

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES CLÍNICAS**  
**ODONTOLÓGICAS**



**EFFECTO DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO Y LOS**  
**ESTRÓGENOS EN EL HUESO OSTEOPORÓTICO:**  
**ANÁLISIS MORFOMÉTRICO EN RATAS WISTAR.**  
**ESTUDIO PILOTO.**

**MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**Trabajo de Investigación**

**Madrid, 2018**

**Alba de la Rosa García**

**Tutora: Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil**

## **MÁSTER EN: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

### **COMPROMISO DEONTOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN, REDACCIÓN Y POSIBLE PUBLICACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER (TFM)**

**CENTRO:** Facultad de Odontología UCM

**ESTUDIANTE DE MÁSTER:** Alba de la Rosa García

**TUTOR/ES DEL TFM:** Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil

**TÍTULO DEL TFM:** Efecto de la hormona del crecimiento y los estrógenos en el hueso osteoporótico: Análisis morfométrico en ratas Wistar. Estudio piloto.

**FECHA DE PRIMERA MATRÍCULA:** Septiembre de 2017

**FECHA DE SEGUNDA MATRÍCULA** (en caso de producirse):

#### **1. Objeto**

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster en \_\_\_\_\_Ciencias Odontológicas\_\_\_\_\_ y su Tutor/es y en el que se fijan las funciones de supervisión del citado trabajo de fin de máster (TFM), los derechos y obligaciones del estudiante y de su/s profesor/es tutor/es del TFM y en donde se especifican el procedimiento de resolución de potenciales conflictos, así como los aspectos relativos a los derechos de propiedad intelectual o industrial que se puedan generar durante el desarrollo de su TFM.

#### **2. Colaboración mutua**

El/los tutor/es del TFM y el autor del mismo, en el ámbito de las funciones que a cada uno corresponden, se comprometen a establecer unas condiciones de colaboración que permitan la realización de este trabajo y, finalmente, su defensa de acuerdo con los procedimientos y los plazos que estén establecidos al respecto en la normativa vigente.

### **3. Normativa**

Los firmantes del presente compromiso declaran conocer la normativa vigente reguladora para la realización y defensa de los TFM y aceptan las disposiciones contenidas en la misma.

### **4. Obligaciones del estudiante de Máster**

- Elaborar, consensuado con el/los Tutor/es del TFM un cronograma detallado de trabajo que abarque el tiempo total de realización del mismo hasta su lectura.
- Informar regularmente al Tutor/es del TFM de la evolución de su trabajo, los problemas que se le planteen durante su desarrollo y los resultados obtenidos.
- Seguir las indicaciones que, sobre la realización y seguimiento de las actividades formativas y la labor de investigación, le hagan su tutor/es del TFM.
- Velar por el correcto uso de las instalaciones y materiales que se le faciliten por parte de la Universidad Complutense con el objeto de llevar a cabo su actividad de trabajo, estudio e investigación.

### **5. Obligaciones del tutor/es del TFM**

- Supervisar las actividades formativas que desarrolle el estudiante; así como desempeñar todas las funciones que le sean propias, desde el momento de la aceptación de la tutorización hasta su defensa pública.
- Facilitar al estudiante la orientación y el asesoramiento que necesite.

### **6. Buenas prácticas**

El estudiante y el tutor/es del TFM se comprometen a seguir, en todo momento, prácticas de trabajo seguras, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de medidas necesarias en materia de salud, seguridad y prevención de riesgos laborales.

También se comprometen a evitar la copia total o parcial no autorizada de una obra ajena presentándola como propia tanto en el TFM como en las obras o los documentos literarios, científicos o artísticos que se generen como resultado del mismo. Para tal, el estudiante firmará la Declaración de No Plagio del ANEXO I, que será incluido como primera página de su TFM.

### **7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos**

En el caso de producirse algún conflicto derivado del incumplimiento de alguno de los extremos a los que se extiende el presente compromiso a lo largo del desarrollo de su TFM, incluyéndose la posibilidad de modificación del nombramiento del tutor/es, la coordinación del máster buscará una solución consensuada que pueda ser aceptada por las partes en conflicto. En ningún caso el estudiante podrá cambiar de Tutor directamente sin informar a su antiguo Tutor y sin solicitarlo oficialmente a la Coordinación del Máster.



En el caso de que el conflicto persista se gestionará según lo previsto en el SGIC de la memoria verificada.

## **8. Confidencialidad**

El estudiante que desarrolla un TFM dentro de un Grupo de Investigación de la Universidad Complutense, o en una investigación propia del Tutor, que tenga ya una trayectoria demostrada, o utilizando datos de una empresa/organismo o entidad ajenos a la Universidad Complutense de Madrid, se compromete a mantener en secreto todos los datos e informaciones de carácter confidencial que el Tutor/es del TFM o de cualquier otro miembro del equipo investigador en que esté integrado le proporcionen así como a emplear la información obtenida, exclusivamente, en la realización de su TFM.

Asimismo, el estudiante no revelará ni transferirá a terceros, ni siquiera en los casos de cambio en la tutela del TFM, información del trabajo, ni materiales producto de la investigación, propia o del grupo, en que haya participado sin haber obtenido, de forma expresa y por escrito, la autorización correspondiente del anterior Tutor del TFM.

## **9. Propiedad intelectual e industrial**

Cuando la aportación pueda ser considerada original o sustancial el estudiante que ha elaborado el TFM será reconocido como cotitular de los derechos de propiedad intelectual o industrial que le pudieran corresponder de acuerdo con la legislación vigente.

## **10. Periodo de Vigencia**

Este compromiso entrará en vigor en el momento de su firma y finalizará por alguno de los siguientes supuestos:

- Cuando el estudiante haya defendido su TFM.
- Cuando el estudiante sea dado de baja en el Máster en el que fue admitido.
- Cuando el estudiante haya presentado renuncia escrita a continuar su TFM.
- En caso de incumplimiento de alguna de las cláusulas previstas en el presente documento o en la normativa reguladora de los Estudios de Posgrado de la Universidad Complutense.

La superación académica por parte del estudiante no supone la pérdida de los derechos y obligaciones intelectuales que marque la Ley de Propiedad Intelectual para ambas partes, por lo que mantendrá los derechos de propiedad intelectual sobre su trabajo, pero seguirá obligado por el compromiso de confidencialidad respecto a los proyectos e información inédita del tutor.



## ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

D./Dña. Alba de la Rosa García, con NIF 70068369-L, estudiante de Máster en la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid en el curso 2017-2018, como autor/a del trabajo de fin de máster titulado “Efecto de la hormona del crecimiento y los estrógenos en el hueso osteoporótico: Análisis morfométrico en ratas Wistar. Estudio piloto” y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyo/s tutor/ es/son:

Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil

---

### DECLARO QUE:

El trabajo de fin de máster que presento está elaborado por mí y es original. No copio, ni utilizo ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones de cualquier obra, artículo, memoria, o documento (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Asimismo, declaro que los datos son veraces y que no he hecho uso de información no autorizada de cualquier fuente escrita de otra persona o de cualquier otra fuente.

De igual manera, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

En Madrid, a 03 de Septiembre 2018

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN debe ser insertada en primera página de todos los trabajos fin de máster conducentes a la obtención del Título.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER  
VISTO BUENO DEL TUTOR  
MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

***El profesor/a tutor***

Nombre y apellidos:

Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil

***del alumno/a***

Nombre y apellidos

Alba de la Rosa García

***encuadrado en la línea de investigación***

Eficacia de protocolos quirúrgicos y regenerativos en implantología

**DA EL VISTO BUENO**

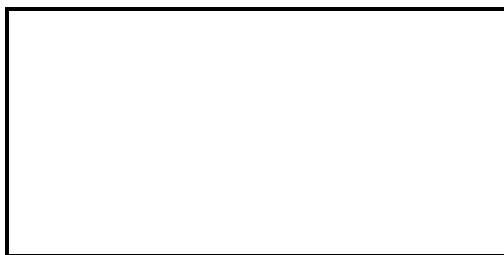
para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

Efecto de la hormona del crecimiento y los estrógenos en el hueso osteoporótico:  
Análisis morfométrico en ratas Wistar. Estudio piloto

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En Madrid a 03 de septiembre de 2018.

Fdo: el profesor/a



El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y tres copias en papel

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora, la Dra. Isabel Fernández-Tresguerres de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, por ser una fuente de inspiración, por su paciencia, su dedicación y su tesón. Por saber cuando llevarme a superar mis límites y cuando dejarme buscar sola el camino. Por ayudarme, encaminarme y enseñarme todos los días. Porque es un gran ejemplo que seguir, siempre dispuesta a enseñar y siempre receptiva a aprender.

A la Dra. Celia Clemente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá, por llevar a cabo el análisis morfométrico y permitir mi colaboración.

Al Dr. Jesús Ángel Fernández Tresguerres de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, que con su financiación ha permitido que este proyecto de investigación sea posible.

