseo se encuentran factores de crecimiento, prostaglandinas y citoquinas:

- Los factores de crecimiento son polipéptidos que regulan la replicación y la función de las células sobre las que actúan y pueden ejercer su función de forma local y sistémica. Algunos ejemplos son: el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1), el factor de crecimiento epidermoide (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) [14].
- Las prostaglandinas regulan el remodelado óseo de manera local.

- Las citoquinas son péptidos de pequeño tamaño que presentan funciones reguladoras sobre la formación, resorción ósea y la respuesta inmune. Algunos ejemplos son las interleuquinas (IL-1, IL-6, IL-11...), factores estimulantes de colonias (M-CSF y GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

Es importante destacar que existe una estrecha interrelación entre la actividad y el desarrollo de osteoblastos y osteoclastos. Los osteoblastos regulan la diferenciación y la actividad de los osteoclastos mediante el sistema RANK/RANKL/OPG.

El RANKL es un potente factor de resorción sintetizado por los osteoblastos y por células del sistema inmune. Se expresa como proteína de membrana, pero también como proteína libre secretada [15] y fue identificada como parte de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) [16-19]. El RANKL, producido por el osteoblasto, se une al receptor RANK situado en la superficie de los osteoclastos y promueve la proliferación, diferenciación, supervivencia y fusión de las células precursoras de osteoclastos, para activarlas hacia osteoclastos maduros e inhibir su apoptosis [16,17]. Para ello, es indispensable, la expresión del M-CSF por los osteoblastos del estroma, en una acción sinérgica [20]. (**Figura 7**).

Los osteoblastos sintetizan también la osteoprotegerina (OPG), que protege al hueso y bloquea los efectos del RANKL, modulando negativamente la activación y desarrollo de los osteoclastos. [21] (**Figura 8**).

Los efectos biológicos de la OPG son antagónicos a los ejercidos por el RANKL y, por tanto, el remodelado óseo depende del equilibrio entre ambos [13].

Por su parte, las hormonas, las citoquinas y los factores de crecimiento actuarían sobre los receptores en los osteoblastos y otras células para inducir la producción del RANKL. Algunos de estos factores también suprimen la producción de la OPG por los osteoblastos, aumentando el ratio RANKL/OPG. Además de PTH, otros agentes pro-resortivos que regulan la expresión de RANKL/OPG incluyen las interleuquinas IL-1, IL-7 e IL-17; TNF α , glucocorticoides y vitamina D. Por otro lado, muchas moléculas que inhiben la resorción ósea,

como los estrógenos, el IFN γ , el TGF β y las interleuquinas IL-4 e IL-13, también han demostrado regular el balance RANKL/OPG.

Figura 7: Unión del RANKL al RANK para iniciar la osteoclastogénesis.

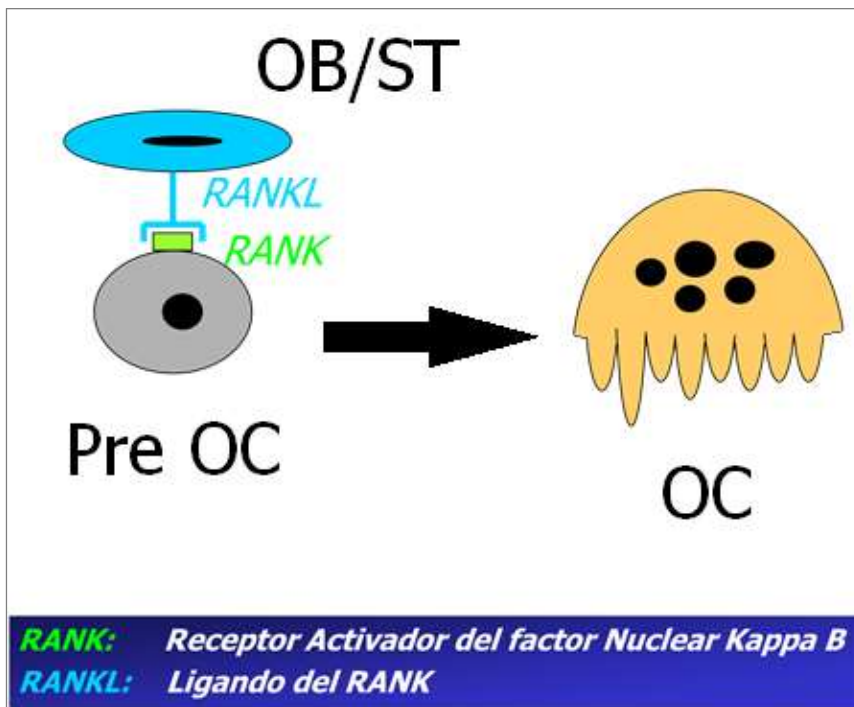
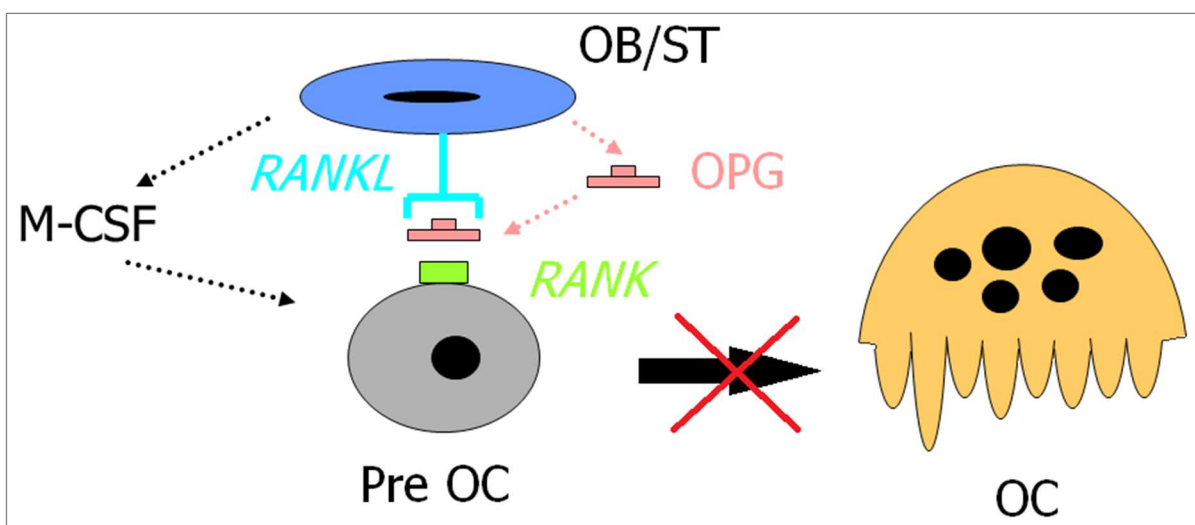


Figura 8: Unión de OPG al RANKL, impidiendo la unión RANK-RANKL.



El principal papel fisiológico del sistema RANK/RANKL/OPG es la regulación del remodelado óseo, interviniendo en un amplio rango de enfermedades óseas en las que se produce un desequilibrio entre formación y resorción. Por ejemplo, en la enfermedad de Paget se han identificado mutaciones de los genes del RANKL y la OPG, pero el aspecto más investigado es el papel del sistema RANK/RANKL/OPG en la osteoporosis postmenopáusica. Para su tratamiento, se autorizó el uso de Denosumab, un anticuerpo monoclonal anti-RANKL [13].

También se ha podido observar la implicación de este sistema en la artritis reumatoide, generando una temprana activación del RANKL y una supresión de la OPG en las articulaciones inflamadas. El uso de Denosumab en esta enfermedad ha mostrado utilidad terapéutica no solo reduciendo la pérdida ósea, sino también protegiendo frente a la erosión ósea y el daño estructural.

Igualmente se ha visto cómo las células cancerosas en metástasis óseas son capaces de aumentar el ratio RANKL/OPG, estimulando la resorción ósea y permitiendo a las células cancerosas crecer dentro del hueso. Lo mismo que ocurre en el mieloma múltiple, cuyas células son incluso más destructivas para el hueso. En los pacientes con mieloma múltiple encontramos concentraciones más bajas de OPG que los controles y el anticuerpo Denosumab ha mostrado efectos antirresortivos persistentes.

En el cáncer de próstata, la OPG podría usarse para el diagnóstico y progresión precoz de la enfermedad. Los pacientes con cáncer de próstata que responden a la terapia antiandrogénica presentan niveles de OPG significativamente más bajos y, por ello, la OPG podría convertirse en un marcador útil en el tratamiento de estos pacientes. Denosumab ha demostrado aumentar la densidad mineral ósea y reducir la incidencia de nuevas fracturas vertebrales en estos pacientes con cáncer de próstata que reciben terapia antiandrogénica.

III.2.3 MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO:

Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo miden los productos generados durante el proceso de formación o degradación de la matriz ósea y pueden determinarse en sangre y orina. Nos permiten cuantificar las actividades formadora y resorptiva del hueso y, por tanto, el grado de riesgo para el desarrollo posterior de fracturas.

Los marcadores óseos que miden la actividad osteoblástica se denominan de formación y los que derivan del número o la actividad de los osteoclastos son los llamados marcadores de resorción.

Dicha medida se puede realizar desde dos puntos de vista: a) determinación de los productos específicos sintetizados por las células óseas (osteocalcina, fosfatasa alcalina, propéptidos del procolágeno, fosfatasa ácida tartrato resistente...) y b) determinación de los componentes del hueso vertidos a la circulación durante la resorción ósea (calcio, hidroxiprolina, piridinolinas, telopéptidos...).

III.2.3.1 MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA:

El osteoblasto realiza dos funciones fundamentales dentro del proceso de formación del hueso:

1. Síntesis de proteínas de la matriz.
2. Mineralización de la matriz ósea.

Entre las proteínas sintetizadas por el osteoblasto están el colágeno y la osteocalcina. Por cada molécula de colágeno I que sintetiza el osteoblasto se produce una molécula de propéptido aminoterminal de procolágeno I (PINP) y otra de propéptido carboxiterminal procolágeno I (PICP). Los niveles de osteocalcina, PINP y PICP en suero nos servirán, por lo tanto, como índices cuantitativos de la actividad del osteoblasto. Por otra parte, en el proceso de mineralización ósea está directamente implicada la fosfatasa alcalina liberada por los osteoblastos.

Los marcadores de formación ósea que más se utilizan en la actualidad son:

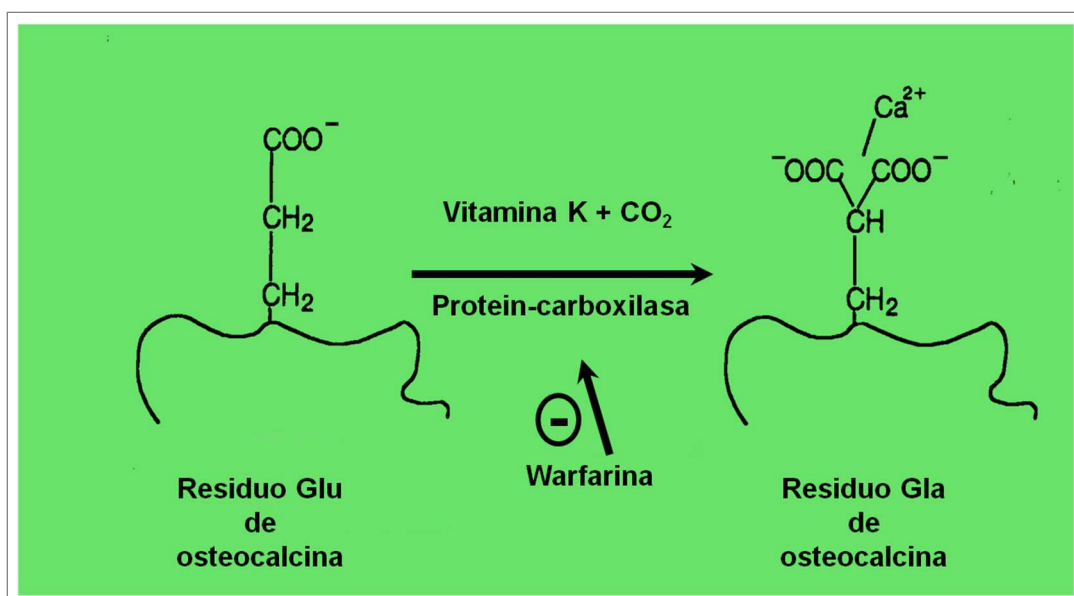
- Fosfatasa alcalina total.
- Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina.
- Osteocalcina.
- Propéptido carboxiterminal del procolágeno I.
- Propéptido aminoterminal del procolágeno I

A continuación, me voy a centrar en los marcadores de formación ósea que he utilizado para el desarrollo de esta tesis.

1. Osteocalcina:

La osteocalcina (BGP, "Bone Gla-Protein"), es una proteína sintetizada por los osteoblastos que contiene 49 aminoácidos. Se caracteriza por la presencia en su secuencia, en posiciones 19, 21 y 24, de tres aminoácidos gamma-carboxiglutámicos (Gla), formados por gamma-carboxilación del ácido glutámico, reacción dependiente de la vitamina K (**Figura 9**).

Figura 9: *Proceso de formación de la molécula de osteocalcina. Tomada de Marcadores bioquímicos de remodelado óseo. Plataforma de experiencia en salud ósea por M Rubert, 2012.*



La osteocalcina se une a la fase mineral del hueso a través de los residuos “Gla” (los dos grupos químicos -COO^- se unen a los Ca^{2+}). Por ello, cuando esta proteína es liberada por el osteoblasto, una parte pasa al suero, y otra se une a la fase mineral del hueso.

La osteocalcina se ha utilizado desde los años 80 como marcador bioquímico de formación ósea debido a que la parte de esta proteína que pasa al suero es directamente proporcional a la cantidad sintetizada por el osteoblasto [22]. Es importante tener en cuenta que, además de la osteocalcina intacta, en el suero existen una serie de fragmentos de esta proteína derivados del metabolismo periférico y procedentes también de la degradación del hueso [23]. Los antisueros utilizados en los inmunoanálisis no son capaces de detectar estos fragmentos metabólicos con la misma especificidad que a la propia BGP, por ello, los resultados obtenidos dependerán del método utilizado [24]. Actualmente existen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra determinadas regiones de la molécula de osteocalcina, que son capaces de reconocer la molécula intacta y/o un determinado tipo de fragmento. A la hora de cuantificar la BGP, es fundamental realizar los estudios completos utilizando siempre la misma técnica de medida ya que se ha visto que cada método tiene diferente especificidad frente a los fragmentos circulantes de osteocalcina y, por tanto, los resultados obtenidos podrían presentar variaciones.

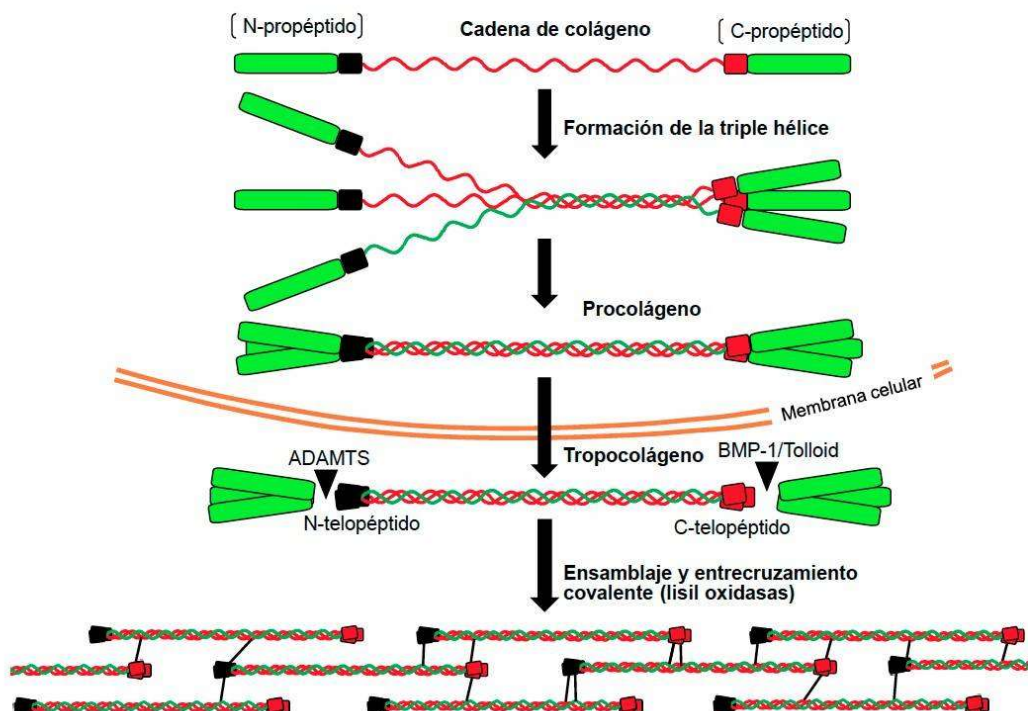
También es importante tener en cuenta la inestabilidad de la BGP a temperatura ambiente a la hora de realizar su medición. En un tiempo pequeño (1-2h), si el suero no se ha congelado inmediatamente, un porcentaje alto de la BGP intacta se degrada a otros fragmentos más pequeños. El fragmento amino-terminal medio es el mayoritario que se obtiene y si el método de cuantificación utilizado no es capaz de detectarlo se obtendrán cifras de BGP significativamente más bajas que las reales. Por tanto, es importante utilizar métodos que sean capaces de detectar este fragmento, para minimizar la infraestimación en la cuantificación que supone la degradación de la molécula a temperatura ambiente.

2. Propéptido Aminoterminal del Procolágeno I (PINP):

El colágeno tipo I predomina en la matriz ósea. Se sintetiza en los osteoblastos y se libera al exterior durante la formación ósea en forma de un precursor, denominado procolágeno I.

La estructura del colágeno I maduro es de triple hélice, formado por dos cadenas proteicas iguales denominadas alfa-1 y otra diferente denominada alfa-2. Su precursor, el procolágeno I, se libera al exterior donde se escinden sus extremos amino y carboxi terminales por acción de peptidasas específicas dando lugar a dos nuevas proteínas, correspondientes a los dos extremos del procolágeno, denominadas propéptido aminoterminal del procolágeno I (PINP) y propéptido carboxiterminal del procolágeno I (PICP), que se liberarán al suero (**Figura 10**).

Figura 10.: Estructura molécula de colágeno y formación de sus propéptidos. Tomada de *Diagnóstico genético molecular en colagenopatías: importancia de la correlación datos genéticos-datos clínicos* por J. Porta, 2020.



La molécula de colágeno pasa a formar parte de la matriz ósea ya sin sus extremos. Cuanto más colágeno se sintetice, más cantidad de propéptidos de procolágeno pasarán a la circulación y, por tanto, las concentraciones de PICP y de PINP pueden considerarse marcadores bioquímicos de formación ósea.

La determinación de PICP en suero se utiliza principalmente para el seguimiento del grado de remodelado óseo en los niños con déficit de hormona de crecimiento [25] pero no presenta una buena sensibilidad es el estudio de las alteraciones del remodelado óseo en la osteoporosis posmenopáusica.

La determinación rutinaria de PINP es más reciente. Aunque según la teoría las sensibilidades del PINP y del PICP deberían ser similares, porque se desprende una molécula de cada propéptido por cada molécula de colágeno sintetizada, la sensibilidad de la determinación del PINP es muy superior a la del PICP en el estudio de la osteoporosis [26]. Actualmente, la técnica del PINP está automatizada por electroquimioluminiscencia lo que ha facilitado enormemente su utilización en el laboratorio clínico.

Diversos estudios demuestran que la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina y el PINP son los marcadores de formación más sensibles y específicos para el estudio de la osteoporosis postmenopáusica [26]. Debido a la existencia de una reacción cruzada entre el método de la fosfatasa alcalina ósea y la fosfatasa alcalina hepática recomendamos la utilización del PINP como marcador más sensible y específico en el estudio y seguimiento de los tratamientos en la osteoporosis postmenopáusica.

III.2.3.2 MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA:

El osteoclasto realiza dos funciones principales que dan lugar al proceso de resorción ósea y son contrarias a las que realiza el osteoblasto:

- 1) Disolución del mineral óseo.
- 2) Degradación de la matriz del hueso.

La anhidrasa carbónica liberando protones al medio, facilita la disolución del fosfato cálcico (hidroxiapatita). El calcio liberado será un índice indirecto de la tasa de destrucción del hueso al pasar al líquido extracelular. Mientras tanto, el osteoclasto libera una serie de enzimas: catepsina K, metaloproteinasas, fosfatasa ácida tartrato resistente...

La fosfatasa ácida tartrato resistente en suero es también un marcador bioquímico de resorción ósea. Además, durante la degradación del colágeno se liberan a la circulación un gran número de productos derivados de su rotura, desde aminoácidos como la hidroxiprolina hasta productos complejos como los telopéptidos.

Los marcadores de resorción ósea que se utilizan en la actualidad son los siguientes ordenados según la actividad o producto de degradación medido:

❖ **Actividad enzimática del osteoclasto.**

- Fosfatasa ácida tartrato resistente.

❖ **Degradación del mineral óseo.**

- Calcio / Creatinina en orina.

❖ **Productos derivados de la rotura del colágeno.**

- Hidroxiprolina en orina.
- Puentes de piridolina: piridolina y desoxipiridolina.
- Telopéptidos carboxiterminales del colágeno I unidos por puentes de piridolina (ICTP).
- Telopéptidos aminotermiales del colágeno I unidos por puentes de piridolina (NTX).
- Telopéptido C-terminal de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I (CrossLaps, CTX).

A continuación, igual que en el caso anterior, me voy a centrar en los marcadores de resorción ósea que he utilizado para el desarrollo de esta tesis.

1. Fosfatasa ácida tartrato resistente en suero:

La fosfatasa ácida tartrato resistente es una enzima lisosomal liberada por el osteoclasto activo. Existen otras isoenzimas de la fosfatasa ácida, pero sólo la procedente de los hematíes y la ósea son resistentes al tartrato. Por ello, la determinación de la actividad sérica de la fosfatasa ácida en presencia del anión tartrato, fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR), en muestras de suero que no presenten hemólisis, constituye una medida específica de resorción ósea.

La determinación de la FATR es una técnica sencilla, similar a la de la fosfatasa alcalina, pero realizada en medio ácido (pH = 4.8) en vez de básico y añadiendo tartrato sódico al medio. La técnica es económica y está automatizada, pero tiene el inconveniente de ser poco específica debido a la presencia en el suero de otras isoenzimas de FATR derivadas de los eritrocitos y las plaquetas, además, la bilirrubina interfiere en la medida del producto final de la reacción, de color amarillo.

Se ha demostrado que el suero contiene dos formas de FATR, la 5a y la 5b. La 5a contiene ácido siálico y la 5b no. Las propiedades antigénicas y el pH óptimo de la isoenzima 5b son idénticos a los de la FATR purificada de los osteoclastos humanos, y completamente diferentes de las de la isoenzima 5a, lo que sugiere que la forma 5b es la que procede de los osteoclastos, y la 5a de otras fuentes no determinadas [27].

Actualmente, existe un método comercial que permite analizar específicamente la isoenzima 5b de la FATR en suero. Los resultados obtenidos indican que la determinación de la isoenzima 5b de la FATR presenta mayor sensibilidad para detectar los cambios en la resorción que la determinación de FATR total [27] en el seguimiento del remodelado óseo.

El mayor inconveniente que presenta el uso de este marcador es su falta de estabilidad, que hace necesaria la congelación de las muestras de suero inmediatamente después de su obtención, lo que dificulta su uso.

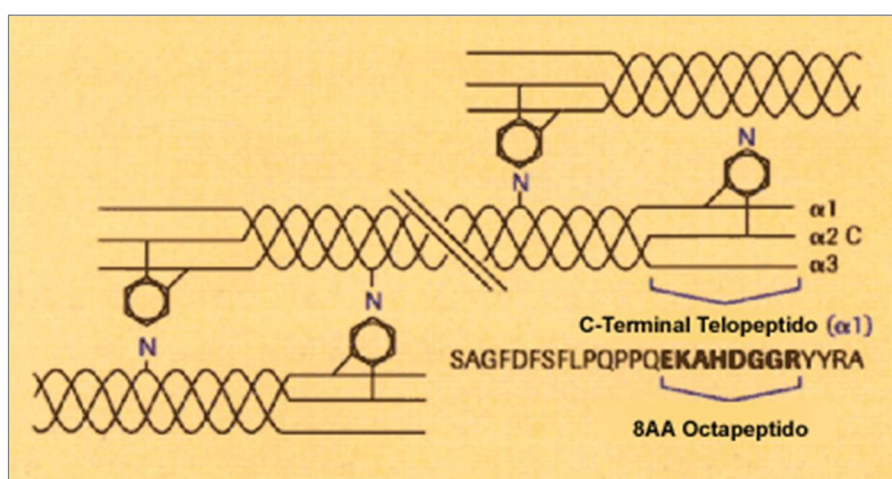
2. Telopéptido Carboxiterminal de la Cadena alfa-1 del Colágeno Tipo I (CrossLaps, CTX):

El CTX es un producto de degradación del colágeno tipo I. Se trata de un fragmento de ocho aminoácidos perteneciente a la zona telopeptídica C-terminal de una cadena alfa-1 del colágeno I. Este péptido se suele eliminar unido a un puente de piridinolina, debido a que cuando el colágeno aún no se ha degradado, el segundo aminoácido de esta secuencia está implicado en la formación de un puente piridinólico. Abreviadamente, lo conocemos como telopéptido carboxiterminal o CTX (**Figura 11**).

Se descubrió que el fragmento de CTX puede sufrir isomerización. Dentro de la secuencia de 8 aminoácidos (EKAHDGGR), la unión DG es un sitio potencial de beta-isomerización [28]. En el colágeno recién sintetizado, el CTX tiene una estructura lineal (alfa-CTX), pero el grado de beta-isomerización (beta-CTX) aumenta al aumentar la edad del colágeno óseo.

En los adultos, mayoritariamente el C-telopéptido se encuentra en la forma beta. Por ello, cuando se determina CTX en el laboratorio nos referimos implícitamente a beta-CTX. Actualmente, además de mediante ELISA, su determinación en suero puede realizarse de manera automatizada por electroquimioluminiscencia.

Figura 11: Estructura del telopéptido carboxiterminal (CTX, Cross Laps). Tomada de <https://www.farestaie.com.ar/>.



III.3. LA OSTEOPOROSIS:

Históricamente la definición de osteoporosis ha sido difícil, ya que estando basada en la densidad mineral ósea (DMO) podría no incluir todos los factores de riesgo para fractura, mientras que una definición basada en fracturas no permitiría la identificación de poblaciones en riesgo.

La primera reunión de consenso para establecer la definición de osteoporosis (OP) tuvo lugar en 1992 y en 1993 se publicó la primera declaración por la Organización Mundial de la Salud (OMS), definiendo la osteoporosis como “una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por una masa ósea baja y por el deterioro microarquitectónico del tejido óseo, con un aumento subsecuente en la fragilidad del hueso y susceptibilidad al riesgo de fractura” [29,30].

Al ir comprendiendo que la densidad mineral ósea no era lo único importante y que se debía tener en cuenta la resistencia ósea, la osteoporosis se redefinió en 2001 en una nueva conferencia de consenso llevada a cabo en el seno del panel de expertos en la prevención de osteoporosis del National Institutes of Health (USA): “La osteoporosis se define como un trastorno del esqueleto caracterizado por una alteración de la resistencia ósea [31] que predispone a una persona a un incremento en el riesgo de fracturas”. La resistencia del hueso refleja principalmente la integración de la DMO y la calidad del hueso. (**Figura 12**).

Se trata de una definición operativa, probablemente con mayor utilidad para el clínico en su práctica diaria. Actualmente, el criterio que nos permitirá identificar a los pacientes que la sufren en el día a día asistencial es la obtención en una densitometría de una puntuación T inferior a -2,5 [32]. El mayor inconveniente en la osteoporosis es la falta de signos de alerta previos a la aparición de fracturas lo que hace que muchos pacientes no sean diagnosticados en las fases tempranas y puedan ser tratados de forma precoz y efectiva. Se ha comprobado que el 95% de los pacientes que presentan una fractura por fragilidad no tenían un diagnóstico previo de osteoporosis [33]. La osteoporosis es una enfermedad que produce un aumento de la morbilidad en los pacientes que la sufren, generando en ellos un deterioro en la calidad de

vida, además aumenta la mortalidad y conlleva a un importante consumo de recursos sociosanitarios de todo tipo [32,34].

Figura 12: *Imagen microscópica del hueso normal y osteoporótico.*



Los pacientes que presentan fracturas por fragilidad han mostrado un deterioro en la calidad de vida y, el temor a sufrir nuevas fracturas los hace más propensos a la depresión. Todo ello condiciona una menor puntuación en muchas de las esferas valoradas en los cuestionarios de calidad de vida [35,36].

Existen numerosas enfermedades o la medicación utilizada para tratarlas que son capaces de producir osteoporosis e incrementar el riesgo de fractura. En estos casos hablaríamos de una osteoporosis secundaria. Las fracturas por fragilidad incrementan el riesgo de sufrir otras fracturas [37,38]. Por ejemplo, después de sufrir una fractura vertebral el riesgo de padecer una nueva fractura en una vértebra aumenta entre 7 y 10 veces [39,40].

Diversos estudios demostraron que los pacientes que sufren fracturas por fragilidad tienen un aumento de la mortalidad, tanto en estudios descriptivos donde se recoge la mortalidad asociada a las fracturas osteoporóticas, como en estudios de cohorte, en los que se observa que los pacientes fracturados tienen una mayor mortalidad si se comparan con los

controles de su misma edad y sexo que no han tenido fracturas [32]. Así, algunos estudios realizados en nuestro país han mostrado que la mortalidad de la fractura de la extremidad proximal del fémur es del 6-10% en el primer mes, pero si se realiza un seguimiento de estos pacientes, la mortalidad aumenta hasta el 30% en el primer año tras la fractura y llega hasta el 40% a los 2 años [41].

Desde el punto de vista socioeconómico las fracturas osteoporóticas suponen una carga de gran magnitud. Es una enfermedad que afecta a 150-200 millones de personas en el mundo. Aproximadamente la mitad de estos pacientes pertenecen a países desarrollados. Se estima que entorno al 33% de las mujeres mayores de 50 años va a sufrir osteoporosis. Hoy en día la osteoporosis sigue estando infradiagnosticada y muchos pacientes permanecen sin tratamiento a pesar de tener fracturas reconocidas. Además de su elevada mortalidad y morbilidad la osteoporosis genera costes socioeconómicos importantes. El cálculo de este coste es difícil y sesgado pero dichos costes se pueden dividir en directos e indirectos. Entre los directos están los debidos a hospitalización, cuidados ambulatorios y farmacéuticos y dentro de los indirectos nos encontramos la pérdida de producción del paciente o de los familiares que los atienden [34].

III.3.1 FISIOPATOLOGÍA:

En la osteoporosis se produce una disfunción de las unidades de remodelado óseo que a su vez se debe fundamentalmente a dos tipos de alteraciones. La primera consiste en el establecimiento de un “balance negativo”; la segunda en un aumento del número de unidades de remodelación, que da lugar a un “aumento del recambio óseo”.

- En el adulto joven existe un balance óseo “cero” debido la cantidad de hueso que forman los osteoblastos en cada unidad de remodelación ósea es igual a la que han destruido previamente los osteoclastos. Sin embargo, alrededor de los 40 años, la cantidad de hueso formada por los osteoblastos comienza a ser menor que la destruida por los osteoclastos. Esto se conoce como “balance negativo”. Dependiendo de la masa ósea inicial, de la

cuantía del balance negativo, y de la edad de la persona, dicha pérdida puede dar lugar a la osteoporosis.

A la disminución de la actividad de los osteoblastos propia de la edad, existe un aumento de la actividad de los osteoclastos que en las mujeres se relaciona con la disminución de los estrógenos. La falta de estas hormonas probablemente también inhibe la actividad formativa por favorecer la apoptosis de los osteoblastos, intensificando el balance negativo [32].

- El aumento del número de unidades de remodelación cuando éstas se encuentran en balance negativo supone un aumento del número de puntos del esqueleto en los que se pierde masa ósea, y por tanto acelera su pérdida. De hecho, el aumento del recambio es el responsable de la mayor cantidad de masa ósea perdida. La menopausia es el mejor ejemplo de aumento del recambio por la depleción de estrógenos que implica. A él se debe la aceleración de la pérdida de masa ósea que sigue a la menopausia, y en definitiva es el mecanismo responsable de la “osteoporosis postmenopáusica” [32].

III.3.2 CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO:

La osteoporosis es una enfermedad asintomática. La sintomatología que presenta está condicionada por las fracturas. No existe relación clínica entre la osteoporosis y la artrosis o la fibromialgia y si estos procesos coinciden en un paciente, se debe al azar.

La fractura por fragilidad constituye la principal complicación clínica de la osteoporosis [42]. Las fracturas por fragilidad más frecuentes se localizan en columna vertebral, muñeca y cadera. Suelen clasificarse de modo general como vertebrales y no vertebrales. Entre las no vertebrales se incluyen además las de húmero, pelvis, costillas y otras de frecuencia menor. No suelen incluirse como osteoporóticas las fracturas de dedo, cráneo y se duda de las de tobillo [43].

Las manifestaciones clínicas de las fracturas suelen incluir dolor, impotencia funcional y deformidad [44]. La fractura vertebral es la más prevalente y su manifestación más típica es un dolor agudo, intenso, localizado en columna, que se exacerba con los movimientos y disminuye con el reposo. En un estudio multicéntrico realizado en España, en mujeres postmenopáusicas que acudían a la consulta de Medicina Interna por dolor crónico de espalda, se observó que existía al menos una fractura vertebral no diagnosticada previamente en el 15,8% de las mismas [45]. También puede observarse, la pérdida de estatura y el desarrollo de cifosis dorsal [46]. En el estudio anterior, las mujeres con fractura vertebral tenían un promedio de 3 cm menos de estatura que las mujeres del grupo control.

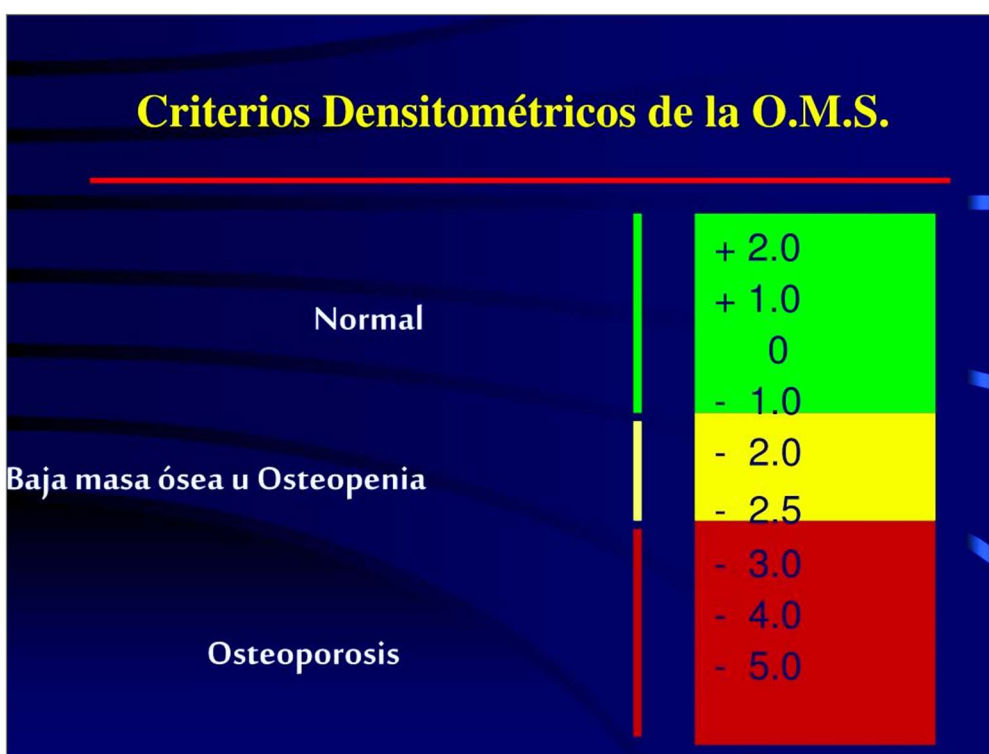
La fractura más grave es la de cadera que suele estar desencadenada por una caída. Aunque sin datos que la apoyen, se ha generalizado la creencia popular de que, en presencia de una osteoporosis importante, el paciente se fractura la cadera estando de pie y que después cae. La mayor tasa de mortalidad asociada a la osteoporosis está relacionada con la fractura de cadera y representa uno de los mayores costes sociales de esta enfermedad. Las causas de muerte son diversas y en muchos casos no se relacionan directamente con la fractura. La mortalidad es del 20-30% en el primer año, aumentando el riesgo de muerte de 2 a 10 veces por encima de lo esperado en la población de similares características [47]. La mayor parte de los pacientes necesitan intervención quirúrgica. Pero, las repercusiones de una fractura de cadera no se limitan a su tratamiento hospitalario, sino al deterioro de la calidad de vida que hace que en muchos casos los pacientes no sean capaces de llevar una vida independiente.

Según los criterios establecidos por la OMS en 1994 (**Figura 13**), la única técnica aceptada y reconocida como “patrón oro” para medir la DMO, es la densitometría o absorciometría de rayos X de doble energía (DXA). Esta prueba mide la cantidad de mineral óseo contenido en un cierto volumen de hueso al pasar una dosis baja de rayos X con dos grados diferentes de energía a través del hueso.

Actualmente está cuantificada la relación entre la masa ósea y el riesgo de fractura por fragilidad; el riesgo relativo aumenta entre 1,5 y 3 por cada desviación estándar (DE) de

disminución de masa ósea, comparada con la media de la población joven del mismo sexo (T-score). De esta manera, según la OMS, el paciente presentará osteoporosis cuando tenga una DMO por debajo de 2,5 respecto a la media de referencia de un adulto joven del mismo sexo y etnia.

Figura 13: Criterios densitométricos de la OMS. Se indican las desviaciones estándar de la DMO frente al pico máximo de masa ósea.



En la práctica clínica habitual, la definición de osteoporosis de la OMS es poco operativa ya que muchas fracturas por fragilidad se producen en pacientes con un T-score $> -2,5$. Por ello, la National Bone Health Alliance ha propuesto considerar el diagnóstico de OP en mujeres postmenopáusicas y en varones > 50 años con fractura femoral por fragilidad, independientemente del valor de la DMO, así como ante una fractura de bajo impacto vertebral, del húmero proximal o de la pelvis, si se constata un T-score $\leq -1,0$ [48].

III.3.3 OSTEOPOROSIS POSTMENOPAÚSICA:

La menopausia supone la condición de riesgo más importante para la osteoporosis. En el mundo occidental la mujer pasa más de la tercera parte de su vida en menopausia por la elevada esperanza de vida. Este hecho justifica que la prevalencia de esta enfermedad haya aumentado de forma notable en los últimos años. La deprivación estrogénica supone una ausencia de freno a la acción de los osteoclastos y esto conlleva una pérdida acelerada del hueso trabecular (alto remodelado óseo). Esta acción, junto con el hecho de que el pico de masa ósea en la mujer es más precoz y de menor cuantía que en el varón justifica, en gran medida, que la osteoporosis sea mucho más frecuente en el sexo femenino. El riesgo es mayor cuanto más precoz es la edad de la menopausia, y mucho más intenso cuando la deprivación hormonal es brusca, como ocurre en la menopausia quirúrgica [49]. A continuación, vamos a explicar este mecanismo con detalle.

El déficit estrogénico hace más sensible el hueso a las hormonas resorptivas y, en concreto, a la PTH. El aumento de la resorción conlleva un aumento del calcio plasmático y una disminución de la PTH, lo que genera, de manera secundaria una disminución de la síntesis renal de 1,25-dihidroxicolecalciferol que implica una reducción de la absorción intestinal del calcio. Esto desencadena un balance negativo del calcio y un incremento de la resorción ósea, aumentando la excreción de calcio a nivel urinario.

Además, la disminución de los niveles de progesterona va a favorecer una discreta acidosis respiratoria, inducida por alteraciones del sistema nervioso central, que favorece la filtración del calcio. Como consecuencia del aumento de la filtración del calcio a través del riñón, se producirá un aumento de las concentraciones de la PTH intentando prevenir la pérdida de calcio. Este aumento de la PTH favorece un aumento de la actividad destructora de la masa ósea, lo cual generará antes o después, si no consigue frenar, una osteoporosis y un aumento del riesgo de fractura.

Cuando ya ha aparecido la menopausia, el equilibrio existente en la homeostasis ósea se va a ver alterado, produciéndose un desequilibrio importante entre los diferentes factores

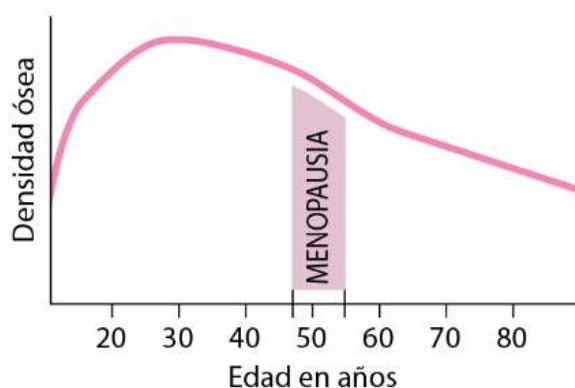
involucrados en el metabolismo de los osteoclastos/osteoblastos. Esto da lugar a un aumento del recambio óseo y una pérdida acelerada del esqueleto, aumentando así el riesgo de fractura. En la **figura 14** podemos observar cómo va disminuyendo la DMO a medida que avanza la edad de la mujer.

La ausencia de estrógenos conlleva una disminución del número y actividad de los osteoblastos y un aumento del número y actividad de osteoclastos. Esto se traduce en un incremento del número de unidades de remodelado óseo y una mayor aceleración de la pérdida de masa ósea.

La ausencia de estrógenos también genera una serie de cambios en la secreción de citocinas y hormonas locales:

- Aumento de la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF alfa) responsables de la atracción de los preosteoclastos y la activación de los osteoclastos, aumentando así la resorción ósea.
- Disminución de la expresión de OPG. La OPG neutraliza la actividad del RANKL y, por tanto, bloquea la transformación de los macrófagos en osteoclastos.
- Estimulación de la diferenciación de precursores osteoclásticos, M-CSF.

Figura 14: Pérdida de densidad ósea en mujeres con la edad. Tomada de <https://www.msdmanuals.com/>



III.3.4 CLASIFICACIÓN DE LA OSTEOPOROSIS:

Según sus características clínicas podemos distinguir dos grandes grupos de osteoporosis: la osteoporosis primaria y la secundaria.

- *Osteoporosis primarias*: Son aquellas en las que no se identifica ninguna enfermedad que las justifique directamente [49,50]:
 - Tipo I (postmenopáusica): Es la debida a la pérdida de estrógenos. Se produce entre los 51 y los 75 años y se caracteriza por una pérdida acelerada y desproporcionada del hueso trabecular (alta remodelación ósea). Causa mayoritariamente las fracturas vertebrales por compresión. Se observa disminución de la actividad PTH para compensar el aumento de la resorción ósea. El tratamiento antirresortivo es eficaz para frenar la pérdida ósea.
 - Tipo II (senil): Afecta a personas mayores de 70 años como consecuencia de un déficit de la función de los osteoblastos (bajo remodelado óseo). Otros factores etiopatogénicos son: sedentarismo-inmovilización, peor absorción intestinal de calcio, menor insolación y trastornos nutricionales que ocasionan déficit de vitamina D e hiperparatiroidismo secundario. Se asocia con fracturas de cuello femoral, porción proximal del humero y pelvis, por afectarse tanto el hueso cortical como el trabecular. El tratamiento antirresortivo es menos eficaz en este tipo de OP. Algunos autores han argumentado en contra de este tipo de clasificación, dado que la pérdida ósea asociada al envejecimiento parece ser asintomática y la morbilidad de la osteoporosis sería exclusivamente secundaria a las fracturas que ocasiona [51].
- *Osteoporosis secundarias*: Son aquellas que son consecuencia o bien una manifestación de otras enfermedades o de su tratamiento. Algunas de las causas más importantes son [52]:

- ✓ Trastornos alimentarios y digestivos: ingesta baja en calcio, déficit de vitamina D, anorexia nerviosa, malabsorción, enfermedad de Crohn, gastrectomías, resección intestinal, hepatopatías crónicas, alcoholismo crónico...
- ✓ Endocrinopatías y enfermedades metabólicas: hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, enfermedad de Cushing, hipogonadismo ovárico o testicular, diabetes, hemocromatosis, acidosis metabólica renal...
- ✓ Enfermedades genéticas: osteogénesis imperfecta, homocistinuria, hipofosfatasa, síndrome de Marfan...
- ✓ Enfermedades reumáticas: artritis reumatoide, lupus, polimialgia reumática, otras conectivopatías, distrofia simpática refleja y en general todas las enfermedades sistémicas que recibe también tratamiento con corticoides.
- ✓ Nefropatías: insuficiencia renal crónica, trasplantados renales...
- ✓ Neoplasias: osteomalacia oncogénica.
- ✓ Enfermedades hematológicas: mieloma, leucemia, macroglobulinemia...
- ✓ Enfermedades respiratorias: EPOC, asma (utilización de corticoides) ...
- ✓ Abuso de tóxicos: tabaco, alcohol, cafeína...
- ✓ Inmovilización prolongada: muy frecuente en los pacientes de edad avanzada (el hueso necesita estímulo mecánico para su formación y remodelado)
- ✓ Fármacos: glucocorticoides, heparina, barbitúricos, anticomiciales, quimioterápicos, psicótropos, indometacina, algunos diuréticos, hormonas tiroideas...

III.3.5 TRATAMIENTOS FRENTE A LA OSTEOPOROSIS:

El objetivo de dicho tratamiento es reducir la incidencia de fracturas en los pacientes, evitando la aparición de osteoporosis con medidas preventivas o tratando la enfermedad una vez que se ha instaurado. Los objetivos se pueden resumir en los siguientes puntos [53]:

- Prevenir las fracturas.
- Optimizar el desarrollo del esqueleto y maximizar el pico de masa ósea.

- Prevenir la pérdida de masa ósea, en especial en los períodos en los que está acelerada.
- Preservar la integridad del esqueleto.
- Mejorar la calidad de vida.
- Disminuir la morbilidad y la mortalidad.

El tratamiento de la osteoporosis es multidisciplinar e incluye tanto medidas no farmacológicas, de salud pública, aplicables a toda la población, como medidas farmacológicas, mayoritariamente terapias antirresortivas.

- *Tratamientos no farmacológicos:* Se basan en medidas preventivas de aplicación a toda la población y haciendo énfasis en las mujeres osteopénicas y osteoporóticas. Estas medidas abarcan un estilo de vida saludable, incluyendo dieta equilibrada y ejercicio físico regular, evitar el tabaco, limitar el consumo de alcohol e implementar medidas para la prevención de caídas.
- *Calcio y vitamina D:* Son dos compuestos fundamentales para el metabolismo óseo y el correcto desarrollo del esqueleto. A continuación, hablaremos de ambos con detalle.
- *Tratamientos farmacológicos:* Según su mecanismo de acción los podemos dividir en [52,53]:

1. Inhibidores de la resorción:

- Calcitonina: Inhibe la actividad osteoclástica. Se utiliza la hormona sintética o la extraída de otros organismos como el salmón. Se administra intranasal y reduce el riesgo de fracturas vertebrales. Presenta efecto analgésico en el tratamiento del dolor agudo en fracturas vertebrales.

Actualmente está retirada del mercado por sus efectos secundarios.

- Terapia hormonal sustitutiva (THS): Reemplaza la deprivación hormonal por el cese de la actividad ovárica. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la resorción y el turnover óseo que se produce durante la menopausia. Actualmente se utiliza en los primeros años de la menopausia para mejorar el síndrome climatérico.
- Bifosfonatos: Compuestos análogos de los pirofosfatos inorgánicos que inhiben la capacidad resortiva de los osteoclastos evitando la unión de estos a la superficie ósea. Han demostrado evidencia de eficacia en reducción de fracturas, rapidez de acción y seguridad, lo que permite su prescripción y mantenimiento por los médicos de Atención Primaria [52]. Ejemplos de bisfosfonatos serían: Alendronato, Risedronato, Ibandronato y el Ácido zoledrónico. Alendronato y Risedronato disminuyen el riesgo de fractura vertebral y de cadera. Ibandronato se utiliza en el tratamiento de OP en mujeres postmenopáusicas con riesgo elevado de fractura.

El Ácido zoledrónico se emplea en el tratamiento de la enfermedad de Paget y en la OP postmenopáusica.

- Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs): Son una alternativa a la terapia hormonal sustitutiva. Son agonistas estrogénicos en los receptores del hueso y antagonistas estrogénicos en los receptores de mama. El raloxifeno es el SERMs más utilizado frente a la osteoporosis. A continuación, hablaremos de los SERMs con detalle.
- Denosumab: Anticuerpo monoclonal recombinante humano, que se une al RANKL. Es un potente antirresortivo que reduce el riesgo de todas las fracturas por fragilidad. Se considera un fármaco de segunda línea, como alternativa al alendronato y risedronato ya que se administra por vía parenteral y tiene un alto coste [54].

2. Estimuladores de la formación:

- Hormona Paratiroidea (PTH): Se puede encontrar como PTH intacta (1-84) o como su análogo, la PTH recombinante humana (1-34). Se ha descrito un efecto positivo mejorando la microarquitectura ósea y una reducción en el riesgo de nuevas fracturas por un mecanismo osteoformador.

3. Inhibidor de la resorción y estimulador de la formación:

- Ranelato de estroncio: Disminuye la diferenciación y actividad osteoclástica y aumenta la replicación de células preosteoblásticas y la síntesis de colágeno. Se ha demostrado su eficacia en la prevención de fracturas vertebrales y no vertebrales.
Actualmente está retirado del mercado por sus efectos secundarios.

A continuación, vamos a profundizar en los tratamientos que se han empleado en el desarrollo de esta tesis: los SERMs y la suplementación con calcio y vitamina D.

III.3.5.1 MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS

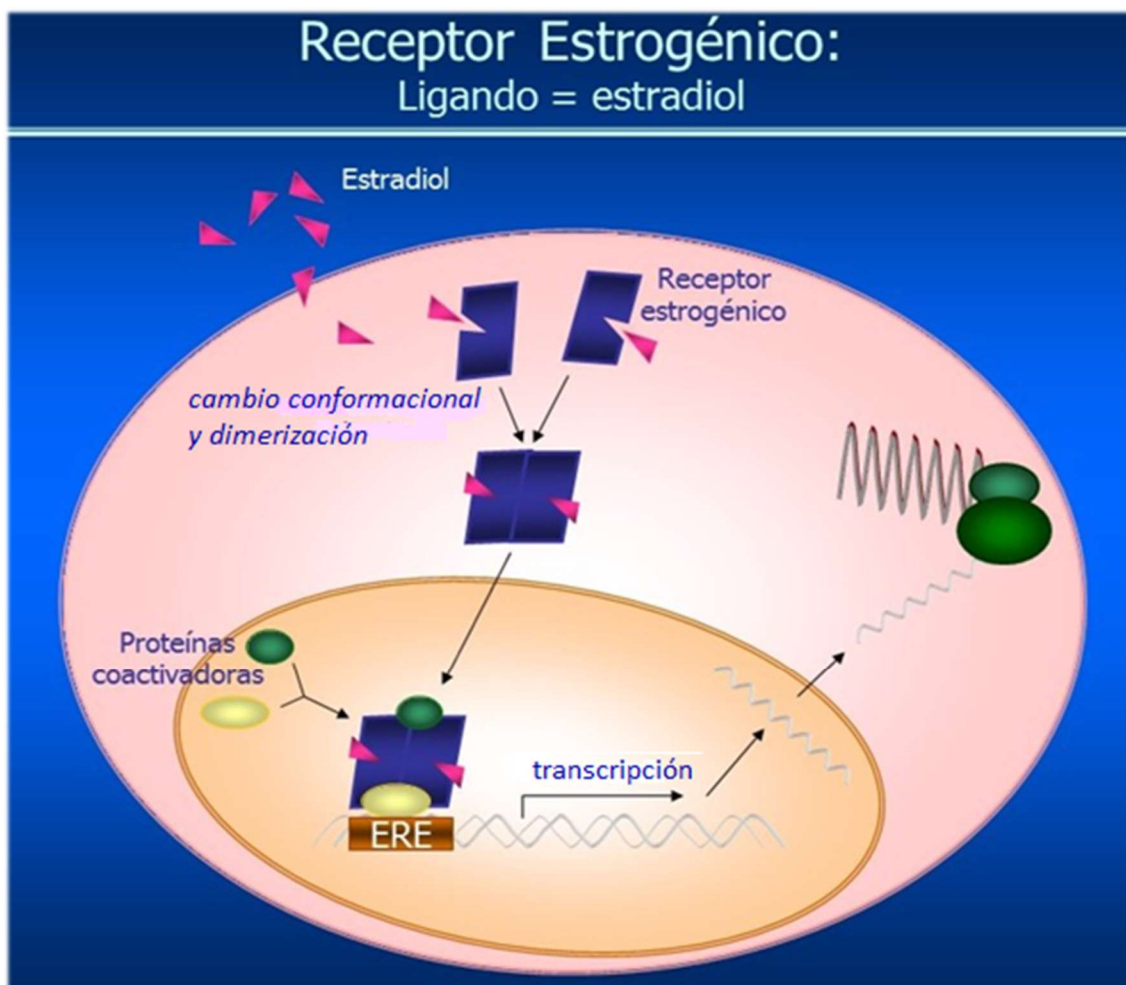
(SERMs). BAZEDOXIFENO.

Para ejercer sus diversas acciones en los tejidos, el estradiol se une a un receptor estrogénico celular, produce un cambio de conformación en el mismo, y luego penetra en la célula y con la ayuda de proteínas coactivadoras, da lugar a la síntesis de proteínas que son las que realizan su acción [55,56] (**Figura 15**).

Los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs) fueron un descubrimiento muy importante en el campo de la medicina. Son agentes sintéticos no esteroideos que se unen también al receptor estrogénico, modificándolo y produciendo una

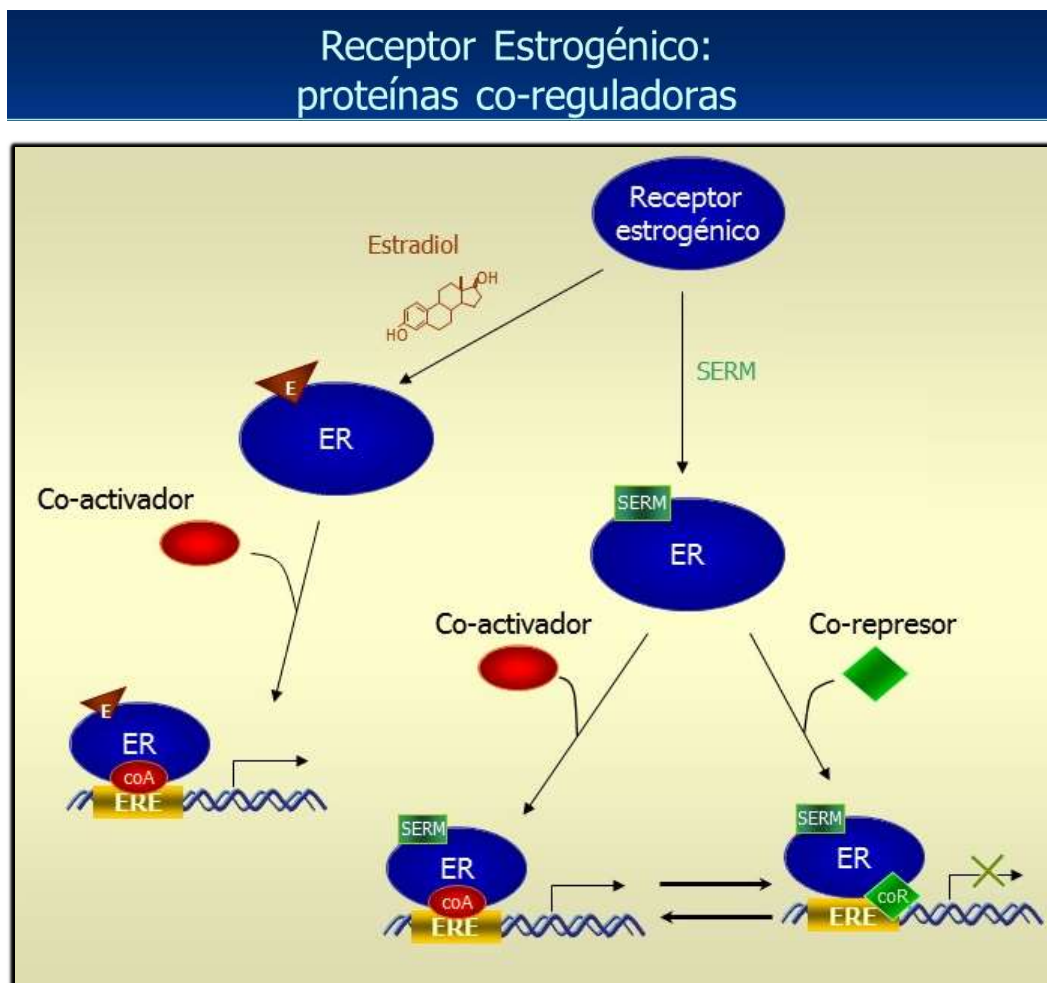
posterior transcripción, pero con la peculiaridad de que pueden actuar como *agonistas* o *antagonistas estrogénicos* dependiendo del tipo de tejido [57,58]. (**Figura 16**). El mecanismo de acción de los SERMs es a través de los dos tipos de receptores estrogénicos (α y β). En general, tienen actividad agonista en el hígado, tubo digestivo, esqueleto y corazón y antagonista en la mama. En el útero, unos SERMs se comportan como agonistas y otros como antagonistas [55]. Existen un gran número de proteínas co-reguladoras que modulan la acción de los SERMs sobre la expresión génica y contribuyen a la farmacología tejido-específica de los mismos [55].

Figura 15: Mecanismo de unión del estradiol al receptor estrogénico y producción de proteínas específicas que expresarán el efecto del estradiol en los diferentes tejidos.



El Tamoxifeno es un SERMs que se utiliza como antiestrógeno mamario para el tratamiento y prevención del cáncer de mama, pero posee actividad agonista estrogénica en el útero, pudiendo inducir hiperplasia endometrial. El Raloxifeno se ha utilizado en la prevención y tratamiento de la osteoporosis y previene el cáncer de mama, pero tiene cierta actividad estrogénica [59]. El bazedoxifeno (BZA) es un SERMs de 3ª generación con efectos agonistas sobre el hueso y efectos favorables adicionales sobre los lípidos, el útero y el tejido mamario [60,61]. En la (Figura 17) mostramos la estructura química del estradiol y la del bazedoxifeno.

Figura 16: Unión de los SERMs al receptor estrogénico. Inducen a la activación de un «elemento de respuesta alternativa del ADN» que activa o inactiva la transcripción genética y, con ello, la respuesta deseada.

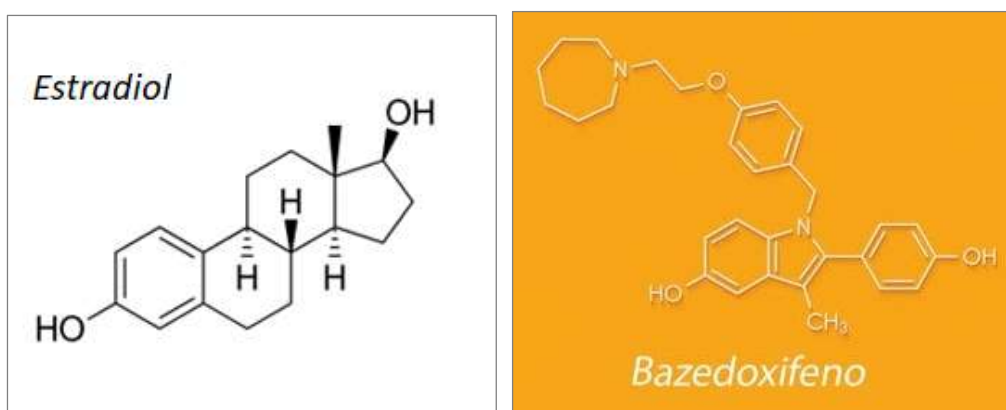


Debido a su acción agonista estrogénica sobre el hueso, el Raloxifeno y el Bazedoxifeno se han utilizado y se utilizan en el tratamiento de la osteoporosis. El Bazedoxifeno tiene la ventaja de una mayor seguridad endometrial, de tal modo que se utiliza también ampliamente junto con estrógenos equinos conjugados para el tratamiento de la endometriosis [62,63,64]. Se ha demostrado que su utilización prolongada produce una disminución en la aparición de nuevas fracturas vertebrales y un descenso del riesgo de fracturas no vertebrales en mujeres de alto riesgo, considerando como tales aquellas con una DMO de cuello femoral con puntuación T inferior a -3,0 y/o 1 fractura vertebral severa o 2 fracturas vertebrales moderadas [65].

La osteoporosis al ser una enfermedad crónica necesita un tratamiento de larga duración, por ello, es necesario el empleo de medidas individualizadas y el uso de tratamientos secuenciales. Dichos tratamientos secuenciales consisten en diseñar estrategias que mantengan un fármaco el tiempo suficiente para conseguir sus beneficios con los mínimos riesgos y la máxima adherencia. El tratamiento farmacológico debe irse cambiando a lo largo de la vida de la mujer para adaptarse así a las necesidades clínicas y metabólicas propias de cada momento [66].

En esta tesis vamos a profundizar en los efectos producidos por el bazedoxifeno sobre la calidad ósea en un modelo experimental de ratas ovariectomizadas que, por lo tanto, se encuentran en un estado de osteopenia.

Figura 17: Estructura química del estradiol y bazedoxifeno.



III.3.5.2 SUPLEMENTACIÓN CON CALCIO Y VITAMINA D.

El calcio es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de un esqueleto sano. Es necesaria una ingesta de calcio de 700- 1.000 mg/día en la infancia; 1.300 mg/día desde los 9 a los 18 años; y 1.000 mg/día desde los 19 hasta los 50 años; incrementando a 1200 mg/día a partir de la menopausia en mujeres y a partir de los 70 años en hombres.

La forma más natural y eficiente de recibir el aporte cálcico necesario es a través de la dieta. Los alimentos que contienen mayor proporción de calcio son los productos lácteos, los pescados azules en conserva, las judías y las almendras. Se recurrirá al uso de los suplementos cálcicos en aquellos casos en los que no se pueda realizar una ingesta mínima de calcio a través de la alimentación. En la actualidad, existen en el mercado múltiples preparados de sales cálcicas, algunos con vitamina D incorporada [53].

La vitamina D es un compuesto imprescindible en el metabolismo óseo. Una adecuada exposición solar, tomar el sol al menos 15 minutos diarios, en la cara, los brazos y el escote es suficiente, en la mayor parte de los casos, para mantener niveles de vitamina D adecuados en sangre. En otras circunstancias, en cambio, sí es aconsejable administrar 800 UI de vitamina D diarios [67] como son:

- Pacientes con osteoporosis.
- Personas mayores de 65 años con riesgo de fractura.
- Personas con déficit de vitamina D.
- Personas con una exposición solar limitada.
- Personas con un aporte de calcio inadecuado (menos de 700-800 mg diarios).

Una dieta equilibrada en cuanto a los contenidos en principios inmediatos y calorías es imprescindible para mantener una buena salud ósea [53].

Los estudios coinciden en la necesidad de asegurar un aporte adecuado de calcio como factor fundamental en cualquier tratamiento de OP [67]. Así, en los pacientes en tratamiento

farmacológico para la OP se deben utilizar suplementos de calcio y vitamina D por varias razones.

En primer lugar, porque todos los estudios de referencia realizados para establecer la reducción del riesgo de fracturas por fragilidad se han realizado administrando a los pacientes un suplemento de calcio y vitamina D [68]. Tendremos que reproducir las mismas condiciones clínicas del estudio para obtener los mismos resultados por los que el fármaco fue aprobado para su uso en los pacientes.

En segundo lugar, la mayor parte de los pacientes que padecen osteoporosis y fracturas por fragilidad tienen hipovitaminosis D y no ingieren las cantidades recomendadas de calcio establecidas por consenso [69].

Por último, la suplementación con calcio y vitamina D ha mostrado eficacia en población >65 años institucionalizada reduciendo el riesgo de fractura no vertebral y de forma más marginal de fractura de cadera [70,71]. Este efecto depende en gran parte de la dosis de vitamina D (≥ 800 UI diarias) y es más evidente a mayor edad y niveles más bajos de vitamina D [70]. Los suplementos de calcio y vitamina D no disminuyen el riesgo de fractura vertebral [70].

Existen datos contradictorios sobre la eficacia de la vitamina D en la prevención de caídas. Algunos resultados indican que los suplementos de vitamina D, con y sin calcio, son eficaces en la prevención de caídas [72], especialmente en ancianos con déficit de vitamina D [73]. Otros estudios no demuestran este efecto beneficioso de la vitamina D [74] e incluso la administración de dosis altas anuales podría aumentar el riesgo de caídas [75].

A pesar de la controversia, es aconsejable la administración de al menos 1.000 UI/día de vitamina D3 y de 600 mg/día de calcio a todos los pacientes en tratamiento para la osteoporosis.

En esta tesis vamos a analizar los efectos producidos por los suplementos de calcio y vitamina D sobre la calidad ósea en un modelo experimental de ratas ovariectomizadas.

III.4 LA RATA OVARIECTOMIZADA COMO MODELO DE OSTEOPOROSIS POSTMENOPAÚSICA.

Para desarrollar nuevos tratamientos farmacológicos contra la osteoporosis se han utilizado modelos animales en los que se induce artificialmente la osteoporosis con técnicas como la ovariectomía, utilizada en nuestro experimento [76]. La OMS y la Food and Drug Administration (FDA) establecieron en sus guías clínicas unos criterios, para regular la utilización de modelos de animales de experimentación en la evaluación preclínica de fármacos en el tratamiento de la osteoporosis [77,78].

La rata ovariectomizada constituye el modelo animal más utilizado en el estudio de la osteoporosis postmenopáusica [79]. La deprivación estrogénica que se produce al extirpar los ovarios de la rata reproduce fielmente los cambios que ocurren cuando la mujer entra en la menopausia a nivel de densidad mineral ósea, marcadores bioquímicos, microarquitectura ósea y biomecánica. De igual forma, la rata ovariectomizada presenta una excelente respuesta frente a los fármacos usados para tratar la osteoporosis [80,81].

Nuestro estudio comenzó con ratas hembra de 6 meses de vida que equivaldría aproximadamente a 30-35 años en los humanos [82]. El tratamiento se mantuvo durante 8 meses, finalizando con ratas de 14 meses que podrían equipararse a mujeres de unos 60 años. La comparación entre ambas especies es siempre aproximada. Debemos tener en cuenta que los 8 meses de tratamiento en la rata corresponderían con un tratamiento a largo plazo en la mujer.

Es importante destacar que, dentro de los modelos animales utilizados en el estudio de la osteoporosis, la rata es de los que presenta mayor sencillez en su manejo y requiere menos espacio vital, así como, un precio asequible.

En nuestra tesis, la rata ovariectomizada ha sido el modelo experimental utilizado para evaluar la eficacia de diferentes tratamientos frente a la OP.

III.5 COMENTARIOS FINALES A LA INTRODUCCIÓN.

El hueso es un tejido dinámico sometido a un continuo proceso de destrucción (resorción) y de formación. En la vida adulta la tasa de formación es igual a la de resorción, por lo que mantiene su masa, pero existen diversas condiciones patológicas en las que una de las actividades supera a la otra, produciéndose un hueso defectuoso.

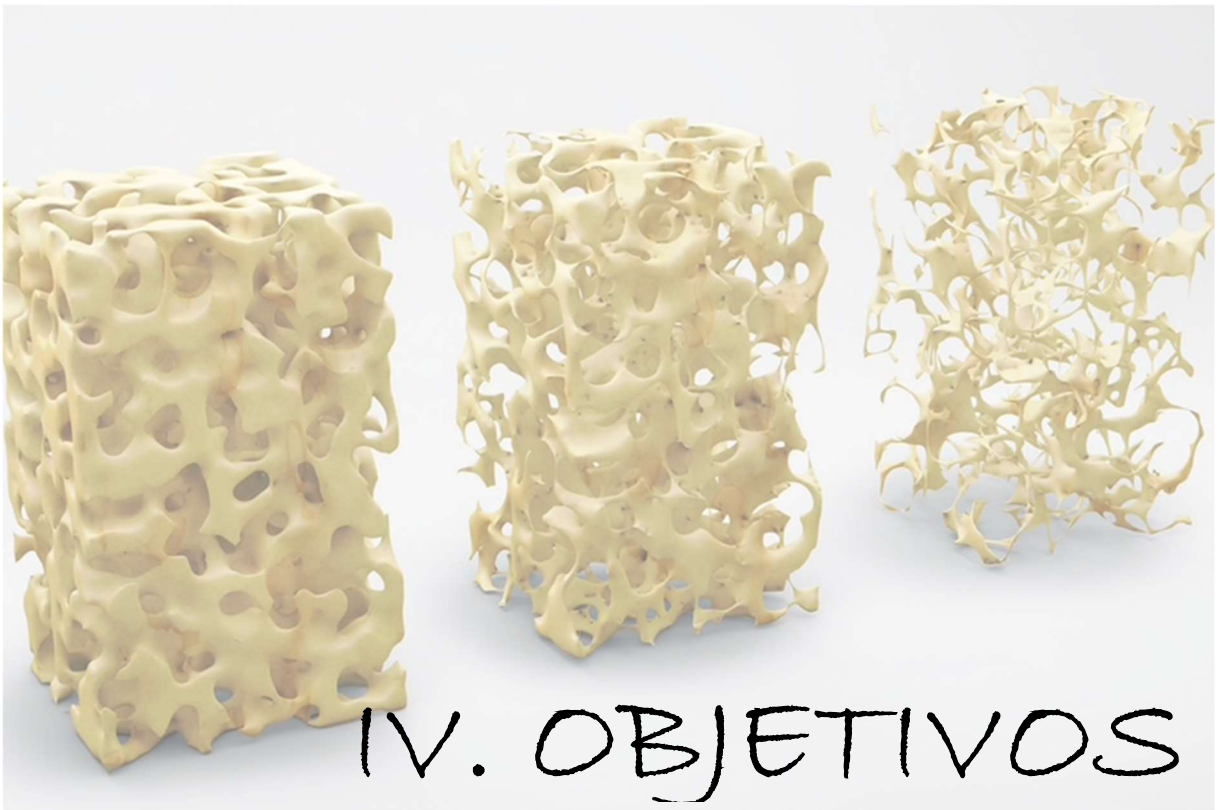
Debido la gravedad del problema, desde su descubrimiento se han ido desarrollando diversos tratamientos para contrarrestar los efectos de la osteoporosis sobre el hueso.

Dado que la característica más importante de la osteoporosis es la existencia de un hueso descalcificado, desde el principio, se pensó que la aportación de calcio y vitamina D sería con seguridad un remedio para esta enfermedad. Todavía se utiliza muchas veces, especialmente al comienzo de la enfermedad y por motivos económicos. Por otra parte, en todos los ensayos clínicos sobre los tratamientos de la osteoporosis postmenopáusica, se administra calcio más vitamina D al grupo placebo.

La falta de estradiol es la causa más frecuente de la osteoporosis postmenopáusica y, por ello, también se utilizó el estradiol como tratamiento de esta patología. Al cabo de un tiempo se observaron efectos secundarios y se abandonó este tratamiento. Los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs) vinieron a sustituir al estradiol, ya que eran medicamentos que se unían al receptor del estradiol y producían acciones en el hueso, similares a las de dicha hormona. Los SERMs se han utilizado mucho en el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica, aunque algunos tienen el inconveniente de activar en exceso los receptores del útero produciendo efectos secundarios no deseados. La investigación de los SERMs ha progresado durante estos últimos años, llegando a los de tercera generación con efectos en el hueso y sin efectos en el útero. Uno de ellos es el bazedoxifeno.

La rata ovariectomizada ha sido utilizada como modelo experimental de osteoporosis postmenopáusica a lo largo de muchos años y su uso en trabajos de experimentación ha sido recomendado por la Organización Mundial de la Salud.

Teniendo en cuenta todo lo presentado hasta este punto, proponemos para esta tesis doctoral los siguientes objetivos.



IV. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- Estudiar el efecto producido sobre la calidad ósea por el tratamiento a largo plazo con BAZEDOXIFENO (SERM de 3ª generación) en un modelo experimental de osteoporosis postmenopáusica, la rata ovariectomizada.
- Estudiar el efecto producido sobre la calidad ósea por el tratamiento de CALCIO + VITAMINA D, en un modelo experimental de osteoporosis postmenopáusica, la rata ovariectomizada.

Los efectos producidos sobre la calidad ósea serán evaluados mediante la determinación de la densidad mineral ósea, el estudio del remodelado óseo, el análisis de parámetros microestructurales y el estudio de las propiedades biomecánicas del hueso.



V. MATERIALES
Y MÉTODOS

V.1 ACCIÓN DEL BAZEDOXIFENO (BZD).

V.1.1 DISEÑO DEL EXPERIMENTO.

Se utilizaron 45 ratas Wistar hembras de 6 meses de edad del animalario de la Fundación Jiménez Díaz que fueron mantenidas en condiciones estables de temperatura de 22º C, ciclos de 12 horas de luz y oscuridad y con acceso libre a comida y agua. La comida se administró mediante una dieta completa para ratas y ratones, SAFE A04 (Augy, France).

El peso medio de las ratas al comienzo del estudio fue de $333,6 \pm 32$ g.

Las ratas se dividieron al azar en 3 grupos:

1. Grupo **SHAM** (n=15) Ratas en las que se simuló la ovariectomía.
2. Grupo **OVX** (n=15) Ratas ovariectomizadas.
3. Grupo **OVX + BZD** (n=15) Ratas ovariectomizadas a las que se les administró 0.33 mg/kg/día de bazedoxifeno mediante sonda oral durante 8 meses.

El tratamiento comenzó el día posterior a la ovariectomía y se mantuvo durante 8 meses. Todos los tratamientos se realizaron de acuerdo con los Estándares Comunitarios Europeos sobre el cuidado y uso de los animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité Ético del Investigación Animal del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz.

○ CRONOGRAMA EXPERIMENTO:

1. Ovariectomía:

- Partimos de 45 ratas Wistar de 6 meses de edad.
- Se realiza la ovariectomía de 30 ratas. Las otras 15 quedan como grupo control SHAM.

2. Tratamiento:

- Tratamiento con 0.33 mg/kg/día de bazedoxifeno por sonda oral a 15 ratas ovariectomizadas durante 8 meses desde el día posterior a la ovariectomía.
- Los grupos SHAM y OVX no fueron tratados.

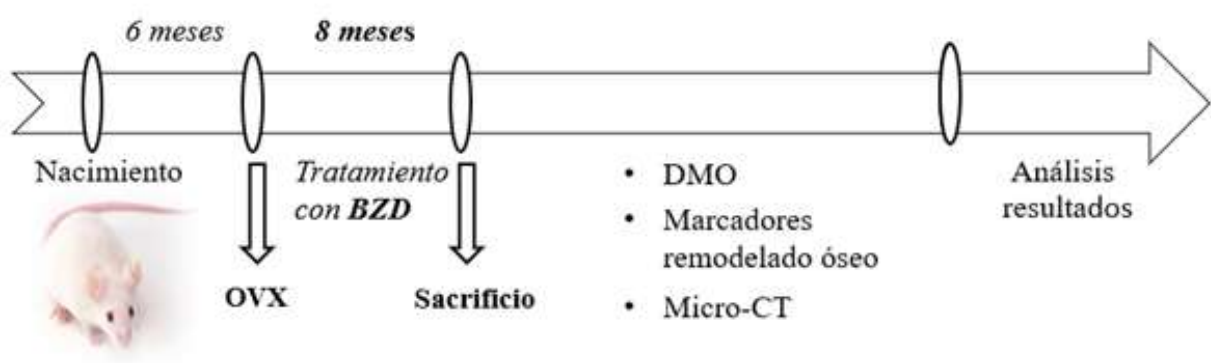
3. Sacrificio:

- Se sacrifican las 45 ratas, a los 8 meses del comienzo del experimento.

4. Realización de densitometrías, marcadores de remodelado óseo, microtomografía computarizada y biomecánica.

- Realización de las densitometrías óseas de los fémures izquierdos y columnas vertebrales.
- Realización de los marcadores de remodelado óseo.
- Envío de los fémures izquierdos para la realización de la microtomografía computarizada a la Universidad de Oviedo, y de los fémures derechos para la realización de los estudios de biomecánica.

5. Análisis de los resultados.



V.1.2 OVARIECTOMÍA, SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

Las ratas fueron anestesiadas para la cirugía mediante inyección intramuscular de 0.7 mL de una mezcla 1:2 de 2 g/ml de hidrocloreuro de Xilacina (Rompun®) y 50mg/ml de Ketamina (Ketolar®). Una vez anestesiadas, fueron inmovilizadas de las cuatro extremidades y se rasuró la zona a intervenir. La posición final del animal fue decúbito supino, apoyado sobre el dorso o espalda.

La cirugía de ovariectomía bilateral se realizó a través de una incisión abdominal. Previamente se inmovilizó al animal y se le rasuró el abdomen. Para la extirpación de los ovarios se identificaron los cuernos uterinos, que están fijados al ovario por un extremo y al útero por otro. Se establecieron las ligaduras a ambos lados del ovario, seccionando y extirpando los mismos. Una vez extirpados los ovarios se suturó la incisión realizada (**Figura 18 a-c**).

Figura 18: Cirugía de ovariectomía.

Figura 18a: Incisión e identificación cuernos uterinos.



Figura 18b: Ligadura y extirpación ovarios.



Figura 18c: Sutura de la incisión.



El fármaco que se administró fue Conbriza® (Pfizer). La dosis se calculó en base al tratamiento indicado para la osteoporosis en humanos, 20 mg/día vía oral. De este modo, la dosis de Bazedoxifeno empleada en nuestras ratas fue 0,33 mg/kg/día mediante sonda oral. El vehículo utilizado fue 0.3 ml de agua destilada en cada animal.

El tratamiento comenzó un día después de la ovariectomía y se mantuvo durante 8 meses. Transcurridos los 8 meses de tratamiento, se pesaron las ratas y se sacrificaron mediante exanguinación por punción cardíaca bajo anestesia con isofluorano (Forane®).

Mediante punción cardíaca se obtuvieron las muestras de sangre, que fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero (**Figura 19**). Dicho suero, se separó en alícuotas y congeló a -80°C hasta la posterior determinación de los parámetros de remodelado óseo.

Las ratas fueron congeladas -20°C, tras la extracción de su sangre, hasta la medición de la densidad mineral ósea. El día previo a la realización de dicha medición las ratas se metieron en una nevera a 4°C para su descongelación. Una vez descongeladas, se amputaron los fémures derechos e izquierdos con la ayuda de pinzas y bisturí (**Figura 20**). Una vez extraídos y limpios se realizó la densitometría mineral ósea de los fémures izquierdos y columnas vertebrales a nivel de L2, L3 y L4.

Figura 19: Exanguinación mediante punción cardiaca.



Figura 20: Amputación del fémur y limpieza de la musculatura adyacente.



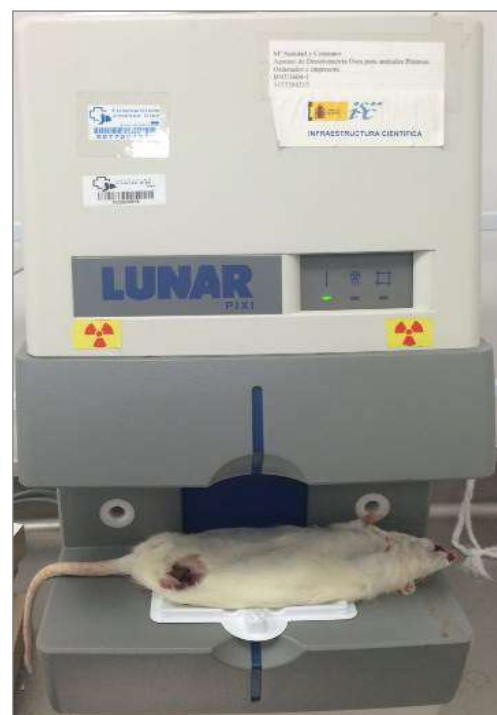
V.1.3 DENSITOMETRÍAS ÓSEAS:

Se procedió a la determinación de la densidad mineral ósea (DMO) del fémur izquierdo y de la columna vertebral a nivel de L2, L3 y L4, por densitometría de doble energía de rayos X (DEXA). Para ello se utilizó un aparato denominado Piximus (Hologic, QDR-1000 TM), que es un densitómetro específico para animales y muestras pequeñas (**Figura 21**).

Para realizar la DMO femoral se utilizó el fémur izquierdo limpio y para determinar la DMO lumbar se colocó a cada rata en posición de decúbito ventral escaneando las tres vertebrae completas (L2, L3, L4). Los resultados de la DMO de la columna se expresaron como la media de los valores obtenidos en cada una de las 3 vértebras. Los coeficientes de variación de esta técnica intra e interensayo son de $< 0,53\%$ y $< 1,2\%$ respectivamente.

Tras esta medición, los fémures izquierdos se envolvieron en gases empapadas con suero fisiológico y se mantuvieron congelados a -20°C hasta la realización de la microtomografía computarizada. Los fémures derechos se envolvieron en gases empapadas con suero fisiológico y se mantuvieron congelados a -20°C hasta la realización del test biomecánico. Se ha comprobado como en estas circunstancias, el hueso no muestra variaciones significativas en sus propiedades mecánicas durante al menos 7 u 8 meses. De igual modo, no se han observado variaciones cuando las muestras se someten hasta en 5 ocasiones a periodos cortos de congelación- descongelación [83].

Figura 21: Aparato Piximus realizando la DMO lumbar de la rata.



V.1.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO:

Las muestras de sangre se descongelaron para determinar los marcadores bioquímicos de remodelado óseo.

V.1.4.1 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE FORMACIÓN ÓSEA:

- **Osteocalcina (BGP):**

Se utilizó un inmunoensayo colorimétrico (ELISA) comercial específico para la determinación de los niveles de osteocalcina en nuestras ratas (Rat-MID™ Osteocalcin). La técnica consiste en la unión competitiva de un anticuerpo monoclonal a la osteocalcina soluble en el suero problema o a osteocalcina inmovilizada en las paredes de los pocillos.

El primer paso es una pre-incubación, que consiste en que la osteocalcina biotinilada se inmoviliza en las paredes de los pocillos de las microplacas mediante su unión a estreptavidina. Los pocillos son lavados, para posteriormente pipetear una solución con anticuerpos anti-osteocalcina junto a los sueros estándar, control o los sueros problema con concentraciones de osteocalcina desconocidas.

Tiene lugar una competición entre la osteocalcina de dichos sueros y la osteocalcina de las paredes de los pocillos en su unión a los anticuerpos monoclonales. Tras esta primera incubación, los pocillos son lavados de nuevo. En una segunda incubación, una solución de peroxidasa conjugada con inmunoglobulinas antiIgG se añade a los pocillos, uniéndose así a las inmunoglobulinas que previamente se habían ligado con la osteocalcina de las paredes de los pocillos. Después de un tercer lavado, se añade TMB (tetrametilbencidina), sustrato cromógeno de la peroxidasa, enzima que se encuentra unida al anticuerpo secundario de las paredes de los pocillos. Posteriormente, la reacción es detenida con ácido sulfúrico. La absorbancia obtenida en esta reacción cromógena es inversamente proporcional a la concentración de osteocalcina en cada muestra.

La sensibilidad del ensayo es de de 50 ng/mL y los coeficientes de variación intra e interensayo <5,0% y <6,6% respectivamente.

- **Própeptido aminoterminal del procolágeno I (PINP):**

Se utilizó un enzimoimmunoensayo (ELISA) comercial específico para determinar las concentraciones de PINP en nuestras ratas (Rat/Mouse PINP). El ensayo no presenta reactividad cruzada con el PINP humano.

La técnica se basa en un enzimoimmunoensayo competitivo que utiliza un anticuerpo policlonal de conejo, anti-PINP que va unido a la superficie de micropocillos de poliestireno.

Durante la pre-incubación, el PINP biotinilado se fija en una placa con estreptavidina pegada. De esta forma, el PINP de las muestras competirá con el PINP biotinilado por unirse al anticuerpo anti-PINP de la superficie, uniéndose menos PINP biotinilado a las paredes de los pocillos cuanto mayor sea la concentración de PINP en nuestras muestras. Posteriormente, se procede al lavado del poliestireno para retirar el PINP no unido al anticuerpo de superficie. Para completar la reacción se añade avidina marcada con peroxidasa. De esta forma, la avidina se unirá al complejo biotina del PINP externo y el resto será lavado. Por último, se revela el ELISA mediante un sustrato cromógeno de la peroxidasa, como es la tetrametilbencidina (TMB). Esta reacción se detiene con ácido clorhídrico. La reacción cromógena se mide por absorbancia a 450 nm, siendo inversamente proporcional a la concentración de PINP de nuestra muestra.

La sensibilidad del método es de de 0,7 ng/mL y los coeficientes de variación intra e interensayo <5% y <8,2% respectivamente.

V.1.4.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE RESORCIÓN ÓSEA:

- **Isoenzima 5b de la Fosfatasa Acida Tartrato Resistente (TRAP-5b):**

Se utilizó un inmunoensayo (ELISA) comercial específico de rata (RatTRAP™ Assay) para determinar la concentración de FATR-5b en sangra de rata.

La técnica se basa en un enzimoimmunoensayo colorimétrico que utiliza anticuerpos monoclonales altamente específicos para la isoenzima 5b de la TRAP.

Un anticuerpo monoclonal anti- TRAP-5b se incuba en los pocillos de la placa de ELISA recubiertos de IgG. Dicho anticuerpo se une a la IgG de los pocillos. Después de una etapa de lavado, los calibradores, controles y problemas se añaden a los pocillos y se incuban, uniéndose la TRAP-5b presente en dichas muestras al anticuerpo anti-TRAP-5b. La actividad anti- TRAP-5b se determina con un sustrato cromogénico (p-nitrofenil fosfato), produciéndose un color amarillo proporcional a la cantidad de enzima presente en la muestra. La reacción se detiene añadiendo a los pocillos NaOH.

La TRAP-5b es la específica de la actividad resortiva osteoclástica y se detecta únicamente su forma activa, es decir, aquella que ha sido recientemente liberada a la circulación y no las formas más antiguas (inactivas o fragmentadas). De esta forma, nuestro ensayo nos da una buena estimación de la tasa de resorción ósea en el momento de la extracción sanguínea.

La sensibilidad del ensayo es de 0,1 U/L y los coeficientes de variación intra e interensayo del método son <5% y <5,5 % respectivamente.

○ **Telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I (CTX):**

Se utilizó un inmunoensayo (ELISA) comercial específico para ratas (RatLaps CTX-ELISA) para determinar los niveles de CTX en sangre de rata.

La técnica se basa en un ELISA competitivo, en el que se utiliza un antígeno sintético biotinilado, similar al CTX de rata, y dos anticuerpos, un anticuerpo primario policlonal de conejo y un anticuerpo secundario anticonejo conjugado con peroxidasa.

La primera parte consiste en una pre-incubación con un antígeno sintético biotinilado en una placa con estreptavidina pegada. Después de esta incubación, se lava la placa y se añade la muestra junto con el anticuerpo primario. Durante la incubación, el antígeno sintético unido a la placa competirá con el CTX soluble de la muestra, por unirse al anticuerpo primario. Se lava y se añade el anticuerpo secundario que está conjugado con peroxidasa. Por último, se revela el ELISA mediante un sustrato cromogénico, la TMB, que da color. Esta reacción se para con ácido sulfúrico. Se mide la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia medida será inversamente proporcional a la concentración de CTX de la muestra.

La sensibilidad del ensayo es de 2,0 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo del método son <5,6% y <10,5% respectivamente.

V.1.5 MICROTOMOGRFÍA COMPUTARIZADA (MICRO-CT).

Los fémures izquierdos de las ratas se enviaron a la Universidad de Oviedo para el estudio de microarquitectura ósea a partir de las imágenes de microtomografía computarizada (micro-CT) adquiridas en las muestras de hueso. Dicho análisis se realizó en la metáfisis distal del fémur y en un anillo de hueso cortical de la diáfisis del mismo.

Todas las muestras se escanearon en un microtomógrafo de rayos X de sobremesa modelo SkyScan 1174 (Bruker, Kontich, Bélgica). Las muestras se colocaron con el eje largo perpendicular al suelo del portamuestras y a la fuente de rayos X. Las imágenes se obtuvieron en las siguientes condiciones:

- Voltaje de la fuente de rayos X: 50 KV
- Intensidad de la fuente de rayos X: 800 μ A
- Utilización de filtro de aluminio de 1 mm
- Resolución: 17,1 μ m
- Paso de rotación de la muestra: 0.4°
- Rotación total: 180°
- Tiempo de exposición: 11000 ms
- Tiempo aproximado de escaneado por muestra: 3h 50 min.
- Se obtuvieron 930 tomogramas en formato TIFF de cada muestra.

La corrección de campo plano se llevó a cabo al principio de cada escaneo. Los tomogramas obtenidos del escaneado de las muestras se reconstruyeron mediante el algoritmo de Feldkamp modificado [84] en la aplicación NRecon versión 1.6.9.16 (Bruker microCT, Kontich, Bélgica). Los parámetros óptimos seleccionados fueron los siguientes:

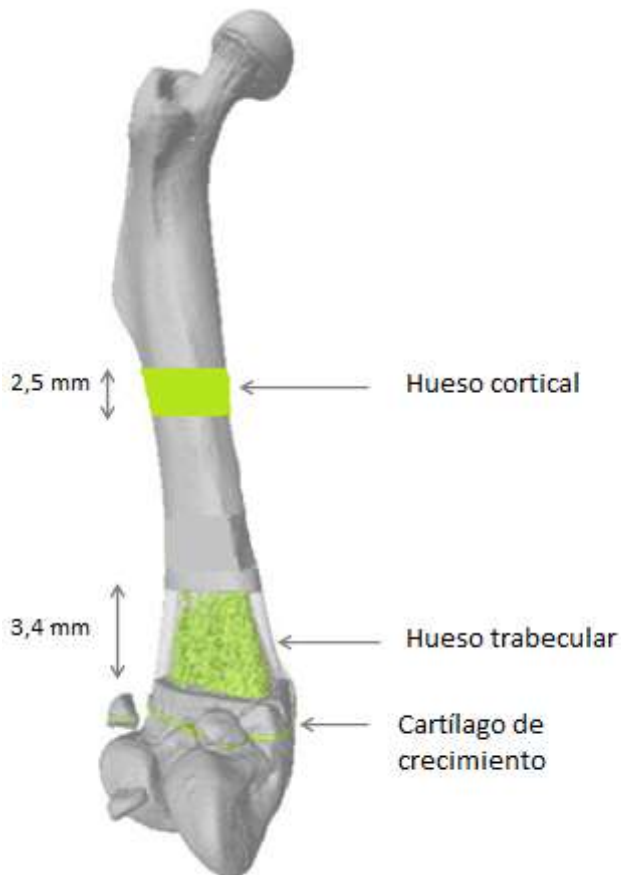
- Ring artefact reduction: 8
- Beam hardening correction: 30
- Smoothing: 1

Los parámetros de escaneo y de reconstrucción utilizados fueron los mismos para todas las muestras. Tras la reconstrucción, se seleccionaron mediante la aplicación CTAn versión 1.14.4.1 (Bruker, Kontich, Bélgica) dos volúmenes de interés (VOI) distintos en los que realizar la determinación de las propiedades microestructurales.