## ÍNDICE

1. Resumen.....	10
2. Abreviaturas.....	12
3. Introducción.....	14
3.1. El tejido óseo.....	14
3.1.1. Células.....	15
3.1.1.1. Osteoclastos.....	15
3.1.1.2. Osteoblastos.....	16
3.1.1.3. Células limitantes .....	17
3.1.1.4. Osteocitos.....	18
3.1.2. Matriz orgánica.....	19
3.1.2.1. Colágeno.....	20
3.1.2.2. Proteínas no colágenas.....	20
3.1.3. Fase mineral.....	24
3.1.4. La unidad de remodelado óseo.....	25
3.1.5. Regulación del tejido óseo.....	26
3.1.5.1. Factores genéticos.....	26
3.1.5.2. Factores mecánicos.....	27
3.1.5.3. Factores vasculo-nerviosos.....	27
3.1.5.4. Factores nutricionales.....	28
3.1.5.5. Hormonas .....	28
3.1.5.6. Factores de crecimiento.....	32
3.2. Osteoporosis .....	37
3.3. Hormona de Crecimiento.....	41
3.4. Estrógenos.....	44
4. Antecedentes y justificación.....	47
5. Hipótesis de trabajo y objetivos.....	49
6. Material y método.....	50
7. Resultados.....	52
8. Discusión.....	54
9. Conclusiones .....	59
10. Bibliografía .....	60
11. Anexos.....	72

## 1. RESUMEN

La osteoporosis es una enfermedad sistémica esquelética que afecta a más de 200 millones de personas en el mundo. Es la enfermedad ósea más frecuente y la mayoría de las personas que la padecen, no van a ser conscientes hasta que no se produce una fractura. Se sabe desde hace tiempo que el déficit de estrógenos está implicado en la etiopatogenia de la osteoporosis, sin embargo, el déficit de otras hormonas, como la hormona de crecimiento (GH) y el aumento del estrés oxidativo constituyen uno de los más recientes descubrimientos en cuanto a los factores etiopatogénicos.

Los tratamientos actuales contra la osteoporosis no carecen de efectos secundarios importantes, como la osteonecrosis de los maxilares y las fracturas subtrocantéreas atípicas. Aunque su prevalencia es baja, se están buscando nuevas alternativas terapéuticas eficaces y seguras.

Se sabe que la GH está implicada en el crecimiento longitudinal del hueso y que es capaz de estimular la proliferación y diferenciación de osteoblastos y osteoclastos, es decir, de estimular el proceso de remodelado.

Por otro lado, los estrógenos están implicados en la etiopatogenia de la osteoporosis y se utilizan en la terapia hormonal sustitutiva para tratar los síntomas de la menopausia.

Sin embargo, por lo que nosotros sabemos, nunca se han empleado GH y estrógenos conjuntamente como tratamiento contra la osteoporosis.

Por ello, el propósito de este estudio piloto fue evaluar el efecto que la GH y los estrógenos, pudieran tener en el hueso osteoporótico de un animal de experimentación, tanto de manera conjunta como por separado. Asimismo, se estudió el efecto de la ovx en diferentes áreas óseas en tibias de ratas viejas.

**Material y método:** Para realizar este estudio piloto se utilizaron 25 ratas Wistar hembras viejas divididas aleatoriamente en 5 grupos experimentales, cada uno de ellos con 5 animales. Un grupo de 5 ratas se mantuvo como grupo control, y a los cuatro restantes se les realizó una ovariectomía bilateral (ovx). De estos cuatro grupos, uno quedó sin tratamiento, actuando como grupo ovx control, otro fue tratado con GH sc (2 mg/kg/día), otro con estradiol sc (125 µg/semana) y otro con una combinación de ambas, es decir, GH (2 mg/kg/día) más estradiol (125 µg/semana), todos ellos tratados durante 10 semanas. Tras ese período de tiempo, los animales fueron sacrificados por decapitación. Las tibias de los animales fueron extraídas, se eliminaron los tejidos blandos y se fijaron

en formaldehído al 10% tamponado a pH 7. Se cortaron en bloques de 2 cm, que se incluyeron en metacrilato (2-hidroxietil-metacrilato), para posteriormente ser cortadas y pulidas mediante el sistema de corte y pulido Exakt. Las muestras se tiñeron con tricrómico de Masson y hematoxilina-eosina y se observaron al microscopio óptico. Se realizó un estudio morfométrico mediante el sistema MIP-4, midiendo: Área Ósea, Área Cortical y Área Trabecular y porosidad cortical. Se realizó el análisis estadístico de las medias con el programa SPSS 22.0 mediante la prueba de ANOVA para buscar significación estadística, considerando significativo si  $p < 0,05$ .

### **Resultados:**

Se pudo observar que la ovx disminuía el área ósea, el área cortical y el área trabecular, mientras que aumentaba la porosidad cortical, aunque las diferencias no alcanzaron significatividad estadística.

La administración sistémica de GH en ratas ovx aumentaba significativamente el área ósea ( $5,47 \pm 0,13$  vs  $4,53 \pm 0,17$ ) y el área cortical ( $5,34 \pm 0,16$  vs  $0,42 \pm 0,20$ ), respecto al grupo ovx control, mientras que el área trabecular y la porosidad cortical aumentaron, pero de forma no significativa.

Respecto a los estrógenos no indujeron diferencias significativas en ningún parámetro estudiado.

La administración conjunta de GH+estrógenos en ratas ovx aumentó el área ósea ( $5,18 \pm 0,60$  vs  $4,53 \pm 0,17$ ) de manera significativa respecto a las ratas ovx sin tratamiento ( $p=0,02$ ). El resto de los parámetros estudiados no alcanzó significatividad estadística.

### **Conclusiones:**

La deprivación estrogénica mediante la ovx bilateral no indujo diferencias significativas en el área ósea, área cortical, área trabecular o porosidad cortical.

La administración sistémica de GH a dosis de 2 mg/kg/día en ratas ovx incrementó de forma significativa el área ósea y el área cortical medidas por morfometría, respecto al grupo ovx control.

La administración de estrógenos no indujo diferencias significativas en las ratas ovx respecto al grupo ovx control.

La administración conjunta de GH+estrógenos incrementó de forma significativa el área ósea en ratas ovx, respecto al grupo ovx control.

## 2. ABREVIATURAS

ALP: Fosfatasa alcalina

BMPs: Proteínas morfogenéticas óseas

Cbfa-1: del inglés *core binding factor-1*

CFU-GM: Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos

COL I: Colágeno tipo I

CTX: Telopéptido carboxi-terminal del colágeno

Cx 43: Conexina 43

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EMA: del inglés *European Medicament Agency* (Agencia Europea del Medicamento)

FDA: del inglés *Food and Drug Administration* (Agencia Americana de Comida y Fármacos)

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

FGF-23: Factor de crecimiento fibroblástico 23

GH: Hormona del crecimiento

GM-CSF: Factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos

IGF-I y II: Factor de crecimiento análogo a la insulina I y II

IGFBP: IGF *binding factor*

IL-1, 4, 6: Interleuquina-1, 4, 6

M-CSF: Factor estimulante de las colonias de macrófagos

MEC: Matriz extracelular

PNC: proteínas no colágenas

OCN: Osteocalcina

OPG: Osteoprotegerina

OP: Osteopontina

Ovx: Ovariectomía

PG-E2: Prostaglandina -E2

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PTH: Hormona paratiroidea

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

RANK: Receptor activador del factor nuclear kappa-B

RGD: Tripéptido Arginina-Glicina-Aspártico

SLRP: del inglés *Small Leucine-Rich Proteoglycans*

T3: triyodo-tironina

T4: tiroxina (tetrayodo-tironina)

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante- $\beta$

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

TRAP: Fosfatasa ácida tartrato resistente

TRH: Terapia de reemplazo hormonal

TSG-6: Factor de Necrosis Tumoral estimulado por el Gen 6

UMB: unidades multicelulares básicas

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

Wnt: del inglés *Wingless protein*

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1. EL TEJIDO ÓSEO**

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, formado por laminillas de matriz osteoide calcificada (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a). Según la forma en que se dispongan dichas laminillas, hay dos tipos de tejido óseo, el cortical o denso y el trabecular o esponjoso. El hueso cortical o compacto representa aproximadamente el 80% del esqueleto, se estructura en osteonas, formadas por conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos. El hueso esponjoso o trabecular, está constituido por laminillas en forma de red tridimensional, cuya orientación está determinada por las fuerzas mecánicas, que delimitan una serie de cavidades que alojan la médula ósea. (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a). El hueso cortical está altamente calcificado y lleva a cabo una función protectora y estructural. El hueso trabecular, por el contrario, está menos calcificado y tiene la capacidad de ser metabólicamente activo, aunque ambos participan en la homeostasis fosfocálcica (Walsh, 2015).

El tejido óseo es un tejido dinámico, que está en constante formación y constante destrucción, fenómeno conocido como “proceso de remodelado”. Esto tiene lugar para mantener la integridad estructural y participar en la homeostasis fosfocálcica. Este remodelado ocurre entre un 5-10% cada año en el esqueleto adulto. Se puede decir por tanto que el esqueleto se remodela por completo cada 10 años. (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a; Little et al, 2011). Idealmente, este proceso está equilibrado. Sin embargo, si se desequilibra, producirá patología en cualquiera de sus formas, si es por excesiva formación, dará lugar a la osteopetrosis y si el exceso es de reabsorción, producirá osteoporosis u osteopenia (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a; Little et al, 2011; Walsh, 2015).

El tejido óseo está formado por: células, matriz extracelular y fase mineral.

### 3.1.1. CÉLULAS

En el hueso existen distintos tipos de células que incluyen: osteoblastos, osteocitos, células limitantes y osteoclastos (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a).

#### 3.1.1.1. OSTEOCLASTOS

Los osteoclastos son las células encargadas de la reabsorción del hueso. Son células de gran tamaño, de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, multinucleadas, que proceden de la fusión de los progenitores de los monocitos. Se localizan en las superficies endóstica y perióstica. Tienen una forma irregular y gran cantidad de mitocondrias y vacuolas, con un borde en cepillo y una zona clara con gran cantidad de microfilamentos a través de los cuales se anclan a la matriz osteoide mediante integrinas o proteínas implicadas en la adhesión de las células a la matriz (Fernández-Treguerres et al, 2006 a; Little et al, 2011; O'Brien et al, 2012). Respecto a las integrinas, hay que resaltar la  $\text{av}\beta 3$ , encargada del reconocimiento de la secuencia RGD o Arg-Gly-Asp (arginina-glicina-aspartico), que se encuentra en el colágeno y otras proteínas de la matriz. Esta secuencia RGD está implicada en la adhesión celular. En el interior del citoplasma del osteoclasto, hay enzimas importantes en la reabsorción, como la anhidrasa carbónica II, que genera un pH ácido, favoreciendo la solubilización de la parte mineral, mientras que la reabsorción de la matriz orgánica tiene lugar por la acción de otras enzimas encargadas de la lisis de proteínas (como colagenasas, metaloproteasas...etc.) (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a).

Los osteoclastos son células derivadas de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea que se denominan “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos” (CFU-GM), implicadas en la formación de macrófagos y monocitos (Fernández-Treguerres et al, 2006 a; Little et al, 2011; O'Brien et al, 2013).

Los osteoclastos existen en dos estados funcionales: móviles y de reabsorción. Durante la fase móvil, el osteoclasto migra desde la médula ósea al lugar donde se precisa la reabsorción. En este estadio es una célula elongada y no polarizada, con protrusiones de la membrana denominadas podosomas, que son la causa de la motilidad de la célula. Una vez que llegan al lugar de reabsorción, se polarizan y se forma el ribete en cepillo y la zona de sellado. En ésta última es donde tiene lugar la secreción ácida encargada de la reabsorción de la fase mineral (Kular et al, 2012).

Actualmente se sabe que existen dos citoquinas implicadas en la osteoclastogénesis: el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, también denominado CSF-1), y el RANKL o ligando del receptor activador del factor nuclear Kappa-B (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a; O'Brien et al, 2013).

Cuando RANKL (situado en la membrana de los osteoblastos) se une a su receptor RANK (en la membrana de los osteoclastos) se inicia la cascada de la osteoclastogénesis, es decir, aumenta la proliferación y diferenciación de los osteoclastos. Pero este sistema tiene otro componente: la OPG (osteoprotegerina), secretada por los osteoblastos. Si la OPG se une a RANKL se produce una inhibición de dicha cascada y por tanto se inhibe el proceso de reabsorción (Fernández-Tresguerres et al, 2006). Existe otra molécula implicada en la inhibición de la actividad osteoclástica, el TSG-6 (Factor de Necrosis Tumoral estimulado por el Gen 6) que actúa igual que la OPG uniéndose a RANKL. TSG-6 es secretada por los propios osteoclastos para cesar la reabsorción (Bayliss et al, 2012).

#### 3.1.1.2. OSTEOLASTOS

Los osteoblastos son células cuboideas, de citoplasma basófilo, que tienen entre 20 y 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y representan entre el 4 y 6% de las células totales del hueso. Son células polarizadas, con un solo núcleo y con un retículo endoplasmático rugoso muy importante, como se observa en las células que realizan la síntesis proteica. Descienden de células madre mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, del endostio, del periostio y de los pericitos vasculares.

Los osteoblastos humanos tienen una vida media de entre 1 y 10 semanas.

La función más conocida de los osteoblastos es la de formación ósea. Se encargan de la síntesis de las proteínas de la matriz osteoide (colágenas y no colágenas) y la mineralización de la misma. Por lo tanto, sintetizan la matriz orgánica a un ritmo de 2-3  $\mu\text{m}$  al día y la mineralizan a un ritmo de 1-2  $\mu\text{m}$  al día. Gracias a la expresión de una enzima característica, la fosfatasa alcalina (ALP), llevan a cabo la mineralización de la matriz osteoide. La mineralización de la matriz orgánica comienza aproximadamente 10 días después de la producción. Además, los osteoblastos poseen otras funciones: dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, realizan la síntesis de determinados factores de crecimiento y regulan la reabsorción (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a; Bayliss et al, 2012).

Una vez se ha completado la formación de la matriz ósea, los osteoblastos pueden seguir tres caminos (Manolagas, 2000): por un lado, pueden inducir la apoptosis y desaparecer; pueden perder la mayoría de sus orgánulos y transformarse en osteocitos embebidos en la matriz ósea (15%); o pueden transformarse en células de revestimiento (en inglés *bone lining cells*). Por lo tanto, estos dos tipos celulares, representarían un estado de maduración más tardío dentro de la estirpe osteoblástica.

La diferenciación osteoblástica está regulada por genes y por factores de transcripción. Entre los primeros están los genes Indian y Sonic Hedgehog y Osterix. Entre los factores de transcripción destacan las BMP, RUNX-2 y Wnt. Asimismo, cuando los osteoblastos se diferencian expresan en su membrana unas proteínas o marcadores, entre los que destacan COL I (colágeno I), ALP, OP (osteopontina), OCN (osteocalcina).

El RUNX-2 es un factor de transcripción multifuncional, que regula la diferenciación de condrocitos y osteoblastos, así como la expresión de genes de varias proteínas de la matriz osteoide, como COL I, OP, ALP y OCN (Komori, 2010). Lleva a cabo su función en la etapa de diferenciación de las células osteoprogenitoras hacia la estirpe osteoblástica. Las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y Wnt son críticos para la generación y función de osteoblastos, ya que inducen la diferenciación desde los progenitores hacia el linaje osteoblástico (Fernández-Tresguerres et al, 2006; Bayliss et al, 2012; Bellido, 2014; Capulli et al, 2014).

### 3.1.1.3. CÉLULAS DE REVESTIMIENTO O LIMITANTES

Las células limitantes o de revestimiento proceden de los osteoblastos. Son células planas y alargadas que recubren la superficie de los huesos. Tienen un núcleo en forma de huso y escasa evidencia de organelas. Se las ha relacionado con el inicio del proceso de remodelado. Se ha podido observar que estas células son capaces de expresar algunos de los marcadores osteoblásticos anteriormente citados (OP, sialoproteína ósea, osteonectina, ALP y receptor de la parathormona). En los últimos años están siendo estudiadas por la posibilidad de sufrir desdiferenciación hacia osteoblastos y favorecer el proceso anabólico de modelado, que se explicará más adelante (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a; Matic et al, 2016).

#### 3.1.1.4. OSTEOCITOS

Cuando el osteoblasto ha dejado de multiplicarse y de sintetizar matriz osteoide, se queda atrapado en el interior de su laguna y se transforma en osteocito. Este proceso, llamado osteocitogénesis, consiste en la transformación de una célula secretora a una célula reguladora, de tal forma que se modifica la forma, de cuboidea a estrellada y comienzan a aparecer prolongaciones citoplasmáticas, que se forman simultáneamente a los conductos calcóforos. La morfología de los osteocitos está condicionada por la expresión de determinados genes como E11/gp28, CD44 y fimbrina (Bellido, 2014). Los osteocitos suponen el mayor porcentaje de componente celular óseo (90-95%) y poseen la vida media más larga, aproximadamente de unos 25 años (Capulli et al, 2014).

Se encuentran embebidos dentro de la matriz calcificada, situados en pequeñas cavidades denominadas lagunas u osteoplasmas. Se interconectan entre sí mediante unas prolongaciones que se alojan dentro de los conductos calcóforos por los que fluye el fluido óseo. Este es un líquido especial que proporciona oxígeno y nutrientes a las células óseas. El conjunto de lagunas y canaliculos forman el sistema lacuno-canalicular, que permite la conexión de los osteocitos entre sí y con las células limitantes de la superficie del hueso, con los osteoblastos y con los osteoclastos, así como con los vasos. De esta forma, todas estas células están interconectadas (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a; Capulli et al, 2014; Hemmatian et al, 2017). Gracias a esta red tridimensional, el osteocito va a tener la capacidad de detectar las variaciones mecánicas de las cargas y transformarlas en una señal química, que permite regular la formación y la reabsorción al controlar la función de osteoclastos y osteoblastos. Este fenómeno se ha llamado mecanotransducción (Fernández-Tresguerres et al, 2006; Capulli et al, 2014; Prideaux et al., 2016).