En el caso del hueso trabecular, se seleccionó un volumen de interés (VOI) comenzando a 1 mm del cartílago de crecimiento de la metafisis distal del fémur (tomado

como sección de referencia) y ocupando 3,4 mm en dirección proximal (un total de 200 imágenes), excluyendo para el análisis el hueso cortical. (**Figura 22**).

Figura 22: Zonas del hueso analizadas en la microtomografía computarizada.



Para el análisis de hueso cortical, se vuelve a tomar como referencia el cartílago de crecimiento de la metáfisis distal, comenzando el VOI a 14 mm del mismo y abarcando 2,5 mm (150 imágenes). (**Figura 22**). El análisis estructural de los VOI se lleva a cabo con el software proporcionada con el equipo (CTAn versión 1.14.4.1). Una vez obtenidos los resultados de los parámetros microestructurales, se utilizó el programa CTVol 2.2.3.0 (Bruker, Kontich, Bélgica) para visualizar los modelos tridimensionales creados con CTAn mediante el algoritmo Marching cubes 33.

V.1.5.1 PARÁMETROS MORFÓMETRICOS HUESO TRABECULAR.

Para el hueso trabecular se determinaron los parámetros morfométricos estándar de hueso esponjoso mediante un análisis en 3D de las trabéculas.

Todos los parámetros se hallaron siguiendo las recomendaciones de nomenclatura de histomorfometría adoptada por ASBMR (American Society for Bone and Mineral Reserach):

❖ Relaciones de superficies y volumen:

- La fracción volumétrica ósea (**BV/TV**) refleja a la perfección la pérdida o ganancia de hueso en los distintos grupos. Se obtiene a partir de los índices morfométricos básicos volumen de hueso (bone volume, BV) y volumen de interés total (total volume of interest, TV). Se expresa comúnmente en porcentaje.
- La superficie total del hueso trabecular (**BS**), se mide mediante triangulación de la superficie del objeto mediante el algoritmo marching cubes. Su relación con el volumen de interés analizado se conoce como densidad de la superficie ósea (**BS/TV**). Se expresa en mm^{-1} , al ser el cociente entre una unidad de superficie y una unidad de volumen.
- La superficie específica ósea (**BS/BV**) expresa la relación entre la superficie total del hueso trabecular con el volumen ocupado únicamente por hueso mineralizado. Al igual que la variable anterior se expresa en mm^{-1} .

❖ Índices métricos directos:

- El grosor trabecular (**Tb.Th**) Se calcular a partir de un método que ocupa con esferas la estructura analizada por transformación de la distancia. Se expresa habitualmente en mm o μm .

- La separación trabecular (**Tb.Sp**), se calcula del mismo modo, pero esta vez ocupando las cavidades medulares. Se expresa en mm o μm .
- El número de trabéculas (**Tb.N**) implica el número de veces que se atraviesan las trabéculas por unidad de longitud por una vía arbitraria a través del volumen de interés. El método consiste en lanzar una línea que atraviese la región de interés y contar cuántas veces atraviesa trabéculas. Se expresa en mm^{-1} .

Las distintas variables se midieron directamente en las imágenes 3D de las trabéculas utilizando métodos descritos en la literatura [85,86].

❖ Índices no métricos directos:

- El factor de patrón trabecular (**Tb.Pf**) describe cuantitativamente la conectividad trabecular. Es un índice de conectividad inverso (a mayor valor de Tb.Pf menos conectadas están las trabéculas) basado en el cálculo de un índice de convexidad o concavidad relativa de la superficie ósea total, en el cual, la concavidad de las superficies trabeculares implica conectividad, mientras que la convexidad indica estructuras desconectadas y aisladas. Se expresa en mm^{-1} [87].
- El índice de modelo estructural (**SMI**) indica la prevalencia relativa de trabéculas en forma de placa (plate-like) o en forma de tubo (rod-like), indicando mayor presencia de placas cuanto más se acerca el valor a cero. Se define en un intervalo de valores de 0 a 3, donde 0 es una estructura en forma de placa ideal y 3 un cilindro.
- La densidad de conectividad (**Conn.D**), indica el número de conexiones redundantes entre estructuras trabeculares por unidad de volumen, expresada en mm^{-3} [88].

- El grado de anisotropía (**DA**) es una medida de la simetría del objeto o de la presencia/ausencia de estructuras alineadas en una determinada dirección. Se trata de una variable adimensional. Cero es la isotropía total y 1 la anisotropía total.

V.1.5.2 PARÁMETROS MORFÓMETRICOS HUESO CORTICAL.

En la región cortical se realizan dos análisis distintos. El primero, la separación endostio-periostio, nos permite calcular el volumen total, el volumen de hueso y el volumen medular. En el segundo, reportamos la porosidad del hueso cortical.

❖ Separación endostio-periostio:

- El volumen total de la sección transversal dentro del periostio (**VIP**) es el valor medio del volumen ocupado por hueso y médula ósea en las secciones transversales analizadas. Se expresa en mm³.

Un valor bajo de VIP nos indica que hay menos formación ósea y más reabsorción y, al contrario, si nos encontramos con un valor alto.

- El volumen de hueso cortical (**Ct.BV**) es el valor medio del volumen ocupado por hueso en las secciones transversales analizadas. Se expresa en mm³.
- El volumen medular (**Md.V**) es el valor medio del volumen ocupado por la médula ósea en las secciones transversales analizadas. Se expresa en mm³. Este valor nos indica lo contrario que VIP.

❖ Porosidad:

- El volumen del hueso cortical excluyendo los poros (**Ct.BV**).

- El ratio entre la superficie cortical y el volumen del hueso cortical sin poros (**Ct.BS/BV**).
- La porosidad del hueso cortical (**Ct.B.Po**).
- El espesor de los poros (**Ct.Th**).
- El diámetro del poro (**Ct.Po.Dm**).

V.1.6 BIOMECÁNICA.

Los fémures derechos de las ratas permanecieron congelados a -80°C y se descongelaron con anterioridad al ensayo mecánico para una correcta preparación. El ensayo se realizó en una máquina universal de ensayos. Se configuró un **ensayo de flexión a 3 puntos** [89,90]. El fémur se colocó horizontalmente sobre dos soportes, aplicando una fuerza por la parte superior en el centro del hueso. La flexión provoca fuerzas de tracción y alargamiento en la cara convexa del hueso, y fuerzas de compresión y acortamiento en la cara cóncava.

La distancia entre soportes fue de 17,6 mm y el diámetro de indentador de 5,6mm. La fuerza se aplicó en la dirección perpendicular al eje del hueso, en la región de la diáfisis, con una velocidad de aplicación de 10mm/min (0.17 mm/s). Se obtuvo una curva carga-desplazamiento para cada muestra y se calculó el diámetro de la diáfisis a partir del promedio de 6 medidas diferentes, para minimizar el efecto de la variabilidad.

La curva carga- desplazamiento nos proporciona información acerca de las propiedades mecánicas **extrínsecas** o **estructurales** del hueso (**Figura 23**). Dichas propiedades incluyen: fuerza máxima, desplazamiento máximo, rigidez extrínseca y trabajo de rotura.

Pero para poder comparar materiales distintos entre sí, es necesario una estandarización de dicha curva obteniendo la curva tensión- deformación, en la que se miden

las propiedades **intrínsecas o materiales** del hueso (**Figura 24**). Estas propiedades abarcan: esfuerzo máximo, deformación máxima, módulo de Young y tenacidad [91].

Figura 23: Curva carga/ desplazamiento.

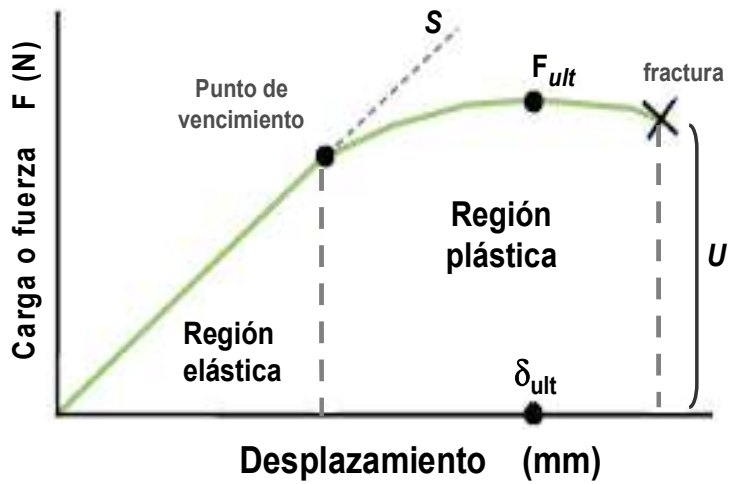
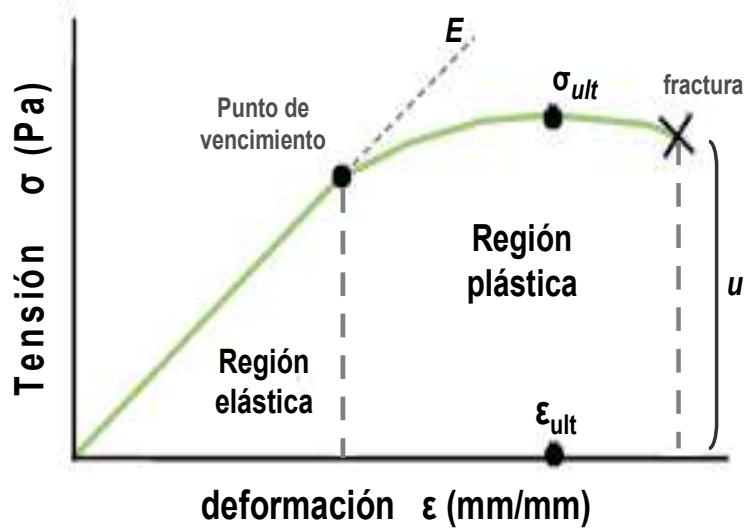


Figura 24: Curva tensión/deformación.



V.1.6.1. PARÁMETROS BIOMECÁNICOS ANALIZADOS.

A partir de la curva resultante de cada experimento se han determinado diferentes parámetros indicadores de las características mecánicas de las muestras [92].

- Fuerza máxima de flexión en el momento del fallo mecánico
- Desplazamiento en el momento del fallo mecánico
- Rigidez extrínseca
- Energía de rotura
- Tensión máxima
- Deformación máxima
- Módulo de Young

V.2 ACCIÓN DEL CALCIO + VITAMINA D.

V.2.1 DISEÑO DEL EXPERIMENTO.

Se realizó un segundo experimento, similar al anteriormente descrito, utilizando 45 ratas Wistar hembras de 6 meses de edad del animalario de la Fundación Jiménez Díaz que fueron mantenidas en condiciones estables de temperatura de 22º C, ciclos de 12 horas de luz y oscuridad y con acceso libre a comida y agua. La comida se administró mediante una dieta SAFE A04 completa para ratas y ratones, que contenía 7.3 g/kg de calcio y 1000 UI/kg de vitamina D3.

El peso medio de las ratas al comienzo del estudio fue de 333,6± 32 g.

Las ratas se dividieron al azar en 3 grupos:

1. Grupo **SHAM** (n=15) Ratas en las que se simuló la ovariectomía.
2. Grupo **OVX** (n=15) Ratas ovariectomizadas.
3. Grupo **OVX + (Ca + Vit D)** (n=15) Ratas ovariectomizadas a las que se les administró 25 mg/kg/día de Natecal D Flash® con sonda oral durante 8 meses. Natecal D Flash® está compuesto de carbonato de calcio and colecalciferol. 25 mg de Natecal D Flash® equivalen a 10 mg de calcio y 6,7 UI de vitamina D.

Ambos tratamientos comenzaron el día posterior a la ovariectomía y se mantuvieron durante 8 meses.

Todos los tratamientos se realizaron de acuerdo con los Estándares Comunitarios Europeos sobre el cuidado y uso de los animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité Ético del Investigación Animal del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz.

○ **CRONOGRAMA EXPERIMENTO:**

1. Ovariectomía:

- Partimos de 45 ratas Winstar de 6 meses de edad.
- Se realiza la ovariectomía de 30 ratas. Las otras 15 quedan como grupo control SHAM.

2. Tratamiento:

- Tratamiento con 25 mg/kg/día de Natecal D Flash® por sonda oral a 15 ratas ovariectomizadas durante ocho meses desde el día posterior a la ovariectomía.

- Los grupos SHAM y OVX no fueron tratados.

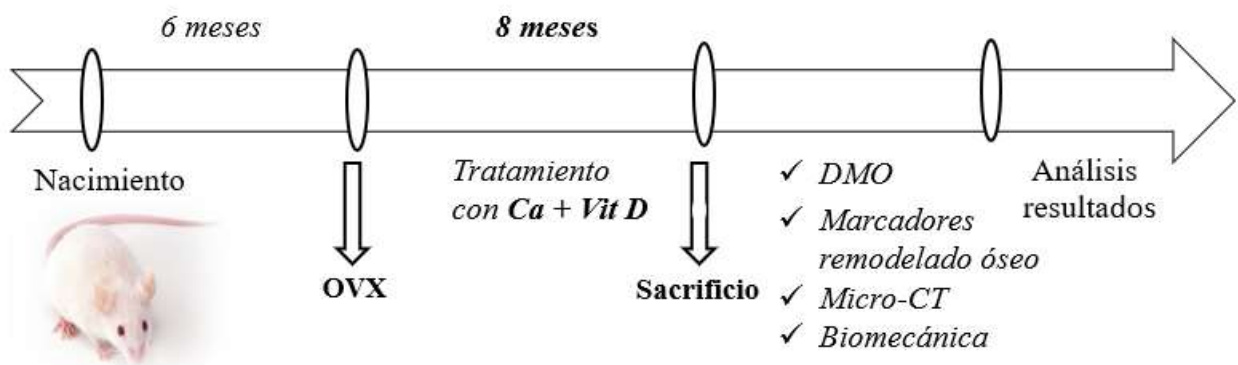
3. Sacrificio:

- Se sacrifican las 45 ratas trascurridos los ocho meses.

4. Realización de densitometrías, marcadores de remodelado óseo, microtomografía computarizada y biomecánica.

- Realización de las densitometrías óseas de los fémures izquierdos y columnas vertebrales.
- Realización de los marcadores de remodelado óseo.
- Envío de los fémures izquierdos para la realización de la microtomografía computarizada y la biomecánica a la empresa QUIBIM S.L (Valencia), y de los fémures derechos para los estudios de biomecánica.

5. Análisis de los resultados.



V.2.2 OVARIECTOMÍA, SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

Se realiza la cirugía de ovariectomía de la misma manera que en el experimento con bazedoxifeno. Ninguna rata murió tras la intervención.

El fármaco que se administró fue Natecal D Flas[®] (Italfármaco). La dosis fue calculada utilizando como base el tratamiento indicado para la osteoporosis en humanos, que es 1200 mg de calcio y 800 UI de colecalciferol (vitamina D3) al día vía oral. De este modo, la dosis empleada en las ratas fue 25 mg/kg/día de Natecal D Flash[®] mediante sonda oral. El vehículo utilizado fue 0.3 ml de agua en cada animal.

El tratamiento comenzó un día después de la ovariectomía y se mantuvo durante 8 meses. Transcurridos los 8 meses de tratamiento, se pesaron las ratas y se sacrificaron mediante exanguinación por punción cardiaca.

El proceso de extracción y congelación de sangre fue igual al realizado en el primer experimento con bazedoxifeno, así como, la conservación de las ratas.

V.2.3 DENSITOMETRÍAS ÓSEAS.

La densidad mineral ósea (DMO) se determinó *in situ* en la columna vertebral a nivel de L2, L3 y L4 y en los fémures izquierdos por DEXA del mismo modo ya descrito en el primer experimento (página 70).

V.2.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO:

En las muestras de sangre se determinaron marcadores bioquímicos de remodelado

óseo ya explicados anteriormente en el experimento con bazedoxifeno (páginas 72-75). Se determinaron osteocalcina y PINP como marcadores de formación ósea y TRAP- 5b y CTX como marcadores de resorción ósea.

V.2.5 MICROTOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA (MICRO-CT).

Los fémures izquierdos de las ratas tratadas con Calcio + Vitamina D se mandaron a estudiar a QUIBIM S.L. (Quantitative Imaging Biomarkers in Medicine) en Valencia. Se estudió la microarquitectura ósea a partir de las imágenes de microtomografía computarizada (micro-TC) adquiridas en las muestras de fémur de rata recibidas.

El análisis de la microarquitectura ósea se realizó en las regiones de la cabeza femoral, trocánter y metáfisis distal del fémur.

Se realizaron las adquisiciones de microtomografía computarizada en un equipo GE para muestras in vitro (eXplore Locus SP®, General Electric, EE. UU.) utilizando tecnología de detectores planos con haz cónico (cone beam CT). Dichas imágenes se dividen en elementos cúbicos pequeños llamados voxels. La resolución espacial de las adquisiciones fue isotrópica con vóxeles de 50× 50× 50 μm [93,94].

Se realizó una sola adquisición de micro-TC a cada uno de los fémures (**Figura 25**). Las imágenes se exportaron en formato DICOM para su análisis mediante técnicas de postproceso de imagen y extracción de biomarcadores.

La segmentación de las imágenes de micro-TC se realizó mediante el posicionamiento de una región de interés (ROI) rectangular y su propagación automática al resto de cortes, verificando en todo momento que las regiones segmentadas contuvieran exclusivamente hueso trabecular y médula, excluyendo el hueso cortical. Se segmentaron 3 regiones

diferentes en cada fémur: cabeza femoral, trocánter y metáfisis femoral distal (cerca a rodilla).

Se utilizó el algoritmo de Otsu para umbralizar las intensidades, quedando finalmente clasificada la imagen 3D exclusivamente en vóxeles pertenecientes o no al hueso esponjoso [95].

V.2.5.1 PARÁMETROS MORFÓMETRICOS HUESO TRABECULAR.

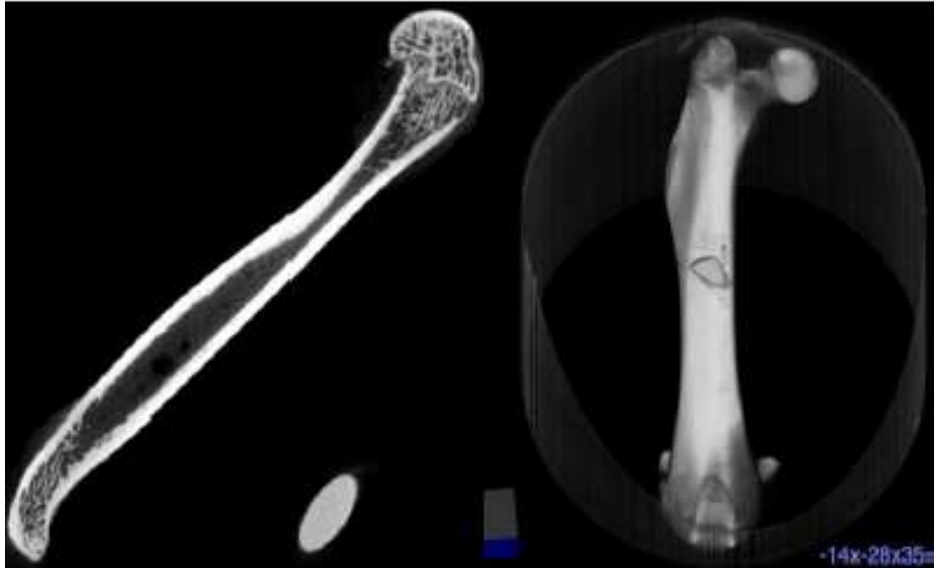
Para el hueso trabecular, se determinaron los parámetros morfométricos estándar de hueso esponjoso siguiendo las recomendaciones de nomenclatura de histomorfometría adoptada por ASBMR.

Los parámetros calculados ya han sido descritos anteriormente (páginas 78-80).

- La fracción volumétrica ósea (**BV/TV**).
- El grosor trabecular (**Tb.Th**)
- La separación trabecular (**Tb.Sp**).
- El número trabecular (**Tb.N**).

Además, se calcularon además propiedades de irregularidad mediante el análisis de la dimensión fractal en 2D (D2D) y en 3D (D3D), que expresan el grado de complejidad de los contornos de una estructura en el llenado de una superficie o un volumen [96].

Figura 25: Izquierda: reconstrucción longitudinal de las imágenes del fémur en micro-TC. Derecha: reconstrucción 3D del fémur.



V.2.6 TEST BIOMECÁNICO:

Las muestras de hueso trabecular reconstruidas a partir de las imágenes de micro-TC se sometieron a simulaciones de ensayos mecánicos de compresión mediante el **método de los elementos finitos**.

Se realizaron simulaciones estáticas de compresión uniaxial en los 3 ejes a las diferentes muestras virtuales obtenidas mediante ensayo de tensión-deformación. Las propiedades del material base se definieron a partir de las del hueso compacto (módulo de Young, $E=10$ GPa; coeficiente de Poisson, $\sigma = 0,3$). En las simulaciones del ensayo de compresión se impuso un desplazamiento nulo en los nodos de una cara y una deformación (ϵ) del 1% de la longitud de la arista en el lado opuesto.

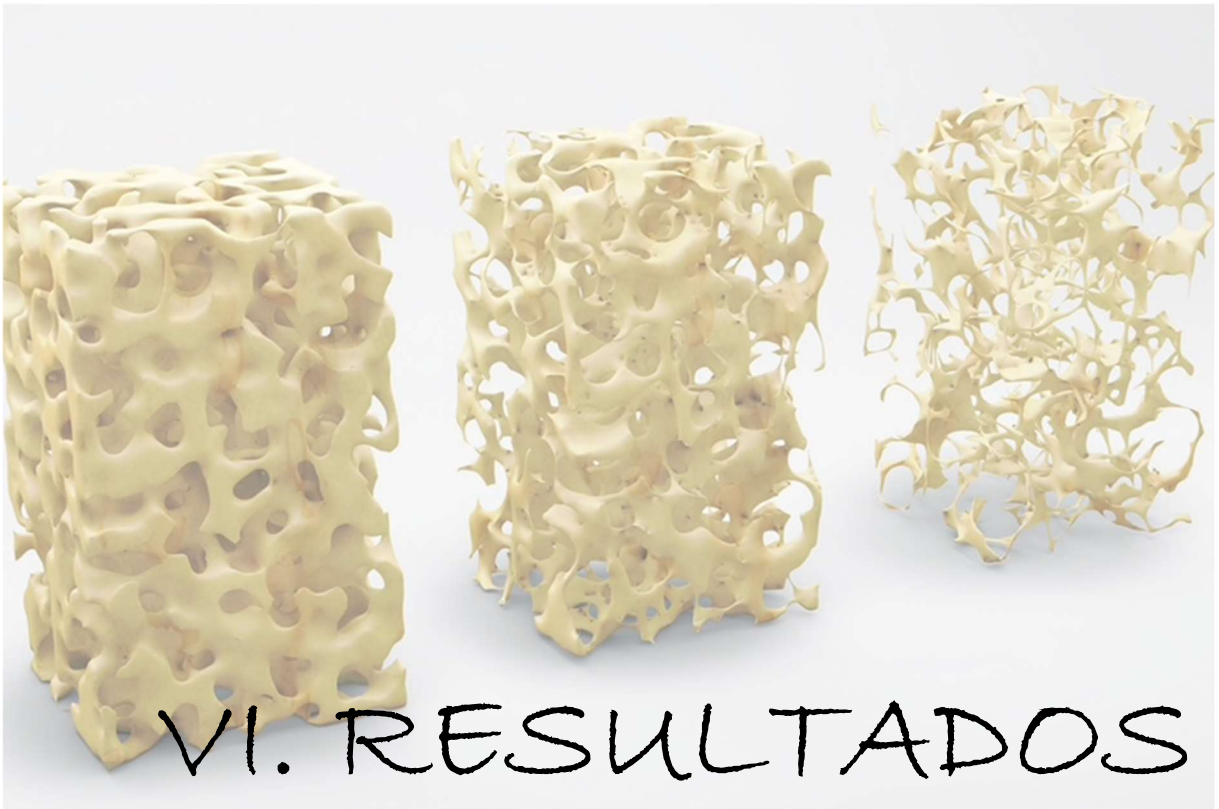
A partir de la resolución del sistema de ecuaciones se extrajo el módulo elástico aparente de toda la estructura en cada una de las direcciones (E_x , E_y , E_z) [97].

V.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los resultados de ambos experimentos fueron expresados como la media \pm DS de los diferentes parámetros.

Se utilizó un método no paramétrico, el test de Mann-Whitney (Programa de Software Medcalc, Bélgica), para comparar los diferentes grupos de tratamiento.

Un valor de $p < 0,05$ fue aceptado como indicador de una diferencia estadísticamente significativa.



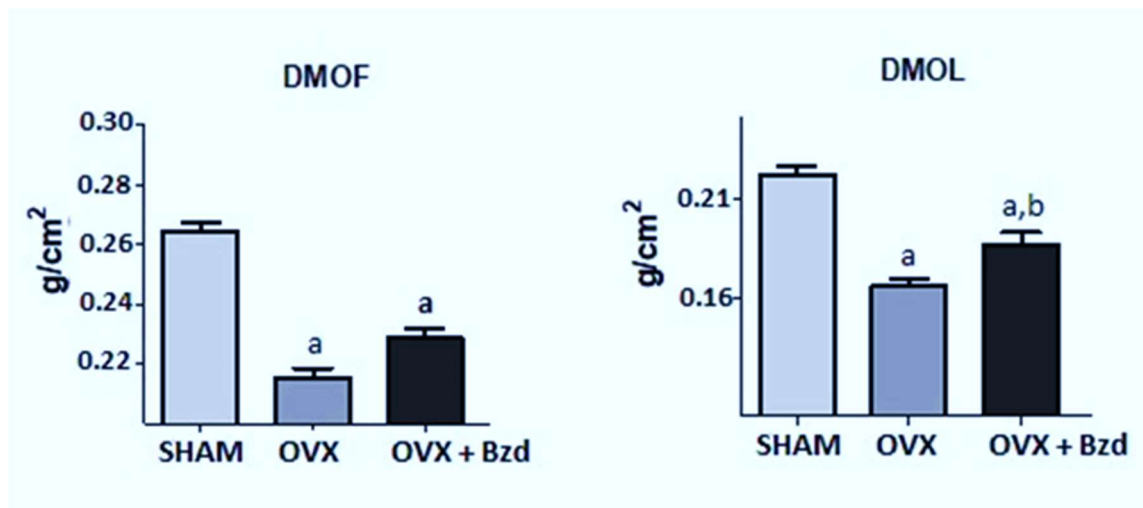
VI. RESULTADOS

VI.1 ACCIÓN DEL BAZEDOXIFENO

VI.1.1 DENSIDAD MINERAL ÓSEA.

La ovariectomía produjo un descenso significativo de la densidad mineral ósea en fémur y columna. El tratamiento con bazedoxifeno recuperó parcialmente la densidad lumbar, pero no tuvo efectos sobre la densidad ósea femoral (**Figura 26**).

Figura 26: Densidad mineral ósea femoral **DMOF** y densidad mineral ósea lumbar **DMOL**.



Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+BZD, ratas ovariectomizadas tratadas con 0.33 mg/kg/día de bazedoxifeno durante 8 meses. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con las letras a y b según el grupo con el que se comparen (a vs grupo SHAM, b vs grupo OVX). **DMOF:** OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs SHAM $p < 0.01$. **DMOL:** OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs OVX $p < 0.05$.

VI.1.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO.

Las ratas ovariectomizadas presentaron, como era de esperar, un aumento significativo en los marcadores de formación y resorción ósea (BGP, PINP y CTX) tras la ovariectomía comparándolas con el grupo control SHAM. El tratamiento con bazedoxifeno recuperó los niveles basales de BGP y de PINP, sin variaciones significativas en los niveles de CTX (**Figura 27**).

VI.1.3 MICROARQUITECTURA ÓSEA.

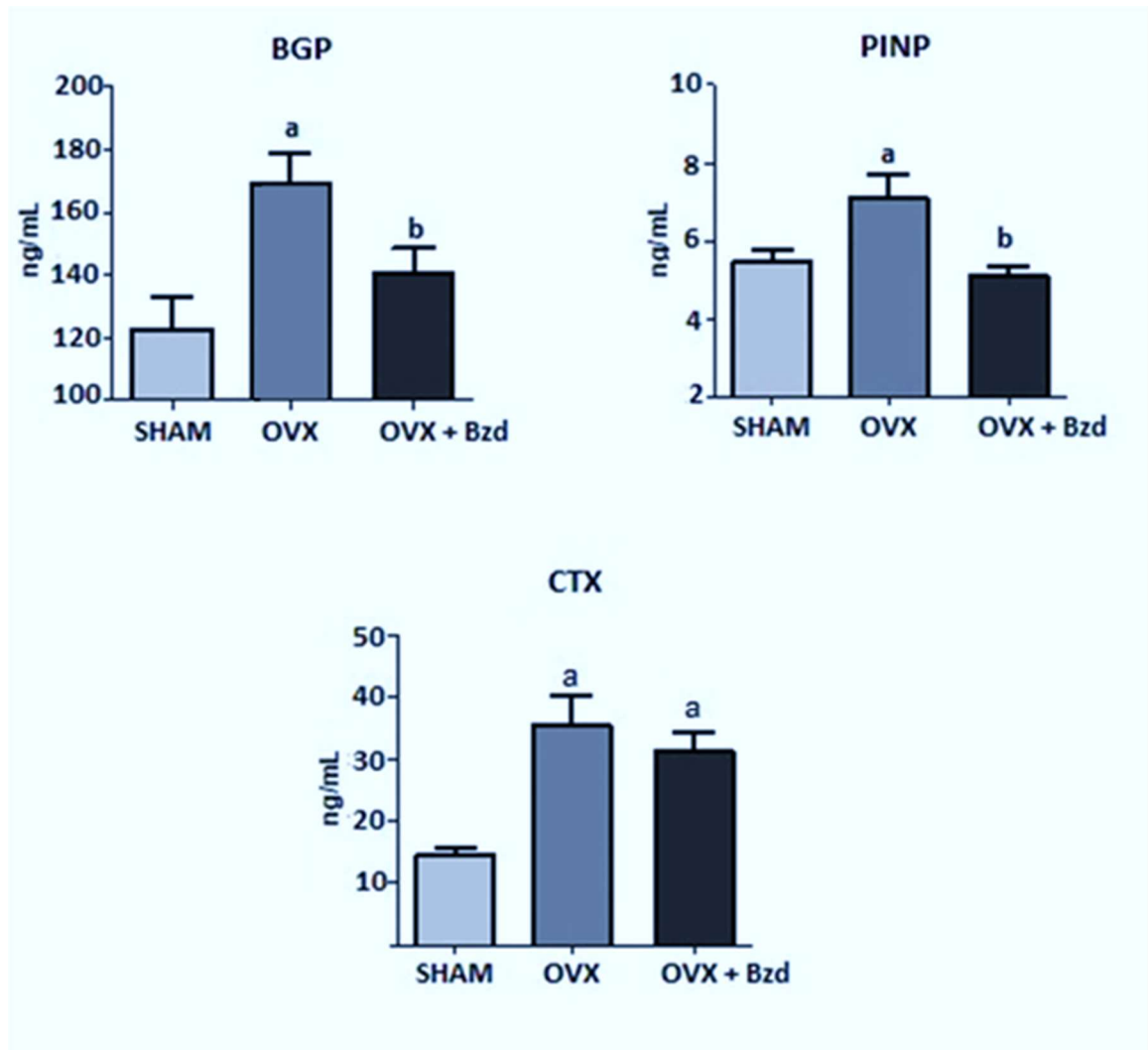
La mayor parte de los parámetros morfométricos tanto en hueso trabecular como en hueso cortical presentaron diferencias significativas entre los grupos OVX y OVX + BZD.

VI.1.3.1 PARÁMETROS MORFÓMETRICOS HUESO TRABECULAR

- **Relaciones de superficie y volumen e índices métricos directos:**

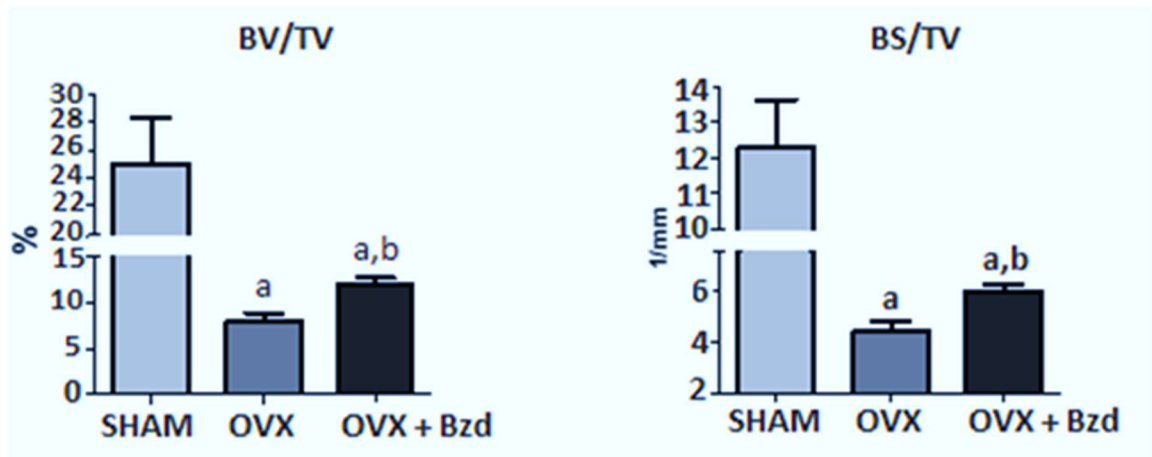
Las ratas ovariectomizadas mostraron un empeoramiento significativo en la mayoría de los parámetros microestructurales óseos estudiados en comparación con las ratas SHAM, debido a la deficiencia estrogénica que presentaban. La fracción volumétrica ósea (BV/TV), al igual que la densidad de superficie ósea (BS/TV) disminuyeron tras la ovariectomía, recuperándose parcialmente después del tratamiento con bazedoxifeno (**Figura 28**). Dicho fármaco, recuperó también parcialmente el aumento en la separación trabecular (Tb.Sp) producido por la ovariectomía, así como la disminución en el número de trabéculas (Tb.N), sin ejercer acciones sobre el espesor trabecular (Tb.Th) (**Figura 29**).

Figura 27: Marcadores bioquímicos de remodelado óseo: Osteocalcina (**BGP**), Propéptido Aminoterminal del Procolágeno I (**PINP**) y telopéptido carboxiterminal del colágeno I (**CTX**).



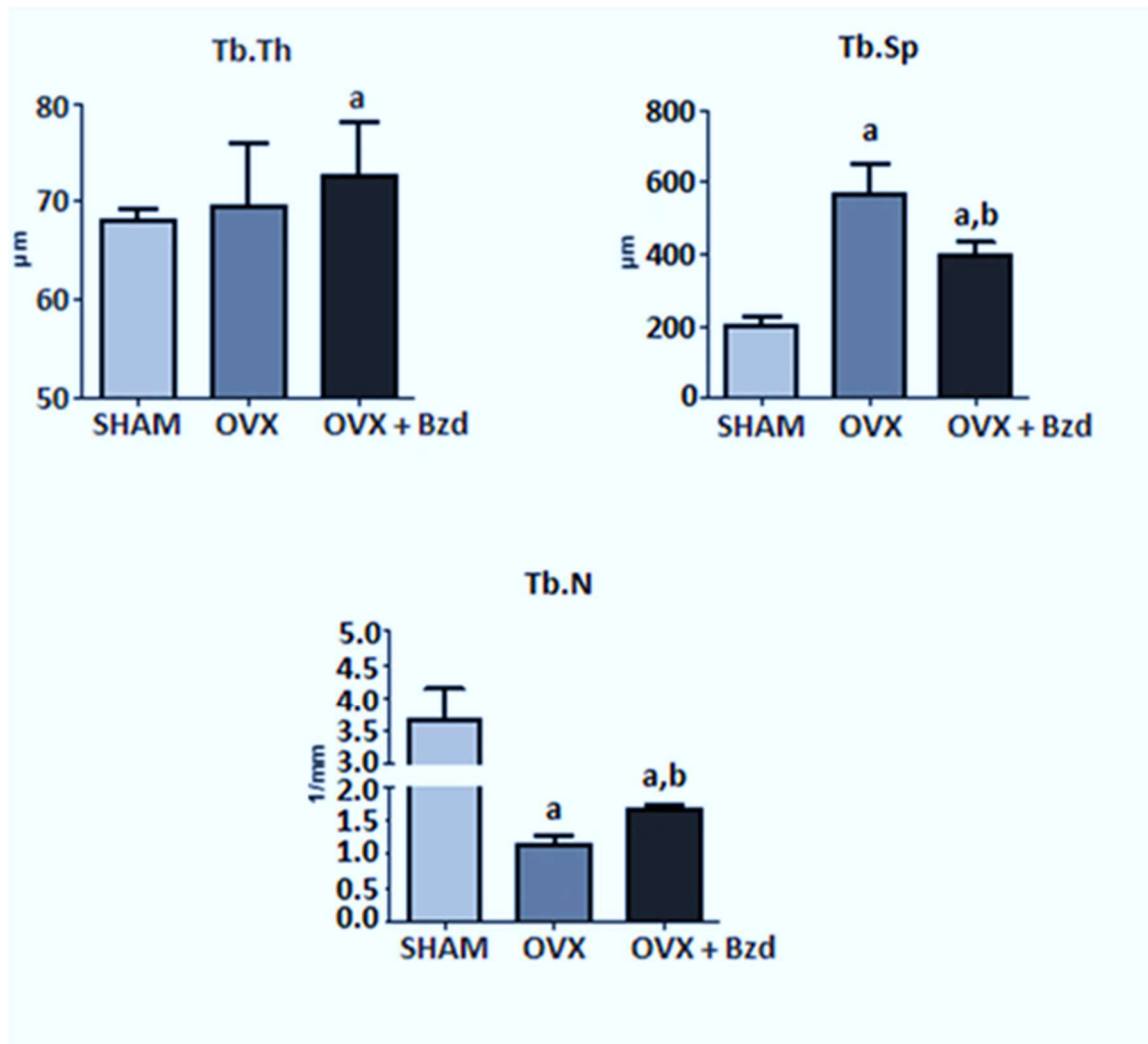
Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+BZD, ratas ovariectomizadas tratadas con 0.33 mg/kg/día de bazedoxifeno durante 8 meses, Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con las letras a y b según el grupo con el que se comparen (a vs grupo SHAM, b vs grupo OVX). **BGP:** OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs OVX $p < 0.01$. **PINP:** OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs OVX $p < 0.01$. **CTX:** OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs SHAM $p < 0.01$.

Figura 28: Parámetros trabeculares métricos directos en fémur. Fracción volumétrica ósea (**BV/TV**) y densidad de superficie ósea (**BS/TV**).



Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+BZD, ratas ovariectomizadas tratadas con 0.33 mg/kg/día de bazedoxifeno durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con las letras a y b según el grupo con el que se comparen (a vs grupo SHAM, b vs grupo OVX). **BV/TV**: OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs OVX $p < 0.05$. **BS/TV**: OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs OVX $p < 0.05$.

Figura 29: Parámetros trabeculares métricos directos en fémur. Espesor trabecular (**Tb.Th**), Separación trabecular (**Tb.Sp**) y número de trabéculas (**Tb.N**).



Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+BZD, ratas ovariectomizadas tratadas con 0.33 mg/kg/día de bazedoxifeno durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con las letras a y b según el grupo con el que se comparen (a vs grupo SHAM, b vs grupo OVX). **Tb.Th:** OVX+BZD vs SHAM $p < 0.05$. **Tb.Sp:** OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs OVX $p < 0.05$. **Tb.N:** OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs OVX $p < 0.05$.

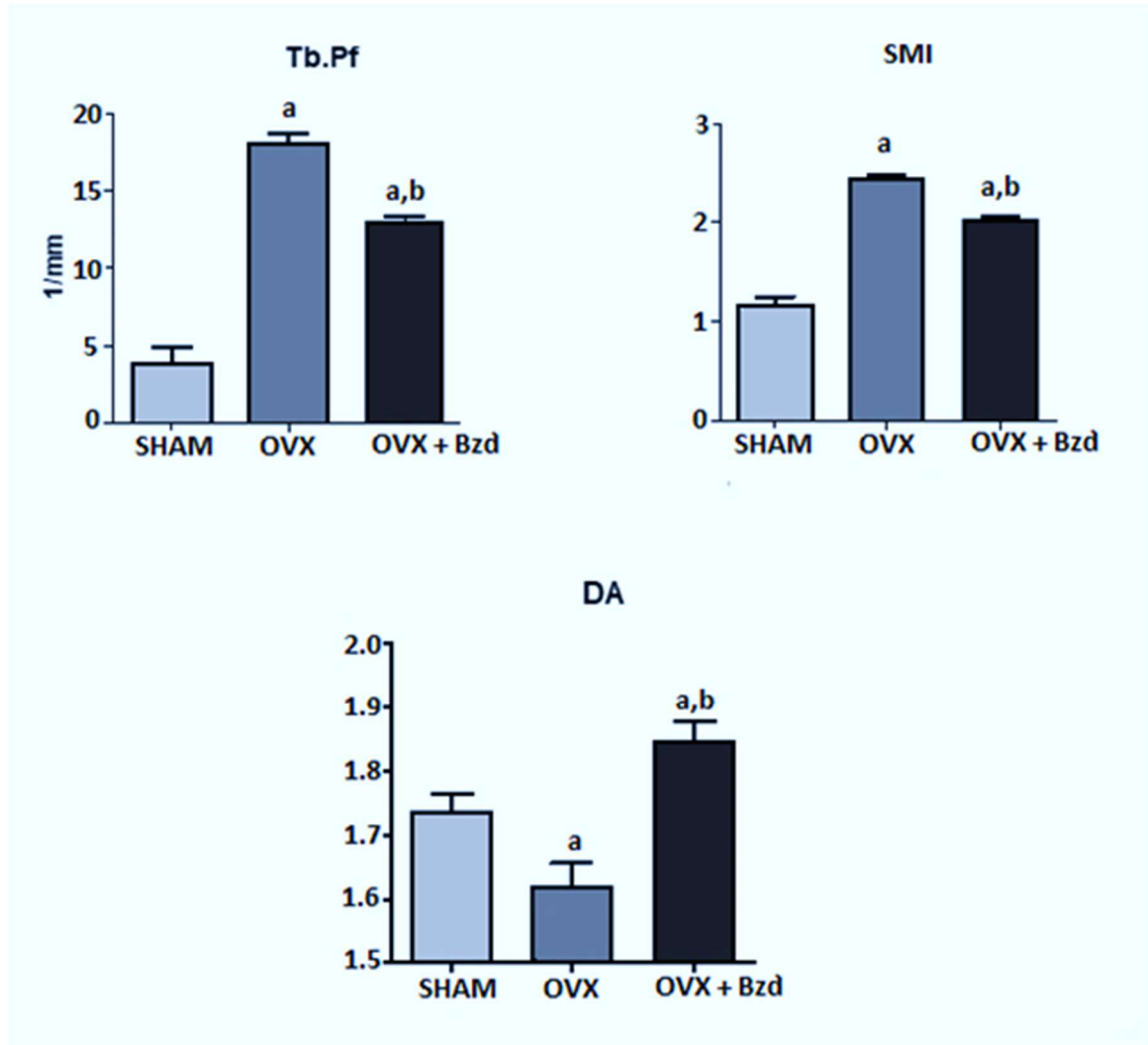
- **Índices no métricos directos:**

La ovariectomía también generó modificaciones en los parámetros no métricos de la morfometría trabecular ósea. Se determinó el factor de patrón trabecular (Tb.Pf), el índice de modelo estructural (SMI) y las variables densidad de conectividad (Conn.Dn) y el grado de anisotropía (DA) en los grupos de ratas estudiados. El Tb.Pf aumentó significativamente en las ratas ovariectomizadas, indicando una importante pérdida de conectividad trabecular tras la ovariectomía. El tratamiento con bazedoxifeno corrigió parcialmente esta pérdida. La ovariectomía aumentó también significativamente el SMI, indicando una prevalencia de trabéculas en forma de tubo, en comparación, con las ratas SHAM con prevalencia de trabéculas en forma de placa. El tratamiento con bazedoxifeno corrigió también parcialmente esta variación. El grado de anisotropía disminuyó significativamente tras la ovariectomía, aumentando tras el tratamiento con bazedoxifeno a valores superiores a los de las ratas controles (**Figura 30**).