Mientras ocurre la diferenciación de los osteocitos, se reducen marcadores específicos de los osteoblastos (pero mantienen COL-1, ALP, OP y OCN). Por otro lado, comienzan a expresarse marcadores específicos de los osteocitos entre los que destacan el Factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) y la esclerostina (Chen et al., 2018). El FGF-23 está implicado en los procesos de homeostasis fosfocálcica y en concreto en la regulación del fosfato. La esclerostina únicamente se expresa en osteocitos maduros y actúa inhibiendo la diferenciación de los osteoblastos y, por tanto, la formación ósea, a través de la inhibición de la vía de la Wnt/ $\beta$ -catenina (Wingless protein) (Komori et al., 2013; Chen et al., 2018). Esto ha provocado gran interés por su potencial como objetivo

terapéutico ya que al aplicar anticuerpos contra la esclerostina se ha visto que aumenta la masa ósea (Prideaux et al., 2016).

Bellido (2014) respalda que la apoptosis de los osteocitos supone un evento importante en la regulación del remodelado. Este proceso de apoptosis estaría inducido por diferentes factores como pueden ser la inmovilización, la fatiga por sobrecarga o una deficiencia en los esteroides sexuales. Cualquiera de estos procesos sería suficiente para atraer osteoclastos a áreas específicas donde aumentaría la reabsorción.

Por lo tanto, la apoptosis de los osteocitos es capaz de producir el reclutamiento de los precursores de los osteoclastos, a través del RANKL. Los osteocitos, además, secretan osteoprotegerina (OPG), que compite con RANKL por su receptor RANK en precursores de osteoclastos. Tanto en osteocitos como en osteoblastos, la secreción de OPG está regulada por la vía de la Wnt/  $\beta$ -catenina (Bellido, 2014; O'Brien et al, 2013).

Además, el osteocito también tendría una función fuera del hueso. El FGF-23 es un factor producido por los osteocitos, pero con acción a distancia sobre el riñón, por lo que, en los últimos años, se está empezando a considerar al osteocito como una célula endocrina (Guo y Bonewald, 2009; Capulli et al, 2014; Walsh, 2015).

### **3.1.2. MATRIZ ORGÁNICA**

La matriz orgánica está formada por una fase orgánica y una fase mineral. La parte orgánica de la matriz osteoide está formada por proteínas y en especial, colágeno tipo I y proteínas no colágenas. Al colágeno se une la parte mineral que estaría formada principalmente por hidroxapatita. Las proteínas no colágenas desempeñan sus funciones en la regulación de la actividad celular y mineralización de la matriz (Walsh, 2015). Hay que tener en cuenta, que la matriz mineralizada no supone únicamente una reserva de calcio y fósforo, sino que, contiene una gran cantidad de proteínas implicadas en la diferenciación celular y en el mantenimiento de la integridad del hueso y de sus funciones (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a).

### **3.1.2.1. Colágeno**

El colágeno es el componente más abundante de la matriz extracelular (MEC); supone aproximadamente el 90% de la misma y en concreto, el colágeno tipo I constituye más del 95% del total (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a).

El colágeno tipo I es una proteína constituida por una triple hélice, formada por dos cadenas  $\alpha 1$  y una cadena  $\alpha 2$ . El colágeno contiene los aminoácidos prolina e hidroxiprolina. Por otro lado, el colágeno no tiene afinidad por el calcio, por lo que son otras proteínas no colágenas las que se ven implicadas en el depósito mineral. (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a; Unal et al, 2018).

La importancia del colágeno se pone de manifiesto en patologías como la osteogénesis imperfecta, en la que el colágeno presenta una estructura anómala, con incremento de la posibilidad de fracturas. La triple hélice del colágeno tiene uniones (en inglés *cross-links*) inter e intra-cadenas de su estructura fibrilar, que son clave para las propiedades mecánicas del hueso (Fonseca et al, 2014). Estas uniones pueden producirse por un proceso enzimático y no enzimático. Enzimáticos son las uniones de piridinolina y deoxipiridinolina y los no enzimáticos son las uniones de pentosidina (producidas por transglicosilación). Se ha visto que un descenso en contenido de piridinolina reduce el módulo de elasticidad del hueso, sin cambiar la masa ósea (Fonseca et al, 2014). En los últimos años, se está dando cada vez más importancia al papel del colágeno y su trascendencia en el proceso de osteoporosis.

### **3.1.2.2. Proteínas no colágenas (PNC)**

Las proteínas no colágenas se pueden dividir en dos grupos según su función. El primero tendría su función principal en cuanto a la estructura y el comportamiento mecánico del hueso. El segundo grupo sería el encargado de regular el comportamiento celular. Este segundo grupo estaría formado por proteasas, factores de crecimiento, hormonas y proteoglicanos. Hay proteínas que debido a que son capaces de llevar a cabo gran cantidad de funciones se podrían incluir en ambos grupos como la OCN o la OP (Sroga y Vashishth, 2012).

## ***Glicoproteínas***

- Fosfatasa alcalina (ALP): producida por los osteoblastos, es una enzima que libera fosfato inorgánico aumentando así la concentración de iones fosfato necesarios para la mineralización de la matriz orgánica. Por otro lado, bloquea la acción inhibitoria que los esteres fosfóricos producen sobre la mineralización (Prieto y Prieto, 2010).
- Proteínas que contienen la secuencia RGD: Contienen repetida la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) reconocida por las integrinas de osteoclastos y osteoblastos. Este sistema de reconocimiento permite la adhesión y migración de las células sobre la matriz osteoide, lo que es básico para la mineralización, remodelado y reparación del hueso. La osteonectina (ON), es una proteína ácida y rica en cisteína (SPARC) y representa el 25% de todas las PNC; la fibronectina (FN), es una de las proteínas que participan en las primeras fases de la osteointegración; por último, la trombospondina, que está implicada en la formación de fibrillas de colágeno, así como en la regulación de los precursores de las células óseas (Sroga y Vashishth, 2012).
- Proteoglicanos: sintetizados y liberados por osteoblastos, están formados por un núcleo proteico al que se unen glucosaminoglicanos formando una macromolécula cuya función principal es la inhibición de la mineralización. Entre todos los proteoglicanos destaca el condroitin sulfato, ya que es el de mayor tamaño. Se encuentra en zonas de formación de hueso actuando a modo de reserva de espacio para el hueso maduro (Prieto y Prieto, 2010; Mikami y Kitagawa, 2013). El hialuronano o ácido hialurónico está formado por ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina y está implicado en la morfogénesis ósea (Prieto y Prieto, 2010; Vigetti et al, 2014). En este grupo se encuentran también el SLRP (del inglés *small leucine-rich proteoglycans*); el biglicano que va a condicionar el diámetro de las fibrillas de colágeno y se une al TGF- $\beta$  al igual que la decorina, que además inhibe la unión de la fibronectina a las células óseas (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a; Prieto y Prieto, 2010; Sroga y Vashishth, 2012).

- **Proteínas con ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico:** El ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico es un aminoácido modificado cuya coenzima es la vitamina K y se halla presente en la osteocalcina (OCN) y en la proteína de la matriz osteoide con ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico. La OCN es la proteína más abundante de todas las PNC de la matriz extracelular y se produce de manera exclusiva por los osteoblastos. También es multifuncional, pero entre sus acciones, la más conocida es la de regular el tamaño y crecimiento de los cristales de hidroxapatita sin influir en la reabsorción o mineralización del hueso. Encontrar niveles de OCN elevados en plasma, se ha relacionado directamente con una alta actividad osteogénica ya que, se relaciona con la cantidad de osteoblastos activos (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a; Morgan et al, 2015; Unal et al, 2018). Su concentración en plasma se considera un marcador de la formación de hueso. Por su parte, la proteína de la matriz osteoide con ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, sintetizada por osteoblastos y condrocitos, tiene una función similar a la osteocalcina.

Es importante destacar que el déficit de vitamina K va a producir una reducción en la síntesis de estas proteínas y, por tanto, en la formación y mineralización de la matriz osteoide (Prieto y Prieto, 2010).

- **Sialoproteínas:** las dos proteínas principales que contienen ácido siálico en su estructura y que se encuentran en la matriz osteoide son la osteopontina (OP) y la sialoproteína ósea, ambas contienen la secuencia RGD. La OP es una de las proteínas no colágenas que se encuentra en mayor proporción, en torno al 1-2% del total (10%) (Morgan et al, 2015; Unal et al, 2018). Producida por osteoblastos y sus precursores, osteocitos, osteoclastos, condrocitos y fibroblastos. Tiene gran cantidad de funciones, pero en concreto estaría encargada de la regulación de la mineralización de la matriz osteoide (Prieto y Prieto, 2010; Morgan et al, 2015; Unal et al, 2018). Cuando se produce una fractura, incrementa su síntesis por parte de los osteoblastos, lo que indica que está implicada en el proceso de reparación ósea produciendo un rápido reclutamiento de células que llevan a cabo esta función. La sialoproteína ósea, producida por osteoblastos y osteocitos induce la diferenciación de los productores de osteoblastos, su proliferación y la formación de núcleos de mineralización (Prieto y Prieto, 2010).

- Metaloproteasas de la matriz osteoide (MMP). Son enzimas proteolíticas que contienen un metal, normalmente Zinc, que digieren la matriz orgánica del hueso. La colagenasa o MMP-1, producida por los osteoblastos, está implicada en la reabsorción ósea y en la reparación de fracturas. Las gelatinasas, producidas por los osteoclastos, están implicadas en la reabsorción ósea, liberando los factores de crecimiento que se encuentran en la matriz osteoide para que actúen sobre las células óseas. Por último, la catepsina K, producida por los osteoclastos, es la proteína clave de la reabsorción ósea ya que es la que posee mayor capacidad para fragmentar el colágeno y los proteoglicanos óseos (Prieto y Prieto, 2010). Actualmente se han desarrollado nuevas dianas terapéuticas contra la osteoporosis, que consisten en anticuerpos monoclonales contra la catepsina K (Odanacatib).

### ***Factores de crecimiento***

Son péptidos que actúan de forma autocrina o paracrina en las células que los producen. Pueden sintetizarlos las plaquetas, el hígado o el hueso, entre otros. Participan en el crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Entre los factores de crecimiento están los transformantes beta (TGF- $\beta$ ), factores similares a la insulina (IGF-I y IGF-II) y proteínas morfogenéticas óseas (BMP), las cuales pertenecen a la familia del TGF- $\beta$  (Fernández-Tresguerres et al, 2006 a; Sroga y Vashishth, 2012).

### ***Citoquinas***

Algunas citoquinas proinflamatorias están involucradas en la osteoclastogénesis mediante la estimulación de RANKL. Algunos autores como Kobayashi (2000) demuestran que algunas citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 pueden inducir la diferenciación de los osteoclastos sin mediación de RANKL (Jung et al, 2014). Sin embargo, otras citoquinas como IL-4 e interferón gamma serían capaces de inhibir la formación de los osteoclastos (Kenkre y Bassett, 2018). Cuando hay una deficiencia de estrógenos, situación que ocurre después de la menopausia, se produce un aumento de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , lo que produce un aumento de RANKL y, por lo tanto, un incremento

de la osteoclastogénesis y de la reabsorción ósea que facilitan la aparición de osteoporosis (Kenkre y Bassett, 2018).

### ***Prostaglandinas***

Son lípidos que actúan de forma autocrina o paracrina a través de una serie de receptores que se encuentran en la proteína G para regular la formación y reabsorción del hueso (Blackwell et al., 2010; Kenkre y Bassett, 2018). Se sabe que la prostaglandina E2 (PGE2) estimula de forma activa la reabsorción ósea aumentando la relación RANKL/OPG para aumentar la osteoclastogénesis. Pero, por otro lado, PGE2 estimularía también la proliferación y producción de osteoblastos contribuyendo a la formación ósea. Esto podría ser porque PGE2 actuaría mediante diferentes receptores de proteínas G (Kenkre y Bassett, 2018).

### **3.1.3. FASE MINERAL**

El componente mineral del hueso, aproximadamente 65% del total del peso del hueso, es el responsable de aumentar la resistencia a la deformación y rigidez del hueso y está formado principalmente por hidroxapatita, compuesta por calcio y fosfato,  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ . También se puede encontrar, aunque en proporciones más pequeñas, carbonato, magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. El cristal de hidroxapatita tiene un pequeño tamaño (200-400 nm de longitud, 20-40 nm de anchura y 10-20 nm de grosor), posee una gran asimetría tanto física como electrostática, que le permite por un lado una disposición que favorece el depósito de agua e iones en su superficie y por otro lado le confiere una gran superficie por unidad de peso. Se encuentra dentro de la sustancia fundamental y dispuesta entre las fibras de colágeno (cada 64 nm) (Fernández-Tresguerres et al 2006; Walsh, 2015).

El proceso biológico de la mineralización tiene lugar durante toda la vida del individuo y está dirigida por los osteoblastos mediante el control de la concentración local de iones y la regulación de la concentración local de proteínas y factores promotores o inhibidores de la mineralización. La mineralización se regula mediante promotores e inhibidores. Los promotores son la ALP, procedente de los osteoblastos; y los inhibidores, el pirofosfato inorgánico (PPi) y algunas proteínas no colágenas como la OP (Sapir-Koren y Livshits, 2011).

El proceso se inicia con vesículas de osteoide formadas por los osteoblastos que se agrupan en racimos y poseen una fina membrana rica en fosfatasa alcalina y fosfolípidos ácidos que tienen afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ . La fase de proliferación mineral es dirigida por las concentraciones de calcio y fosfato, proteínas no colágenas presentes en las vesículas osteoides (osteocalcina, osteopontina, sialoproteínas) y por las características de la matriz osteoide. En contraposición, el proteoglicano inhibe la maduración de los fosfatos amorfos y su agregación y depósito en la matriz (Prieto y Prieto, 2010).

### **3.1.4. UNIDAD DE REMODELADO ÓSEO**

El remodelado óseo ocurre durante toda la vida a través de unas unidades multicelulares básicas (en inglés *BMU-bone multicelular unit*). Cada una de ellas está formada por un grupo de células (osteoclastos, osteoblastos, osteocitos, células limitantes y vasos sanguíneos), que tienen la función de remodelar el hueso como respuesta a diferentes estímulos, que pueden ser tanto mecánicos, como biológicos (Kular et al, 2012).

El ciclo de remodelado comienza con una fase de activación, que incluye el reclutamiento de los precursores de osteoclastos, su diferenciación y su activación, dando lugar al proceso de reabsorción. Una vez terminada la reabsorción, tiene lugar la fase reversa, en la que los osteoclastos sufren apoptosis y se produce el reclutamiento de los precursores de osteoblastos, que comienzan a diferenciarse. Esta fase reversa es la transición de la reabsorción a la formación. La fase de terminación o fase final es aquella en la cual se produce la formación del hueso reabsorbido previamente y es la más larga. De los 200 días que dura todo el proceso de remodelado, la fase de formación dura 150 días (Kular et al, 2012).

Como el proceso de remodelado óseo se produce a nivel multicelular, es importante la comunicación entre las diferentes células. Como ya se mencionó al hablar de los osteoclastos, existen dos citoquinas que son cruciales para la osteoclastogénesis, que son CSF-1 y RANKL, ambos sintetizados por los osteoblastos y osteocitos.

Por otro lado, el osteoclasto también sintetiza factores que actúan sobre la estirpe osteoblástica, como la esfingosina fosfatasa-1 y la semaforina 4D, posiblemente implicadas en la transición osteoclasto-osteoblasto (Kular et al, 2012).

Sin embargo, recientes avances en fisiología ósea han planteado la existencia de un proceso diferente al remodelado, llamado modelado, en el que sólo tendría lugar la formación de hueso, sin existir reabsorción previa. En este proceso podrían estar

involucradas las células limitantes, ya que se ha visto que tras el estímulo con PTH (hormona paratiroidea) sufren un proceso de desdiferenciación y se transforman en osteoblastos, favoreciendo la formación ósea y dando origen al fenómeno anabólico del modelado.

### **3.1.5. REGULACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO**

El proceso de remodelado existe durante toda la vida. Se podría pensar que esto supone un gran gasto energético, pero es así para mantener la integridad estructural y llevar a cabo la homeostasis fosfocálcica.

La masa ósea se va adquiriendo en las primeras etapas de la infancia. Durante la pubertad se produce el pico máximo de crecimiento, relacionado con la secreción de hormona de crecimiento (GH) y los esteroides sexuales. Esta masa ósea sigue aumentando hasta los 25-30 años, donde se dice que existe la máxima masa ósea del individuo; a partir de aquí se mantiene y es a partir de los 50 años, cuando empieza a descender, debido al desequilibrio entre formación y reabsorción, en relación con el descenso de determinadas hormonas (GH, estrógenos y melatonina). Asimismo, en los últimos tiempos se ha sugerido la teoría del estrés oxidativo en la etiopatogenia de este desequilibrio.

En la regulación del proceso de remodelado hay que tener en cuenta factores genéticos, mecánicos, vasculares, nerviosos, nutricionales, hormonales y factores de crecimiento.

#### **3.1.5.1. Factores genéticos**

Parecen ser los más importantes; determinan entre el 60 y el 80% de la masa ósea máxima, de esta manera las hijas de madres con osteoporosis tendrán mayor predisposición a padecerla. En cuanto a la raza, la negra posee una masa ósea mayor que la blanca y que la amarilla (Fernández-Tresguerres et al., 2006; Rizzoli et al., 2014). Durante mucho tiempo se pensó que la mineralización de la matriz extracelular era un proceso pasivo, sin embargo, tras el impacto de estudios en genética, se comprobó que este proceso está controlado por múltiples vías genéticas que regularían la homeostasis del calcio y del fósforo (Murshed, 2018).