VI.1.3.2 PARÁMETROS MORFÓMETRICOS HUESO CORTICAL.

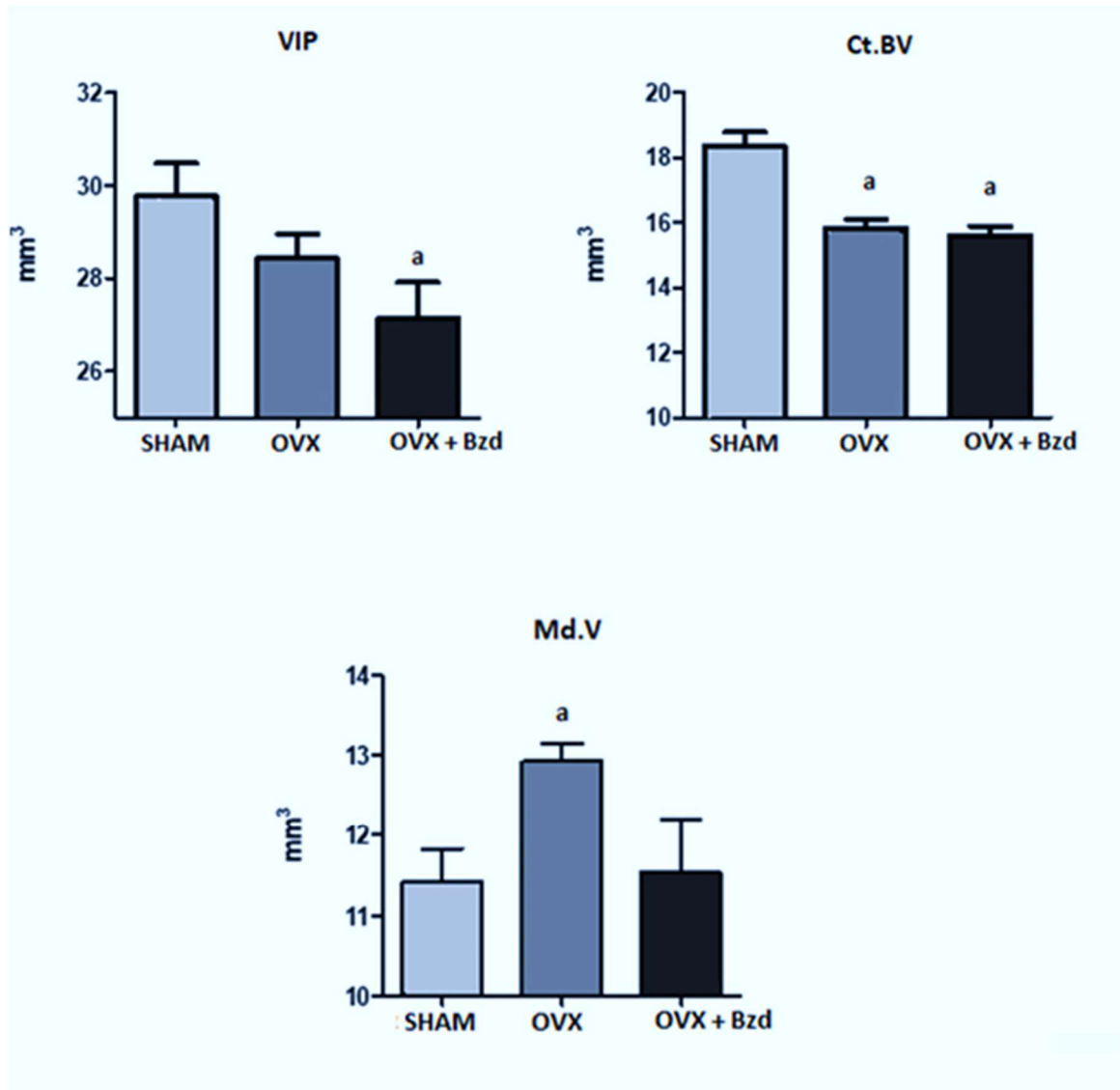
Los parámetros microestructurales analizados en la región cortical de los fémures de rata no presentaron diferencias significativas entre los grupos OVX y OVX + Bzd. Se estudiaron el volumen de hueso + médula ósea (VIP), el volumen de hueso cortical (Ct.BV) y el volumen medular (Md.V) en la región cortical de los fémures. El volumen de hueso + médula no parece variar significativamente tras la ovariectomía, pero es menor en las ratas ovariectomizadas tratadas con bazedoxifeno. El volumen de hueso cortical (Ct.BV) disminuye significativamente tras la ovariectomía, no ejerciendo acción positiva el bazedoxifeno. El volumen de médula ósea (Md.V) aumenta tras la ovariectomía, permaneciendo constante tras el tratamiento con bazedoxifeno (**Figura 31**).

Figura 30: Parámetros trabeculares no métricos directos. Factor de patrón trabecular (**Tb.Pf**), Índice de modelo estructural (**SMI**) y grado de anisotropía (**DA**).



Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+BZD, ratas ovariectomizadas tratadas con 0.33 mg/kg/día de bazedoxifeno durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con las letras a y b según el grupo con el que se comparen (a vs grupo SHAM, b vs grupo OVX). **Tb.Pf**: OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs OVX $p < 0.05$. **SMI**: OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs OVX $p < 0.05$. **DA**: OVX vs SHAM $p < 0.05$; OVX+BZD vs OVX $p < 0.01$.

Figura 31: Parámetros morfométricos hueso cortical. Volumen total de la sección transversal dentro del periostio que incluye, volumen de hueso + médula ósea (**VIP**), hueso cortical (**Ct.BV**) y volumen medular (**Md.V**) en la cortical.



Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+BZD, ratas ovariectomizadas tratadas con 0.33 mg/kg/día de bazedoxifeno durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los grupos se expresan con la letra *a* y se compara con el grupo SHAM. **VIP:** OVX+BZD vs SHAM $p < 0.01$; **CtBv:** OVX vs. SHAM $p < 0.05$, OVX+BZD vs. SHAM $p < 0.05$; **Md.V:** OVX vs. SHAM $p < 0.01$.

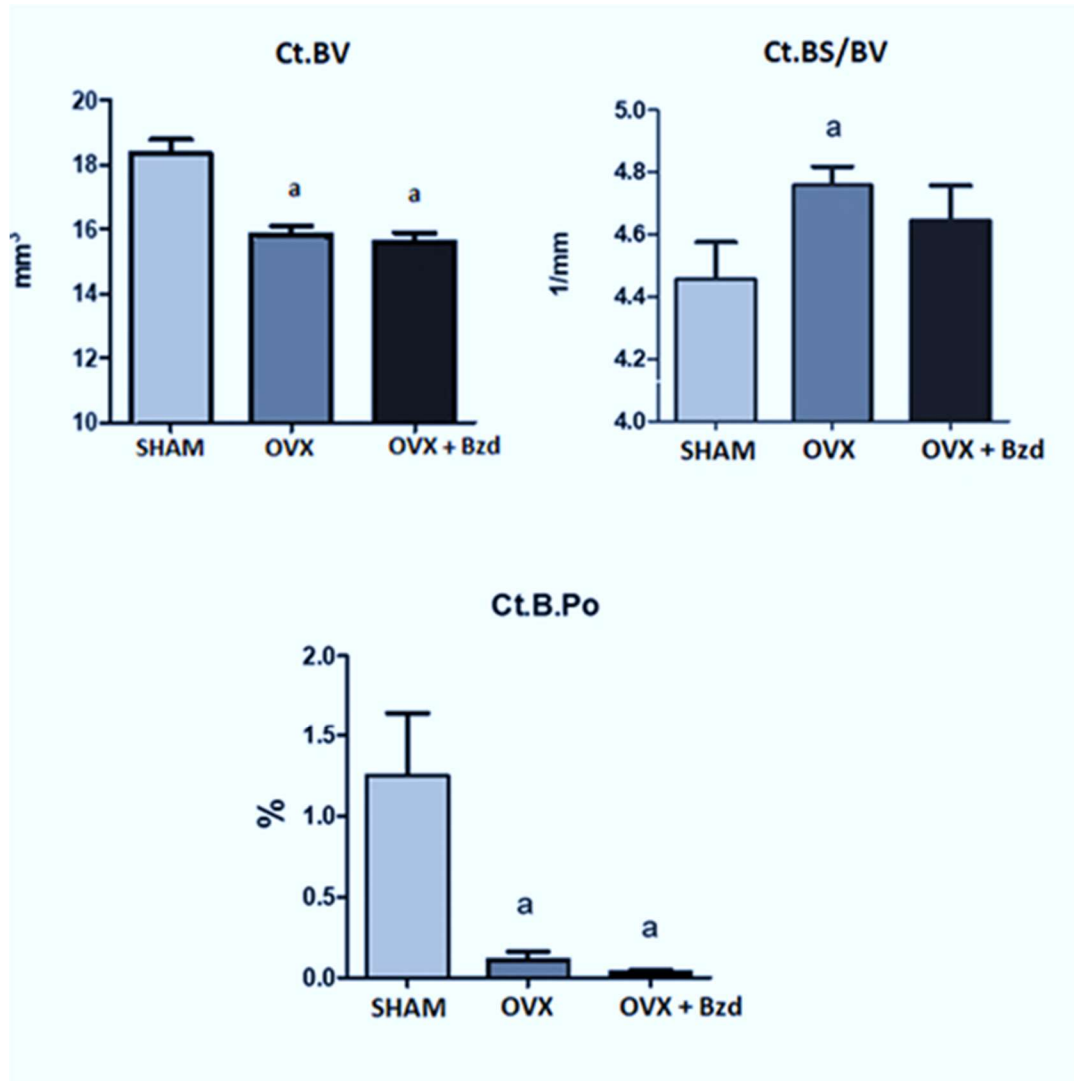
En cuanto a los parámetros de porosidad del hueso cortical se estudiaron, además del volumen de hueso cortical (Ct.BV) el ratio entre la superficie cortical y el volumen de hueso cortical sin poros (Ct.BS/BV) y la porosidad del hueso cortical (Ct.B.Po). Observamos como el volumen de hueso cortical disminuye tras la ovariectomía, no ejerciendo ninguna acción el bazedoxifeno. La superficie relativa cortical aumenta tras la ovariectomía, normalizándose tras el tratamiento con bazedoxifeno. La porosidad (Ct.B.Po) disminuye significativamente tras la ovariectomía, no produciendo variaciones el tratamiento con bazedoxifeno (**Figura 32**).

VI.1.4 BIOMECÁNICA ÓSEA.

La cirugía de ovariectomía no supuso importantes alteraciones en la biomecánica ósea. Analizando las propiedades biomecánicas extrínsecas de las muestras de fémur estudiadas podemos ver como el desplazamiento máximo, la rigidez y el trabajo de rotura no varían con la ovariectomía ni con el tratamiento con bazedoxifeno. En cambio, la fuerza máxima de flexión en el momento del fracaso mecánico disminuye con la ovariectomía, como era de esperar, sin ejercer efecto el bazedoxifeno (**Figura 33**).

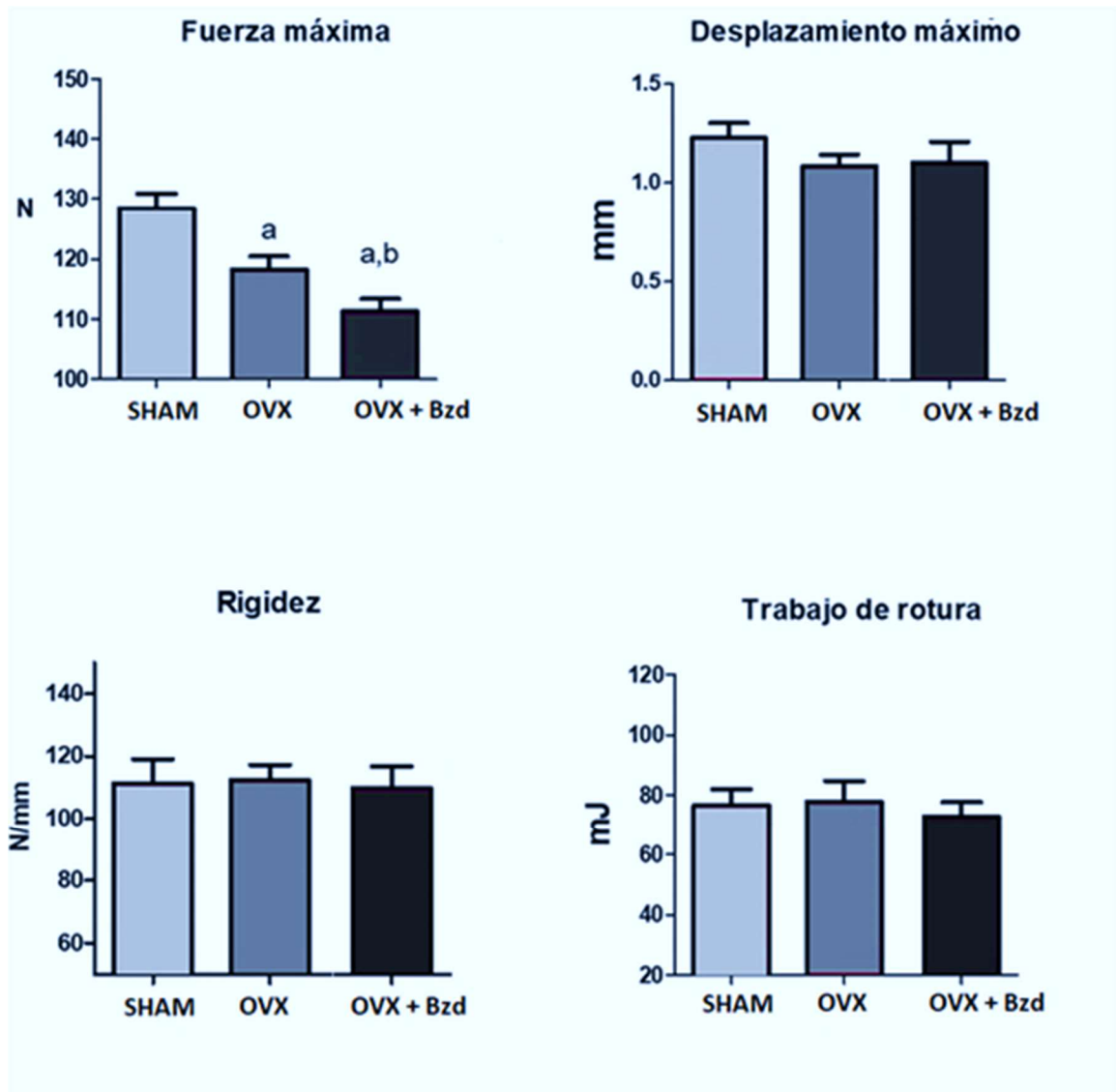
En cuanto a las propiedades biomecánicas intrínsecas del hueso observamos como la tensión máxima y el módulo de Young no se alteran con la cirugía, al contrario que la deformación máxima antes de la rotura que disminuye con la ovariectomía, recuperándose muy ligeramente con el tratamiento con bazedoxifeno pero sin diferencias significativas respecto al grupo OVX (**Figura 34**).

Figura 32: Parámetros de porosidad en hueso cortical. Volumen de hueso cortical (**Ct.BV**), ratio entre la superficie cortical y el volumen del hueso cortical sin poros (**Ct.BS/BV**) y porosidad del hueso cortical (**Ct.B.Po**).



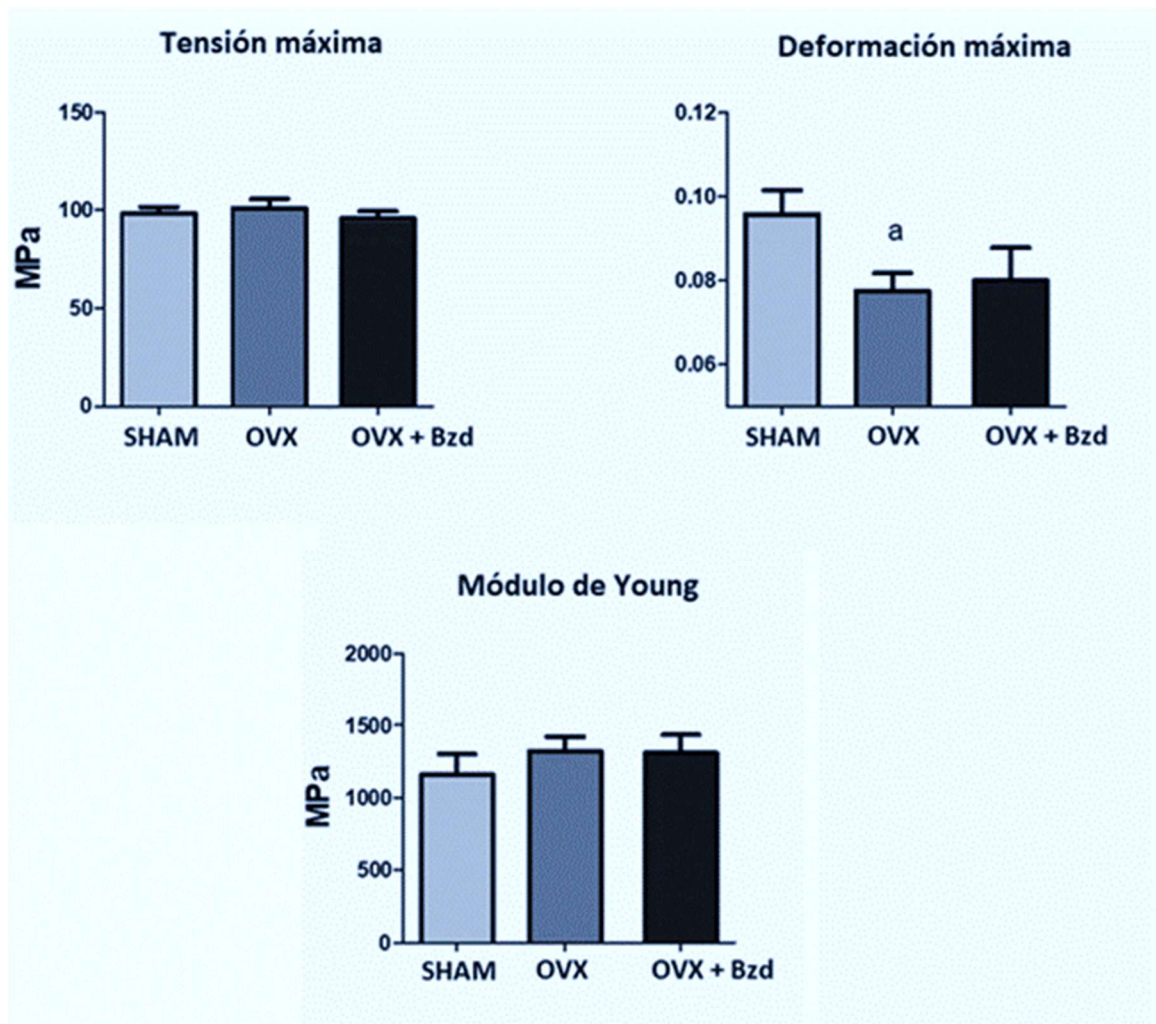
Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+BZD, ratas ovariectomizadas tratadas con 0.33 mg/kg/día de bazedoxifeno durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con las letras a y b según el grupo con el que se comparen (a vs grupo SHAM, b vs grupo OVX). **CtBv**: OVX vs. SHAM $p < 0.05$, OVX+BZD vs. SHAM $p < 0.05$; **Ct.BS/BV**: OVX vs. SHAM $p < 0.05$; **CtB.Po**: OVX vs. SHAM $p < 0.001$, OVX+BZD vs. SHAM $p < 0.001$.

Figura 33: Propiedades *biomecánicas extrínsecas* del hueso: fuerza máxima, desplazamiento máximo, rigidez y trabajo de rotura.



Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+BZD, ratas ovariectomizadas tratadas con 0.33 mg/kg/día de bazedoxifeno durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con las letras a y b según el grupo con el que se comparen (a vs grupo SHAM, b vs grupo OVX). **Fuerza máxima:** OVX vs. SHAM $p < 0.05$, OVX+BZD vs. SHAM $p < 0.05$.

Figura 34: Propiedades *biomecánicas intrínsecas* del hueso: tensión máxima, deformación máxima y módulo de Young.

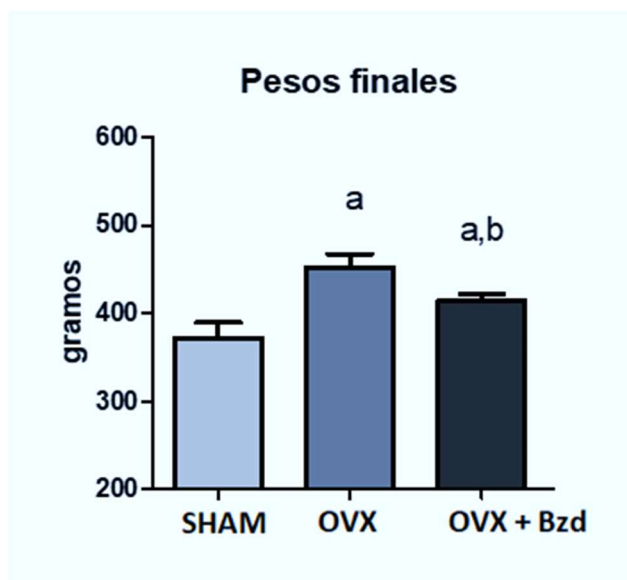


Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+BZD, ratas ovariectomizadas tratadas con 0.33 mg/kg/día de bazedoxifeno durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con las letras a y b según el grupo con el que se comparen (a vs grupo SHAM, b vs grupo OVX). **Deformación máxima:** OVX vs. SHAM $p < 0.05$

VI.1.5 EVOLUCIÓN DEL PESO.

Con respecto a los pesos de las ratas, al final del experimento, el grupo SHAM pesaba 380 ± 25 g, el grupo OVX 475 ± 30 g y el grupo tratado con bazedoxifeno 425 ± 15 g. Como era de esperar, la ovariectomía hizo ganar peso a las ratas y el tratamiento con bazedoxifeno amortiguó parcialmente dicha ganancia (**Figura 35**).

Figura 35: Pesos finales de las ratas.



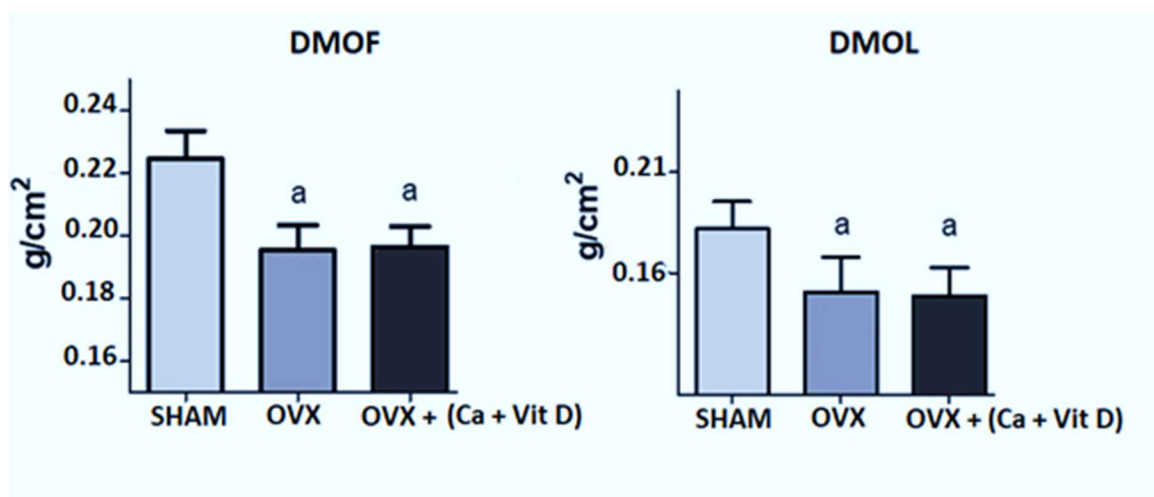
Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+BZD, ratas ovariectomizadas tratadas con 0.33 mg/kg/día de bazedoxifeno durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con las letras a y b según el grupo con el que se comparen (a vs grupo SHAM, b vs grupo OVX). **Pesos finales:** OVX vs. SHAM $p < 0.01$, OVX+BZD vs. SHAM $p < 0.05$; OVX +BZD vs. OVX $p < 0.05$.

VI.2 ACCIÓN DEL CALCIO + VITAMINA D.

VI.2.1 DENSIDAD MINERAL ÓSEA.

La densidad mineral ósea femoral y lumbar disminuyeron significativamente con la ovariectomía. La administración de Natecal D Flash® no produjo ningún cambio significativo en la DMOF y DMOL del grupo de ratas OVX en comparación con el grupo SHAM (**Figura 36**).

Figura 36: Densidad mineral ósea femoral (**DMOF**) y densidad mineral ósea lumbar (**DMOL**).



Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+(Ca + Vit D), ratas ovariectomizadas tratadas con 25 mg/kg/día de Natecal D Flash® con sonda oral durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con las letras a y b según el grupo con el que se comparen (a vs grupo SHAM, b vs grupo OVX). **DMOF:** OVX vs. SHAM $p < 0.01$; OVX+(Ca + Vit D) vs SHAM $p < 0.01$. **DMOL:** OVX vs. SHAM $p < 0.01$; OVX+(Ca + Vit D) vs SHAM $p < 0.01$.

VI.2.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO.

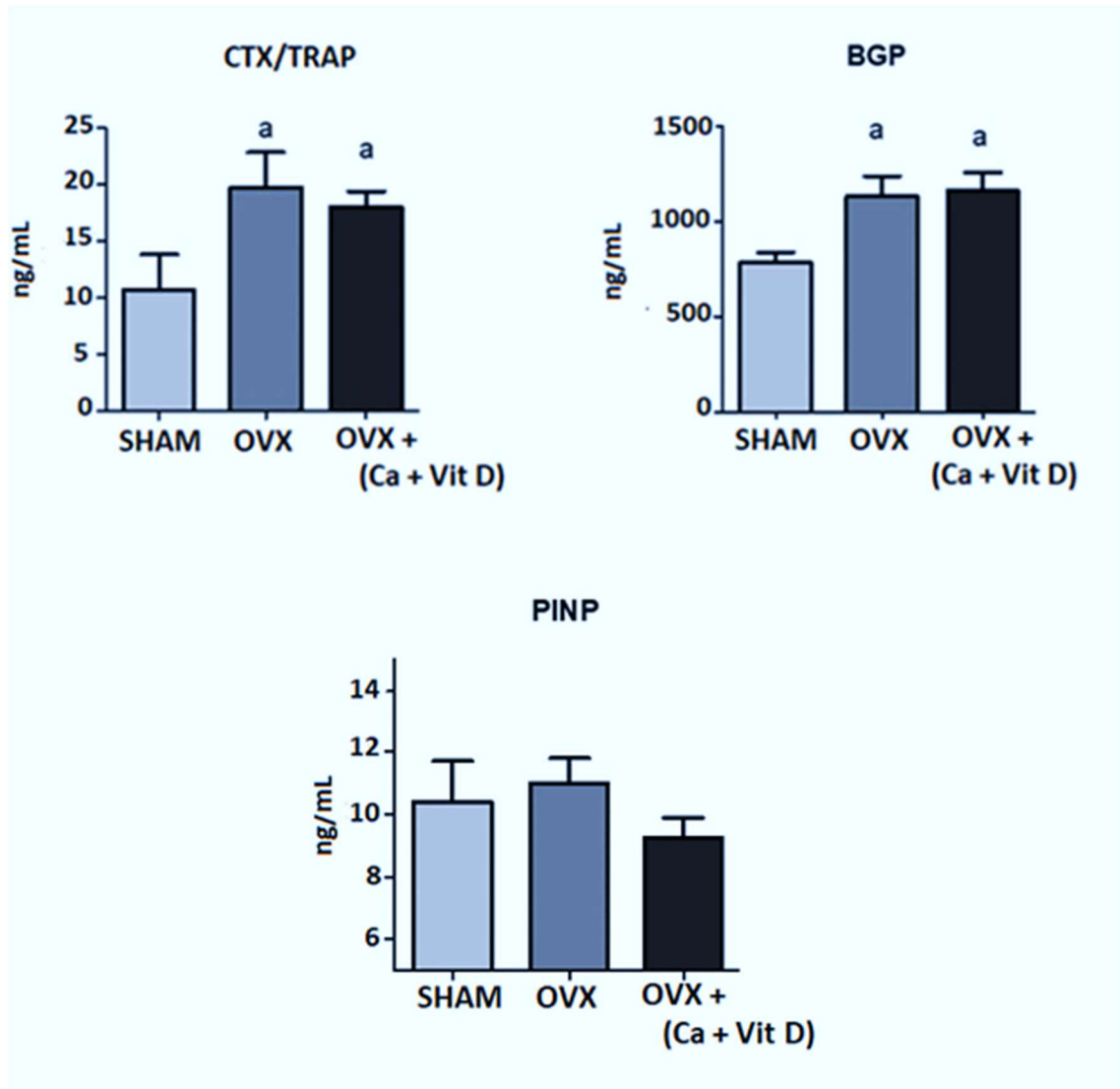
La ovariectomía produjo un aumento en los niveles séricos del marcador de formación ósea BGP y del marcador de resorción ósea CTX/TRAP, sin variaciones en los niveles de PINP. El tratamiento con calcio y vitamina D (Natecal D Flash®) no produjo ninguna mejora significativa en los marcadores de remodelado óseo entre el grupo OVX y el grupo OVX + (Ca + Vit D) (**Figura 37**).

VI.2.3 MICROARQUITECTURA ÓSEA.

Transcurridos ocho meses desde la cirugía, muchas de las variables que determinan la estructura ósea, analizadas por microtomografía computarizada (micro-CT), fueron significativamente diferentes en el grupo OVX en comparación con el grupo SHAM. El grupo OVX presentó una disminución significativa en la fracción volumétrica ósea ocasionada por un aumento significativo en la separación trabecular y una disminución significativa en el número de trabéculas, sin cambios en el espesor trabecular. El tratamiento con calcio + vitamina D (Natecal D Flash®) no corrigió el empeoramiento en la estructura ósea de las ratas ovariectomizadas por lo que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo OVX y el grupo OVX + (Ca + Vit D) (**Figura 38**).

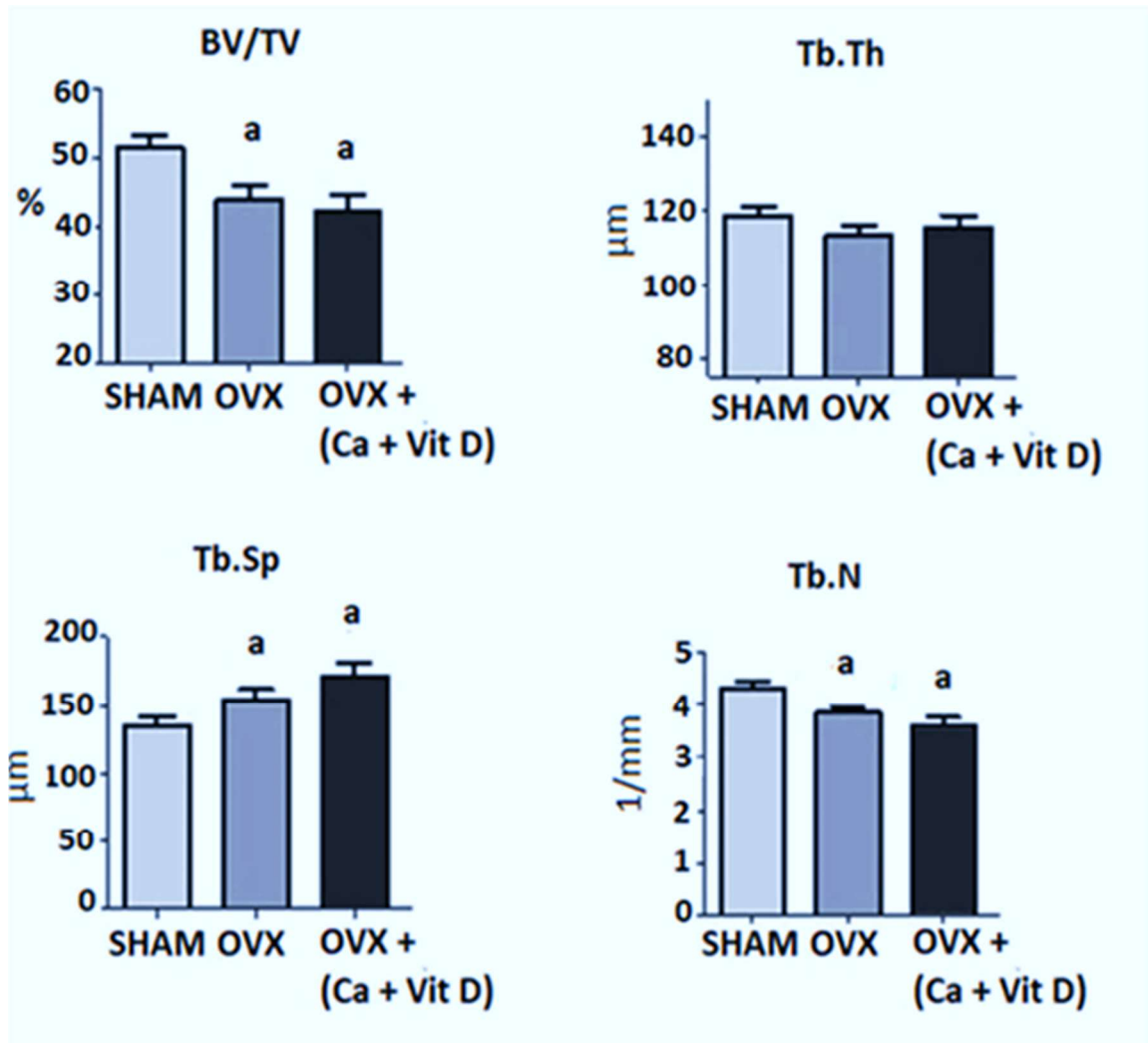
La **figura 39** representa la microarquitectura ósea trabecular de los tres grupos estudiados: SHAM, OVX y OVX + (Ca + Vit D). Podemos observar importantes diferencias entre el grupo SHAM y los dos grupos ovariectomizados, por tanto, el tratamiento con Natecal D Flash® no previno la pérdida de estructura ósea producida por la ovariectomía.

Figura 37: Marcadores bioquímicos de remodelado óseo: Telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I/Isoenzima 5b de la Fosfatasa Acida Tartrato Resistente (**CTX/TRAP**), osteocalcina (**BGP**) y propéptido aminoterminal del procolágeno I (**PINP**).



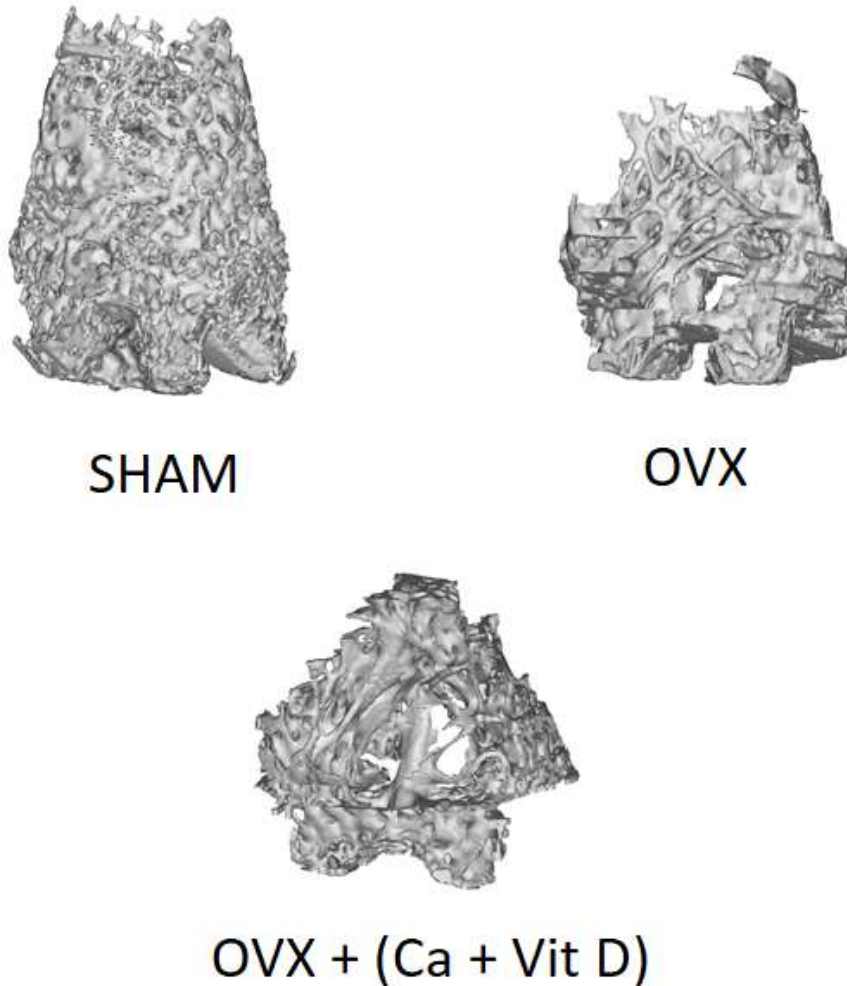
Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+(Ca + Vit D), ratas ovariectomizadas tratadas con 25 mg/kg/día de Natecal D Flash® con sonda oral durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con la letra a (a vs grupo SHAM). **CTX/TRAP** OVX vs. SHAM $p < 0.01$; OVX+(Ca + Vit D) vs SHAM $p < 0.01$; **BGP** OVX vs. SHAM $p < 0.01$; OVX+(Ca + Vit D) vs SHAM $p < 0.01$.

Figura 38: Parámetros morfométricos en hueso trabecular. Fracción volumétrica ósea (**BV/TV**), espesor trabecular (**Tb.Th**), separación trabecular (**Tb.Sp**) y número de trabéculas (**Tb.N**).



Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+(Ca + Vit D), ratas ovariectomizadas tratadas con 25 mg/kg/día de Natecal D Flash® con sonda oral durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con la letra a (a vs grupo SHAM). **BS/TV**: OVX vs. SHAM $p < 0.01$; OVX+(Ca + Vit D) vs SHAM $p < 0.01$. **Tb. Sp**: OVX vs. SHAM $p < 0.05$; OVX+(Ca + Vit D) vs SHAM $p < 0.05$. **Tb.N**: OVX vs. SHAM $p < 0.05$; OVX+(Ca + Vit D) vs SHAM $p < 0.05$.

Figura 39: Imágenes en 3D de hueso trabecular en secciones de fémur.

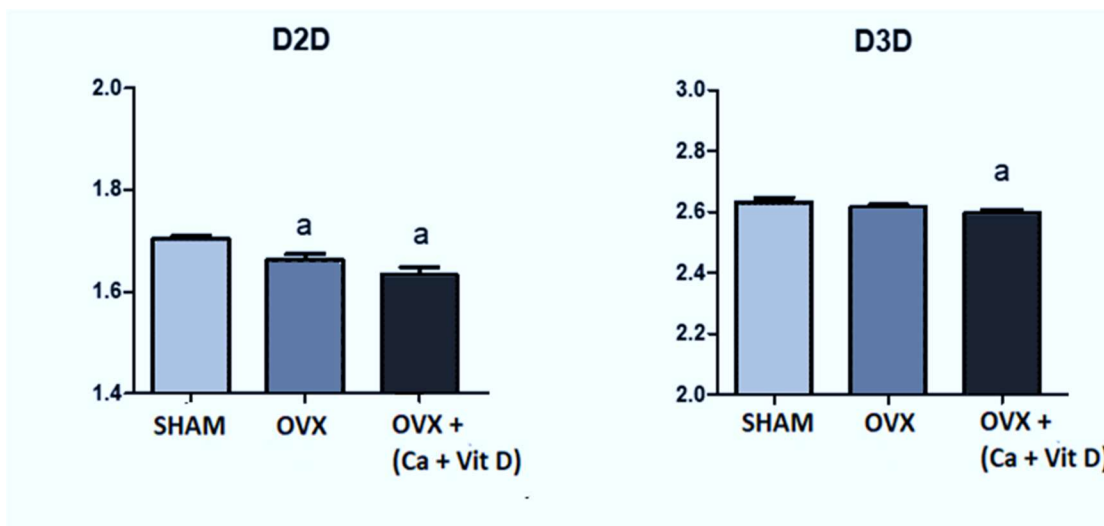


Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+(Ca + Vit D), ratas ovariectomizadas tratadas con 25 mg/kg/día de Natecal D Flash® con sonda oral durante 8 meses.

En cuanto a las propiedades de irregularidad, la dimensión fractal en 2D (D2D) disminuyó significativamente en las ratas OVX en comparación con las ratas SHAM, sin cambios significativos en la D3D. El grupo de ratas ovariectomizadas y tratadas con Ca + Vit D

mostró el mismo descenso en D2D y D3D que el grupo OVX sin ningún tipo de mejoría significativa (**Figura 40**).

Figura 40: Dimensión fractal en 2D (D2D) y en 3D (D3D).

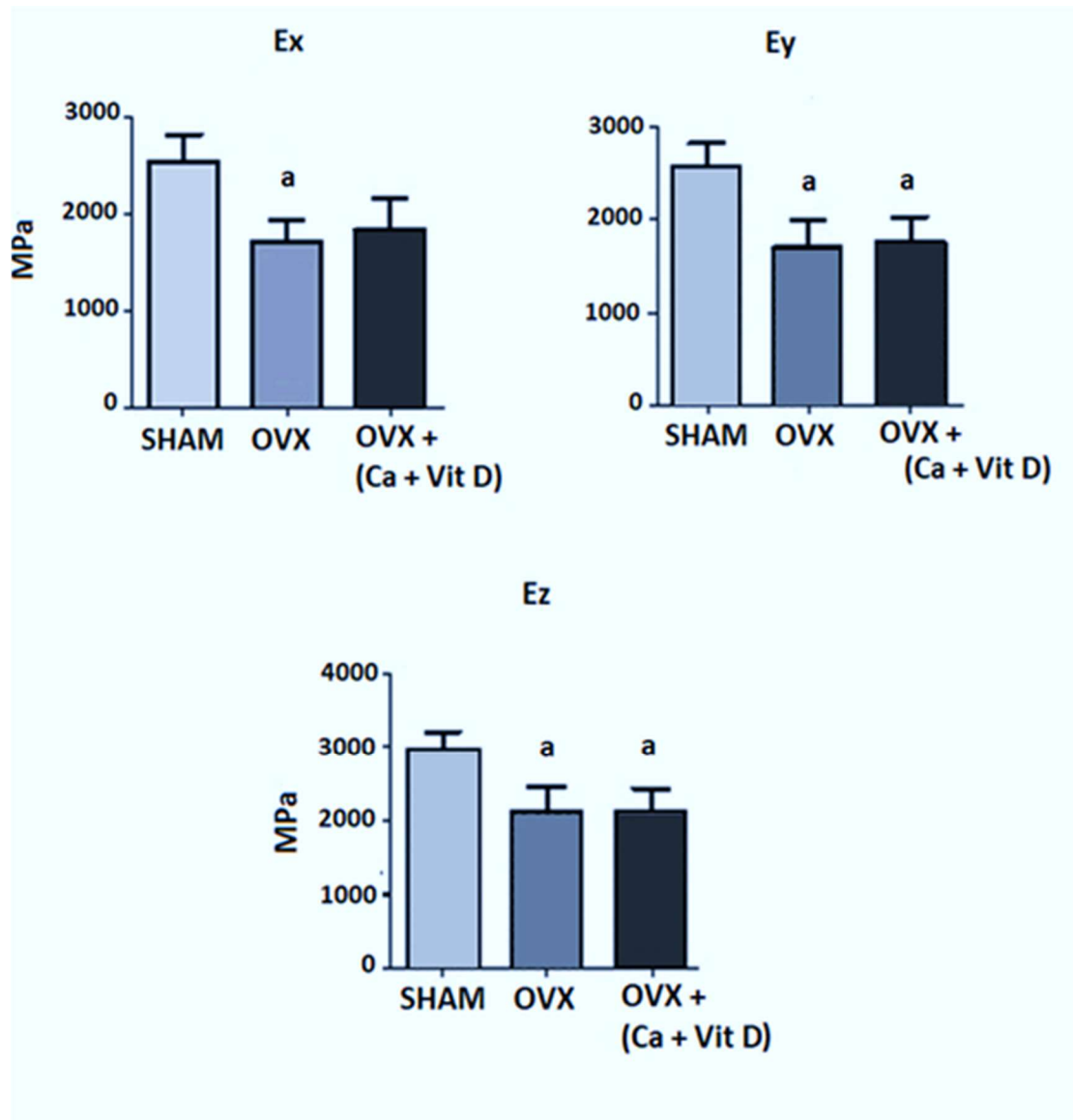


Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+(Ca + Vit D), ratas ovariectomizadas tratadas con 25 mg/kg/día de Natecal D Flash® con sonda oral durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con la letra a (a vs grupo SHAM). **D2D:** OVX vs. SHAM $p < 0.05$; OVX+(Ca + Vit D) vs SHAM $p < 0.05$. **D3D:** OVX+(Ca + Vit D) vs SHAM $p < 0.05$.

VI.2.4 BIOMECÁNICA ÓSEA.