### 3.1.5.2. Factores mecánicos

Los factores mecánicos llevan a cabo un papel importante en el remodelado del hueso. Estos factores se clasifican en estiramiento, cizallamiento y compresión, y desempeñan diferentes funciones en la diferenciación y proliferación de las células óseas interviniendo en sus interacciones (Wang et al., 2018). Esta forma de remodelado es explicada por la influencia de las cargas físicas y mecánicas que sufre el esqueleto diariamente, sin las cuales, y por desuso el hueso comenzaría un proceso de reabsorción, por el contrario, al recibir estas cargas, el hueso, aumentaría su volumen (You et al, 2008; Bonewald y Johnson, 2008; O'Brien et al, 2013). Este proceso es conocido como “remodelación adaptativa” y el esqueleto, es el único tejido dotado de esta característica en relación al proceso de remodelado continuo que sufre el hueso como respuesta adaptativa a la resistencia de las cargas diarias (Bonewald y Johnson, 2008). Esta teoría comienza con la ley de Wolff entre los años 1983 y 1902. Wolff afirma que, en una persona sana “la forma o la función de un hueso es seguida por los cambios adaptativos en su arquitectura interior y su forma externa” (Bayliss et al, 2012). Actualmente, se piensa que son los osteocitos los responsables de esta respuesta adaptativa en un proceso denominado mecanotransducción (Fernández-Tresguerres et al, 2006; O'Brien et al, 2013; You et al, 2008; Bonewald y Johnson, 2008).

Por ello es tan importante para adquirir masa ósea el deporte en los primeros años de infancia y juventud.

### 3.1.5.3. Factores vasculo-nerviosos

La vascularización es un factor crítico para el desarrollo del esqueleto tanto en la etapa embrionaria como en el crecimiento postnatal y en el remodelado óseo. Los vasos sanguíneos invaden el tejido óseo aportando osteoblastos, osteoclastos, nutrientes, factores de crecimiento y factores de diferenciación (Chim et al., 2013). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se encarga de regular la condensación del cartílago en la etapa embrionaria al expresarse en condrocitos sometidos a la diferenciación. En el crecimiento postnatal, las células endoteliales ocupan el cartílago en la placa de crecimiento formando un canal vascular para el acceso de las células osteoformadoras. Además, la vascularización sirve de andamio para las células que

forman el hueso, la formación de hueso nuevo y la reparación de fracturas (Fernández-Tresguerres et al., 2006; Chim et al., 2013; Walsh et al., 2015).

Además, también es especialmente importante la adecuada inervación para mantener la integridad del tejido óseo. Esta inervación vendría dada por el sistema nervioso autónomo y las fibras nerviosas sensoriales. Existen fibras en el periostio, endostio, hueso cortical, incluso asociadas a los vasos sanguíneos de los conductos de Volkman así como neuropéptidos y sus receptores en el interior del hueso (Fernández-Tresguerres et al., 2006). Las dos ramas del sistema nervioso autónomo, adrenérgica y colinérgica, están implicadas en la remodelación ósea. La primera, favorece la pérdida ósea, sin embargo, la actividad colinérgica fomentaría la formación (Eimar et al., 2013).

#### 3.1.5.4. Factores nutricionales

Su interés reside en la posibilidad de modificarlos y además pueden modular el potencial genético. Es necesario un mínimo de calcio para que se produzca la mineralización que se establece en unos 1200 mg hasta los 25 años. En los siguientes años, hasta los 45, no debería ser inferior a 1 gramo y después de la menopausia, al menos debe ser de 1500 mg al día. Además, hábitos tóxicos como el tabaco, el alcohol, la cafeína o el exceso de sal se consideran como factores de riesgo para la aparición de osteopenia. Por lo tanto, la nutrición y otros factores ambientales podrían contribuir a una prevención eficaz de la osteoporosis a largo plazo (Fernández-Tresguerres et al., 2006; Rizzoli et al., 2014).

En situaciones de desnutrición severa (por ejemplo, en la anorexia nerviosa) o de baja ingesta proteica, se puede alterar la masa ósea, reducir la densidad mineral y, por tanto, crear una situación de mayor riesgo de fractura (Rizzoli et al., 2014).

#### 3.1.5.5. Hormonas

##### ***Hormona paratiroidea o parathormona (PTH):***

La PTH es una hormona polipeptídica de 84 aminoácidos, que se secreta en el retículo endoplásmico de las principales células de las glándulas paratiroides, actuando como regulador rápido de la homeostasis para evitar situaciones de hipocalcemia (Walsh et al., 2015; Prieto y Prieto, 2010).

La actividad biológica de la PTH se encuentra en los 34 aminoácidos de su extremo amino terminal y en la región del 28 al 34 de encuentra el punto donde se combina con su receptor en las células diana. Los tejidos diana de la PTH, son el hueso y el riñón y en ellos encuentran una serie de receptores formados por proteínas que se encuentran acopladas a una proteína G. Cuando se produce la combinación entre PTH con su proteína receptora, esta sufre un cambio conformacional que hace que se disocie de la proteína G, produciendo la activación de una serie de mediadores (quinasa A, fosfolipasa C y proteína quinasa C) que tienen como resultado la fosforilación de factores de transcripción tales como el Cbfa1 (core binding factor A1), clave en la diferenciación de células precursoras de osteoblastos (Prieto y Prieto, 2010).

La secreción de PTH está regulada principalmente por la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el plasma. Si el calcio disminuye, se activa una secreción rápida de PTH y si aumenta, ocurre de manera contraria (Walsh et al, 2015). En las células paratiroides y en sus tejidos diana se encuentra un sensor o receptor. Una proteína que detecta la concentración de calcio en plasma y regula de manera continua la secreción de PTH. Dicha proteína se denomina CaSR, descubierta en 1993, pertenece a la superfamilia de “receptores acoplados a la proteína G”. Aunque no es específica para el  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que responde ante otros cationes, por este tiene una afinidad superior (Prieto y Prieto, 2010). Existen otros factores implicados en la formación de PTH como el calcitriol o  $1,25(\text{OH})_2$  vitamina D, que también posee receptores en las células principales paratiroides y que, a concentraciones elevadas en plasma, inhiben la formación de PTH. Además, el fosfato plasmático también parece estimular de manera directa la producción de PTH, sobre todo en situaciones de hiperfosfatemia (Prieto y Prieto, 2010; Walsh et al, 2015).

Su función principal consiste en controlar de manera continua la homeostasis del calcio actuando a nivel de huesos y riñones, de manera directa, y en los intestinos, de manera indirecta, a través del calcitriol. Regula y mantiene la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el líquido extracelular evitando la hipocalcemia (Prieto y Prieto, 2010; Walsh et al, 2015). Además, la PTH posee receptores en los osteoblastos y células del estroma, uniéndose a ellos para incrementar la producción de RANKL, de M-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos) y de IL-1, IL-2 y TNF- $\alpha$ . Por otra parte, disminuye la expresión OPG, para que se pueda producir la unión RANK-RANKL y aumentar la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos potenciar la salida de calcio a la sangre (Walsh et al, 2015).

Por tanto, la PTH es la hormona hipercalcemiante por excelencia. Cuando disminuye el calcio plasmático, aumenta su secreción, actuando sobre el hueso, favoreciendo la reabsorción. Esto tiene lugar con dosis altas y continuas. Sin embargo, la administración de PTH a dosis pequeñas e intermitentes produce un aumento de la formación ósea, es decir, es anabólica.

### ***Proteína relacionada con la PTH (PTHrP)***

Está formada por tres péptidos con secuencias semejantes. Comparte receptores en hueso y riñón con la PTH, sintentizándose en la mama, en la placenta, en el sistema nervioso, útero, pulmón, hueso y células musculares de los vasos. En condiciones fisiológicas, no es posible detectarla en sangre. En cuanto a su relación con el metabolismo óseo, va a participar en la formación de hueso endocondral, participando en la proliferación y diferenciación de los condrocitos (Prieto y Prieto, 2010).

### ***Hormonas tiroideas***

Son la tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3) responsables de estimular la glándula tiroidea. Estas hormonas poseen la capacidad de estimular a los osteoblastos para mineralizar la matriz osteoide y a los condroblastos para producir conseguir elongar la epífisis de los huesos largos (Kenkre y Bassett, 2018). Por lo tanto, cuando existe un déficit de hormona tiroidea, la tasa de remodelado y recambio óseo disminuye dando lugar al cretinismo, caracterizado tanto por baja estatura como por alteraciones neurológicas. (Fernández-Tresguerres et al 2006; Kenkre y Bassett, 2018). La tiroxina (T4) aumenta la producción de RANKL e IL-6 por parte de los osteoblastos, estimulando la osteoclastogénesis.

### ***Estrógenos***

El principal regulador endocrino del remodelado óseo en hombres y mujeres son los esteroides sexuales. Como se han empleado como variable independiente en este trabajo se estudiarán en un apartado aparte.

### ***Calcitonina***

La calcitonina, hormona polipeptídica de 32 aminoácidos, se libera cuando aumentan los niveles de calcio por las células C parafoliculares de la glándula tiroides. Aunque su función fisiológica es algo incierta, está encargada de inhibir la reabsorción ósea al unirse a los receptores de calcitonina de los osteoclastos (Kenkre y Bassett, 2018). Además, se ha observado que activa la  $1\alpha$ -hidroxilasa de la 25-OH-D cuando la calcemia es normal, a diferencia de la PTH, que solo lo haría en situaciones de hipocalcemia (Prieto y Prieto, 2010).

### ***Hormona de crecimiento***

La hormona de crecimiento (GH, del inglés *growth hormone*), es una hormona peptídica de 191 aminoácidos que se secreta en la hipófisis o glándula pituitaria. Como se ha empleado como variable independiente en este trabajo se estudiará en un apartado aparte.