El módulo elástico aparente de los fémures en las tres direcciones del espacio Ex, Ey y Ez sufrió un descenso significativo en las ratas OVX en comparación con las ratas SHAM. Las ratas ovariectomizadas tratadas con Natecal D Flash® no presentaron diferencias significativas en comparación con el grupo OVX (**Figura 41**).

Figura 41: Módulo elástico en las tres direcciones del espacio (Ex, Ey, Ez).

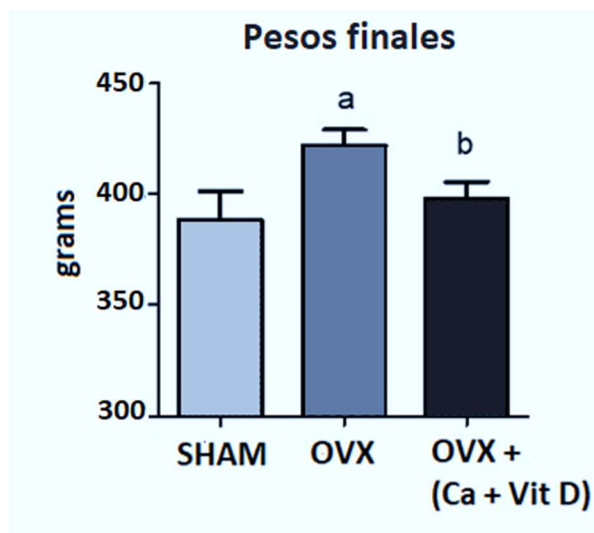


Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+(Ca + Vit D), ratas ovariectomizadas tratadas con 25 mg/kg/día de Natecal D Flash® con sonda oral durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con la letra a (a vs grupo SHAM). **Ex:** OVX vs. SHAM $p < 0.01$. **Ey:** OVX vs. SHAM $p < 0.01$; OVX+(Ca + Vit D) vs SHAM $p < 0.01$. **Ez:** OVX vs. SHAM $p < 0.01$; OVX+(Ca + Vit D) vs SHAM $p < 0.01$.

VI.2.5 EVOLUCIÓN DEL PESO.

Analizando los pesos de las ratas, al final del experimento, el grupo SHAM pesaba 385 ± 15 g, el grupo OVX 425 ± 10 g y el grupo tratado con calcio + vitamina D 400 ± 10 g. Como era de esperar, la ovariectomía hizo ganar peso a las ratas y el tratamiento con *Natecal D Flash*[®] amortiguó dicha ganancia (**Figura 42**).

Figura 42: Pesos finales de las ratas.



Ratas Wistar hembra de 6 meses de edad fueron divididas en tres grupos: SHAM, ratas utilizadas como control simulando la ovariectomía; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+(Ca + Vit D), ratas ovariectomizadas tratadas con 25 mg/kg/día de *Natecal D Flash*[®] con sonda oral durante 8 meses. Las diferencias significativas entre los distintos grupos se expresan con con las letras a y b según el grupo con el que se comparen (a vs grupo SHAM, b vs grupo OVX). **Pesos finales:** OVX vs. SHAM $p < 0.01$; OVX +BZD vs. OVX $p < 0.05$.



VII.1 ACCIÓN DEL BAZEDOXIFENO.

El bazedoxifeno es un SERM que, utilizado durante al menos 5 años, produce una disminución en la aparición de nuevas fracturas vertebrales y un descenso en fracturas no vertebrales en mujeres con alto riesgo. Su perfil de seguridad y el hecho de que no incrementa el riesgo de cáncer de mama y reduzca la incidencia de cáncer de endometrio lo convierte en un fármaco de primera elección en el tratamiento de la osteoporosis [98]. Su capacidad de actuar como agonista o antagonista estrogénico según el tejido donde ejerza su acción nos resultó interesante para estudiarlo.

A continuación, vamos a analizar los resultados obtenidos en nuestras ratas ovariectomizadas tras 8 meses de tratamiento con bazedoxifeno.

Analizando los **marcadores bioquímicos de remodelado óseo**, nuestros resultados muestran un descenso en los niveles de BGP y PINP tras el tratamiento con bazedoxifeno, aunque sin cambios en el CTX. Los marcadores de formación ósea vuelven a los niveles previos a la ovariectomía. Coincidiendo con nuestros resultados, Bueno y cols. [99] observaron en un estudio realizado en 7492 pacientes latinas postmenopáusicas, afectadas de osteoporosis, que el bazedoxifeno redujo el remodelado óseo y las fracturas óseas. Al respecto, es importante señalar que no solo la densidad mineral ósea, sino que también el aumento de remodelado óseo está asociado a un incremento en el riesgo de fracturas osteoporóticas en mujeres postmenopáusicas [100] y que los cambios a corto plazo en los marcadores de remodelado óseo pueden predecir la respuesta a los dos años en la densidad mineral ósea en aquellas mujeres tratadas con terapia hormonal sustitutiva [101].

Con respecto a la **microarquitectura ósea**, los parámetros estudiados por micro-CT muestran resultados positivos del tratamiento con bazedoxifeno sobre los parámetros trabeculares BV/TV, BS/TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N, Tb.Pf, SMI, DA y Md.V y sobre el cortical Ct.BS/BV, aunque no en todos los casos se recuperan los valores basales de las ratas control, pero sí mejoran con respecto a las ovariectomizadas.

Saito y cols. [102] estudiaron monos adultos hembras ovariectomizadas a las que se suministró 0.2 o 0.5 mg/kg de bazedoxifeno durante 18 meses. Los parámetros BV/TV, y Tb.Th fueron mayores en el grupo tratado con bazedoxifeno que en el ovariectomizado y, al contrario, el SMI y Tb.Pf fueron menores en el grupo tratado con bazedoxifeno que en el grupo ovariectomizado. En conclusión, demostraron que el tratamiento con bazedoxifeno previno los efectos negativos de la ovariectomía en propiedades estructurales como el BV/TV, Tb.Th y Tb.Pf que contribuyen significativamente a la fuerza ósea del tejido trabecular.

En cuanto a la **biomecánica** del hueso no encontramos diferencias significativas entre las ratas ovariectomizadas no tratadas y aquellas a las que se les administró bazedoxifeno. Por tanto, dicho fármaco no produjo ningún efecto beneficioso en la biomecánica ósea.

Respecto al **peso**, el bazedoxifeno mitigó el aumento que sufrieron las ratas ovariectomizadas pero no consiguió reducirlo al peso inicial que tenían las ratas control.

De acuerdo con los resultados de nuestro experimento, el tratamiento con bazedoxifeno recuperó parcialmente la **densidad ósea** lumbar, pero no la femoral. Coincidiendo con nuestros resultados, Barrionuevo y cols. [103] realizaron un estudio incluyendo 107 ensayos clínicos en los que se podía concluir que existía una reducción significativa de las **fracturas vertebrales** con el bazedoxifeno. Del mismo modo, Jin y cols. [104] estudiando 41 artículos de ensayos clínicos realizados entre junio de 2015 y junio de 2019 observaron que el bazedoxifeno previene las fracturas vertebrales secundarias a osteoporosis. Peng y cols. [105] realizando una revisión sistemática de estudios desarrollados durante 3 y 7 años y Palacios y cols. [106] en un estudio realizado durante 7 años, observaron que la incidencia de nuevas fracturas vertebrales fue menor dentro de las mujeres postmenopáusicas con osteoporosis tratadas con bazedoxifeno que en el grupo placebo.

La mayoría de los estudios sobre los efectos del bazedoxifeno lo hacen sobre las fracturas vertebrales, como los que hemos comentado anteriormente [104-106]. Algunos autores como Reginster y cols. [107] confirman que el bazedoxifeno es también capaz de reducir el riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales en mujeres con alto riesgo de

padecer osteoporosis. Autores como Yavropoulou y cols. [60] observaron tras el tratamiento con bazedoxifeno un aumento de la DMO lumbar pero no de la DMO de cadera, pero al igual que Reginster [107] sí observaron una disminución del riesgo de fracturas no vertebrales en el caso de mujeres postmenopáusicas de alto riesgo.

Con respecto al efecto comparativo ejercido por el bazedoxifeno y otros fármacos, en un metanálisis realizado sobre 48.200 pacientes, Liu y cols. [108] observaron que el alendronato y risendronato ejercían un efecto positivo mayor que el bazedoxifeno sobre la osteoporosis, pero que el bazedoxifeno era la opción más segura presentando menos efectos adversos. Gatti y cols. [109] afirman que el bazedoxifeno es tan efectivo como el raloxifeno en prevenir la pérdida ósea en mujeres con riesgo de osteoporosis y en reducir la incidencia de nuevas fracturas vertebrales en aquellas mujeres que ya padecen la enfermedad. Otros autores como Ellis y cols. [110] consideran que el bazedoxifeno es comparable a los bifosfonatos para prevenir las fracturas vertebrales entre las mujeres con alto riesgo de padecer osteoporosis postmenopáusica.

En un trabajo realizado por nuestro grupo [111] administramos ácido zoledrónico a ratas ovariectomizadas y conseguimos efectos muy superiores de aumento de la DMO lumbar y femoral sobre las ratas no tratadas que en el caso del bazedoxifeno. Autores como Yavropoulou y cols. [60] afirman que el bazedoxifeno no parece ofrecer ventajas significativas sobre otros agentes anti-resortivos, pero considerando la necesidad de tratamientos de larga duración para la osteoporosis, es un fármaco que tiene un puesto en el esquema terapéutico a largo plazo para combatir esta enfermedad. Autores como Gatti y cols. [109] sugieren que debido a su particular perfil el bazedoxifeno se puede considerar como una terapia de segunda línea para mujeres entre 65 y 70 años donde los bifosfonatos estén contraindicados o sean mal tolerados. Estos autores piensan que el bazedoxifeno puede también tener su puesto como terapia en primer lugar en mujeres postmenopáusicas más jóvenes para el manejo de su menopausia y la prevención de la osteoporosis y que se podría prescribir sólo o con estrógenos conjugados.

VII.2 ACCIÓN DEL CALCIO + VITAMINA D.

La suplementación con calcio y vitamina D ha sido ampliamente recomendada para prevenir la osteoporosis y las fracturas óseas derivadas de dicha enfermedad [112]. Sin embargo, existe una gran controversia acerca de su eficacia. Existen un gran número de trabajos acerca de los efectos del calcio y la vitamina D en pacientes con osteoporosis, pero resulta difícil encontrar una población homogénea para realizar dichos estudios. Esta ha sido nuestra razón para realizar un estudio con ratas ovariectomizadas que, como comentamos anteriormente, constituyen un modelo animal de referencia en el estudio de la osteoporosis postmenopáusica [80].

Analizando nuestros resultados podemos observar como la ovariectomía disminuyó la densidad ósea lumbar y femoral, redujo el número de trabéculas y aumentó la separación entre ellas. En cuanto a la biomecánica ósea, la ovariectomía disminuyó la dimensión fractal en dos dimensiones (D2D) y el módulo elástico en las tres direcciones del espacio (Ex, Ey, Ez). Se observó un incremento del remodelado óseo, aumentado los parámetros BGP y CTX/TRAP, sin cambios en PINP. Aunque los niveles de PINP no sufrieran cambios, no podemos descartar un aumento en sus niveles en el transcurso de los 8 meses de tratamiento. Los resultados de nuestro estudio muestran como el tratamiento con calcio y vitamina D a largo plazo no produjo ningún cambio en cuanto a la densidad mineral ósea, microarquitectura ósea, marcadores bioquímicos de remodelado óseo y biomecánica de las ratas ovariectomizadas. Es importante destacar, que estos resultados se analizaron al final del tratamiento, por lo que no podemos asegurar que se produjeran cambios en estadios más tempranos.

Existen estudios que apoyan el uso de calcio y vitamina D para prevenir el riesgo de fracturas en la osteoporosis. Weaver et al. [113] realizaron un metanálisis de ensayos clínicos aleatorizados para ver la asociación entre la suplementación de calcio y vitamina D y la prevención de fracturas óseas en adultos. El estudio mostró que la suplementación con calcio y vitamina D reducía un 15% el riesgo total de fracturas óseas y un 30% el riesgo de fracturas

de cadera. Este metanálisis apoya el uso de suplementos de calcio y vitamina D como intervención para reducir el riesgo de fracturas en adultos de mediana edad y ancianos.

Pascalis et al. [114] realizaron un estudio para analizar la calidad ósea en pacientes que recibían durante largos periodos suplementación de vitamina D (400-1200 UI) y calcio (1-1.5g) en comparación con los que no la tomaban. Observaron que la porción mineral frente a la cantidad de colágeno del hueso y el contenido de glicosaminoglicano fueron mayores mientras que la porosidad, la madurez mineral, cristalinidad y el contenido en piridolina del hueso fueron menores en pacientes que tomaron suplementación de calcio y vitamina D durante largos periodos. Por tanto, los autores concluyeron que dicho tratamiento estaba asociado con alteraciones tanto de la matriz mineral del hueso como de la matriz orgánica.

Aloia et al. [115] desarrollaron un estudio para evaluar la influencia de la suplementación con calcio y vitamina D sobre la PTH y el remodelado óseo. 159 mujeres postmenopáusicas sanas participaron en el estudio longitudinal doble ciego que tuvo una duración de 6 meses. Las pacientes se dividieron aleatoriamente en 4 grupos: 1) doble placebo, 2) calcio (1200 mg diarios) más placebo, 3) vitamina D3 (100µg) más placebo y 4) vitamina D3 y calcio. Se observó como la PTH disminuía rápidamente con el aporte de vitamina D3 y también disminuía con la suplementación de calcio. La suplementación diaria con 1200 mg de calcio reducía los marcadores de remodelado óseo mientras que el aporte de cantidades inferiores a 100 µg de vitamina D3 no lo hacía.

Avenell et al. [116] revisaron 53 ensayos con un total de 91791 pacientes para determinar los efectos de la vitamina D con o sin calcio para prevenir las fracturas óseas en mujeres postmenopáusicas y hombres mayores. Hay evidencia de que la vitamina D sola en las dosis comercializadas es poco probable que sea efectiva previniendo fracturas de cadera. La evidencia también sugiere que la vitamina D más calcio disminuyen ligeramente el riesgo de fracturas de cadera y disminuyen significativamente el riesgo de fracturas no vertebrales, sin presentar ningún efecto, en las fracturas vertebrales. Se observó también un pequeño aumento de síntomas gastrointestinales y enfermedades renales asociadas a la ingesta de vitamina D y calcio, pero sin aumento de la mortalidad.

Es importante destacar que varios estudios que han investigado los efectos combinados de la suplementación con calcio y vitamina D en mujeres postmenopáusicas han mostrado una disminución en el riesgo de fracturas óseas, teniendo en cuenta siempre que la adherencia al tratamiento es esencial para obtener resultados eficaces. Lips et al. [117] revisaron 19 ensayos clínicos aleatorizados de vitamina D administrada con o sin calcio. Observaron que un suplemento de 800 UI de vitamina D combinada con calcio disminuía la incidencia de fracturas no vertebrales, especialmente en ancianos con bajos niveles de vitamina D y bajo aporte de calcio que tuvieron buen cumplimiento del tratamiento. Sin embargo, no hubo mejoría en cuanto a la incidencia de fracturas vertebrales. Boonen et al. [118] llevaron a cabo un estudio con mujeres postmenopáusicas y hombres mayores de 50 años con riesgo de fractura de cadera. Estudiaron 9083 pacientes que tomaban solo vitamina D y 45509 tratados con calcio y vitamina D. Sus resultados sugirieron que la ingesta de vitamina D reduce el riesgo de tener fractura de cadera únicamente cuando se realiza combinada con calcio. La Women's Health Initiative (WHI) llevó a cabo un ensayo clínico doble ciego con 36282 mujeres postmenopáusicas que vivían en EE.UU. El ensayo tuvo una duración de 7 años. Aleatoriamente se dividió a las mujeres, administrando al primer grupo 1000 mg de carbonato de calcio más 400 UI de vitamina D3 diariamente y al otro grupo se les administró placebo. Los resultados determinaron que el uso a largo plazo de vitamina D y calcio reducía significativamente el riesgo de fractura de cadera entre las mujeres postmenopáusicas [119].

Sin embargo, otros estudios revelan que el suplemento con calcio y vitamina D no supone ninguna reducción en el número de fracturas óseas. Michaelson et al. [120] estudiaron a una población de 60689 mujeres con edades comprendidas entre los 40 y 74 años durante un periodo de 4 años. Durante el seguimiento se observó que 3986 mujeres presentaron algún tipo de fractura y 1535 presentaron fractura de cadera. No se encontró una asociación dosis-respuesta entre la ingesta diaria de calcio y el riesgo de fractura. Las mujeres que tenían una ingesta diaria de calcio inferior a 400 mg/diarios, las que tomaban una ingesta intermedia y las que ingerían dosis diarias superiores a 1200 mg de calcio diarios tuvieron un riesgo de padecer fractura de cadera ajustado a su edad. De igual modo, la ingesta de vitamina D no tuvo ninguna asociación con el riesgo de fracturas. Grant et al. [121] estudiaron una población de 5292 personas de 70 años o mayores con buena movilidad a los que dividieron

aleatoriamente en 4 grupos: a) se les administró 800 UI diarias de vitamina D3, b) se les administró 1000 mg de calcio, c) se les administró 800 UI de vitamina D3 combinadas con 1000 mg de calcio y d) se les administró un placebo. El seguimiento se realizó durante un periodo entre 24 y 62 meses. No se encontraron diferencias entre los distintos grupos en la incidencia de nuevas fracturas de cadera.

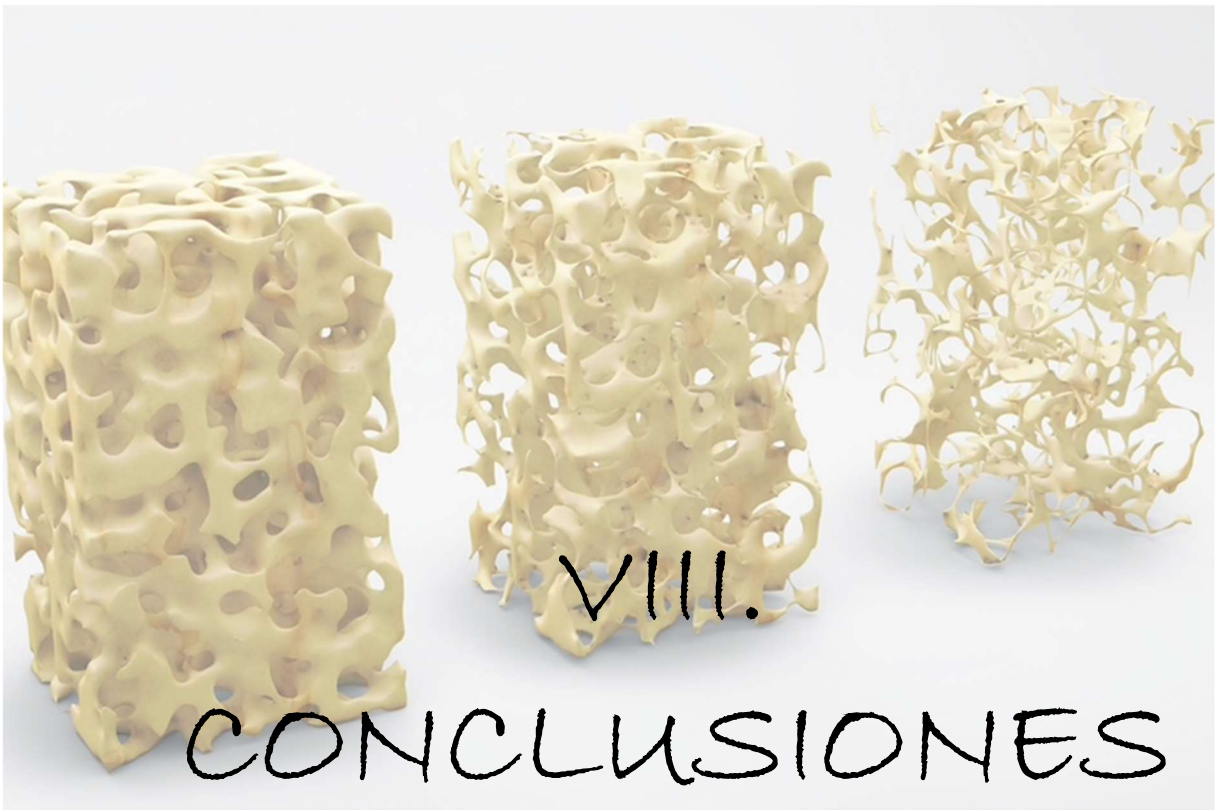
Kahwati et al. [122] recientemente llevaron a cabo una costosa revisión que incluyó a 47676 pacientes para estudiar los posibles beneficios y efectos adversos de la suplementación con calcio, vitamina D y calcio más vitamina D en la prevención de fracturas óseas primarias en población adulta. Los autores observaron que la suplementación con calcio y vitamina D durante un periodo de 3 y 7 años no tenía un efecto significativo en la incidencia del número total de fracturas óseas.

Es importante destacar la influencia que puede tener la suplementación con calcio y vitamina D en el desarrollo de otras enfermedades. Cesareo et al. [123] concluyeron que no se puede asegurar que los suplementos de calcio más vitamina D no generen efectos cardiovasculares o estén relacionados con un incremento del riesgo cardiovascular. Sin embargo, otros autores como Kahwati et al [122], Kopecky [124] et al. y Prentice [119] manifestaron que la combinación de calcio y vitamina D no aumentaba la mortalidad por eventos cardiovasculares. Kahwati et al. [122] y Avenell et al. [116] observaron que la combinación de calcio y vitamina D está asociada con un aumento de la incidencia de piedras en el riñón. Grant et al. [121] no observaron diferencias entre los distintos grupos en cuanto a la mortalidad, número de caídas o calidad de vida de los pacientes.

En resumen, hay dos corrientes de opinión opuestas en cuanto a la suplementación con calcio y vitamina D, una de ellas apoyando que se prescriba dicha suplementación a las mujeres osteoporóticas o a aquellas con riesgo de padecer osteoporosis y, la opinión contraria, de que la suplementación oral con calcio y vitamina D no tiene utilidad para prevenir las fracturas en la osteoporosis. En nuestro trabajo, no hemos encontrado ningún efecto positivo de la suplementación con calcio y vitamina D sobre la densidad mineral ósea, microarquitectura ósea, marcadores bioquímicos de remodelado óseo o biomecánica en las

ratas ovariectomizadas. Teniendo en cuenta trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación, las ratas estaban osteopénicas desde al menos 3 meses después de la ovariectomía [125]. El único efecto positivo que observamos fue que el tratamiento con calcio y vitamina D evitó el aumento de peso que provoca la ovariectomía en las ratas, pero no tenemos explicación para ello.

De acuerdo con nuestros resultados, los suplementos calcio y vitamina D no tienen ningún efecto beneficioso en la calidad ósea de las ratas ovariectomizadas. Por esta razón, no podemos apoyar que el tratamiento con calcio y vitamina D sea necesario en todos los pacientes con osteoporosis. Sin embargo, el tratamiento con vitamina D será necesario en aquellos pacientes tanto osteoporóticos como no, que tienen niveles de vitamina D inferiores a 24 ng/mL [126, 127] para prevenir un hiperparatiroidismo secundario, así como, una revisión de las ingestas de calcio de la población general para asegurar un correcto aporte de calcio que ayude a prevenir enfermedades cardiovasculares y ayude a una buena calidad ósea.

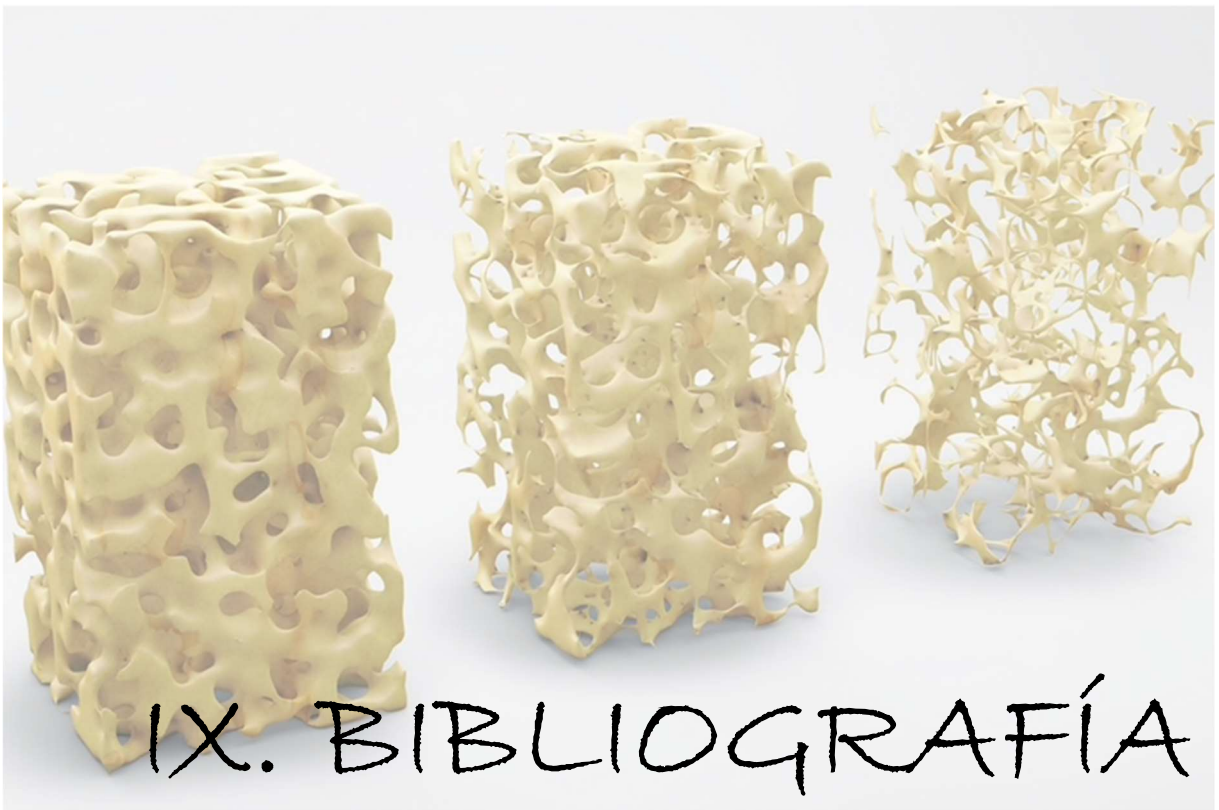


De los resultados obtenidos se puede deducir las siguientes conclusiones:

- La ovariectomía produjo severos trastornos sobre la calidad ósea en ratas, disminuyendo la densidad mineral ósea, incrementando el remodelado óseo, alterando de forma negativa los parámetros microestructurales óseos y los parámetros biomecánicos, así como, aumentando el peso de las ratas.
- Tras el tratamiento a largo plazo con bazedoxifeno, la **densidad mineral ósea** lumbar se recuperó parcialmente, sin efectos sobre la mineralización del fémur. Los suplementos de Calcio más Vitamina D no afectaron a la densidad mineral ósea lumbar ni femoral de las ratas ovariectomizadas.
- En cuanto al **remodelado óseo**, el bazedoxifeno recuperó los niveles de los marcadores de formación sin cambios en los marcadores de resorción. Por el contrario, los suplementos de Calcio más Vitamina D no tuvieron ningún efecto positivo sobre el aumento de remodelado óseo en las ratas ovariectomizadas.
- En cuanto a la **microestructura ósea**, el Bazedoxifeno recuperó la fracción volumétrica ósea (BV/TV), la densidad de superficie ósea (BS/TV), el aumento en la separación trabecular (Tb.Sp), la disminución en el número de trabéculas (Tb.N) y el aumento del factor de patrón trabecular Tb.Pf y el SMI. La superficie relativa cortical, aumentada tras la ovariectomía, se normalizó con Bazedoxifeno. El tratamiento con Calcio más Vitamina D no produjo ningún cambio sobre la microarquitectura ósea de las ratas ovariectomizadas.
- Con respecto a las **propiedades biomecánicas**, el Bazedoxifeno recuperó la deformación máxima antes de la rotura producida por la ovariectomía, pero los suplementos con Calcio y Vitamina D no tuvieron ningún efecto.
- En referencia a la ganancia de **peso** de las ratas ovariectomizadas, tanto el Bazedoxifeno como los suplementos de Calcio más Vitamina D amortiguaron dicha ganancia.

Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos, se observa que el tratamiento a largo plazo con Bazedoxifeno, a las dosis empleadas en este trabajo, tuvo un efecto positivo sobre la calidad ósea de nuestro grupo experimental de ratas, revirtiendo en gran parte las alteraciones que produjo la ovariectomía sobre dicha calidad.

Sin embargo, el tratamiento a largo plazo con suplementos de Calcio más Vitamina D no fue capaz de recuperar la calidad ósea de las ratas previa a la cirugía. La única mejoría que presentó este tratamiento fue la ausencia de ganancia de peso en las ratas ovariectomizadas.



IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Dempster, D.W. (2006). Anatomy and functions of the adult skeleton. In: M.J. Favus (Ed.), *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, American Society for Bone and Mineral Research (6th ed., pp. 7-11). Lippincott Williams and Wilkins.
2. Kini, U., Nandeehs, B.N. (2012). Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In: Fogelman (Ed.), *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging* (pp. 29-57). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
3. Fradinger, E. (2001). Composición ósea. En: J.R. Zanchetta y J.R. Talbot (Eds.), *Osteoporosis: fisiopatología, diagnóstico, prevención y tratamiento* (pp. 17-22). Editorial Médica Panamericana.
4. Ducy, P., Desbois ,C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A., Karsenty, G. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382, 448-52.
5. Viladot Voegeli, A., Lorenzo Roldán, J.C. (2001). Biomecánica del hueso. En: A. Viladot Voegeli (Ed.), *Lecciones básicas de biomecánica del aparato locomotor* (pp. 41-52). Springer-Verlag Ibérica.
6. Theill, L.E., Boyle, W.J., Penninger, J.M. (2002). RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annual Review of Immunology*, 20, 795-823.
7. Hadjidakis, D., Androulakis, I. (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092, 385-96.
8. Feng, X., McDonald, J.M. (2011). Disorders of Bone Remodeling. *Annual Review of Pathology*, 6, 121–145.
9. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Alobera Gracia, M.A., Del Canto Pingarrón, M., Blanco Jerez, L. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 11,151-157.

10. Canalis, E. (1993). Systemic and local factors and the maintenance of bone quality. *Calcified Tissue International*, 53 (Suppl 1), S90-S92.
11. Kenkre, J.S., Bassett, J.H.D. (2018). The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry*, 55, 308-27.
12. Lean, J.B., Jagger, C.J., Chambers, T.J. (1995). Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *American Journal of Physiology*, 268, 318-27.
13. Neyro Bilbao, J.L., Cano Sánchez, A., Palacios Gil-Antuñano, S. (2011). Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 3, 105-12.
14. Lian, J.B., Stein, G.S., Canalis, E. (1999). Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins and mineralization process. In: M.J. Favus (Ed.), *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* (pp. 14-29). Lippincott Williams and Wilkins.
15. Boyce, B.F., Xing, L. (2007). Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. *Arthritis Research and Therapy*, 9 (Suppl 1), S1.
16. Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M. J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93, 165-176.
17. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 3597-3602.
18. Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390, 175-9.

19. Wong, B.R., Rho, J., Arron. (1997). TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 25190- 94.
20. Quinn, J.M., Elliott, J., Gillespie, M.T. (1998). A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology*, 139, 4424-27.
21. Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R. (2000). The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *The Journal of Bone and Mineral Research*, 15, 2-12.
22. Gundberg, C.M. (1998). Biology, Physiology and Clinical Chemistry of Osteocalcin. *Journal of Clinical Ligand Assay*, 21, 128-38.
23. Díaz Diego E.M., Nácher, M., Rapado, A., Serrano, S., Bosch, J., Aubia, J., de la Piedra, C. (1998). Immunoreactive osteocalcin forms in conditioned media from human osteoblast culture and in sera from healthy adult control subjects and patients with bone pathologies. *European Journal of Clinical Investigation*, 28, 45-58.
24. Díaz Diego, E.M., Guerrero, R., De la Piedra, C. (1994) Six osteocalcin assays compared. *Clinical Chemistry*, 40, 2071-2077.
25. Melkko, J., Niemi, S., Risteli, L., Risteli, J. (1990) Radioimmunoassay for the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen (PICP). *Clinical Chemistry*, 36, 1328-32.
26. Domínguez, C., Sosa, M., Traba, M.L., Alvarez, E., De la Piedra, C. (1998) Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis International*, 8, 147-51.
27. Halleen, J.M., Alatalo, S.L., Suominen, H., Cheng, S., Janckila, A.J., Väänänen, H.K. (2000). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: A novel serum marker of bone resorption. *The Journal of Bone and Mineral Research*, 15, 1337-1345.

28. Fledelius, C., Johnson, A.H., Cloos, P.A.C., Bonde, M., Qvist, P. (1997). Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 9755-9763.
29. Consensus Development Conference. (1993). Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *The American Journal of Medicine*, 94, 646-50.
30. Kanis, J.A. (1996). Osteoporosis y sus consecuencias. En J.A. Kanis (Ed.), Osteoporosis (pp. 1-25). Blackwell Science Ltd.
31. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. (2001). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA International Medicine*, 285, 785-795.
32. Sosa Henríquez, M., Gómez Díaz, J. (2010). La osteoporosis. Definición. Importancia. Fisiopatología y Clínica. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 2 (Supl 5), S3-7.
33. Castel, H., Bonneh, D.Y., Sherf M., Liel, Y. (2001). Awareness of osteoporosis and compliance with management guidelines in patients with newly diagnosed low-impact fractures. *Osteoporosis International*, 12, 559-64.
34. Del Pino Montes, J. (2010). Osteoporosis: Concepto e importancia. Cuadro clínico. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 2 (Supl 4), S15-S20.
35. Adachi, J.D., Adami, S., Gehlbach, S., Anderson, F.A., Boonen S., Chapurlat, R.D. (2010). Impact of Prevalent Fractures on Quality of Life: Baseline Results from the Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women. *Mayo Clinic Proceedings*, 85, 806-13.
36. Cizza, G., Primma, S., Coyle, M., Gourgiotis, L., Csako, G. (2010). Depression and osteoporosis: a research synthesis with meta-analysis. *Hormone and Metabolic Research*, 42, 467-82.
37. Kanis, J.A., Johnell, O., De Laet, C., Johansson, H., Oden, A., Delmas, P. (2004). A meta-analysis of previous fracture and subsequent fracture risk. *Bone*, 35, 375-82.

38. Melton, L.J., Atkinson, E.J., Cooper, C., O'Fallon, W.M., Riggs, B.L. (1999). Vertebral fractures predict subsequent fractures. *Osteoporosis International*, 10, 214-21.
39. Ismail, A.A., Cockerill W., Cooper, C., Finn J.D., Abendroth, K., Parisi, G. (2001). Prevalent vertebral deformity predicts incident hip though not distal forearm fracture: results from the European Prospective Osteoporosis Study. *Osteoporosis International*, 12, 85-90.
40. O'Neill, T.W., Felsenberg, D., Varlow, J., Cooper, C., Kanis, J.A., Silman, A.J. (1996). The prevalence of vertebral deformity in European men and women: the European Vertebral Osteoporosis Study. *The Journal of Bone and Mineral Research*, 11, 1010-8.
41. Sosa Henríquez, M., Segarra Sánchez, M., Liminana Canal, J., Hernández Hernández, D., González Pacheco, A., Betancor León, P. (1993). Morbilidad y mortalidad de la fractura osteoporótica de la extremidad proximal del fémur tras un año de seguimiento. *Medicina Clínica*, 101, 481-3.
42. Tarantino, U., Cannata, G., Lecce D, Celi, M., Cerocchi, I., Iundusi, R. (2007). Incidence of fragility fractures. *Aging Clinical and Experimental Research*, 19 (Suppl 4), S7-11.
43. Seeman E. (2002). Pathogenesis of bone fragility in women and men. *The Lancet*, 359, 1841-50.
44. Compston, J. (2009). Clinical and therapeutic aspects of osteoporosis. *European Journal of Radiology*, 71, 388-91.
45. Sosa Henríquez, M., Díaz Curiel, M. (2010). Prevalencia de fracturas vertebrales en pacientes que acuden a la consulta externa de Medicina Interna. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 2, 9-13.
46. Sosa Henríquez, M. (2005). Osteoporosis: el dilema de su definición. *Medicina Clínica*, 124, 259-60.
47. Johnell, O., Kanis, J. (2005). Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporosis International*, 16 (Suppl 2), S3-S7.

-
48. Siris, E.S., Adler, R., Bilezikian, J., Bolognese, M., Dawson-Hughes, B., Favus, M.J. (2014). The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the National Bone Health Alliance Working Group. *Osteoporosis International*, 25, 1439-43.
49. Hermoso de Mendoza, M.T. (2003). Clasificación de la osteoporosis: Factores de riesgo. Clínica y diagnóstico diferencial. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26 (Supl.3), S29-52.
50. Stephen, M., Krane, M., Holick, F. (1998). Enfermedad ósea metabólica. Osteoporosis. *Principios de Medicina Interna. Harrison* (14ª Ed, c355, pp. 2557-70.). McGraw-Hill-interamericana.
51. García Hernández, P.A. (2008). Patogénesis de la osteoporosis. En: E. Barreira Mercado y F. Cons Molina (Eds.), *Avances en Osteoporosis*. Asociación Mexicana de Metabolismo Óseo y Mineral (pp. 47-52). Grupo Editorial M & M.
52. Carbonell Abella, C., Martín Jiménez, J.A., Valdés, C. (2008). Atención primaria de calidad. Guía de buena práctica clínica en osteoporosis.
https://www.cgcom.es/sites/default/files/guia_osteoporosis_edicion2.pdf.
53. Blanch, C., Jodar, E., Sosa, M. (2003) ¿Cómo tratar la osteoporosis? Guía de fácil manejo. Salud de la mujer.
<https://www.fesemi.org/sites/default/files/documentos/publicaciones/guia-osteoporosis.pdf>.
54. Sosa Henríquez, M., Gómez de Tejada Romero, M.J. (2018). Tratamiento de la osteoporosis. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 10 (Supl 1), S13-17.
55. Riggs, L., Hartmann, L.C. (2003). Selective estrogen receptor modulators. Mechanisms of action and application to clinical practice. *The New England Journal of Medicine*, 348, 618-29.
56. Ki-Chan, A. (2016) Selective estrogen receptor modulators. *Asian Spine Journal*, 10, 787-791.

-
57. Martín, F., Barbancho, M.C. (2006). Clinical pharmacology of selective estrogen receptor modulators (SERMs). In: A. Cano, J. Calaf & J.L. Dueñas (Eds.), *Selective estrogen receptor modulators. A new brand of multi target drugs* (pp. 49-65). New York: Springer.
 58. Stump, A.I., Kelley, K.W., Wensel, T.M. (2007). Bazedoxifene, a third-generation selective estrogen modulator for treatment of postmenopausal osteoporosis. *Annals of Pharmacotherapy*, 41, 833-39.
 59. Pinkerton, J.V., Conner, E.A. (2019). Beyond estrogen: advances in tissue selective estrogen complexes and selective estrogen receptor modulators. *Climacteric*, 22, 140-7.
 60. Yavropoulou, M.P., Makras, P., Anastasilakis, A.D. (2019). Bazedoxifene for the treatment of osteoporosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20, 1201-10.
 61. McKeand, W. (2017). Pharmacokinetics, dose proportionality and bioavailability of bazedoxifene in healthy postmenopausal women. *Clinical Therapeutics*, 39, 1769-79.
 62. Sanchez Borrego, R., Lugo Salcedo, F. (2010). Bazedoxifeno. Primer SERM de 3ª generación. Seguridad endometrial y en mama. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 2 (Supl 5), S13-S18.
 63. Pinkerton, J.V. (2018). Tissue-selective estrogen complex for menopausal hormone therapy. *Clinical Obstetrics & Gynecology*, 61, 463-69.
 64. Flores, V.A., Stachenfeld, N.S., Taylor, H.S. (2018). Bazedoxifene-conjugated estrogens for treating endometriosis. *Obstetrics & Gynecology*, 132, 475-77.
 65. Sosa Henríquez, M., Cancelo Hidalgo, M.J. (2012). Papel del bazedoxifeno en el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 4 (Supl 1), S23-7.
 66. Palacios Gil-Antuñano, S. (2010). Eficacia del bazedoxifeno, terapia secuencial de la osteoporosis pre-bifosfonato y perfil del paciente de bazedoxifeno. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 2 (Supl 5), S19-S25.
 67. Naranjo Hernandez, A., Diaz del Campo Fontecha, P., Aguado Acín, P., Arboleya

- Rodríguez, L., Casado Burgos, E., Castañeda, S. (2019). Recomendaciones de la Sociedad Española de Reumatología sobre osteoporosis. *Reumatología Clínica*, 15, 188–210.
68. Sosa Henríquez, M., Gómez de Tejada Romero, M.J. (2018). Tratamiento de la osteoporosis. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 10 (Supl 1), S13-17.
69. Harvey, N.C., Biver, E., Kaufman, J.M., Bauer, J., Branco, J., Brandi, M.L. (2017). The role of calcium supplementation in healthy musculoskeletal ageing: An expert consensus meeting of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO) and the International Foundation for Osteoporosis (IOF). *Osteoporosis International*, 28, 447-62.
70. Moyer, V.A. (2013). Vitamin D and calcium supplementation to prevent fractures in adults: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Annals of Internal Medicine*, 158, 691-96.
71. Avenell, A., Mak, J.C., O'Connell, D. (2014). Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
72. Weaver, C.M., Alexander, D.D., Boushey, C.J., Dawson-Hughes, B., Lappe, J.M., LeBoff, M.S. (2016). Calcium plus vitamin D supplementation and risk of fractures: An updated meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation. *Osteoporosis International*, 27, 367-76.
73. Michael, Y.L., Whitlock, E.P., Lin, J.S., Fu, R., O'Connor, E.A., Gold, R. (2010). Primary care-relevant interventions to prevent falling in older adults: A systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine*, 153, 815-25.
74. Gillespie, L.D., Robertson, M.C., Gillespie, W.J., Lamb, S.E., Gates, S., Cumming, R.G. (2009). Interventions for preventing falls in older people living in the community. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

-
75. Uusi-Rasi, K., Patil, R., Karinkanta, S., Kannus, P., Tokola, K., Lamberg-Allardt, C. (2015). Exercise and vitamin D in fall prevention among older women: A randomized clinical trial. *JAMA International Medicine*, 175, 703-11.
 76. Yamazaki, I., Yamaguchi, H. (1989). Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. *The Journal of Bone and Mineral Research*, 4, 13-22.
 77. Food and Drug Administration, Division of Metabolism and Endocrine Drugs Products. (1994). Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis in women.
 78. World Health Organization. (1998). Guidelines for preclinical evaluation and clinical trials in osteoporosis.
 79. Turner, A.S. (2001). Animal models of osteoporosis- necessity and limitations. *European Cells & Materials*, 1, 66-81.
 80. Lelovas, P.P., Xanthos, T.T., Thoma, S.E. (2008). The laboratory rat as an animal model of osteoporosis. *Comparative Medicine*, 58, 424-30.
 81. Kalu, D.N. (1991). The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*, 15, 175-91.
 82. Quinn, R. (2005). Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*, 21: 775-77.
 83. Borchers, R.E., Gibson, L.J., Burchardt, H., Hayes, W.C. (1995). Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials*, 16, 545-51.
 84. Feldkamp, L.A., Davis, L.C. (1984). Practical cone-beam algorithm. *Journal of the Optical Society of America*, 1, 612-19.
 85. Hildebrand, T., Rüegsegger, P. (1997). A new method for the model independent assessment of thickness in three dimensional images. *Journal of Microscopy*, 185, 67-75.

-
86. Ulrich, D., Van Rietbergen, B., Laib, A., Rüegsegger, P. (1999). The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone*, 25, 55-60.
 87. Hahn, M., Vogel, M., Pompesius-Kempa, M., Delling, G. (1992). Trabecular bone pattern factor: A new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone*, 13, 327-30.
 88. Odgaard, A., Gundersen, H.J. (1993). Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3-D reconstructions. *Bone*, 14, 173-82.
 89. American National Standards Institute (Approved Feb 1993; reaffirmed Mar 1998). ANSI/ASAE S459 MAR98. Shear and three-point bending test of animal bone.
 90. Jamsa, T., Jalovaara, P., Peng, Z. (1998). Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone*, 23, 155-61.
 91. Guede, D., Gonz alez P., Caeiro, J.R. (2013). Biomecánica y hueso (I): Conceptos básicos y ensayos mecánicos cl sicos. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 5, 43-50.
 92. Ritchie, O. (2008). Measurement of the toughness of bone: A tutorial with special reference to small animal studies. *Bone*, 43, 798-812.
 93. Baum, T., Carballido-Gamio, J., Huber, M.B. (2010). Automated 3D trabecular bone structure analysis of the proximal femur—prediction of biomechanical strength by CT and DXA. *Osteoporosis International*, 21, 1553-64.
 94. Alberich-Bayarri, A., Marti-Bonmati, L., Sanz-Requena, R., Belloch, E., Moratal, D. (2008). In vivo trabecular bone morphologic and mechanical relationship using high-resolution 3-T MRI. *American Journal of Roentgenology*, 191, 721-26.
 95. Alberich –Bayarri, A. (2014). Reproducibility and accuracy in the morphometric and mechanical quantification of trabecular bone from 3 Tesla Magnetic resonance images. *Radiologia*, 56, 27-34.