### ***Glucocorticoides***

Los glucocorticoides tienen la capacidad de disminuir la formación del hueso ya que ayudan a la supervivencia de los osteoclastos e inducen la apoptosis de los osteoblastos. Por lo tanto, en dosis superiores a las fisiológicas, se produce un aumento de RANKL y una disminución de OPG favoreciendo el proceso de reabsorción causando osteoporosis (Kenkre y Bassett, 2018).

### ***Vitamina D***

La vitamina D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> o calciferoles, son esteroides cuya función principal consiste en mantener las concentraciones plasmáticas del calcio y del fósforo procurando una adecuada mineralización y mantenimiento del esqueleto (Treguerres, 2010; Kenkre y Bassett, 2018). La vitamina D<sub>2</sub>, escasea en los alimentos y a todos los efectos se comporta como la vitamina D<sub>3</sub>, que deriva del colesterol y tampoco abunda en los alimentos en estado natural (Prieto y Prieto, 2010; Prisby, 2017). Necesitan su activación mediante la luz solar.

Existen receptores de vitamina D (RVD) en casi todas las células del organismo, en concreto, en células intestinales y paratiroides encargadas de la homeostasis del calcio y el fósforo.

La vitamina D, es una hormona esteroidea esencial para el metabolismo mineral gracias a la acción que desempeña en intestino, hueso, cartílago y riñón. Además, está involucrada en el desarrollo de piel, músculos y sistema inmune. En el intestino, favorece la absorción intestinal de calcio y fósforo, esto va a producir una acción indirecta en el hueso facilitando los materiales para la mineralización de la matriz orgánica (Prisby, 2017). Por lo tanto, cuando hay un déficit de vitamina D, la matriz no se va a mineralizar de manera correcta, produciendo unos huesos más débiles y deformados caracterizando el raquitismo en el niño. Además, el calcitriol actúa de manera directa en el hueso ya que existen receptores RVD en los osteoblastos y al unirse a ellos estimula la síntesis de proteínas no colágenas y a su vez estimula la diferenciación de células precursoras de osteoclastos para favorecer la reabsorción ósea (Prieto y Prieto, 2010).

#### 3.1.5.6. Factores de crecimiento

Como se ha descrito anteriormente, los factores de crecimiento son polipéptidos que se encargan de regular determinados procesos celulares como la proliferación y diferenciación o remodelación de la matriz. Entre los factores de crecimiento están:

#### ***Factores de crecimiento transformantes (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3)***

Los TGF- $\beta$  1-3 son pleiotrópicos y solo están presentes en los mamíferos. Regulan la proliferación celular, la migración y diferenciación durante el desarrollo embrionario y participan de forma activa en el mantenimiento de la homeostasis tisular en adultos. Sin embargo, su función más importante es la de reclutar células madre progenitoras que participen en el proceso de remodelado (Xu et al., 2018). Dentro de la superfamilia del TGF- $\beta$ , el TGF- $\beta$ 2 y el TGF- $\beta$ 3 están implicados en la condrogénesis y el TGF- $\beta$ 1 en la fisiología del hueso. El TGF- $\beta$ 1, por tanto, actúa como factor quimiotáctico de células osteoprogenitoras y a su vez, estimula la proliferación y diferenciación de osteoblastos que va a generar la producción y activación de citoquinas que favorecen la génesis y activación de osteoclastos, comenzando así el proceso de remodelado. Junto a todo ello,

se produce la inducción de la transcripción del mRNA del factor de crecimiento endotelial (VEGF), que es imprescindible para que se desarrolle la red vascular ósea (Prieto y Prieto, 2010; Crane y Cao, 2014).

### ***Factores similares a la insulina (IGF I-II)***

El sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF I y II) tienen una función diversa, por un lado, actúan como potentes mitógenos y, en algunas ocasiones como factores de diferenciación. En el hueso, IGF I y II son muy abundantes y se almacenan inactivados unidos a sus proteínas de unión (IGFBP, IGF *binding factor* 1 a 6) en la matriz. Durante el proceso de remodelado, se libera IGF-I activado siendo un hecho crítico para la homeostasis del hueso. Prácticamente el 80% del IGF-I se produce en el hígado, aunque puede ser sintetizado por tejidos locales incluido el hueso (Kawai y Rosen, 2012). Aunque es un sistema complejo, se acepta que IGF-I es críticamente importante en la regulación del crecimiento, desarrollo y metabolismo óseo, actuando de forma activa en la interacción osteoclasto-osteoblasto (Fernández-Tresguerres et al., 2006; Mohan y Kesavan, 2012). Están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales. La GH, los estrógenos y la progesterona estimulan su producción y los glucocorticoides la disminuyen. IGF-II es el más abundante de la matriz ósea y tiene un papel importante durante la embriogénesis, aunque en el esqueleto maduro se desconoce su función (Fernández-Tresguerres et al., 2006).

### ***Proteínas morfogenéticas óseas (BMP)***

Son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  conocidos por ser potentes inductores de la formación ósea (osteoinductores) (Fernández-Tresguerres et al., 2006; Drazin et al., 2017). La BMP-2, BMP-4 y la BMP-7 son las más estudiadas en cuanto a curación ósea (Buza y Einhorn, 2016). Se sintetizan en las células óseas, llevan a cabo una función crítica en la embriogénesis temprana y en el mantenimiento de la masa ósea en el esqueleto ya formado. Junto con Wnt, desempeñan un papel crucial en las primeras etapas de la osteoblastogénesis, se unen a las células osteoprogenitoras produciendo un aumento de transcripción de genes osteoinductores como Runx2 para la diferenciación de los osteoblastos (Capulli et al., 2014; Buza y Einhorn, 2016). También

tienen un papel en la diferenciación de las células estromales de la médula hacia condrocitos y adipocitos. Además, tienen funciones extraóseas a nivel vascular y neuronal (Biver et al., 2013).

### ***Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)***

La familia de polipéptidos PDGF incluyen el PDGF A, B, C y D, codificados por cuatro genes que se sitúan en diferentes cromosomas (Hollinger et al., 2008). Desempeñan un papel importante en la curación de fracturas ya que atraen al sitio de fractura a neutrófilos, macrófagos, células progenitoras, al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), del que se hablará más adelante y a la interleuquina 6 (IL-6) para así regular la angiogénesis y favorecer a la curación del hueso (Buza y Einhorn, 2016). PDGF es el reparador por excelencia ya que actúa uniéndose a receptores en la superficie células de las células madre mesenquimales ejerciendo efectos estimulantes como la quimioatracción, además de su potencia mitógena y su capacidad para inducir la angiogénesis (Hollinger et al., 2008).

### ***Factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23)***

Los mamíferos poseen 22 miembros de FGF. Algunos son intracelulares, otros, tipo hormona y el resto tienen gran afinidad por la heparina y actúan de manera paracrina (Charoenlarp et al., 2017). El FGF-23 fue descubierto en el año 2000 por tres grupos de investigadores. Es producido por los osteocitos y se describe como una proteína agrupada filogenéticamente con el FGF19 y el FGF21, que constituyen una subfamilia FGF con capacidad de actuar como hormonas ya que pueden combinarse con receptores en presencia de la proteína Klotho (Prieto y Prieto, 2010; Charoenlarp et al., 2017). Al combinarse con su receptor en el túbulo proximal va a causar la inhibición del cotransportador Na/P lo que va a crear una situación de fosfaturia. Además, junto a su cofactor Klotho, inhibe la actividad de la  $1\alpha$ -hidroxilasa renal, produciendo una menor síntesis de la  $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ . Este eje hueso-riñón, tendría como función principal regular la homeostasis del fósforo y de  $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$  (Crane y Cao, 2014; Prieto y Prieto, 2010). Por todo ello, si existe un déficit de FGF-23 o la ausencia de su cofactor, se va a crear una situación de hiperfosfatemia, ya que estaría reducido su efecto fosfatúrico y tasas

elevadas plasmáticas de 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>. Si existe un exceso, se producirá la situación contraria (Prieto y Prieto, 2010).

#### ***Factor de crecimiento epidérmico (EGF)***

La familia de ligandos EGF son potentes mitógenos de células madre de la médula ósea que son las progenitoras de los osteoblastos. Sin embargo, todos los EGF tienen un papel en la inhibición de los osteoblastos en una vía dependiente de su receptor EGFR. Además, están involucrados en la inhibición de la expresión de genes marcadores de osteoblastos como son la fosfatasa alcalina, la sialoproteína ósea, la osteocalcina y los factores de transcripción específicos de los osteoblastos como son Runx2 y Osterix (Zhu et al., 2011; Zhang et al., 2011). Zhang et al (2011) sugieren que EGF regula la osteoclastogénesis y la reabsorción mediante la señalización de EGFR.

#### ***Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)***

VEGF es una proteína que estimula la angiogénesis restaurando el suministro de oxígeno a los tejidos cuando la circulación sanguínea es deficiente. Tanto la formación adecuada de hueso como la curación de fracturas están relacionadas con la osteogénesis y la angiogénesis y para ello el VEGF es un factor clave (Aryal et al., 2014; Strachna et al., 2014). Además, el hueso es un tejido con un gran componente vascular y es necesaria una adecuada relación entre los vasos sanguíneos y las células para mantener la vitalidad. La función principal de VEGF es la de crear nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario o durante una lesión, ejercicio muscular (Aryal et al., 2014). El VEGF, además, potencia el efecto osteogénico de las BMP y mediante los receptores que posee en los osteoclastos, favorece la agrupación de estas células en áreas de remodelado (Prieto y Prieto, 2010).