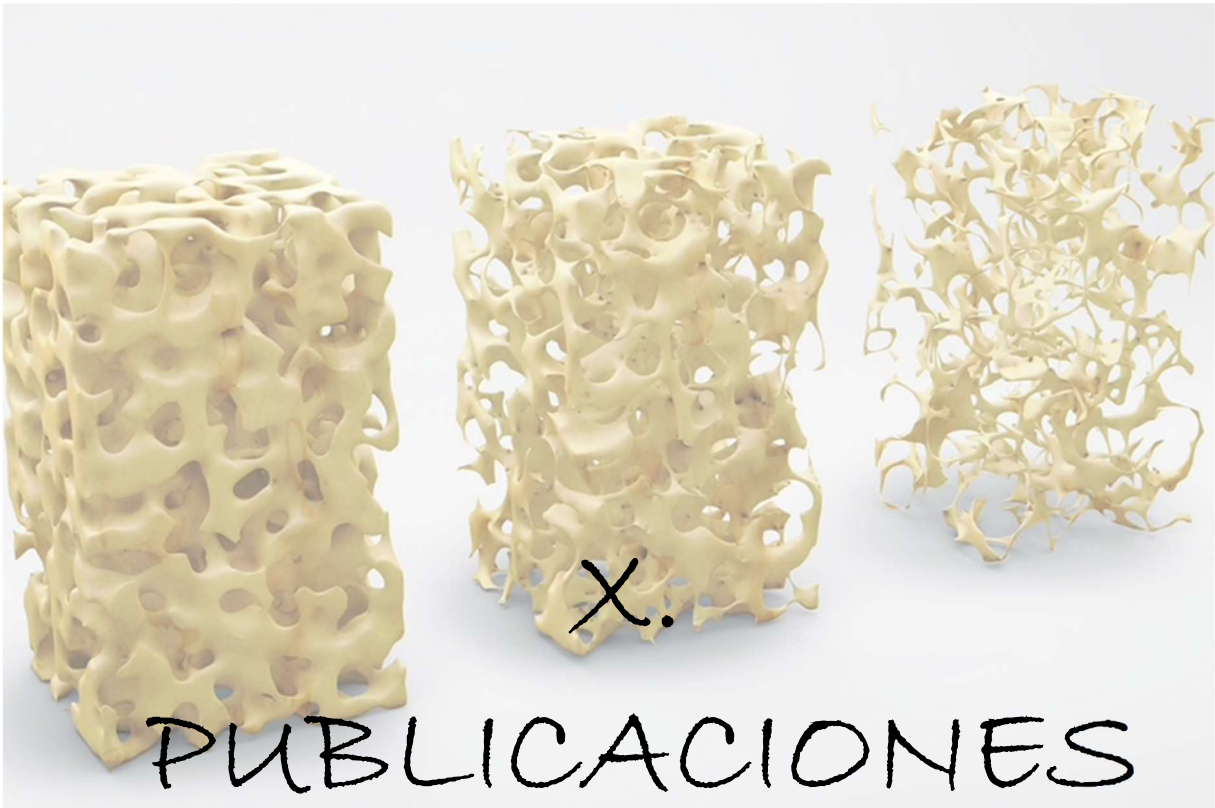
-
96. Alberich –Bayarri, A. (2010). Assesment of 2D and 3D fractal dimension measurements of trabecular bone from high-spatial resolution magnetic resonance images in 3T. *Medical Physics*, 37, 4930-37.
97. Alberich –Bayarri, A. (2009). Microcomputed tomography and microfinite element modeling for evaluating polymer scaffolds architecture and their mechanical properties. *Journal of Biomedical Mater Research Part B: Applied Biomaterials*, 91,191-202.
98. Sosa Henríquez M, Cancelo Hidalgo MJ. (2012). Papel del bazedoxifeno en el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 4 (Supl1), S23-7.
99. Bueno, J.A.H., Arias, L., Yu, C.R., Williams, R., Komm, B.S. (2017). Efficacy and safety of bazedoxifene in postmenopausal Latino women with osteoporosis. *Menopause*, 24, 1033-39.
100. Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Claustrat, B., Theelmas, P.D. (2000). Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *The Journal of Bone and Mineral Research*, 15, 1526-36.
101. Delmas, P.D., Hardy, P., Garnero, P., Daih, M. (2000). Monitoring individual response to hormone replacement therapy with bone markers. *Bone*, 26, 553-60.
102. Saito, M., Kida, Y., Nishizawa, T. (2015). Effects of 18-month treatment with bazedoxifene on enzymatic immature and mature cross-links and non-enzymatic advanced glycation end products, mineralization and trabecular microarchitecture of vertebra in ovariectomized monkeys. *Bone*, 81, 573-80.
103. Barrionuevo, P., Kapoor, E., Asi, N. (2019). Efficacy of pharmacological therapies for the prevention of fractures in postmenopausal women: a network meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 104, 1623-30.
104. Jin, Y.Z., Lee, J.H., Xu, B., Cho, M. (2019). Effects of medications on prevention of secondary osteoporotic vertebral compression fracture, non-vertebral fracture, and discontinuation due to adverse events: a meta-analysis of randomized controlled trials.

BMC Musculoskeletal Disorders, 20, 399.

105. Peng, L., Luo, Q., Lu, H. (2017). Efficacy and safety of bazedoxifene in postmenopausal women with osteoporosis. A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 96, 49.
106. Palacios, S., Silverman, S.L., de Villiers, T.J. (2015). A 7-year randomized, placebo-controlled trial assessing the long-term efficacy and safety of bazedoxifene in postmenopausal women with osteoporosis: effects on bone density and fracture. *Menopause*, 22, 806-13.
107. Reginster, J.Y., Ferrari, S., Hadji, P. (2014). Current challenges in the treatment of osteoporosis: an opportunity for bazedoxifene. *Current Medical Research and Opinion*, 30, 1165-76.
108. Liu, G.F., Wang, Z.Q., Liu, L., Zhang, B.T., Miao, Y.Y., Yu, S.N. (2018). A network meta-analysis on the short-term efficacy and adverse events of different anti-osteoporosis drugs for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119, 4469-81.
109. Gatti, D., Rossini, M., Sblendorio, I., Lello, S. (2013). Pharmacokinetic evaluation of bazedoxifene for the treatment of osteoporosis. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 9, 883-92.
110. Ellis, A.G., Reginster, J.Y., Luo, X. (2014). Indirect comparison of bazedoxifene vs oral bisphosphonates for the prevention of vertebral fractures in postmenopausal osteoporotic women. *Current Medical Research and Opinion*, 30, 1617-26.
111. Martín-Fernández, M., Gómez-Chinchón, M., Álvarez-Galovich, L., Torrubia, B., Díaz-Curiel, M., Guede, D., Caeiro, J.R. (2016). Effects of long-term preventive treatment with strontium ranelate and zoledronic acid on bone quality in ovariectomized rats. *American Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 4, 191-200.
112. Rizzoli, R., Boonen, S., Brandi, M.L., Burlet, N., Delmas, P. (2008). The role of Calcium and Vitamin D in the management of osteoporosis. *Bone*, 42, 246-49.

-
113. Weaver, C.M., Alexander, D.D., Boushey, C.J., Dawson-Hughes, B., Lappe, J.M. Calcium plus vitamin D supplementation and risk of fractures: an updated meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation. *Osteoporosis International*, 27, 367-76.
114. Paschalis, E.P., Gamsjaeger, S., Hassler, N., Fahrleitner-Pammer, A., Dobnig, H. (2016). Vitamin D and calcium supplementation for three years in postmenopausal osteoporosis significantly alters bone mineral and organic matrix quality. *Bone*, 95, 41-46.
115. Aloia, J.F., Dhaliwal, R., Shied, A., Mikhail, M., Islam, S. (2013). Calcium and vitamin D supplementation in postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98, 1702-09.
116. Avenell, A., Mak J.C.S., O'Connell, D. (2014). Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4.
117. Lips, P., Gielen, E., Van Schoor, N.M. (2014). Vitamin D supplements with or without calcium to prevent fractures. *Bonekey Reports*, 3, 512.
118. Boonen, S., Lips, P., Bouillon, R., Bischoff-Ferrari, H.A., Vanderschueren, D. (2007). Need for additional calcium to reduce the risk of hip fracture with vitamin D supplementation: evidence from a comparative metaanalysis of randomized controlled trials. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92, 1415-23.
119. Prentice, R.L., Pettinger, M.B., Jackson, R.D., Wactawski-Wende, J., Lacroix, A.Z. (2013). Health risks and benefits from calcium and vitamin D supplementation: Women's Health Initiative clinical trial and cohort study. *Osteoporosis International*, 24, 567-80.
120. Michaëlson, K., Melhus, H., Bellocco, R., Wolk, A. (2003). Dietary calcium and vitamin D intake in relation to osteoporotic fracture risk. *Bone*, 32, 694-703.
121. Grant, A.M., Anderson, F.H., Avenell, A., Campbell, M.K., McDonald, A.M. (2005). Oral vitamin D3 and calcium for secondary prevention of low-trauma fractures in elderly people (randomised evaluation of calcium or vitamin D, RECORD): a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, 356, 1621-28.

-
- 122.** Kahwati, L.C., Weber, R.P., Pan, H., Gourlay, M., LeBlanc, E. (2019). Vitamin D, calcium or combined supplementation for the primary prevention of fractures in community-dwelling adults: evidence report and systematic review for the US preventive services task force. *JAMA*, 319, 1600-12.
- 123.** Cesareo, R., Iozzino, M., D'Onofrio, L., Terrinoni, I., Maddaloni, E. (2015). Effectiveness and safety of calcium and vitamin D treatment for postmenopausal osteoporosis. *Minerva Endocrinology*, 40, 231-37.
- 124.** Kopecky, S.L., Bauer, D.C., Gulati, M., Nieves, J.W., Singer, A.J. (2016). Lack of evidence linking calcium with or without vitamin D supplementation to cardiovascular disease in generally healthy adults: a clinical guideline from the national osteoporosis foundation and the American society for preventive cardiology. *Annals of Internal Medicine*, 165, 867-68.
- 125.** Montero, M., Serfati, D., Luna S., Díaz Curiel, M., Carrascal, M.T. (2010). The effectiveness of intermittent rat parathyroid hormone (1-34) treatment on low bone mass due to oestrogen or androgen depletion in skeletally mature rats. *The Aging Male*, 13, 59-73.
- 126.** Wahl, D.A., Cooper, C., Ebeling, P.R., Eggersdorfer, M., Hilger, J. (2012). A global representation of vitamin D status in healthy populations. *Archives of Osteoporosis*, 7, 155-72.
- 127.** López-Ramiro, E., Rubert, M., Mahillo, I., De la Piedra, C. (2016). Hiperparatiroidismo secundario al déficit de vitamina D. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 8, 55-60.



PUBLICACIONES CIENTÍFICAS RELACIONADAS CON ESTA TESIS:

1. Torrubia B, Martín-Fernández M, Rubert M, Gómez-Chinchón M, Sosa M, Díez-Pérez A, Recio Visedo P, De la Piedra C. Effects of Calcium and Vitamin-D Supplementation on Bone Quality in an Ovariectomized Rat Model. *J Surg.* 2020; 5: 1276-84. DOI: 10.29011/2575-9760.001276.
2. Blanca Torrubia, Marta Martín Fernández, Mercedes Rubert, Marina Gómez-Chinchón, Paz Recio Visedo, Concepción de la Piedra. Efectos del tratamiento con bazedoxifeno sobre la calidad ósea en ratas ovariectomizadas. *Rev Osteoporos Metabol Miner.* 2020; 12: 20-7.
El trabajo anterior también fue publicado en inglés:

Blanca Torrubia, Marta Martín Fernández, Mercedes Rubert, Marina Gómez-Chinchón, Paz Recio Visedo, Concepción de la Piedra. Effects of the treatment with bazedoxifene on bone quality in ovariectomized rats. *Rev Osteoporos Metabol Miner.* 2020; 12: 20-2.

Research Article

Effects of Calcium and Vitamin-D Supplementation on Bone Quality in an Ovariectomized Rat Model

Blanca Torrubia¹, Marta Martín-Fernández¹, Mercedes Rubert², Marina Gómez-Chinchón¹, Manuel Sosa³, Adolfo Díez-Pérez⁴, Paz Recio Visado⁵, Concepción de la Piedra^{1*}

¹Biochemistry Research, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

²Hospital Support Team Palliative Care, Hospital Universitario de Móstoles, Móstoles, Madrid, Spain

³Osteoporosis Research Group, Instituto de Investigación Biomédica, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

⁴Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Hospital del Mar-IMIM, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Department of Physiology of Pharmacy University, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Running title: Effects of calcium and vitamin D on osteoporosis

*Corresponding author: Concepción de la Piedra, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz Bioquímica Investigación, Avenida Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

Citation: Torrubia B, Martín-Fernández M, Rubert M, Gómez-Chinchón M, Sosa M, et al. (2020) Effects of Calcium and Vitamin-D Supplementation on Bone Quality in an Ovariectomized Rat Model. J Surg 5: 1276. DOI: 10.29011/2575-9760.001276

Received Date: 08 January, 2020; Accepted Date: 30 January, 2020; Published Date: 05 February, 2020

Abstract

Introduction: Many osteopenic patients or patients with osteoporosis are treated only with calcium and vitamin D (vit D) as a preventive or therapeutic regimen. All the clinical trials about the use of osteoporosis treatments administered calcium and vit D to both control and intervention groups.

Aim of the study: To determine if treatment with calcium and vit D is useful in the treatment of osteoporosis. With this purpose we study the effects on bone quality produced by long-term treatment with calcium and vit D in ovariectomized rats.

Methods: Forty-five 6-month-old female Wistar rats were grouped as follows: SHAM (n=15), simulated intervention; OVX (n=15), ovariectomized; and OVX+(Ca+vit D) (n=15), ovariectomized treated with calcium and vit D (10 mg of calcium and 6.7 IU of vit D/kg/day by oral gavage). The rats were sacrificed 8 months after treatment. We measured femoral (F) and lumbar (L) Bone Mineral Density (BMD), biochemical markers of bone turnover, and trabecular microstructure, irregular structures through fractal dimension analysis in 2D (D2D) and 3D (D3D) and biomechanical testing by finite elements analysis.

Results: FBMD and LBMD decreased in OVX rats, with no changes observed in treated rats. Ovariectomy produced an increase in osteocalcin values and carboxyterminal telopeptide/tartrate resistant acid phosphatase, producing no differences in aminoterminal propeptide of procollagen I; These variations did not change after treatment. Ovariectomy produced a decrease in bone microstructural parameters maintained under treatment with calcium and vitamin D. D2D decreased significantly in the OVX group, while no changes were evidenced on D3D; no variations were seen after treatment with calcium and vit D. The apparent elastic modulus in the x, y, and z direction was significantly decreased in the OVX group, with no differences after treatment. Ovariectomy significantly increased the weight of the rats. Treatment with calcium and vit D prevented this increase.

Conclusion: Long-term treatment with calcium and vit D did not revert alterations in bone quality caused by ovariectomy.

Keywords: Calcium; Ovariectomy; Vitamin D

Introduction

Calcium is the most important nutrient for achieving optimal bone mass as well as preventing age-related loss of bone mass [1]. In addition, calcium plays an essential role in the normal functioning of a wide variety of body tissues and physiological processes, including muscle contraction, blood coagulation, nerve transmission, and in the role of second messenger, controlling the activity of various hormones [2]. In the United States, the recommended calcium intake is 1000 mg/day up to age 50 and 1200-1500 mg thereafter [3]. In Europe, the recommended intake is somewhat lower, at 700-800 mg/day at any age and 800 mg/day for women aged 50-65 years [4]. Worldwide, however, the daily dietary intake of calcium is below these recommendations. In recent years there has been a renewed interest in the effects of vitamin D status on health. Although deficiencies in vitamin D status have been classically associated with bone pathology, the discovery that nearly all body tissues and cells have Vitamin D Receptors (VDR) and an enzyme system to synthesize 1,25(OH)₂VitaminD (1,25(OH)₂D) has made it clear that vitamin D carries out other functions, such as inhibition of cellular proliferation, angiogenesis, and renin production, the stimulation of cellular maturation, and the regulation of immune response. For this reason, low levels of vitamin D have been associated with mortality, cancer, cardiovascular disease, autoimmune diseases, diabetes, psychiatric illness, and even respiratory disease in addition to the previously known effects on bone metabolism (osteomalacia, secondary hyperparathyroidism, osteoporosis, and fracture) [2,5].

In the general population, there is a high prevalence of vitamin D deficiency [6], creating a need for vitamin D supplementation. Osteoporosis is presently the most common metabolic bone disease and one of the most pressing global public health problems due to its huge social and economic burden. All the recommendations for the treatment of osteoporosis recommended therapy with antiresorptive agents, or anabolic agents such as PTH 1-84 or PTH 1-34 [7]. At this point, it is important to note that all the clinical trials upon which these recommendations are based administered calcium and vitamin D to both control and intervention groups [7]. Due to economic reasons, many osteopenic patients or patients with osteoporosis, especially in their initial stages in primary attention, are treated only with calcium and vitamin D as a preventive or therapeutic regimen in order to avoid the development of the disease and future fractures. The aim of this work is to determine the effectiveness of calcium and vitamin D in the treatment of osteoporosis. For that, we studied an experimental model of postmenopausal osteoporosis consisting of ovariectomized rats treated with calcium and vitamin D over a prolonged time period (8 months) assessing the effects of these two substances on Bone Mineral Density (BMD), bone microstructure, bone turnover, and

biomechanical parameters.

Materials and Methods

Animals

Forty-five 6-month-old female Wistar rats weighing 328±50 g (mean ± SD) were used in this study. The animals were kept under constant living conditions (22°C, 12-hour light-dark cycles per day), and food (standard laboratory chow) and water were available ad libitum. The animals were randomized into the following groups: SHAM (n=15), simulated intervention; OVX (n=15), ovariectomized; OVX+(Ca+vit D) (n=15), ovariectomized and treated with calcium and vitamin D (25 mg/kg/day of Natecal D Flash[®], Italfarmaco, Milan, Italy; by oral gavage) over 8 months. Natecal D Flash[®] is composed of calcium carbonate and cholecalciferol. Twenty-five mg of Natecal D Flash[®] is equivalent to 10 mg of calcium and 6.7 IU of vitamin D. Treatment began first day after ovariectomy. The diet of the rats, SAFE A04 (Augy, France), contained 7.3 g/kg of calcium and 1000 IU/kg of vitamin D3. No animals died during the study. One day after the last treatment, the experimental animals were weighed and killed by exsanguination under isoflurane (Florane[®]) anesthesia. Blood samples were obtained by cardiac puncture and serum samples were immediately frozen at -80°C as aliquots until determination of biochemical markers of bone turnover. Once the blood was collected, the animals were frozen at -20°C until determination of BMD in previously thawed animals. Prior to BMD analyses, the left femurs were excised and cleaned of adjacent tissue for BMD determination. Right femurs were also excised and cleaned of adjacent tissue and used for computerized micro tomography (micro-CT) and biomechanical testing. Lumbar spine BMD was determined in situ. It has been shown that the use of repeated freeze-thaw cycles does not influence the structural properties of bone [8]. All procedures were carried out in accordance with European Community standards on the care and use of laboratory animals and after approval of the Ethics Committee of Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz.

Bone Mineral Density

BMD was determined in situ in the lumbar spine (L2, L3, and L4) and in the entire right femur by Dual-Energy X-Ray Densitometry (DEXA) using a Piximus densitometer (HOLOGIC QDR-1000 TM) with small-animal software. Intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) were <0.53% and <1.2%, respectively. The scans of the femur were analyzed to determine the BMD of the whole femur. Scans of the L2, L3, and L4 vertebrae were analyzed for BMD and the results were expressed as the mean of the values obtained.

Biochemical markers of bone turnover

Serum Bone Gla Protein (BGP) was measured by ELISA for

specific quantitative determination of rat osteocalcin levels (Rat-MID Osteocalcin, IDS, UK). The sensitivity of this assay was 50 ng/ml. Intra- and inter-assay coefficients of variation of the method were <5.0% and <6.6%, respectively. Serum procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) was measured by a specific ELISA for both rat and mouse PINP (Rat/Mouse PINPEIA, IDS, UK). The sensitivity of this assay was 0.7 ng/ml. The intra- and inter-assay coefficients of variation were <7.4% and <8.0%, respectively. Serum 5b isoenzyme of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) was measured by an ELISA specific for rat TRAP (RatTRAP Assay, IDS, UK). The sensitivity of the assay was 0.1 U/L. The intra- and inter-assay variation coefficients for the method were <5.0% and <5.5%, respectively. Serum C-Telopeptide of Type I Collagen (CTX) was measured using a specific ELISA assay for rat CTX (RatLaps ELISA, IDS, UK). The sensitivity of the assay was 2.0 ng/ml. Intra- and inter-assay variation coefficients of the method were <5.6% and <10.5%, respectively.

Trabecular Microarchitecture Analysis of Femur

Trabecular bone microarchitecture was performed using the QUIBIM SL system (Quantitative Imaging Biomarkers in Medicine, Valencia, Spain) with computerized micro tomography. We used a GE system for *in vitro* samples (eXplore Locus SP[®], General Electric, USA), which includes technology for plane detection by means of cone-beam CT. The spatial resolution of the acquired images was isotropic, with voxels of 50×50×50 μm. Although the voxel had a limited spatial resolution of 50μm, this was considered as adequate for the study of trabecular thickness assuming that the measurement would take into account partial volume effect and that previous studies have used larger voxels (290μm) to measure human trabecular thickness (80-150μm), obtaining significant correlation with mechanical properties [9]. Other studies have used an isotropic voxel of 180μm interpolated to 90μm [10]. Primary spongiosa was excluded in the analysis. Segmentation of the μCT samples was performed by placing a rectangular region of interest and automatically propagating this position to the rest of the slices, verifying that all the regions were segmented in each femur, that is, femoral head, trochanter, and distal femoral metaphysis (near the knee). Otsu's method was used for thresholding intensities [11]. The following morphometric parameters of trabecular bone were determined: Bone Volume/Total Bone Volume (BV/TV), Trabecular Thickness (Tb. Th), Trabecular Number (Tb. N), and (Tb. Sp). We also calculated irregularity through fractal dimension analysis in 2D (D2D) and in 3D (D3D), expressing the degree of complexity of the contour of a structure in the fill of a surface or a volume, respectively [12].

Biomechanical Analysis

Samples of trabecular bone reconstructed from μCT images were subjected to simulation of mechanical compression by the

method of finite elements (FEA). Static simulations of uni-axial compression in the 3 axes were performed on the different virtual samples obtained by tension-deformation assay. Properties of the basic material were defined from those of compact bone (Young module E=10 GPa; Poisson coefficient, $\sigma=0.3$). In the simulations of compression assays, null displacement on nodes from one side, and a displacement of 1% of the edge length of the opposite side was applied. Using the resolution of the equation systems, the apparent elastic modulus of the structure was obtained in three directions (Ex, Ey, Ez) [13].

Statistical Analysis

The results of the experiments were expressed as the mean ± SD of the different parameters. The Mann-Whitney test (Medcalc Software Program, Belgium), a nonparametric method, was used to compare the different treatment groups. A p-value <0.05 was accepted as denoting a significant difference.

Results

Compared to the SHAM group, FBMD and LBMD were significantly decreased in OVX rats ($p<0.001$). Administration of Ca+Vit D to OVX rats did not produce any significant change in FBMD or in LBMD with respect to the untreated OVX group (Figure 1).

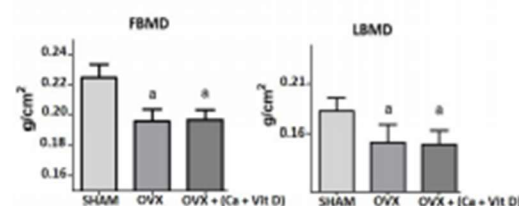


Figure 1: FBMD and LBMD in a group of SHAM operated, ovariectomized, and ovariectomized rats treated with calcium and vitamin D (Ca+ Vit D) over a period of 8 months. Data are expressed as mean ± SD. Statistical significance $p<0.001$: (a) vs. SHAM.

Figure 2 shows bone microstructural parameters. Eight months after surgery, most of the micro-CT variables characterizing bone structure were significantly different in the OVX group relative to the SHAM group. OVX rats presented a significant decrease in BV/TV in the femora ($p<0.01$). This decrease in BV/TV was due to a significant increase in Tb. Sp ($p<0.05$) and a decrease in Tb. N ($p<0.01$), without differences in Tb.Th. Administration of Ca+VitD did not correct the state of OVX rats, and no significant differences were found with regard to the untreated OVX group (Figure 2).

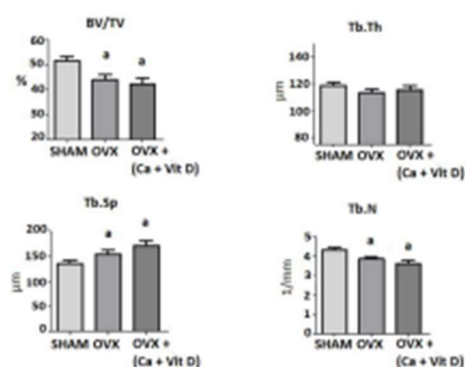


Figure 2: Femoral trabecular microarchitecture analysis: Bone volume/total volume (BV/TV), Trabecular Thickness (Tb. Th), Trabecular Separation (Tb. Sp), and Trabecular Number (Tb. N). SHAM operated, ovariectomized, and ovariectomized rats treated with calcium and vitamin D (Ca+ Vit D) OVER a period of 8 months. Data are expressed as mean \pm SD. Statistical significance $p < 0.001$: (a) vs. SHAM. Data are expressed as mean \pm SD. Statistical significance: $p < 0.01$ (a) vs. SHAM. OVX vs. Ca+Vit D: BV/TV $p < 0.01$; Tb.Sp $p < 0.05$; Tb N $p < 0.01$.

D2D decreased significantly ($p < 0.05$) in the OVX group compared to the SHAM group, without significant changes in

D3D. OVX rats treated with Ca+Vit D showed the same decrease in D2D and a significant decrease with respect to the SHAM and OVX groups on D3D (Figure 3).

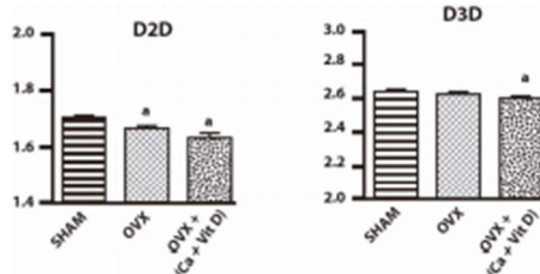


Figure 3: Fractal dimension in 2D (D2D) and in 3D (D3D) in a group of SHAM operated, ovariectomized, and ovariectomized rats treated with calcium and vitamin D (Ca+ Vit D) over a period of 8 months. Data are expressed as mean \pm SD. Statistical significance $p < 0.05$: (a) vs. SHAM.

The apparent elastic modulus in the three spatial directions (Ex, Ey, and Ez) was significantly decreased in OVX rats with respect to the SHAM group ($p < 0.01$). OVX animals treated with Ca VitD had Ex values that did not differ significantly when compared to the SHAM or OVX groups (Figure 4).

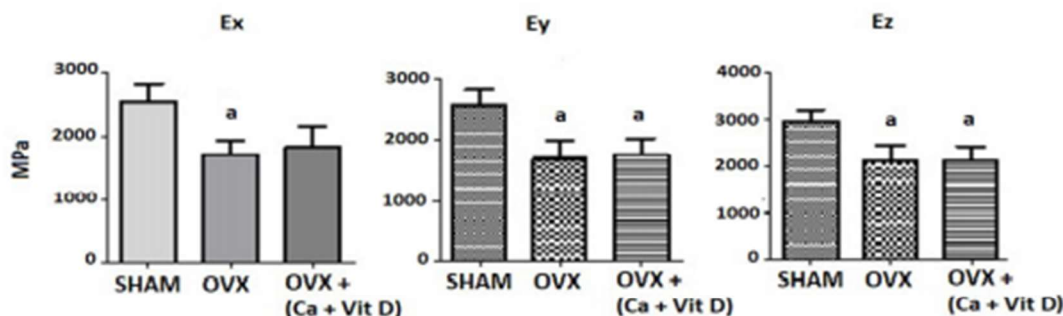


Figure 4: Apparent elastic modulus in the x, y, and z spatial direction (Ex, Ey and Ez) in a group of SHAM operated, ovariectomized, and ovariectomized rats treated with calcium and vitamin D (Ca+ Vit D) over a period of 8 months. Data are expressed as mean \pm SD. Statistical significance $p < 0.05$: (a) vs. SHAM.

Ovariectomy produced an increase in BGP values ($p < 0.01$) and CTX/TRAP ($p < 0.001$) without causing differences in PINP levels. Treatment with Ca+VitD did not produce any difference in the OVX rat group with respect to the OVX group (Figure 5).

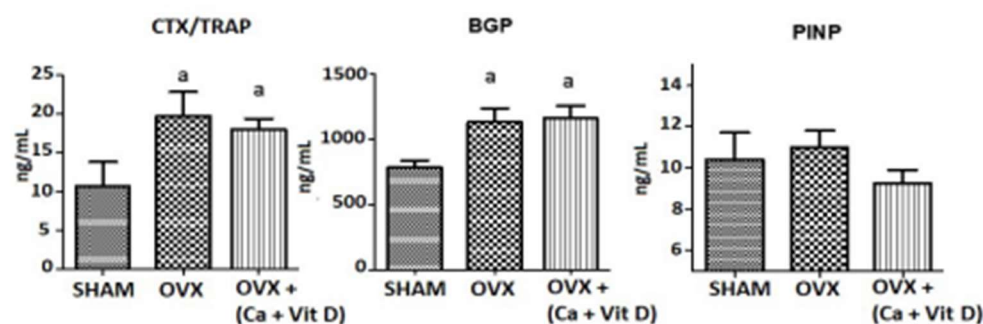


Figure 5: Biochemical markers of bone turnover: serum osteocalcin (BGP), telopeptide carboxyterminal of collagen/isoenzyme β of tartrate resistant acid phosphatase (CTX/TRAP) and propeptide carboxyterminal of procollagen I (PINP) in a group of SHAM operated, ovariectomized, and ovariectomized rats treated with calcium and vitamin D (Ca+ Vit D) over a period of 8 months. Data are expressed as mean \pm SD. Statistical significance: $p < 0.001$ (a) vs. SHAM; OVX vs. OVX + Ca+VitD: BGP $p < 0.01$; CTX/TRAP $p < 0.001$.

Ovariectomy significantly increased the weight of rats ($p < 0.05$), though treatment with Ca+VitD avoided this increase in OVX-treated animals (Figure 6).

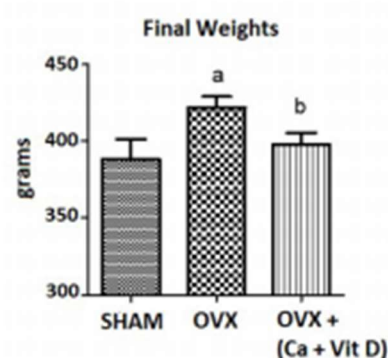


Figure 6: Body weight in a group of SHAM operated, ovariectomized, and ovariectomized rats treated with calcium and vitamin D (Ca+ Vit D) over a period of 8 months. Data are expressed as mean \pm SD. Statistical significance $p < 0.05$: (a) vs. SHAM, (b) vs. OVX.

Discussion

Calcium plus vitamin D supplementation has been widely recommended to prevent osteoporosis and subsequent fracture [14]. However, considerable controversy exists about its efficacy. There is a large number of works about the effects of calcium and vitamin D in patients with osteoporosis. However, it is difficult in these cases to have a homogeneous population. This is the reason to make this study in an ovariectomized rat model, a reference pattern in the study of osteoporosis [15]. As expected, we found a decrease in FBMD and LBMD, a decrease in trabecular number, increased

trabecular separation, a decrease in D2D fractal dimension, and a decrease in the biomechanical parameters Ex, Ey, and Ez as a result of ovariectomy. Ovariectomy also produced an increase in bone remodeling as reflected in BGP and CTX/TRAP values. Although PINP levels were not changed, we could not rule out that they were previously elevated during the eight-month period following ovariectomy. The results of our work show that treatment with calcium and vitamin D over a long period of time did not produce any effect on BMD, bone microstructure, biochemical markers of bone turnover, or biomechanics in ovariectomized rats. These

results were analyzed at the end of treatment, and we cannot rule out the possibility that these changes took place in earlier stages of the disease.

Previous research supports the use of calcium and vitamin D to prevent fracture risk in osteoporosis. Weaver, et al. [16] conducted a meta-analysis of randomized controlled trials of calcium plus vitamin-D supplementation for fracture prevention in adults. The study shows that calcium plus vitamin-D supplementation produced a statistically significant 15% reduction in risk of total fractures and a 30% reduced risk of hip fracture. This study supports the use of calcium plus vitamin-D supplements as an intervention for fracture-risk reduction in both community dwelling adults and institutionalized middle-aged to elderly adults. Pascalis, et al. [17] analyze a number of bone-quality indices in patients who received long-term Vitamin-D (400-1200 IU) and calcium (1.0-1.5 g) supplementation versus those who did not. The study was a part of the HORIZON trial. The mineral/matrix ratio and glycosaminoglycan content were higher, while Nano porosity (a surrogate for tissue water content), mineral maturity/crystallinity, and pyridinoline content were lower in patients without long-term supplementation. The authors conclude that vitamin D and calcium administration were associated with altered mineral and organic properties.

Aloia, et al. [18] performed a study to evaluate the influence of calcium and vitamin D on PTH and bone turnover. One hundred fifty-nine healthy postmenopausal women participated in a 6-month, double-blind, placebo-controlled study in which patients were grouped as follows: a) double placebo, 2) 1200 mg/day calcium, 3) 100 µg, and 4) vitamin D, and calcium. Fasting PTH declined with vitamin D supplementation, and PTH declined after calcium intake. Dietary supplementation with 1200 µg calcium/day reduced CTX and PINP, whereas supplementation with up to 100 µg of vitamin D, did not. Avenell, et al. [19] reviewed 53 trials in which a total of 91 791 participants were included to determine the effects of vitamin D with or without calcium for preventing fracture in post-menopausal women and older men. High-quality evidence indicates that when administered alone and in the formats and doses tested, vitamin D is unlikely to be effective in preventing hip fracture. Quality evidence also suggests that vitamin D plus calcium results in a slight reduction in hip-fracture risk. It has also been found that vitamin D plus calcium is associated with a statistically significant reduction in the incidence of new non-vertebral fractures. However, they found only moderate-quality evidence of an absence of a statistically significant preventive effect on clinical vertebral fractures.

It is important to note that many studies that have investigated the effects of combined calcium and Vitamin-D supplementation on postmenopausal women have shown a reduction in fracture risk, provided sufficient patient compliance (75-85%) was reached

[14]. Lips, et al. [20] reviewed 19 randomized clinical trials of vitamin D administered with or without calcium. Vitamin-D supplementation of 800 IU/day in combination with calcium showed good compliance and may decrease the incidence of non-vertebral fractures, especially in older individuals, groups having low baseline Vitamin-D status and low calcium intake and also showing good compliance. However, analysis of vertebral fractures was negative in detecting reduction in all cases. Boonen, et al. [21] conducted a study in women and men ≥ 50 years who were at risk for hip fracture. They studied 9083 patients treated with vitamin D and 45 509 treated with vitamin D and calcium. Their results suggest that oral vitamin D reduces the risk of hip fracture when calcium supplementation is added.

The Women's Health Initiative (WHI) carried out a double-blind, placebo-controlled trial [22] in which 36 282 postmenopausal women living in the US were randomly assigned to a regimen consisting of 1000 mg of elemental calcium carbonate plus 400 IU of vitamin D daily or placebo. This study, which reports an average intervention period of 7 years, found that long-term use of calcium and vitamin D appears to cause a possibly significant reduction in the risk of hip fracture among postmenopausal women. However, there are other reports in which treatment with calcium and vitamin D do not seem to provide any benefit in the number of bone fractures. Michaelson, et al. [23] studied 60 689 women aged 40-74 years over a 4-year period. During follow-up, the authors observed that 1535 women had sustained hip fractures. Women with an estimated calcium intake below 400 mg/day, intermediate calcium intake, and calcium intake above 1200 mg/day had a similar age-adjusted hip-fracture risk, and Vitamin-D intake was not associated with fracture risk. Grant, et al. [24] studied 5292 people aged 70 years or older who had experienced a low-trauma fracture. Study patients were randomly assigned to daily administration of vitamin D, 1000 mg/day of calcium, both, or placebo. The groups did not differ in the incidence of all-new fractures or hip fractures. Kahwati, et al [25] recently carried out an extensive review that included 47 676 patients regarding primary prevention of fractures in adults with vitamin D, calcium, or combined supplementation. The authors found that supplementation with vitamin D and calcium for 3 to 7 years had no statistically significant effect on total fracture incidence.

Here it is worth mentioning how treatment with calcium and vitamin D could influence the course of other diseases. Cesario, et al. [26] concluded that it is currently not possible to ensure that calcium supplements given with vitamin D do not cause adverse cardiovascular events or link these supplements to increased cardiovascular risk. However, other authors such as Kahwati, et al. [25], Kopecky, et al. [27], and Prentice [22] stated that vitamin D with calcium does not increase all-cause mortality from cardiovascular events. Kahwati, et al. [25] and Avenell, et al. [19] suggest that vitamin D with calcium is associated with

an increase in the incidence of kidney stones. Grant, et al. [24] observed that treatment with calcium and vitamin D had no effect on death, number of falls, or quality of life. In sum, there are two opposing lines of opinion: one supporting that supplementation with calcium and vitamin D should be indicated for osteoporotic women and those at risk of osteoporosis and the opposite position, that is that oral supplementation with calcium and vitamin D is not useful in the treatment of osteoporosis or prevention of fractures. In our work, we failed to find any positive effect of calcium and vitamin D on BMD, bone microstructure, biochemical markers of bone turnover, and biomechanics in ovariectomized rats. According to previous research produced by our group, the rats were osteopenic at least from three months after ovariectomy [28]. The only positive effect of treatment was the absence of excess weight presented in ovariectomized rats. We have no explanation for this result.

Limitations of The Study

The study was done in rats and this could be a limitation. Ovariectomized rats is considered an adequate research model to study postmenopausal osteoporosis. We used rats in order to have a homogeneous population, very difficult to have in the case of a study in osteoporotic women.

Conclusion

According to our results, calcium and Vitamin-D supplements do not have any positive effect on bone quality in ovariectomized rats. Due to this fact, we can affirm that calcium and vitamin D supplements are not useful in osteoporosis treatment and they are not necessary in all the cases. However, we have not studied the possible effects of these treatments on the many other metabolic pathways that are important for life in which calcium and vitamin D play a role. Moreover, a substantial percentage of the world population presents Vitamin-D deficit [29].

Recommendations: These findings do not support treatment with calcium and vitamin D in all the patients with osteoporosis. However, Vitamin-D treatment may be necessary in osteoporotic or non-osteoporotic patients with Vitamin-D levels below 24 ng/ml [30], mainly to prevent secondary hyperparathyroidism and a review of calcium intake in the general population is necessary to ensure enough intake.

References

1. Heaney RP (2002) The importance of calcium intake for lifelong skeletal health. *Calcif Tissue Int* 70: 70-73.
2. Rojas Rivera J, De la Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egidio J (2010) The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant* 25: 2850-2865.
3. Optimal calcium intake. NIH Consensus Statement 12: 1-31.
4. Opinion of the Scientific Committee on Food on the tolerable upper intake level of calcium 2003.
5. Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B (2008) Calcifediol levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med* 168: 1629-1637.
6. Quesada JM, Diaz-Curiel M, Sosa-Henriquez M, Malouf-Sierra J, Nogues-Solan X, et al. (2013) Low calcium intake and insufficient serum vitamin D status in treated and non-treated postmenopausal osteoporotic women in Spain: the PREVADICAD study. *Osteoporosis Int* 19: S29-207.
7. Quesada Gómez JM, Blanch Rubió J, Díaz Curiel M, Díez Pérez A (2011) Calcium citrate and vitamin D in the treatment of osteoporosis. *Clin Drug Investig* 31: 285-298.
8. Borchers RE, Gibson LJ, Burchardt H, Hayes WC (1995) Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials* 16: 545-551.
9. Baum T, Carballido-Gamio J, Huber MB, Müller D, Monetti R, et al. (2010) Automated 3D trabecular bone structure analysis of the proximal femur-prediction of biomechanical strength by CT and DXA. *Osteoporosis Int* 21: 1553-1564.
10. Alberich-Bayarri A, Martí-Bonmati L, Sanz-Requena R, Belloch E, Moratal D (2008) *In vivo* trabecular bone morphologic and mechanical relationship using high-resolution 3-T MRI. *AJR Am J Roentgenol* 191: 721-726.
11. Alberich-Bayarri A (2014) Reproducibility and accuracy in the morphometric and mechanical quantification of trabecular bone from 3 Tesla Magnetic resonance images. *Radiologia* 56: 27-34.
12. Alberich-Bayarri A, Martí-Bonmati L, Angeles Pérez M, Sanz-Requena R, Lerma-Garrido JJ, et al. (2010) Assessment of 2D and 3D fractal dimension measurements of trabecular bone from high-spatial resolution magnetic resonance images in 3T. *Med Phys* 37: 4930-4937.
13. Alberich-Bayarri A, Moratal D, Ivirico JL, Rodríguez Hernández JC, Vallés-Lluch A, et al. (2009) Microcomputed tomography and micro-finite element modeling for evaluating polymer scaffolds architecture and their mechanical properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91: 191-202.
14. Rizzoli R, Boonen S, Brandi ML, Burlet N, Delmas P, et al. (2008) The role of calcium and Vitamin in the management of osteoporosis. *Bone* 42: 248-249.
15. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008) The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 58: 424-430.
16. Weaver CM, Alexander LU, Boushey CJ, Dawson-Hughes B, Lappe JM, et al. (2016) Calcium plus vitamin D supplementation and risk of fractures: an updated meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation. *Osteoporosis Int* 27: 367-376.
17. Paschalis EP, Gamsjaeger S, Hassler N, Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H, et al. (2016) Vitamin D and calcium supplementation for three years in postmenopausal osteoporosis significantly alters bone mineral and organic matrix quality. *Bone* 95: 41-46.
18. Aloia JF, Dhaliwal R, Shied A, Mikhail M, Islam S, et al. (2013) Calcium and vitamin D supplementation in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 98: E1702-1709.

19. Avenell A, Mak JCS, O'Connell D (2014) Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men. *Cochrane Database of Systematic reviews* 4.
20. Lips P, Gielen E, Van Schoor NM (2014) Vitamin D supplements with or without calcium to prevent fractures. *BonKEy Reports* 3.
21. Boonen S, Lips P, Bouillon R, Bischoff-Ferrari HA, Vanderschueren D, et al. (2007) Need for additional calcium to reduce the risk of hip fracture with vitamin D supplementation: evidence from a comparative metaanalysis of randomized controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1415-1423.
22. Prentice RL, Pettinger MB, Jackson RD, Wactawski-Wende J, Lacroix AZ, et al. (2013) Health risks and benefits from calcium and vitamin D supplementation: Women's Health Initiative clinical trial and cohort study. *Osteoporosis Int* 24: 567-580.
23. Michaëlson K, Melhus H, Bellocco R, Wolk A (2003) Dietary calcium and vitamin D intake in relation to osteoporotic fracture risk. *Bone* 32: 694-703.
24. Grant AM, Anderson FH, Avenell A, Campbell MK, McDonald AM, et al. (2005) Oral vitamin D3 and calcium for secondary prevention of low-trauma fractures in elderly people (randomized evaluation of calcium or vitamin D, RECORD): a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 356: 1621-1628.
25. Kahwati LC, Weber RP, Pan H, Gourlay M, LeBlanc E, et al. (2018) Vitamin D, calcium or combined supplementation for the primary prevention of fractures in community-dwelling adults: evidence report and systematic review for the US preventive services task force. *JAMA* 319: 1600-1612.
26. Cesario R, Iozzino M, D'Onofrio L, Terrinoni I, Maddaloni E, et al. (2015) Effectiveness and safety of calcium and vitamin D treatment for postmenopausal osteoporosis. *Minerva Endocrinol* 40: 231-237.
27. Kopecny SL, Bauer DC, Gulaf M, Nieves JW, Singer AJ, et al. (2016) Lack of evidence linking calcium with or without vitamin D supplementation to cardiovascular disease in generally healthy adults: a clinical guideline from the national osteoporosis foundation and the American society for preventive cardiology. *Ann Intern Med* 165: 867-868.
28. Montero M, Serfati D, Luna S, Díaz Curiel M, Carrascal MT, et al. (2010) The effectiveness of intermittent rat parathyroid hormone (1-34) treatment on low bone mass due to oestrogen or androgen depletion in skeletally mature rats. *The Aging Male* 13: 59-73.
29. Wahi DA, Cooper C, Ebeling PR, Eggersdorfer M, Hilger J, et al. (2012) A global representation of vitamin D status in healthy populations. *Archives of Osteoporosis* 7: 155-172.
30. López-Ramiro E, Rubert M, Mahillo I, De la Piedra C (2016) Hiperparatiroidismo secundario al déficit de vitamina D. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* 8: 55-60.

Efectos del tratamiento con bazedoxifeno sobre la calidad ósea en ratas ovariectomizadas

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000100004>

Torrubia B¹, Martín Fernández M¹, Rubert M², Gómez-Chinchón M¹, Recio Visado P³, De la Piedra C¹

¹ Bioquímica Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas, Fundación Jiménez Díaz, Madrid (España)

² Equipo de Soporte Hospitalario, Cuidados Paliativos, Hospital Universitario de Móstoles, Móstoles, Madrid (España)

³ Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid (España)

Fecha de recepción: 02/12/2019 - Fecha de aceptación: 25/02/2020

Resumen

Objetivo: El bazedoxifeno es un SERM de 3ª generación con efectos agonistas sobre el hueso y sobre el útero y el tejido mamario. Nuestro objetivo ha sido estudiar los efectos del bazedoxifeno sobre la calidad ósea en un modelo experimental de ratas ovariectomizadas.

Materiales y métodos: Se utilizaron 3 grupos de 15 ratas Wistar hembras de 6 meses de edad: uno control; otro de ratas ovariectomizadas; y un tercer grupo de ratas ovariectomizadas tratadas con bazedoxifeno (0,33 mg/kg/día). Tras 8 meses se estudiaron la densitometría ósea lumbar y femoral, los parámetros microtomográficos, los marcadores bioquímicos de remodelado y los parámetros biomecánicos del hueso.

Resultados: La ovariectomía descendió la densidad ósea femoral y lumbar. La última se recuperó parcialmente con bazedoxifeno. El remodelado óseo aumentó, recuperando el bazedoxifeno los niveles de formación. El bazedoxifeno recuperó la fracción volumétrica ósea (BV/TV), la densidad de superficie ósea (BS/TV), el aumento en la separación trabecular (Tb.Sp), la disminución en el número de trabéculas (Tb.N), el aumento del factor de patrón trabecular (Tb.Pf) y el índice de modelo estructural (SMI). La superficie relativa cortical aumentó tras la ovariectomía, normalizándose con bazedoxifeno. También recuperó la deformación máxima antes de la rotura producida por la ovariectomía, y amortiguó parcialmente la ganancia de peso de las ratas ovariectomizadas.

Conclusiones: Nuestro estudio muestra resultados positivos del bazedoxifeno sobre la calidad ósea. Este fármaco podría estar especialmente indicado para mujeres jóvenes postmenopáusicas con osteoporosis o en riesgo de padecerla.

Palabras clave: bazedoxifeno, densidad mineral ósea, remodelado óseo, microtomografía, biomecánica, seguridad endometrial.

INTRODUCCIÓN

Los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs) son agentes sintéticos no esteroideos que tienen actividades como agonistas o antagonistas estrogénicos en diversos tejidos¹. El mecanismo de acción de los SERMs es a través de los dos tipos de receptores estrogénicos (α y β). Los SERMs poseen propiedades agonistas o antagonistas dependiendo del tipo de tejido^{2,3}. En general tienen actividad agonista en el hígado, tubo digestivo, esqueleto y corazón, y antagonista en la mama. En el útero, unos SERMs se comportan como agonistas y otros como antagonistas¹. Existen un gran número de proteínas co-reguladoras que modulan la acción de los SERMs sobre la expresión génica y contribuyen a la farmacología tejido-específica de los mismos⁴.

El tamoxifeno es un SERM que se utiliza como antiestrogénico mamario para el tratamiento y prevención del cáncer de mama con actividad agonista estrogénica en el útero. El raloxifeno se ha utilizado en la prevención y tratamiento de la osteoporosis y previene el cáncer de mama, pero tiene una cierta actividad estrogénica⁴. El bazedoxifeno es un SERM de 3ª generación con efectos agonistas sobre el hueso y efectos favorables adicionales sobre los lípidos, el útero y el tejido mamario^{5,6}.

Debido a su acción agonista estrogénica sobre el hueso, el raloxifeno y el bazedoxifeno se han utilizado y se utilizan en el tratamiento de la osteoporosis. El bazedoxifeno tiene la ventaja de una mayor seguridad endometrial, de tal modo que se utiliza también ampliamente junto con estrógenos equinos conjugados para el tratamiento de la endometriosis⁷⁻⁹.



Correspondencia: Concepción de la Piedra (cpiedra@fjd.es)

En este trabajo nos hemos centrado en los efectos producidos por el bazedoxifeno sobre el hueso. Pero nos parece también interesante señalar que el bazedoxifeno se ha descubierto como efectivo agente terapéutico en el cáncer humano colono-rectal¹⁰. También en el tratamiento del cáncer de mama¹¹, del cáncer gastrointestinal¹² y del adenocarcinoma gástrico¹³.

Centrándonos en los efectos sobre el hueso, Keating y cols.¹⁴ observaron que el bazedoxifeno reducía la incidencia de nuevas fracturas vertebrales en pacientes con osteoporosis y también la incidencia de fracturas no vertebrales en pacientes de alto riesgo. Por otra parte, es un medicamento muy bien tolerado, sin efectos nocivos sobre el endometrio o el tejido mamario⁷.

El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar en detalle los efectos del bazedoxifeno sobre la calidad ósea utilizando un modelo experimental de ratas ovariectomizadas y un tratamiento a largo plazo (8 meses). Se estudió la densitometría ósea lumbar y femoral, los parámetros microtomográficos trabeculares y corticales, los marcadores bioquímicos de remodelado de formación y resorción, y los parámetros biomecánicos del hueso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 45 ratas Wistar hembras de 6 meses de edad del animalario de la Fundación Jiménez Díaz que fueron mantenidas en condiciones estables de temperatura de 22°C, ciclos de 12 horas de luz y oscuridad y con acceso libre a comida y agua. La comida se administró mediante una dieta completa para ratas y ratones (Panlab®, Barcelona, España). El peso medio de las ratas al comienzo del estudio fue de 333,6±32 g (media ± desviación estándar).

Las ratas se dividieron al azar en 3 grupos:

1. Grupo SHAM (n=15): ratas en las que se simuló la ovariectomía; 2. Grupo OVX (n=15): ratas ovariectomizadas; 3. Grupo OVX + BZD (n=15): ratas ovariectomizadas a las que se les administró 0,33 mg/kg/día de bazedoxifeno mediante sonda oral durante 8 meses. El tratamiento comenzó el día posterior a la ovariectomía y se mantuvo durante 8 meses. Todos los tratamientos se realizaron de acuerdo con los estándares comunitarios europeos sobre el cuidado y uso de los animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz.

El fármaco que se administró como bazedoxifeno fue Conbriza® (Pfizer). Fue donado amablemente por Laboratorios Pfizer. La dosis se calculó en base al tratamiento indicado para la osteoporosis en humanos, 20 mg/día por vía oral. De este modo, la dosis de bazedoxifeno empleada en nuestras ratas fue 0,33 mg/kg/día mediante sonda oral. El vehículo utilizado fue 0,3 ml de agua en cada animal.

Las ratas fueron anestesiadas para la cirugía mediante inyección intramuscular de 0,7 ml de una mezcla 1:2 de 2 g/ml de hidrocloreuro de xilacina (Rompun®) y 50 mg/ml de ketamina (Ketolar®). Una vez anestesiadas, fueron inmovilizadas de las cuatro extremidades y se rasuró la zona a intervenir. La posición final del animal fue decúbito supino, apoyado sobre el dorso o espalda. La cirugía de ovariectomía bilateral se realizó a través de una incisión abdominal. Para la extirpación de los ovarios se identificaron los cuernos uterinos, fijados al ovario por un extremo y al útero por otro. Se establecieron las ligaduras a ambos lados del ovario, seccionando y extirpando los mismos. Una vez extirpados los ovarios se suturó la incisión realizada. Transcurridos los 8 meses de tratamiento,

se pesaron las ratas y se sacrificaron mediante exsanguinación por punción cardíaca bajo anestesia con isofluorano (Forane®). Mediante punción cardíaca se obtuvieron las muestras de sangre, que fueron centrifugadas a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos para obtener el suero. Dicho suero se separó en alícuotas y se congeló a -80°C hasta la posterior determinación de los parámetros de remodelado óseo.

Las ratas fueron congeladas -20°C, tras la extracción de su sangre, hasta la medición de la densidad mineral ósea. El día previo a la realización de dicha medición las ratas se metieron en una nevera a 4°C para su descongelación. Una vez descongeladas, se amputaron los fémures derechos e izquierdos con la ayuda de pinzas y bisturí. Una vez extraídos y limpios, se realizó la densitometría mineral ósea de los fémures izquierdos y columnas vertebrales a nivel de L2, L3 y L4.

Densitometría ósea

Se procedió a la determinación de la densidad mineral ósea (DMO) del fémur izquierdo y de la columna vertebral a nivel de L2, L3 y L4, por densitometría de doble energía de rayos X (DXA). Para ello se utilizó un aparato denominado Piximus (Hologic®, QDR-1000 TM), que es un densitómetro específico para animales y muestras pequeñas.

El escaneo de la DMO se realizó en todo el fémur y en las tres vertebrales completas (L2, L3, L4) y los resultados se expresaron como la media de los valores obtenidos. Los coeficientes de variación de esta técnica intra e interensayo fueron <0,53% y <1,2%, respectivamente.

Tras esta medición, los fémures se envolvieron en gasas empapadas con suero fisiológico y se mantuvieron congelados a -20°C hasta la realización de la microtomografía computarizada. Los fémures derechos se guardaron del mismo modo para la realización del test biomecánico. Se ha comprobado que en estas circunstancias el hueso no muestra variaciones significativas en sus propiedades mecánicas durante al menos 7 u 8 meses. De igual modo, no se han observado variaciones cuando las muestras se someten hasta en 5 ocasiones a períodos cortos de congelación-descongelación¹⁵.

Marcadores bioquímicos de remodelado óseo

Las muestras de sangre se descongelaron para determinar los marcadores bioquímicos de remodelado óseo.

Marcadores bioquímicos de formación ósea:

- Osteocalcina (BGP): se utilizó un inmunoensayo colorimétrico (ELISA) comercial específico para la determinación de los niveles de osteocalcina en ratas (Rat-MID™ Osteocalcin, IDS, Reino Unido). La sensibilidad del ensayo fue de 50 ng/ml, y los coeficientes de variación intra e interensayo <5,0% y <6,6%, respectivamente.

- Própeptido aminoterminal del procolágeno I (PINP): se utilizó un enzimoensayo (ELISA) comercial específico para determinar las concentraciones de PINP en ratas (Rat/Mouse PINP, IDS, Reino Unido). La sensibilidad del método fue de 0,7 ng/ml, y los coeficientes de variación intra e interensayo <5% y <8,2%, respectivamente.

Marcador bioquímico de resorción ósea:

- Telopeptido carboxiterminal del colágeno tipo I (CTX): se utilizó un ELISA específico para ratas (RatLaps CTX-I ELISA, IDS, Reino Unido). La sensibilidad del ensayo fue de 2,0 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo del método fueron <5,6% y <10,5%, respectivamente.

Microtomografía

Los fémures izquierdos de las ratas se enviaron a la Universidad de Oviedo para el estudio de la microarquitectura ósea a partir de las imágenes de microtomografía computarizada (micro-CT) adquiridas en las muestras de hueso. Dicho análisis se realizó en la metafisis distal del fémur y en un anillo de hueso cortical de la diáfisis del mismo.

Todas las muestras se escanearon en un microtomógrafo de rayos X de sobremesa modelo SkyScan 1174 (Bruker, Kontich, Bélgica). Las muestras se colocaron con el eje largo perpendicular al suelo del portamuestras y a la fuente de rayos X. Las imágenes se obtuvieron en las siguientes condiciones: voltaje de la fuente de rayos X: 50 KV; intensidad de la fuente de rayos X: 800 μ A; utilización de filtro de aluminio de 1 mm; resolución: 17,1 μ m; paso de rotación de la muestra: 0,4°; rotación total: 180°; *frame averaging*: 2; tiempo de exposición: 11.000 ms; tiempo aproximado de escaneado por muestra: 3 horas y 50 minutos. Se obtuvieron 930 tomogramas en formato TIFF de cada muestra.

La corrección de campo plano se llevó a cabo al principio de cada escaneo. Los tomogramas obtenidos del escaneado de las muestras se reconstruyeron mediante el algoritmo de Feldkamp modificado en la aplicación NRecon versión 1.6.9.16 (Bruker microCT, Kontich, Bélgica). Los parámetros óptimos seleccionados fueron: *ring artefact reduction*: 8; *beam hardening correction*: 30; *smoothing*: 1.

Los parámetros de escaneo y de reconstrucción utilizados fueron los mismos para todas las muestras. Tras la reconstrucción, se seleccionaron mediante la aplicación CTAn versión 1.14.4.1 (Bruker, Kontich, Bélgica) dos volúmenes de interés (VOI) distintos en los que realizar la determinación de las propiedades microestructurales y de la densidad mineral ósea. En el caso del hueso trabecular, se seleccionó un VOI comenzando a 1 mm del cartilago de crecimiento de la metafisis distal del fémur (tomado como sección de referencia) y ocupando 3,4 mm en dirección proximal (un total de 200 imágenes), excluyendo para el análisis el hueso cortical. Para el análisis de hueso cortical, se vuelve a tomar como referencia el cartilago de crecimiento de la metafisis distal, comenzando el VOI a 14 mm del mismo y abarcando 2,5 mm (150 imágenes). El análisis estructural de los VOI se lleva a cabo con el software proporcionado con el equipo (CTAn versión 1.14.4.1). Una vez obtenidos los resultados de los parámetros microestructurales, se utilizó el programa CTVol 2.2.3.0 (Bruker, Kontich, Bélgica) para visualizar los modelos tridimensionales creados con CTAn mediante el algoritmo *Marching cubes* 33.

Para el hueso trabecular se determinaron los parámetros morfométricos estándares de hueso esponjoso mediante un análisis en 3D de las trabéculas.

A continuación, se detallan los parámetros estudiados para el hueso trabecular.

Relaciones de superficies y volumen:

La fracción volumétrica ósea (BV/TV) refleja a la perfección la pérdida o ganancia de hueso en los distintos grupos. Se obtiene a partir de los índices morfométricos básicos volumen de hueso (*bone volume*, BV) y volumen de interés total (*total volume of interest*, TV). Se expresa comúnmente en porcentaje. La superficie total del hueso trabecular (BS), se mide mediante triangulación de la superficie del objeto. Su relación con el volumen de interés analizado se conoce como densidad de la superfi-

cie ósea (BS/TV). Se expresa en mm^{-1} , al ser el cociente entre una unidad de superficie y una unidad de volumen. La superficie específica ósea (BS/BV) expresa la relación entre la superficie total del hueso trabecular con el volumen ocupado únicamente por hueso mineralizado. Al igual que la variable anterior se expresa en mm^{-1} .

Índices métricos directos:

El grosor trabecular (Tb.Th) se calcula a partir de un método que ocupa con esferas la estructura analizada por transformación de la distancia. Se expresa habitualmente en mm o μ m. La separación trabecular (Tb.Sp) se calcula del mismo modo, pero esta vez ocupando las cavidades medulares. Se expresa en mm o μ m. El número trabecular (Tb.N) implica el número de veces que se atraviesan las trabéculas por unidad de longitud por una vía arbitraria a través del volumen de interés. El método consiste en lanzar una línea que atraviese la región de interés y contar cuántas veces atraviesa trabéculas. Se expresa en mm^{-1} .

Índices no métricos directos:

El factor de patrón trabecular (Tb.Pf) describe cuantitativamente la conectividad trabecular. Es un índice de conectividad inverso (a mayor valor de Tb.Pf menos conectadas están las trabéculas) basado en el cálculo de un índice de convexidad o concavidad relativa de la superficie ósea total, en el cual la concavidad de las superficies trabeculares implica conectividad, mientras que la convexidad indica estructuras desconectadas y aisladas. A mayor valor del Tb.Pf la red trabecular muestra una peor conectividad, que lleva implícita una disminución de la resistencia mecánica. Se expresa en $\text{mm}^{-1.16}$. El índice de modelo estructural (SMI) indica la prevalencia relativa de trabéculas en forma de placa (*plate-like*) o en forma de tubo (*rod-like*), indicando mayor presencia de placas cuanto más se acerca el valor a cero¹⁷. Se define en un intervalo de valores de 0 a 3, donde 0 es una estructura en forma de placa ideal y 3 un cilindro. El grado de anisotropía (DA) es una medida de la simetría del objeto o de la presencia/ausencia de estructuras alineadas en una determinada dirección. Se trata de una variable adimensional. Cero es la isotropía total y 1 la anisotropía total. Las distintas variables se midieron directamente utilizando métodos descritos en la literatura^{18,19}.

En la región cortical se realizaron dos análisis distintos. El primero (separación endostio-periostio) nos permitió calcular el volumen total, el volumen de hueso y el volumen medular. En el segundo reportamos la porosidad del hueso cortical.

Separación endostio-periostio: El volumen total de la sección transversal dentro del periostio (VIP) es el valor medio del volumen ocupado por hueso y médula ósea en las secciones transversales analizadas. Se expresa en mm^3 . Un valor bajo de VIP nos indica que hay menos formación ósea y más reabsorción, y al contrario si nos encontramos con un valor alto. El volumen de hueso cortical (Ct.BV) es el valor medio del volumen ocupado por hueso en las secciones transversales analizadas. Se expresa en mm^3 . El volumen medular (Md.V) es el valor medio del volumen ocupado por la médula ósea en las secciones transversales analizadas. Se expresa en mm^3 . Este valor nos indica lo contrario que VIP.

Parámetros de porosidad estudiados: El volumen del hueso cortical excluyendo los poros (Ct.BV); el *ratio* entre la superficie cortical y el volumen del hueso cortical sin poros (Ct.BS/BV); y la porosidad del hueso cortical (Ct.B.Po).

Biomecánica

Los fémures derechos de las ratas permanecieron congelados a -80°C y se descongelaron con anterioridad al ensayo mecánico para una correcta preparación. El ensayo se realizó en una máquina universal de ensayos. Se configuró un ensayo de flexión a 3 puntos, con una distancia entre soportes de 17,6 mm y un diámetro de indentador de 5,6 mm. La fuerza se aplicó en la dirección perpendicular al eje del hueso, en la región de la diáfisis, con una velocidad de aplicación de 10 mm/min (0,17 mm/s). Se obtuvo una curva carga-desplazamiento para cada muestra y se calculó el diámetro de la diáfisis a partir del promedio de 6 medidas diferentes, para minimizar el efecto de la variabilidad.

Parámetros biomecánicos analizados:

A partir de la curva resultante de cada experimento se han determinado diferentes parámetros indicadores de las características mecánicas de las muestras²⁰: la fuerza máxima de flexión en el momento del fallo mecánico; el desplazamiento en el momento del fallo mecánico; la rigidez extrínseca; la energía de rotura; la tensión máxima; la deformación máxima; y el módulo de Young.

Análisis estadístico

Los resultados se han expresado como media \pm desviación estándar (DE) de los diferentes parámetros. Los grupos de tratamiento han sido comparados mediante el test de Mann-Whitney para muestras no emparejadas (Medcal, Bélgica). Las diferencias se han considerado significativas a partir de un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

La figura 1 muestra los resultados obtenidos en la densidad mineral ósea femoral (DMOF) y lumbar (DMOL) de las ratas estudiadas. La ovariectomía produjo un descenso significativo de la densidad ósea en fémur y columna. El tratamiento con bazedoxifeno recuperó parcialmente la densidad lumbar, pero no la femoral.

La figura 2 muestra los niveles de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo en los grupos de ratas estudiadas. Como era de esperar, los marcadores de formación y resorción ósea (BGP, PINP y CTX) experimenta-

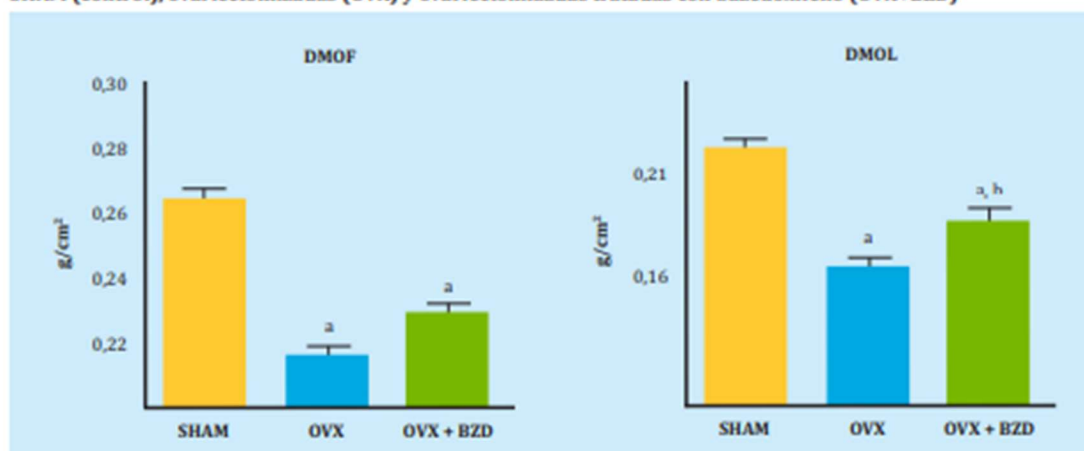
ron un aumento significativo tras la ovariectomía. El tratamiento con bazedoxifeno recuperó los niveles basales de BGP y de PINP, sin variaciones significativas en los niveles de CTX.

La figura 3 muestra una serie de parámetros microestructurales cuantitativos estudiados. La fracción volumétrica ósea (BV/TV) y la densidad de superficie ósea (BS/TV) disminuyeron tras la ovariectomía, recuperándose parcialmente tras el tratamiento con bazedoxifeno. El bazedoxifeno recuperó también parcialmente el aumento en la separación trabecular (Tb.Sp) producido por la ovariectomía, así como la disminución en el número de trabéculas (Tb.N), sin ejercer acciones sobre el espesor trabecular (Tb.Th).

La figura 4 muestra las variables no métricas Tb.Pf y SMI y las cuantitativas Conn.Dn y DA en los grupos de ratas estudiados. El factor de patrón trabecular Tb.Pf aumentó significativamente en las ratas ovariectomizadas, indicando una importante pérdida de conectividad trabecular tras la ovariectomía. El tratamiento con bazedoxifeno corrigió parcialmente esta pérdida. La ovariectomía aumentó también significativamente el índice de modelo estructural SMI, indicando una prevalencia de trabéculas en forma de tubo en comparación con las ratas control, con prevalencia de trabéculas en forma de placa. El tratamiento con bazedoxifeno corrigió también parcialmente esta variación. El grado de anisotropía disminuyó significativamente tras la ovariectomía, aumentando tras el tratamiento con bazedoxifeno a valores superiores a los de las ratas controles.

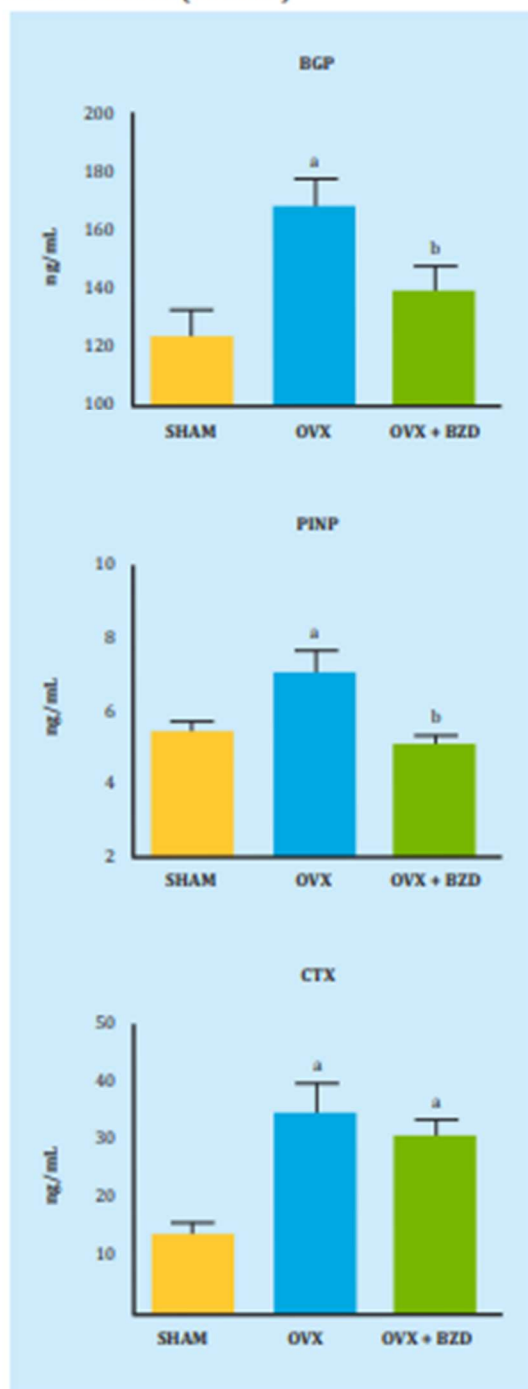
La figura 5 muestra los resultados del volumen de hueso + médula ósea (VIP), hueso cortical (Ct.BV) y volumen medular (Md.V) en la cortical. El volumen de hueso + médula no pareció variar significativamente tras la ovariectomía, pero fue menor en las ratas ovariectomizadas tratadas con bazedoxifeno, lo que parece indicar una influencia de la falta de ovarios no resuelta por este fármaco. El volumen de hueso cortical (Ct.BV) disminuyó significativamente tras la ovariectomía, no ejerciendo acción positiva el bazedoxifeno. El volumen de médula ósea (Md.V) aumentó tras la ovariectomía, permaneciendo constante tras el tratamiento con bazedoxifeno.

Figura 1. Densidad mineral ósea femoral (DMOF) y densidad mineral ósea lumbar (DMOL) en los 3 grupos de ratas SHAM (control), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas tratadas con bazedoxifeno (OVX+BZD)



DMOF. a: OVX vs. SHAM, $p < 0,01$; OVX+BZD vs. SHAM, $p < 0,01$; DMOL. a: OVX vs. SHAM, $p < 0,01$; OVX+BZD vs. SHAM, $p < 0,05$; b: OVX+BZD vs. OVX, $p < 0,05$.

Figura 2. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo: osteocalcina (BGP), propéptido aminoterminal del procolágeno I (PINP) y telopéptido carboxiterminal del colágeno I (CTX) en los 3 grupos de ratas SHAM (control), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas tratadas con bazedoxifeno (OVX+BZD)



BGP: a: OVX vs. SHAM, $p < 0,01$, b: OVX+BZD vs. OVX, $p < 0,01$; **PINP:** a: OVX vs. SHAM, $p < 0,01$, b: OVX+BZD vs. OVX, $p < 0,01$; **CTX:** a: OVX vs. SHAM $p < 0,01$; OVX+BZD vs. SHAM $p < 0,01$.

El volumen de hueso cortical disminuyó tras la ovariectomía ($p < 0,05$), no ejerciendo ninguna acción el bazedoxifeno. La superficie relativa cortical aumentó tras la ovariectomía ($p < 0,05$), normalizándose tras el tratamiento con bazedoxifeno. La porosidad (Ct.B.Po) disminuyó significativamente tras la ovariectomía ($p < 0,001$), no produciendo variaciones el tratamiento con bazedoxifeno.

El desplazamiento máximo, la rigidez, el trabajo de rotura, la tensión máxima y el módulo de Young no variaron con la ovariectomía ni con el trabajo de rotura. La fuerza máxima de flexión en el momento del fracaso mecánico disminuyó con la ovariectomía ($p < 0,05$), como era de esperar, sin ejercer efecto el bazedoxifeno. La deformación máxima antes de la rotura disminuyó con la ovariectomía ($p < 0,05$), recuperándose con el tratamiento con bazedoxifeno.

Con respecto a los pesos de las ratas, al final del experimento el grupo SHAM pesaba 380 ± 25 g, el grupo OVX 475 ± 30 g (OVX vs. SHAM, $p < 0,01$) y el grupo tratado con bazedoxifeno 425 ± 15 g (BZD vs. SHAM, $p < 0,05$; BZD vs. OVX, $p < 0,05$). La ovariectomía hizo ganar peso a las ratas y el tratamiento con bazedoxifeno amortiguó parcialmente dicha ganancia.

DISCUSIÓN

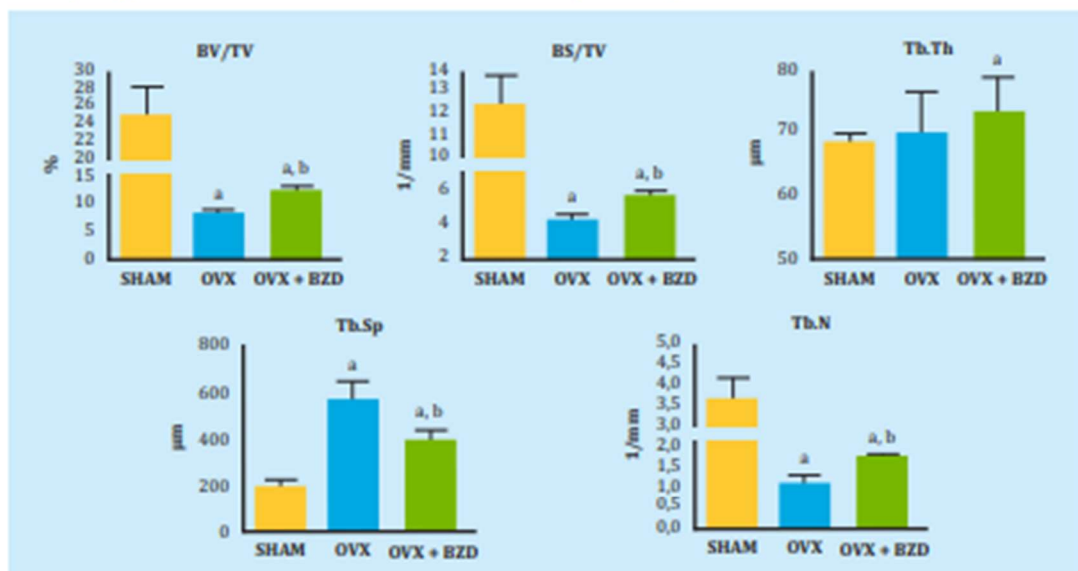
De acuerdo con nuestros resultados, el tratamiento con bazedoxifeno recuperó parcialmente la densidad ósea lumbar, pero no la femoral.

Coincidiendo con ello, Barrionuevo y cols.²¹ realizaron un estudio incluyendo 107 ensayos clínicos en que se podía concluir que existía una reducción significativa de las fracturas vertebrales con el bazedoxifeno. Del mismo modo, Jin y cols.²², estudiando 41 artículos de ensayos clínicos desde 2015 hasta 2019, concluyeron que el bazedoxifeno previene las fracturas vertebrales. Peng y cols.²³ realizando una revisión sistemática de estudios desarrollados durante 3 y 7 años, y Palacios y cols.²⁴, en un estudio realizado durante 7 años, observaron que la incidencia de nuevas fracturas vertebrales fue menor en mujeres tratadas con bazedoxifeno que en el grupo placebo.

Con respecto a los marcadores bioquímicos de remodelado óseo, nuestros resultados muestran un descenso del mismo en los niveles de BGP y PINP tras el tratamiento con bazedoxifeno, aunque sin cambios en el PINP. Coincidiendo con nuestros resultados, Bueno y cols.²⁵ observaron en un estudio realizado en 7.492 pacientes que el bazedoxifeno redujo el remodelado óseo en mujeres postmenopáusicas latinas afectadas de osteoporosis. A este respecto es importante señalar que, no solo la disminución de la densidad mineral ósea, sino también el aumento de remodelado óseo está asociado a un incremento en el riesgo de fractura²⁶, y que los cambios en los niveles de osteocalcina a los 6 meses de tratamiento predijeron los cambios observados a los 2 años en la densidad mineral ósea²⁷.

En cuanto a la calidad ósea, de acuerdo a los parámetros de la microtomografía, nuestros resultados mostraron efectos positivos del tratamiento con bazedoxifeno sobre los parámetros trabeculares BV/TV, BS/TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N, Tb.Pf, SMI, DA y Md.V y sobre el cortical Ct.BS/BV, aunque no en todos los casos se recuperaron los valores basales de las ratas control, pero sí mejoran con respecto a las ovariectomizadas.

Figura 3. Fracción volumétrica ósea (BV/TV), densidad de superficie ósea (BS/TV), espesor trabecular (Tb.Th), separación trabecular (Tb.Sp) y número de trabéculas (Tb.N) en los 3 grupos de ratas SHAM (control), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas tratadas con bazedoxifeno (OVX+BZD)



BV/TV. a: OVX vs. SHAM $p < 0,01$; OVX+BZD vs. SHAM, $p < 0,05$; b: OVX+BZD vs. OVX, $p < 0,05$; BS/TV. a: OVX vs. SHAM $p < 0,01$; OVX+BZD vs. SHAM, $p < 0,05$; b: OVX+BZD vs. OVX, $p < 0,05$; Tb.Th. a: OVX+BZD vs. SHAM, $p < 0,05$; Tb.Sp. a: OVX vs. SHAM $p < 0,01$; OVX+BZD vs. SHAM, $p < 0,05$; b: OVX+BZD vs. OVX, $p < 0,05$; Tb.N. a: OVX vs. SHAM $p < 0,01$; OVX+BZD vs. SHAM, $p < 0,05$; b: OVX+BZD vs. OVX, $p < 0,05$.

Saito y cols.²⁸ estudiaron monos adultos hembras ovariectomizadas a las que se suministró 0,2 o 0,5 mg/kg de bazedoxifeno durante 18 meses. Los niveles de *cross-links* inmaduros y maduros, BV/TV, y Tb.Th fueron mayores en el grupo tratado con bazedoxifeno que en el ovariectomizado. Sin embargo, el SMI fue menor en el grupo tratado con bazedoxifeno que en el grupo ovariectomizado. El tratamiento con bazedoxifeno previno el deterioro de los niveles de *cross-links* enzimáticos inmaduros, en los productos avanzados de glicosilación y en propiedades estructurales como el BV/TV, Tb.Th y Tb.Pf, que controlan significativamente la fuerza ósea del tejido trabecular.

Con respecto a los parámetros biomecánicos, en nuestro trabajo observamos que el bazedoxifeno ejerció también una acción positiva con respecto a las ratas ovariectomizadas sobre la deformación máxima a la que es sometido el fémur al realizar sobre el mismo una fuerza.

Por último, el bazedoxifeno produjo una acción positiva sobre el aumento de peso que experimentaron las ratas tras la ovariectomía, siendo menor que el experimentado por las ratas ovariectomizadas, aunque incrementado con respecto a las controles.

La mayoría de estudios sobre los efectos del bazedoxifeno lo hacen sobre las fracturas vertebrales, como los que hemos comentado anteriormente^{14,22-24}. Algunos autores como Reginster y cols.²⁹ confirman que el bazedoxifeno es también capaz de reducir el riesgo de fracturas no vertebrales en mujeres con alto riesgo de padecer osteoporosis. Autores como Yavropoulou y cols.⁵ observaron tras el tratamiento con bazedoxifeno un aumento de la BMD lumbar pero no de la BMD de cadera, pero, al igual que Reginster²⁹, sí observaron una disminución del riesgo de fracturas no vertebrales en el caso de mujeres postmenopáusicas de alto riesgo.

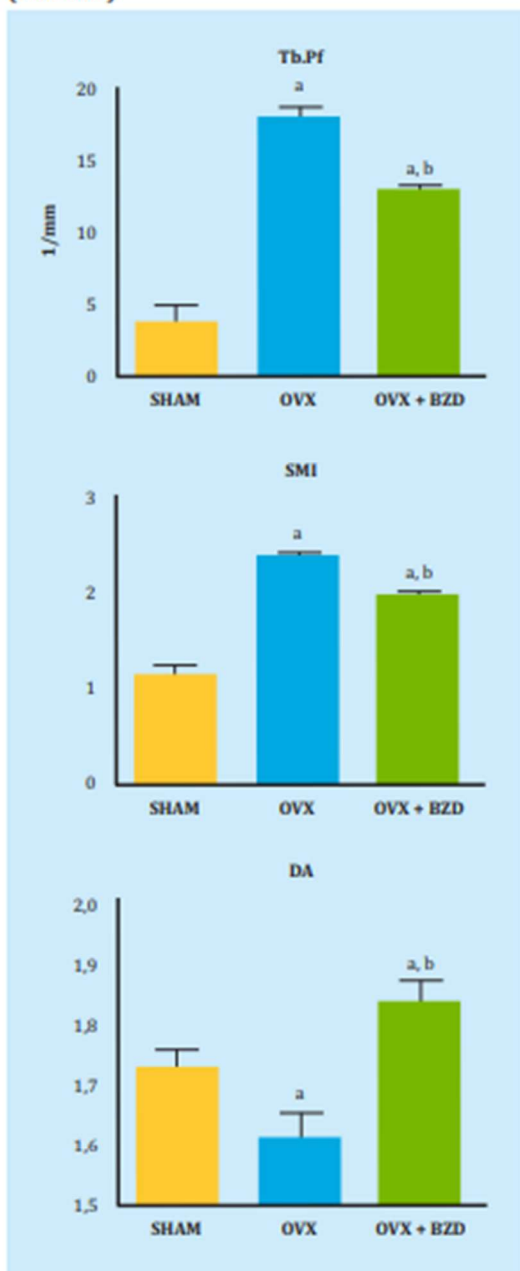
En relación al efecto comparativo ejercido por el bazedoxifeno y otros fármacos, en un meta-análisis realizado sobre

48.000 pacientes, Liu y cols.³⁰ observaron que el alendronato y el risendronato ejercían un efecto positivo mayor que el bazedoxifeno sobre la osteoporosis, pero con más efectos adversos. Gatti y cols.³¹ afirman que el bazedoxifeno es tan efectivo como el raloxifeno en prevenir la pérdida ósea en mujeres con osteoporosis y en reducir la incidencia de nuevas fracturas vertebrales. Otros autores como Ellis y cols.³² consideran que el bazedoxifeno es comparable a los bifosfonatos para prevenir las fracturas vertebrales entre las mujeres con osteoporosis postmenopáusica de alto riesgo.

En un trabajo realizado por nuestro grupo³³ administramos ácido zoledrónico a ratas ovariectomizadas y conseguimos efectos muy superiores de aumento de la DMO lumbar y femoral sobre las ratas no tratadas que en el caso del bazedoxifeno. Las condiciones de edad de las ratas y tiempo de ovariectomía eran totalmente similares a las de este trabajo, por lo que los resultados pueden ser comparados. Autores como Yavropoulou y cols.⁵ afirman que el bazedoxifeno no parece ofrecer ventajas significativas sobre otros agentes antirresortivos, pero considerando la necesidad de tratamientos de larga duración para la osteoporosis, es un fármaco que tiene un puesto en el esquema terapéutico a largo plazo para combatir esta enfermedad. Autores como Gatti y cols.³¹ sugieren que, debido a su particular perfil, el bazedoxifeno se puede considerar como una terapia de segunda línea para mujeres entre 65 y 70 años donde los bifosfonatos estén contraindicados o sean mal tolerados. Estos autores piensan que el bazedoxifeno puede también tener su puesto como terapia en primer lugar en mujeres postmenopáusicas más jóvenes para el manejo de su menopausia y la prevención de la osteoporosis, y que se podría prescribir solo o con estrógenos conjugados.

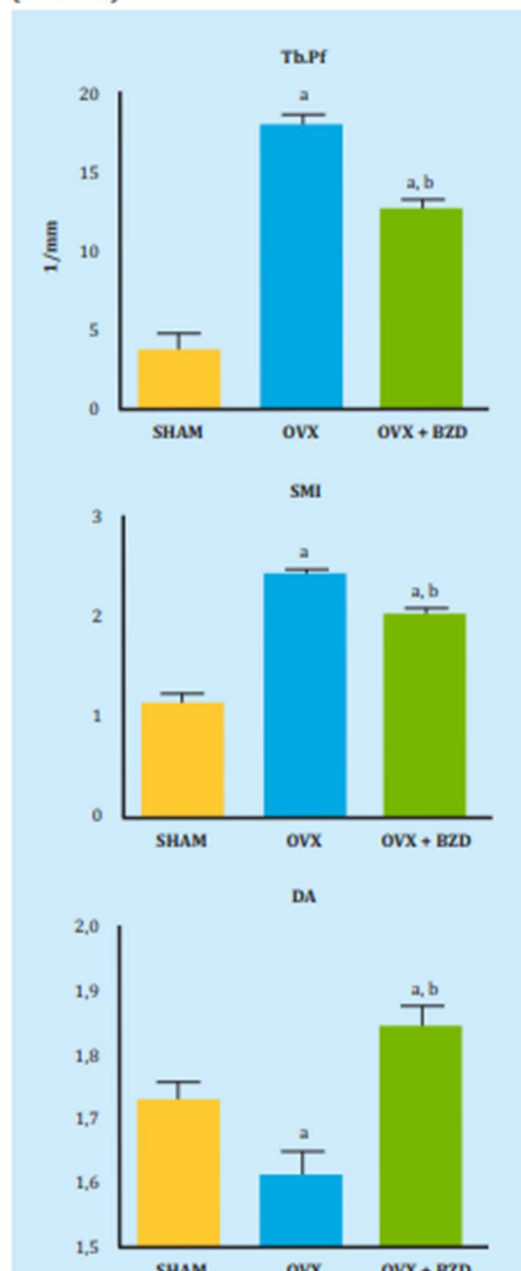
Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III, ayuda PI12/01472, FEDER.

Figura 4. Factor de patrón trabecular (Tb.Pf), índice de modelo estructural (SMI) y grado de anisotropía (DA). En los 3 grupos de ratas SHAM (control), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas tratadas con bazedoxifeno (OVX+BZD)



Tb.Pf. a: OVX vs. SHAM, $p < 0,01$; OVX+BZD vs. SHAM, $p < 0,05$, b: OVX+BZD vs. OVX, $p < 0,05$; **SMI.** a: OVX vs. SHAM, $p < 0,01$; OVX+BZD vs. SHAM, $p < 0,05$, b: OVX+BZD vs. OVX, $p < 0,01$; **DA.** a: OVX vs. SHAM, $p < 0,05$; OVX+BZD vs. SHAM, $p < 0,01$, b: OVX+BZD vs. OVX, $p < 0,01$.

Figura 5. Volumen de hueso + médula ósea (VIP), hueso cortical (Ct.BV) y volumen medular (Md.V) en la cortical. En los 3 grupos de ratas SHAM (control), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas tratadas con bazedoxifeno (OVX+BZD)



Ct.BV. a: OVX vs. SHAM, $p < 0,05$; OVX+BZD vs. SHAM, $p < 0,05$; **Md.V.** a: OVX vs. SHAM, $p < 0,01$.



Conflicto de intereses: Lo autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

- Riggs L, Hartmann LC. Selective estrogen receptor modulators. Mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med*. 2003;348: 618-29.
- Martin F, Barbancho MC. Clinical pharmacology of selective estrogen receptor modulators (SERMs). In: Cano A, Calaf J, Dueñas JL, eds. *Selective estrogen receptor modulators. A new brand of multi target drugs*. New York: Springer; 2006. p. 49-65.
- Stump AI, Kelley KW, Wenzel TM. Bazedoxifene, a third generation selective estrogen modulator for treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ann Pharmacother*. 2007;41:833-9.
- Pinkerton JW, Conner EA. Beyond estrogen: advances in tissue selective estrogen complexes and selective estrogen receptor modulators. *Climateric*. 2019; 22:140-7.
- Yavropoulou MP, Makras P, Anastasilakis AD. Bazedoxifene for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20:1201-10.
- McKeand W. Pharmacokinetics, dose proportionality and bioavailability of bazedoxifene in healthy postmenopausal women. *Clin Ther*. 2017;39:1769-79.
- Sanchez Borrego R, Lugo Salcedo F. Bazedoxifeno. Primer SERM de 3ª generación. Seguridad endometrial y en mama. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2010;2 (Supl. 5):S13-8.
- Pinkerton JW. Tissue-selective estrogen complex for menopausal hormone therapy. *Clin Obstet Gynecol*. 2018;61:463-9.
- Flores VA, Stachenfeld NS, Taylor HS. Bazedoxifene-conjugated estrogens for treating endometriosis. *Obstet Gynecol*. 2018;132:475-7.
- Wei J, Ma L, Lai YH, Zhang R, Li H, Li C, et al. Bazedoxifene as a novel GP130 inhibitor for colon cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):63.
- Tian J, Chen X, Fu S, Zhang R, Pan L, Cao Y, et al. Bazedoxifene is a novel IL6/GP130 inhibitor for treating triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;175:553-66.
- Thilakasiri P, Huynh J, Poh AR, Tan CW, Nero TL, Tran K, et al. Repurposing the selective estrogen receptor modulator bazedoxifene to suppress gastrointestinal cancer growth. *EMBO Mol Med*. 2019;11:pil e9539.
- Burkhardt C, Bühler L, Tihy M, Morel P, Forni M. Bazedoxifene as a novel strategy for treatment of pancreatic and gastric adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2019;10:3198-202.
- Keating GM, Lyseng-Williamson KA, Duggan ST, McKeage K. Bazedoxifene: a guide to its use in postmenopausal osteoporosis. *Drugs Aging*. 2012;29:329-34.
- Borchers RE, Gibson LJ, Burchardt H, Hayes WC. Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials*. 1995;16:545-51.
- Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G. Trabecular bone pattern factor: A new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone*. 1992;13:327-30.
- Hildebrand T, Rüegsegger P. Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. *Comput Methods Biomech Biomed Eng*. 1997; 1:15-23.
- Hildebrand T, Rüegsegger P. A new method for the model independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microsc*. 1997;185:67-75.
- Ulrich D, van Rietbergen B, Laib A, Rüegsegger P. The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone*. 1999;25:55-60.
- Ritchie O, Koester KJ, Ionova S, Yao W, Lane NE, Ager JW 3rd. Measurement of the toughness of bone: a tutorial with special reference to small animal studies. *Bone*. 2008;43:798-812.
- Barrionuevo P, Kapoor E, Asi N, Alahdab F, Mohamed K, Benkhadra K, et al. Efficacy of pharmacological therapies for the prevention of fractures in postmenopausal women: a network meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019; 104:1623-30.
- Jin YZ, Lee JH, Xu B, Cho M. Effects of medications on prevention of secondary osteoporotic vertebral compression fracture, non-vertebral fracture, and discontinuation due to adverse events: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Musculoskeletal Disord*. 2019;20(1):399.
- Peng L, Luo Q, Lu H. Efficacy and safety of bazedoxifene in postmenopausal women with osteoporosis. A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(49):e8659.
- Palacios S, Silverman SL, de Villiers TJ, Levine AB, Goemaere S, Brown JP, et al. A 7-year randomized, placebo-controlled trial assessing the long-term efficacy and safety of bazedoxifene in postmenopausal women with osteoporosis and fracture. *Menopause*. 2015;22:806-13.
- Bueno JAH, Arias L, Yu CR, Williams R, Komm BS. Efficacy and safety of bazedoxifene in postmenopausal Latino women with osteoporosis. *Menopause*. 2017;24:1033-9.
- Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat BD, Theelmas PD. Bone markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res*. 2000;15:1526-36.
- Delmas PD, Hardy P, Garnero P, Dai H. Monitoring individual response to hormone replacement therapy with bone markers. *Bone*. 2000;26:553-60.
- Saito M, Kida Y, Nishizawa T, Arakawa S, Okabe H, Seki A, et al. Effects of 18-month treatment with bazedoxifene on enzymatic immature and mature cross-links and non-enzymatic advanced glycation end products, mineralization and trabecular microarchitecture of vertebra in ovariectomized monkeys. *Bone*. 2015;81:573-80.
- Reginster JY, Ferrari S, Hadji P. Current challenges in the treatment of osteoporosis: an opportunity for bazedoxifene. *Curr Med Res Opin*. 2014;30:1165-76.
- Liu GF, Wang ZQ, Liu L, Zhang BT, Miao YY, Yu SN. A network meta-analysis on the short-term efficacy and adverse events of different anti-osteoporosis drugs for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Cell Biochem*. 2018;119:4469-81.
- Gatti D, Rossini M, Sblendorio I, Lello S. Pharmacokinetic evaluation of bazedoxifene for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9:883-92.
- Ellis AG, Reginster JY, Luo X, Cappelleri JC, Chines A, Sutradhar S, et al. Indirect comparison of bazedoxifene vs oral bisphosphonates for the prevention of vertebral fractures in postmenopausal osteoporotic women. *Curr Med Res Opin*. 2014;30:1617-26.
- Martin-Fernández M, Gómez-Chinchón M, Álvarez-Galovich L, Torrubia B, Diaz-Curiel M, Guede D, et al. Effects of long-term preventive treatment with strontium ranelate and zoledronic acid on bone quality in ovariectomized rats. *Am J Clin Exp Med*. 2016; 4:191-200.

Effects of bazedoxifene treatment on the bone quality of ovariectomized rats

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000100004>

Torrubia B¹, Martín Fernández M¹, Rubert M², Gómez-Chinchón M¹, Recio Visado P³, De la Piedra C¹

¹ Biochemical Research. Institute for Medical Research. Jimenez Diaz Foundation. Madrid (Spain)

² Hospital Support Team. Palliative Care. Mostoles University Hospital. Mostoles. Madrid (Spain)

³ Department of Physiology. Faculty of Pharmacy. Complutense University of Madrid. Madrid (Spain)

Date of receipt: 02/12/2019 - Date of acceptance: 25/02/2020

Summary

Objective: Bazedoxifene is a 3rd generation SERM with agonistic effects on the bones, uterus and breast tissue. Our goal has been to study the effects of bazedoxifene on bone quality of an experimental group of ovariectomized rats.

Material and methods: 3 groups of 15 6-month-old Wistar female rats were used: a control group, a group of untreated ovariectomized rats and a group of ovariectomized rats treated with bazedoxifene (0.33 mg/kg/day). After 8 months we studied the lumbar and femur bone densitometry, the microtomographic parameters, the biochemical markers for bone remodelling and the bone biomechanical parameters.

Results: The ovariectomy depleted the femur and lumbar bone density. After receiving bazedoxifene, the lumbar bone density showed partial healing. Bone remodelling increased recovering bazedoxifene formation levels. Bazedoxifene promoted the recovery of the bone volume fraction (BV/TV), the bone surface density (BS/BV), the trabecular number (Tb.N), the trabecular spacing (Tb.Sp), the trabecular pattern factor (Tb.Pf) and the structural model index (SMI). The cortical surface increased after the ovariectomy and returned to normal levels with the administration of bazedoxifene. The maximum deformation showed before the ovariectomy was also restored, partially cushioning the ovariectomized rats' weight gain.

Conclusions: Our study has shown bazedoxifene positive results on bone quality. This specific drug could be particularly suitable for young postmenopausal women suffering or at risk of suffering osteoporosis.

Key words: bazedoxifene, bone mineral density, bone remodelling, microtomography, biomechanics, endometrial safety.

INTRODUCTION

Selective estrogen-receptor modulators (SERMs) are synthetic, nonsteroidal agents with estrogenic agonist-antagonist activity in different target tissues¹. Their estrogenic responses are mediated by estrogen receptors (α and β). SERMs may present agonistic or antagonistic behavior depending on the tissue type^{2,3}. In general, SERMs exhibit agonist activity in the liver, the digestive tube, the skeleton and the heart, but antagonist activity in the breast. In the uterus some SERMs manifest agonist activity while others show an antagonist behavior¹. Several co-regulatory proteins modify the behavior of the SERMs on gene expression and contribute to their tissue-selective pharmacology.

Tamoxifen is a SERM used as a mammary antiestrogen for preventing and treating breast cancer with estrogen agonistic activity in the uterus. Raloxifene has been used for the prevention and treatment of osteoporosis and prevents breast cancer but presents some estrogenic activity⁴. Bazedoxifene is a 3rd generation SERM with agonistic effects on the bone and additional positive effects on lipids, the uterus and the breast tissue^{5,6}.

Due to its estrogen agonistic activity on the bone, raloxifene and bazedoxifene are used to treat osteoporosis. Bazedoxifene has the advantage of a greater endometrial safety, therefore it is as well widely used in combination with conjugated equine estrogens for the treatment of endometriosis⁷⁻⁹.



Correspondence: Concepción de la Piedra (cpiedra@fjd.es)

Our study focuses on the effects produced by bazedoxifene on the bone. However, we find it interesting to point out that bazedoxifene has also been identified as an effective therapeutic agent against human colorectal cancer¹⁰, breast cancer¹¹, gastrointestinal cancer¹² and gastric adenocarcinoma¹³.

Regarding the effects on the bone, Keating et al.¹⁴ found that bazedoxifene reduced the rates of new vertebral fractures in patients affected by osteoporosis, as well as the rates of non-vertebral fractures in high-risk patients. Moreover, it is a very well-tolerated drug, without adverse effects on the endometrium or breast tissue⁷.

The purpose of our research was to study the effects of bazedoxifene on the bone quality in detail, using an experimental group of ovariectomized rats and long-term treatment (8 months). We examined the lumbar and femoral bone densitometry, the microtomographic trabecular and cortical parameters, the biochemical markers reflecting bone formation and bone resorption and the bone biomechanical parameters.

MATERIAL AND METHODS

45 6-month-old Wistar female rats from the Jimenez Diaz Foundation animal facility were used. These rats were kept at a constant temperature of 22°C, observing 12-hour light-dark cycles and with free access to food and drink. The food was a complete diet for rats and mice (Panlab®, Barcelona, España). The average weight of the rats at the beginning of the study was 333.6±32 g (mean ± standard deviation).

The rats were randomly divided in 3 groups:

1. SHAM group (n=15): the ovariectomy was simulated; 2. OVX group (n=15): ovariectomized rats; OVX + BZD group (n=15): ovariectomized rats, administered 0.33 mg/kg/day of bazedoxifene using a feeding tube for 8 months. The treatment started the day after the ovariectomy had been performed and continued during the following 8 months. Every single treatment was administered according to the EU directives on the protection of animals used for scientific purposes and were approved by the ethics committee of the Institute for Health Research of the Jimenez Diaz Foundation.

The bazedoxifene drug was Conbriza® (Pfizer), donated by Pfizer Laboratories. The dosage was calculated based on the recommended treatment for osteoporosis in humans, 20 mg/day taken orally, therefore the dose of bazedoxifene we used on our rats was 0.33 mg/kg/day through a feeding tube and 0.3 ml of water for each animal.

For surgery, the rats were anaesthetized via intramuscular injections of 0.7 ml of a 1:2 mixture of 2 g/ml of xylazine hydrochloride (Rompun®) and 50 mg/ml of ketamine (Ketalar®). Once anesthetized, all four limbs were immobilized and the area to be operated on was clipped. The animals were in the supine position, leaning on their backs. The bilateral ovariectomy surgery was carried out through an abdominal incision. To remove the ovaries, the uterine horns were identified, one end attached to the ovary and the other to the uterus. When ties were established on either side of the ovary, we proceeded to section and remove them. Once this process finished, the incision was stitched. After 8 months of treatment, the rats were weighed and sacrificed via exsanguination by a heart perfusion under anaesthesia with Isoflurane (Forane®). Through this perfusion, we obtained the blood samples that would be centrifuged

at 3,000 r.p.m. for 15 minutes to obtain the serum. This serum was divided into aliquots and frozen at -80°C, up to the moment the bone remodelling parameters were to be determined.

After extracting their blood, the rats were frozen at -20°C until bone mineral density measurement had to be taken. The day before such procedure, the rats were introduced in a fridge at -20°C in order to thaw. Then their right and left femur were amputated using scalpel and tweezers. Once the femurs were extracted and cleaned, we performed a bone mineral densitometry on the left femur and spine at L2, L3 and L4 levels.

Bone densitometry

We proceeded to the determination of the bone mineral densitometry (BMD) of the left femur and the spine at L2, L3 and L4 levels, undergoing a dual-energy X-Ray densitometry (DXA). We used a machine called Piximus (Hologic®, QDR-1000 TM), a specific densitometer for animal and small samples.

The BMD scanning was carried out on the femur entirely and on the whole three vertebrae (L2, L3 and L4), and the results were expressed as the average of the obtained values. The inter- and intra-assay coefficients of variability were <0.53% and <1.2% respectively.

After taking this measurement, the femurs were wrapped in gauze soaked in physiological saline solution and kept frozen at -20°C until the computerized microtomography was carried out. The right femurs were kept in the same way for biomechanical testing. In these circumstances, the mechanical properties of the bone were not found to significantly change for at least 7 or 8 months. Likewise, no variations have been observed after samples go through up to 5 short freezing-thawing periods¹⁵.

Biochemical markers of bone remodeling

Blood samples were thawed to determine biochemical markers of bone remodeling.

Biochemical markers of bone formation:

- Osteocalcin (BGP): a specific commercial colorimetric immunoassay (ELISA) was used for the determination of osteocalcin levels in rats (Rat-MID™ Osteocalcin, IDS, UK). The sensitivity of the assay was 50 ng/ml, and the inter- and intra-assay coefficients of variability were <5.0% and <6.6%, respectively.

- Procollagen I amino-terminal propeptide (PINP): a specific commercial enzyme immunoassay (ELISA) was used to determine concentrations of PINP in rats (Rat/Mouse PINP, IDS, UK). The sensitivity of the method was 0.7 ng/ml, and the inter- and intra-assay coefficients of variability <5% and <8.2%, respectively.

Biochemical marker of bone resorption:

- Type I collagen carboxy-terminal telopeptide (CTX): a rat-specific ELISA (RatLaps CTX-I ELISA, IDS, UK) was used. The sensitivity of the assay was 2.0 ng/ml and the inter- and intra-assay coefficients of variability of this method were <5.6% and <10.5% respectively.

Microtomography

The left femurs of the rats were sent to the University of Oviedo to study the bone microarchitecture from the computerized microtomography (micro-CT) images got from the bone samples. This analysis was performed in the distal metaphysis of the femur and in a cortical bone ring of its diaphysis.

All samples were scanned on a SkyScan 1174 desktop X-Ray microtomograph (Bruker, Kontich, Belgium). The samples were placed with the long axis perpendicular both to the base of the sample holder and to the X-Ray source. The images were obtained under the following conditions: voltage of the X-Ray source: 50 kV; X-Ray source intensity: 800 μ A; use of 1 mm aluminum filter; resolution: 17.1 μ m; sample rotation step: 0.4°; total rotation: 180°; frame averaging: 2; exposure time: 11,000 ms; approximate scanning time per sample: 3 hours and 50 minutes. 930 tomograms in TIFF format were obtained from each sample.

The flat-field correction was carried out at the beginning of every scan. The tomograms obtained from scanning the samples were reconstructed using the Feldkamp algorithm, modified in the NRecon application, version 1.6.9.16 (Bruker microCT, Kontich, Belgium). The optimal parameters selected were: ring artefact reduction: 8; beam hardening correction: 30; smoothing: 1.

The scanning and reconstruction parameters used were the same for all samples. After the reconstruction, two different volumes of interest (VOI) were selected using the CTAn application, version 1.14.4.1 (Bruker, Kontich, Belgium) in which to determine the microstructural properties and bone mineral density. In the case of the trabecular bone, a VOI was selected starting at 1 mm from the growth cartilage of the distal metaphysis of the femur (taken as reference section) and occupying 3.4 mm in the proximal direction (a total of 200 images), excluding the cortical bone to be analyzed. For cortical bone analysis, the growth cartilage of the distal metaphysis is again taken as a reference, starting the VOI at 14 mm from it and covering 2.5 mm (150 images). The structural analysis of the VOI is carried out with the software provided with the equipment (CTAn version 1.14.4.1). Once the results of the microstructural parameters were obtained, the CTVol 2.2.3.0 program (Bruker, Kontich, Belgium) was used to visualize the three-dimensional models created with CTAn using the Marching cubes 33 algorithm.

For the trabecular bone, standard cancellous bone morphometric parameters were determined by a 3D analysis of the trabeculae.

The parameters studied for the trabecular bone are detailed below.

Surface and volume relationships:

The bone volume fraction (BV/TV) perfectly reflects the bone loss or gain in the different groups. It is obtained from the basic morphometric indexes, bone volume (BV) and total volume of interest (TV). It is commonly expressed as a percentage. The total area of the trabecular bone (BS) is measured by triangulating the surface of the object. Its relationship with the volume of interest analyzed is known as bone surface density (BS/TV). It is expressed in mm^{-2} , as it is the quotient between an area unit and a volume unit. The bone specific surface (BS/BV) expresses the relationship between the total area of the trabecular bone with the volume occupied only by mineralized bone. Like the previous variable, it is also expressed in mm^{-1} .

Direct metric indices:

The trabecular thickness (Tb.Th) is calculated following a method that occupies with spheres the structure analyzed by distance transformation. It is usually expressed in mm or μ m. The trabecular separation (Tb.Sp) is calculated in the same way, but this time occupying the medullary cavities. It is expressed in mm or μ m. The tra-

becular number (Tb.N) means the number of times trabeculae are traversed by an arbitrary path through the volume of interest per unit length. The method is to launch a line through the region of interest and count how many times it crosses trabeculae. It is expressed in mm^{-1} .

Direct non-metric indices:

The trabecular pattern factor (Tb.Pf) quantitatively describes trabecular connectivity. It is an inverse connectivity index (the higher the Tb.Pf value, the less connected the trabeculae are) based on the calculation of a relative convexity or concavity index of the total bone surface, in which the concavity of the trabecular surfaces implies connectivity, while convexity indicates disconnected and isolated structures. The higher the Tb.Pf value, the worse connectivity the trabecular network shows, which implies a decrease in mechanical resistance. It is expressed in mm^{-1} .¹⁶ The structural model index (SMI) shows the relative prevalence of plate-like or rod-like trabeculae, indicating more presence of plates the closer its value get to zero.¹⁷ It is defined in a range of values from 0 to 3, where 0 is an ideal plate-shaped structure and 3 is a cylinder. The degree of anisotropy (DA) is a measure of the symmetry of the object or the presence/absence of structures aligned in a certain direction. It is a dimensionless variable. Zero is total isotropy and 1 is total anisotropy. The different variables were directly measured using methods described in the bibliography.^{18,19}

Two different analyses were carried out in the cortical region. The first one (endosteum-periosteum separation) allowed us to calculate total volume, bone volume and medullary volume. In the second one we report the porosity of the cortical bone.

Endosteum-periosteum separation: the total volume of the cross section inside the periosteum (VIP) is the mean value of the volume occupied by bone and bone marrow in the analyzed cross sections. It is expressed in mm^3 . A low VIP value indicates that there is less bone formation and more resorption, and the other way round if we find a high value. Cortical bone volume (Ct.BV) is the mean value of the volume occupied by bone in the analyzed cross sections. It is expressed in mm^3 . The medullary volume (Md.V) is the mean value of the volume occupied by the bone marrow in the analyzed cross sections. It is expressed in mm^3 . This value indicates the opposite of VIP.

Porosity parameters studied: cortical bone volume excluding pores (Ct.BV); the ratio between the cortical surface and the volume of the cortical bone without pores (Ct.BS/BV); and the porosity of the cortical bone (Ct.B.Po).

Biomechanics

The right femurs of the rats remained frozen at -80°C and were thawed prior to the mechanical test for proper preparation. The test was carried out on a universal testing machine. A 3-point bending test was set up, with a spacing of 17.6 mm and an indenter diameter of 5.6 mm. The force was applied perpendicularly to the axis of the bone, in the region of the diaphysis, with an application speed of 10 mm/min (0.17 mm/s). We obtained a load-displacement curve for each sample and we proceeded to calculate the diameter of the diaphysis from the average of 6 different measurements, to minimize the effect of variability.

Analyzed biomechanical parameters:

From the curve resulting from each experiment, different parameters indicating the mechanical character-

istics of the samples have been determined²⁰: maximum bending force at the time of mechanical failure; displacement at the time of mechanical failure; extrinsic stiffness; breaking energy; maximum tension; maximum deformation; and Young's modulus.

Statistic analysis

The results have been expressed as mean \pm standard deviation (SD) of the different parameters. The treatment groups have been compared using the Mann-Whitney test for unpaired samples (Medcal, Belgium). Differences have been considered significant from a value of $p < 0.05$.

RESULTS

Figure 1 shows the results obtained in the femur bone mineral density (FBMD) and lumbar bone mineral density (LBMD) of the rats studied. Ovariectomy produced a significant decrease in bone density in the femur and spine. Bazedoxifene treatment partially recovered lumbar density, but not femur density.

Figure 2 shows the levels of the biochemical markers of bone remodeling in the groups of rats studied. As expected, markers of bone formation and resorption (BGP, PINP, and CTX) experienced a significant increase after ovariectomy. Bazedoxifene treatment recovered the basal levels of BGP and PINP, without significant variations in CTX levels.

Figure 3 shows a series of studied quantitative microstructural parameter. Bone volume fraction (BV/TV) and bone surface density (BS/TV) decreased after the ovariectomy, partially recovering after the treatment with bazedoxifene. Bazedoxifene also partially recovered the increase in the trabecular separation (Tb.Sp) produced by the ovariectomy, as well as the decrease in the trabecular number (Tb.N), without acting on trabecular thickness (Tb.Th).

Figure 4 shows the non-metric variables Tb.Pf and SMI and the quantitative variables Conn.Dn and DA in the groups of the studied rats. The trabecular pattern factor Tb.Pf increased significantly in the ovariectomized rats, indicating a significant loss of trabecular connectivity after the ovariectomy. Bazedoxifene treatment

partially corrected this loss. The ovariectomy also significantly increased the structural model index SMI, indicating a prevalence of rod-shaped trabeculae, compared to control rats, with a prevalence of plate-shaped trabeculae. Bazedoxifene treatment also partially corrected this variation. The degree of anisotropy decreased significantly after the ovariectomy, increasing after treatment with bazedoxifene to values higher than that of the control rats.

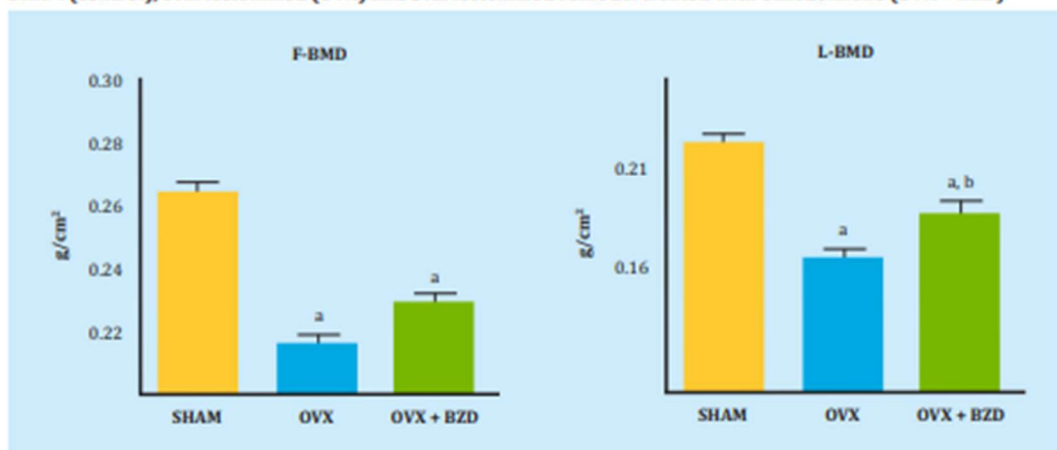
Figure 5 shows the results of bone volume + bone marrow (VIP), cortical bone (Ct.BV) and medullary volume (Md.V) in the cortical. Bone + marrow volume did not seem to have varied significantly after the ovariectomy, but it was lower in the ovariectomized rats treated with bazedoxifene, suggesting an unresolved ovarian failure influenced by this drug. Cortical bone volume (Ct.BV) decreased significantly after the ovariectomy, with bazedoxifene not exerting a positive action. Medullary volume (Md.V) increased after the ovariectomy, remaining constant after bazedoxifene treatment.

Cortical bone volume decreased after the ovariectomy ($p < 0.05$), with bazedoxifene treatment not producing any effects. The relative cortical surface increased after the ovariectomy ($p < 0.05$), normalizing after treatment with bazedoxifene. The porosity (Ct.B.Po) decreased significantly after the ovariectomy ($p < 0.001$), with bazedoxifene treatment not producing variations.

Maximum displacement, stiffness, break work, maximum tension, and Young's modulus did not vary with the ovariectomy or the break work. The maximum bending force at the time of mechanical failure decreased with the ovariectomy ($p < 0.05$), as expected, with no effect from bazedoxifene. The maximum deformation before rupture decreased with the ovariectomy ($p < 0.05$), recovering with bazedoxifene treatment.

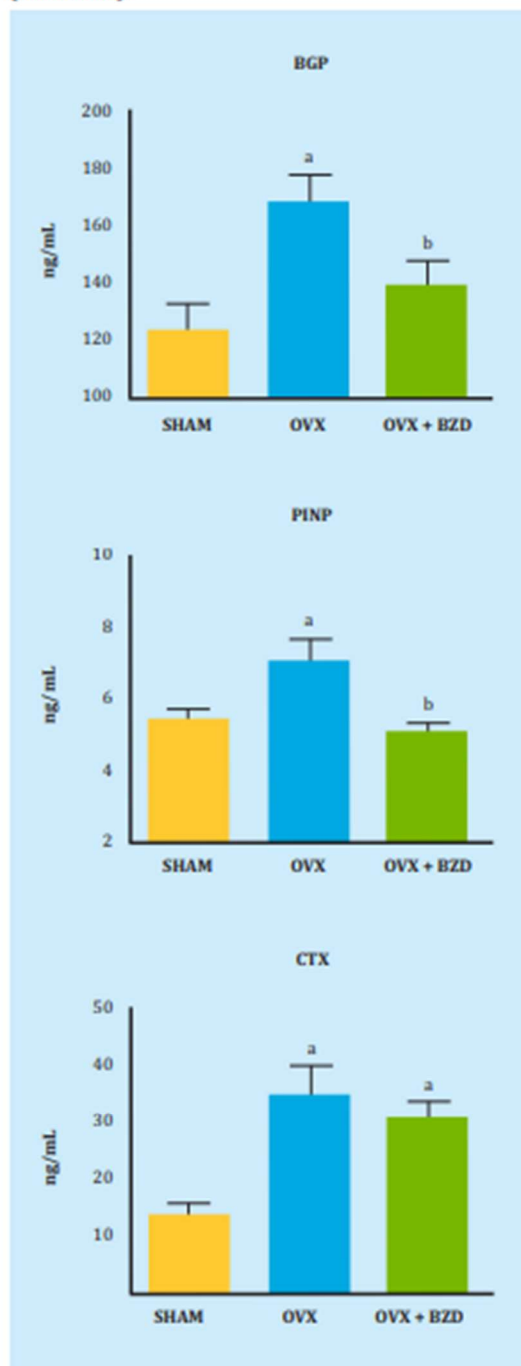
Regarding the weights of the rats, at the end of the experiment the SHAM group weighed 380 ± 25 g, the OVX group 475 ± 30 g (OVX vs SHAM, $p < 0.01$) and the group treated with bazedoxifene 425 ± 15 g (BZD vs SHAM, $p < 0.05$; BZD vs OVX, $p < 0.05$). The ovariectomy made the rats gain weight and the treatment with bazedoxifene partially cushioned this gain.

Figure 1. Femoral bone mineral density (F-BMD) and lumbar bone mineral density (L-BMD) in the 3 groups of rats: SHAM (control), ovariectomized (OVX) and ovariectomized remodel treated with bazedoxifene (OVX + BZD)



F-BMD: a: OVX vs SHAM, $p < 0.01$; OVX+BZD vs SHAM, $p < 0.01$; **L-BMD:** a: OVX vs SHAM, $p < 0.01$; OVX+BZD vs SHAM, $p < 0.05$, b: OVX+BZD vs OVX, $p < 0.05$.

Figure 2. Biochemical markers of bone remodelling: osteocalcin (BGP), aminoterminal procollagen I propeptide (PINP) and carboxyterminal collagen I telopeptide (CTX) in the 3 groups of rats: SHAM (control), ovariectomized (OVX) and ovariectomized treated with bazedoxifene (OVX + BZD)



BGP: a: OVX vs SHAM, $p < 0.01$, b: OVX+BZD vs OVX, $p < 0.01$; **PINP:** a: OVX vs SHAM, $p < 0.01$, b: OVX+BZD vs OVX, $p < 0.01$; **CTX:** a: OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs SHAM $p < 0.01$.

DISCUSSION

According to our results, bazedoxifene treatment partially recovered lumbar bone density, but not femur bone density.

Coinciding with this, Barrionuevo et al.²³ conducted a study including 107 clinical trials in which it could be concluded that there was a significant reduction in vertebral fractures with bazedoxifene. Similarly, Jin et al.²², studying 41 articles from clinical trials from 2015 to 2019, concluded that bazedoxifene prevents vertebral fractures. Peng et al.²³ conducting a systematic review of studies carried out over 3 and 7 years, and Palacios et al.²⁴, in a study carried out over 7 years, observed that the incidence of new vertebral fractures was lower in women treated with bazedoxifene than in the placebo group.

Regarding the biochemical markers of bone remodeling, our results show a decrease in the same in BGP and PINP levels after treatment with bazedoxifene, although without changes in PINP. Coinciding with our results, Bueno et al.²⁵ observed in a study carried out in 7,492 patients that bazedoxifene reduced bone remodeling in postmenopausal Latino women affected by osteoporosis. In this regard, it is important to note that not only the decrease in bone mineral density, but also the increase in bone remodeling is associated with an increased risk of fracture²⁶, and that changes in osteocalcin levels after 6 months of treatment predicted the changes in bone mineral density observed after 2 years²⁷.

Regarding bone quality, according to the parameters of the microtomography, our results showed positive effects from the treatment with bazedoxifene on the trabecular parameters BV/TV, BS/TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N, Tb.Pf, SMI, DA and Md.V and on the cortical Ct.BS/BV, although the basal values of the rats from the control group were not recovered in all cases, but they did improve compared to the ovariectomized ones.

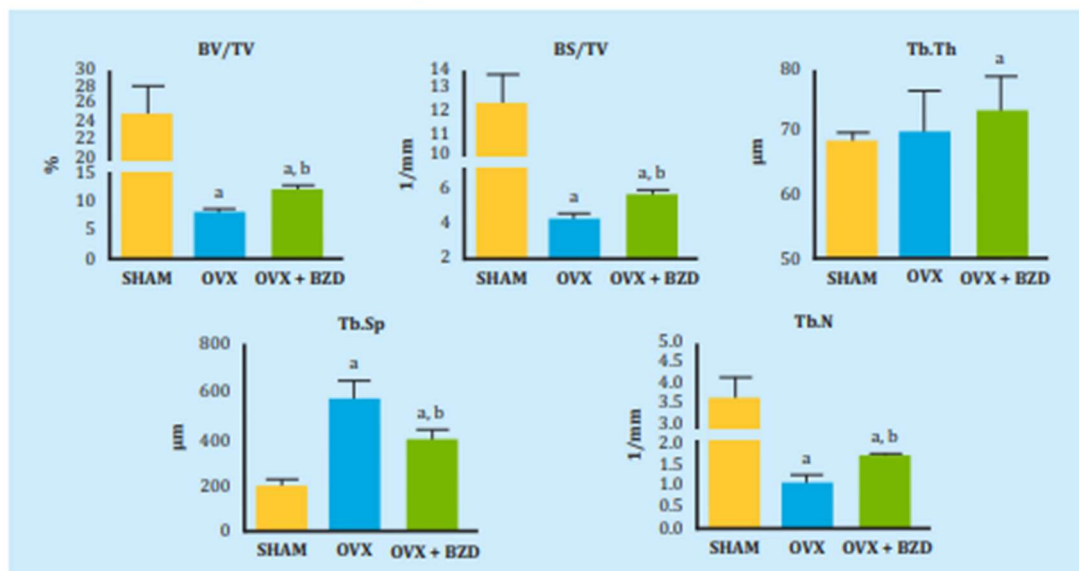
Saito et al.²⁸ studied ovariectomized female adult monkeys who were administered 0.2 or 0.5 mg/kg bazedoxifene for 18 months. The levels of immature and mature cross-links, BV/TV, and Tb.Th were higher in the group treated with bazedoxifene than in the ovariectomized group. However, the SMI was lower in the group treated with bazedoxifene than in the ovariectomized group. Bazedoxifene treatment prevented the deterioration of immature enzyme cross-link levels, in advanced glycosylation products, and in structural properties such as B/TV, Tb.Th, and Tb.Pf, which significantly control the bone strength of trabecular tissue.

Regarding biomechanical parameters, we observed in our study that bazedoxifene also exerted a positive action regarding the ovariectomized rats on the maximum deformation to which the femur is subjected when performing a force on it.

Lastly, bazedoxifene produced a positive action on the weight gain experienced by rats after the ovariectomy, being a lesser weight gain than the experienced by ovariectomized rats, although higher than the experienced by the rats in the control group.

Most studies on the effects of bazedoxifene focus on vertebral fractures, such as those previously discussed^{14,22-24}. Some authors such as Reginster et al.²⁹ confirm that bazedoxifene also reduces non-vertebral fracture risk in women with a high risk of suffering os-

Figure 3. Bone volume fraction (BV/TV), bone surface density (BS/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular spacing (Tb.Sp) and trabecular number (Tb.N) in the 3 groups of rats: SHAM (control), ovariectomized (OVX) and ovariectomized treated with bazedoxifene (OVX + BZD)



BV/TV. a: OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs SHAM, $p < 0.05$, b: OVX+BZD vs OVX, $p < 0.05$; **BS/TV.** a: OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs SHAM, $p < 0.05$, b: OVX+BZD vs OVX, $p < 0.05$; **Tb.Th.** a: OVX+BZD vs SHAM, $p < 0.05$; **Tb.Sp.** a: OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs SHAM, $p < 0.05$, b: OVX+BZD vs OVX, $p < 0.05$; **Tb.N.** a: OVX vs SHAM $p < 0.01$; OVX+BZD vs SHAM, $p < 0.05$, b: OVX+BZD vs OVX, $p < 0.05$.

teoporosis. Authors such as Yavropoulou et al.⁵ observed an increase in lumbar BMD but not hip BMD after the treatment with bazedoxifene, but, like Reginster²⁹, they did observe a decrease in the risk of non-vertebral fractures in high-risk postmenopausal women.

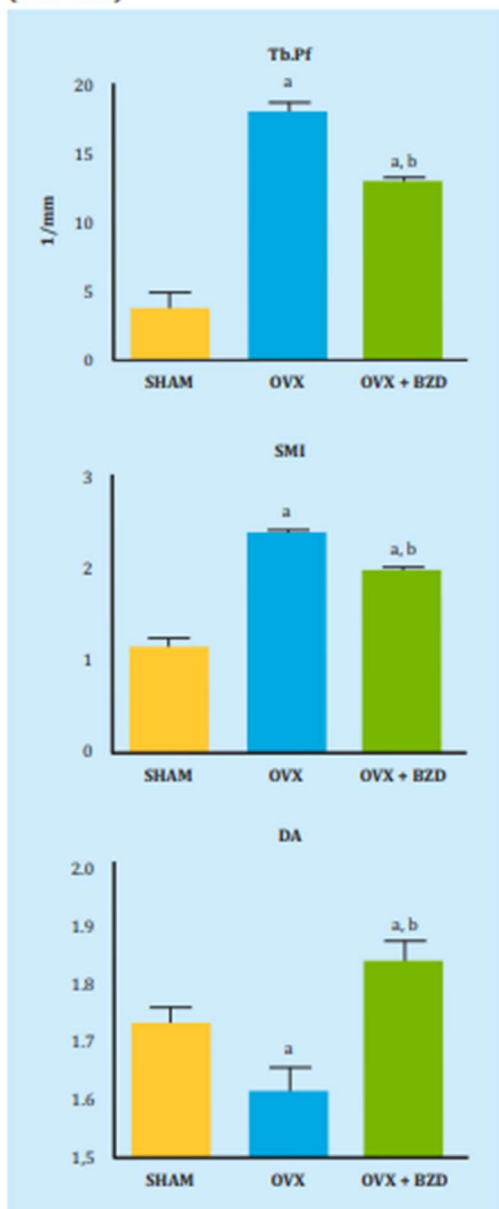
Regarding the comparative effect exerted by bazedoxifene and other drugs, in a meta-analysis carried out on 48,000 patients, Liu et al.³⁰ observed that alendronate and risendronate produced a greater positive effect than bazedoxifene on osteoporosis, but with more side effects. Gatti et al.³¹ report that bazedoxifene is as effective as raloxifene in preventing bone loss in women with osteoporosis and in reducing the frequency of new vertebral fractures. Other authors such as Ellis et al.³² consider that bazedoxifene is comparable to bisphosphonates to prevent vertebral fractures among women with high-risk postmenopausal osteoporosis.

In a study carried out by our group³³, we administered zoledronic acid to ovariectomized rats and we obtained much greater effects on increasing lumbar and femoral BMD on untreated rats than in the case of baze-

doxifene. The rats' age conditions and ovariectomy time were totally similar to those in this study, so the results can be compared. Authors like Yavropoulou et al.⁵ state that bazedoxifene does not seem to offer significant advantages over other antiresorptive agents, but considering the need for long-term treatments for osteoporosis, it is a drug that has a place in the long-term therapeutic scheme to combat this sickness. Authors such as Gatti et al.³¹ suggest that, due to its particular profile, bazedoxifene can be considered as a second-line therapy for women between 65 and 70 years of age where bisphosphonates are contraindicated or poorly tolerated. These authors think that bazedoxifene may also be a first-place therapy in younger postmenopausal women to deal with their menopause and the prevention of osteoporosis, and that it could be prescribed alone or with conjugated estrogens.

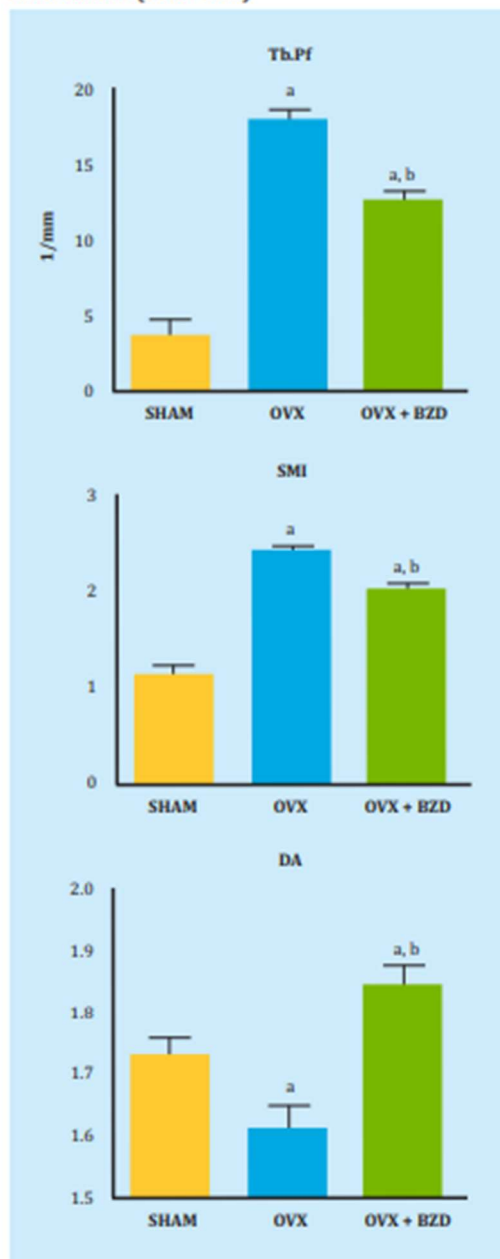
Acknowledgments: This research has been funded by Carlos III Health Institute, aid P112/01472, FEDER.

Figure 4. Trabecular pattern factor (Tb.Pf), structural model index (SMI) and degree of anisotropy (DA). In the 3 groups of SHAM rats (control), ovariectomized (OVX) and ovariectomized rats treated with bazedoxifene (OVX + BZD)



Tb.Pf. a: OVX vs SHAM, $p < 0.01$; OVX+BZD vs SHAM, $p < 0.05$, b: OVX+BZD vs OVX, $p < 0.05$; **SMI.** a: OVX vs SHAM, $p < 0.01$; OVX+BZD vs SHAM, $p < 0.05$, b: OVX+BZD vs OVX, $p < 0.01$; **DA.** a: OVX vs SHAM, $p < 0.05$; OVX+BZD vs SHAM, $p < 0.01$, b: OVX+BZD vs OVX, $p < 0.01$.

Figure 5. Bone volume + bone marrow (VIP), cortical bone (Ct.BV) and medullary volume (Md.V) in the cortical in the 3 groups of rats: SHAM (control), ovariectomized (OVX) and ovariectomized rats treated with bazedoxifene (OVX + BZD)



Ct.Bv. a: OVX vs SHAM, $p < 0.05$; OVX+BZD vs SHAM, $p < 0.05$; **Md.V.** a: OVX vs SHAM, $p < 0.01$.

Bibliography

1. Riggs L, Hartmann LC. Selective estrogen receptor modulators: Mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med*. 2003;348: 618-29.
2. Martín F, Barbancho MC. Clinical pharmacology of selective estrogen receptor modulators (SERMs). In: Cano A, Calaf J, Dueñas JL, eds. *Selective estrogen receptor modulators. A new brand of multi target drugs*. New York: Springer; 2006. p. 49-65.
3. Stump AI, Kelley KW, Wensel TM. Bazedoxifene, a third generation selective estrogen modulator for treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ann Pharmacother*. 2007;41:833-9.
4. Pinkerton JV, Conner EA. Beyond estrogen: advances in tissue selective estrogen complexes and selective estrogen receptor modulators. *Climacteric*. 2019; 22:140-7.
5. Yavropoulou MP, Makras P, Anastasilakis AD. Bazedoxifene for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20:1201-10.
6. McKeand W. Pharmacokinetics, dose proportionality and bioavailability of bazedoxifene in healthy postmenopausal women. *Clin Ther*. 2017;39:1769-79.
7. Sanchez Borrego R, Lugo Salcedo F. Bazedoxifeno. Primer SERM de 3ª generación. Seguridad endometrial y en mama. *Rev Osteopor Metab Miner*. 2010;2 (Supl. 5):S13-8.
8. Pinkerton JV. Tissue-selective estrogen complex for menopausal hormone therapy. *Clin Obstet Gynecol*. 2018;61:463-9.
9. Flores VA, Stachenfeld NS, Taylor HS. Bazedoxifene-conjugated estrogens for treating endometriosis. *Obstet Gynecol*. 2018;132:475-7.
10. Wei J, Ma L, Lai YH, Zhang R, Li H, Li C, et al. Bazedoxifene as a novel GP130 inhibitor for colon cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):63.
11. Tian J, Chen X, Fu S, Zhang R, Pan L, Cao Y, et al. Bazedoxifene is a novel IL6/GP130 inhibitor for treating triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;175:553-66.
12. Thilakasiri P, Huynh J, Poh AR, Tan CW, Nero TL, Tran K, et al. Repurposing the selective estrogen receptor modulator bazedoxifene to suppress gastrointestinal cancer growth. *EMBO Mol Med*. 2019;11:pii e9539.
13. Burkhardt C, Bühler L, Tihy M, Morel P, Forni M. Bazedoxifene as a novel strategy for treatment of pancreatic and gastric adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2019;10:3198-202.
14. Keating GM, Lyseng-Williamson KA, Duggan ST, McKeage K. Bazedoxifene: a guide to its use in postmenopausal osteoporosis. *Drugs Aging*. 2012;29:329-34.
15. Borchers RE, Gibson LJ, Burchardt H, Hayes WC. Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials*. 1995;16:545-51.
16. Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G. Trabecular bone pattern factor: A new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone*. 1992;13:327-30.
17. Hildebrand T, Rüegsegger P. Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. *Comput Methods Biomech Biomed Eng*. 1997; 1:15-23.
18. Hildebrand T, Rüegsegger P. A new method for the model independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microsc*. 1997;185:67-75.
19. Ulrich D, van Rietbergen B, Laib A, Rüegsegger P. The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone*. 1999;25:55-60.
20. Ritchie O, Koester KJ, Ionova S, Yao W, Lane NE, Ager JW 3rd. Measurement of the toughness of bone: a tutorial with special reference to small animal studies. *Bone*. 2008;43:798-812.
21. Barrionuevo P, Kapoor E, Asi N, Alahdab F, Mohamed K, Benkhadra K, et al. Efficacy of pharmacological therapies for the prevention of fractures in postmenopausal women: a network meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019; 104:1623-30.
22. Jin YZ, Lee JH, Xu B, Cho M. Effects of medications on prevention of secondary osteoporotic vertebral compression fracture, non-vertebral fracture, and discontinuation due to adverse events: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Musculoskeletal Disord*. 2019;20(1):399.
23. Peng L, Luo Q, Lu H. Efficacy and safety of bazedoxifene in postmenopausal women with osteoporosis. A systematic review and meta-analysis. *Medicine*. (Baltimore). 2017;96(49):e8659.
24. Palacios S, Silverman SL, de Villiers TJ, Levine AB, Goemaere S, Brown JP, et al. A 7-year randomized, placebo-controlled trial assessing the long-term efficacy and safety of bazedoxifene in postmenopausal women with osteoporosis: effects on bone density and fracture. *Menopause*. 2015;22:806-13.
25. Bueno JAH, Arias L, Yu CR, Williams R, Komm BS. Efficacy and safety of bazedoxifene in postmenopausal Latino women with osteoporosis. *Menopause*. 2017;24:1033-9.
26. Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat BD, Theelmas PD. Bone markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res*. 2000;15:1526-36.
27. Delmas PD, Hardy P, Garnero P, Dai H. Monitoring individual response to hormone replacement therapy with bone markers. *Bone*. 2000;26:553-60.
28. Saito M, Kida Y, Nishizawa T, Arakawa S, Okabe H, Seldi A, et al. Effects of 18-month treatment with bazedoxifene on enzymatic immature and mature cross-links and non-enzymatic advanced glycation end products, mineralization and trabecular microarchitecture of vertebrae in ovariectomized monkeys. *Bone*. 2015;81:573-80.
29. Reginster JY, Ferrari S, Hadji P. Current challenges in the treatment of osteoporosis: an opportunity for bazedoxifene. *Curr Med Res Opin*. 2014;30:1165-76.
30. Liu GF, Wang ZQ, Liu L, Zhang BT, Miao YY, Yu SN. A network meta-analysis on the short-term efficacy and adverse events of different anti-osteoporosis drugs for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Cell Biochem*. 2018;119:4469-81.
31. Gatti D, Rossini M, Sblendorio I, Lello S. Pharmacokinetic evaluation of bazedoxifene for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9:883-92.
32. Ellis AG, Reginster JY, Luo X, Cappelleri JC, Chines A, Sutradhar S, et al. Indirect comparison of bazedoxifene vs oral bisphosphonates for the prevention of vertebral fractures in postmenopausal osteoporotic women. *Curr Med Res Opin*. 2014;30:1617-26.
33. Martín-Fernández M, Gómez-Chinchón M, Álvarez-Galovich L, Torrubia B, Díaz-Curiel M, Guede D, et al. Effects of long-term preventive treatment with strontium ranelate and zoledronic acid on bone quality in ovariectomized rats. *Am J Clin Exp Med*. 2016; 4:191-200.