#### ***Factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF y M-CSF)***

GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) y G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor) son citoquinas hematopoyéticas capaces de dirigir la maduración de las células madre pluripotenciales hacia granulocitos maduros, macrófagos y células T en la médula ósea (Truong et al., 2017).

GM-CSF interviene en la producción de varias señales para la proliferación y supervivencia de células especialmente de tipo hematopoyético y ayuda a formar colonias progenitoras que se diferencien en granulocitos o macrófagos. En estados estacionarios, el GM-CSF está ausente y es cuando se producen los estímulos inflamatorios cuando aumentan sus niveles séricos. Además, es importante en la osteoclastogénesis y puede intervenir en la patogenia de la osteopetrosis (Fernández-Tresguerres et al., 2006).

M-CSF es el factor estimulador de colonias de macrófagos, producido por los osteoblastos y las células estromales. Se une a su receptor c-fms en los precursores de los osteoclastos promoviendo su supervivencia y proliferación, aunque no tienen ningún papel en la actividad de los osteoclastos (Fernández-Tresguerres et al., 2006; Kular et al., 2012; O'Brien et al., 2013).

## 3.2. OSTEOPOROSIS

La osteoporosis (OP) es la enfermedad ósea más frecuente; se dice que más de 200 millones de personas la padecen en el mundo, de los cuales unos 30 millones están en Europa y alrededor de 3 millones en España. Más del 50% de las mujeres que superan los 50 años, van a sufrir alguna fractura debido a la osteoporosis. Se dice que 1 de cada 3 mujeres y 1 de cada 5 hombres sufrirán fracturas debidas a la osteoporosis, lo que supone un importante problema de salud pública (Kenkre y Bassett, 2018). Además, la mayoría de las personas que padecen esta enfermedad, no van a ser conscientes de ello hasta que no se produzca una fractura, que en ocasiones ocurre de manera espontánea y por ello se denomina “epidemia silente” (Schurman et al., 2013).

### Concepto

En 1994 la OMS definió la osteoporosis como *“enfermedad sistémica esquelética, caracterizada por un descenso en la masa ósea y una alteración de la microarquitectura del hueso, lo que predispone a la aparición de fracturas”* (WHO Study Group, 1994).

Esta definición hace hincapié en el descenso cuantitativo de la masa ósea, pero también es importante la alteración de la calidad del hueso, de la microestructura, que predispondría a un aumento en la susceptibilidad a las fracturas. Sin embargo, la masa ósea no es el único determinante del riesgo. Son importantes los antecedentes personales de fractura previa o la existencia de alteraciones en las trabéculas de determinados huesos. Por ello, en 2001 la OMS promovió otra definición de osteoporosis como *“trastorno generalizado del esqueleto caracterizado por una alteración de la resistencia ósea que predispone a la persona a un mayor riesgo de fractura”*. En esta alteración de la resistencia estaría englobado el concepto de calidad y cantidad.

La cantidad ósea se mide a través de la densitometría, mientras que para estudiar la calidad habría que analizar la microestructura de determinados huesos (midiendo porosidad cortical, pérdida de conectividad trabecular, microlesiones...), a través de la micrografía computarizada o la resonancia magnética de alta resolución. Asimismo, se están estudiando marcadores plasmáticos para evaluar el metabolismo óseo, aunque aún no existe un consenso general para su uso clínico (Garnero, 2017).

## **Diagnóstico**

El diagnóstico de la osteoporosis se realiza a partir la medición de la densidad mineral ósea (DMO) en raquis lumbar y en cuello de fémur, mediante DXA (densitometría radiológica dual). Se diagnostica osteoporosis cuando la DMO ha disminuido por debajo de 2,5 veces la desviación estándar (DE) de lo que correspondería a una persona joven del mismo género.

En 1994 un comité de expertos de la OMS (WHO, 1994) estableció cuatro categorías diagnósticas, en función de la densidad mineral ósea, evaluada mediante densitometría ósea, comparando con la media del pico de masa ósea alcanzado en la juventud (T-score).

- a. Normal: DMO hasta 1 DE por debajo del pico
- b. Osteopenia: DMO entre 1 y 2,5 DE por debajo del pico
- c. Osteoporosis: DMO menor a 2,5 DE por debajo del pico
- d. Osteoporosis grave o establecida: cuando además se añade la presencia de una o más fracturas

## **Clasificación**

Según Riggs, (Riggs et al, 1998) existen dos tipos de osteoporosis, primaria y secundaria. Por un lado, la osteoporosis primaria, forma más común, que incluye la osteoporosis idiopática en adultos y la osteoporosis involutiva. La osteoporosis secundaria se relaciona con una enfermedad sistémica o intervención farmacológica y en su etiología se incluyen hipercortisolismo (Síndrome de Cushing), alcoholismo crónico, hiperparatiroidismo, diabetes mellitus tipo I, enfermedades reumáticas (artritis reumatoide), inmovilización o encamamiento, neoplasias (mieloma múltiple) o trastornos digestivos (gastrectomía, síndromes de malabsorción) (Romanillos y Rodriguez, 2003). Sin embargo, las causas que de forma más común causan osteoporosis secundaria son los glucocorticoides y la inmovilización (Kenkre y Bassett, 2018).

La osteoporosis primaria, a su vez puede clasificarse en tipo I o postmenopáusica y tipo II o senil (Sosa Henriquez, 2003).

La osteoporosis tipo I se produce sobre todo en mujeres, tras el cese de la función ovárica (entre los 50 y 65 años). Existe una pérdida acelerada de hueso, sobre todo hueso

trabecular. Son características las fracturas vertebrales por aplastamiento y las fracturas de Colles (de la extremidad distal del antebrazo).

La osteoporosis tipo II o senil, se produce en hombres y mujeres a partir de los 70 años. Afecta al hueso cortical y trabecular. Es una pérdida lenta. Son características la fractura de cuello de fémur y de húmero. Las diferencias se aprecian en tabla I.

### **Etiopatogenia**

Uno de los principales factores etiopatogénicos de esta enfermedad sería la deficiencia de estrógenos que ocurre en mujeres postmenopáusicas. La asociación entre la disminución de los niveles de estrógenos en la menopausia y la osteoporosis fue descrita por primera vez en 1940 por Fuller Albright, acuñando el nombre de “osteoporosis postmenopáusica” (Albright et al, 1940). Cuando se produce este déficit existe un recambio óseo acelerado, donde la formación ósea no es suficiente para compensar la reabsorción. Esto puede ser debido a una disfunción en los osteoblastos o a la pérdida de hueso maduro por una reabsorción excesiva (Kenkre y Bassett, 2018). La disminución de la función de los osteoblastos puede ser debida a la inhibición de factores de crecimiento locales o a la disminución en la síntesis. Además, el envejecimiento también supone un factor de riesgo ya que existe un menor número de osteoblastos, que además son incapaces de responder a las necesidades formativas del hueso (Kenkre y Bassett, 2018).

Como se comentó anteriormente, la masa ósea se adquiere hasta los 25-30 años, donde tiene lugar el pico de masa ósea, relacionado en un 60-80% con factores genéticos. Pero a partir de los 50 años, empieza a descender, debido al desequilibrio entre formación y reabsorción, en relación con el descenso de determinadas hormonas (GH, estrógenos y melatonina). Asimismo, en los últimos tiempos se ha sugerido la teoría del aumento del estrés oxidativo en la etiopatogenia de la osteoporosis.

### **Tratamiento**

El tratamiento de la osteoporosis tiene como objetivo principal evitar las fracturas. Lo primero es llevar a cabo medidas higiénico-dietéticas como dejar de fumar, caminar, tomar más de 1gr de calcio diario y tener en sangre más de 30 ng/ml de vitamina D.

El tratamiento farmacológico se basa en fármacos anti-resortivos o anabólicos. Los anti-resortivos más conocidos son los bifosfonatos, los moduladores selectivos del receptor de

estrógenos y el ranelato de estroncio. Actualmente el único tratamiento anabólico admitido por la FDA y la EMA (Agencia Europea del Medicamento) es el Teriparatide. Finalmente, están en estudio otros fármacos como los inhibidores de catepsina K o los anticuerpos anti-esclerostina (Burr et al., 2016).

- Bifosfonatos: como el alendronato, risendronato, ibandronato, ácido zaledrónico.... Tienen un efecto antiangiogénico y producen efectos beneficiosos en cuanto a la prevención de fracturas, sin embargo, poseen graves efectos secundarios ya que se acumulan durante años en la matriz ósea. Estos efectos adversos pueden ser la osteonecrosis de los maxilares o las fracturas subtrocantéreas atípicas, aunque tienen un bajo porcentaje de aparición (Ruggiero et al., 2014; Gedmintas, Solomon y Kim; 2013).
- Terapia hormonal de reemplazo (THR): mediante estrógenos y progestágenos y van a tener un buen efecto en la reducción de fracturas (Schurman, 2013).
- Raloxifeno: efectivo en la prevención de fracturas vertebrales en mujeres postmenopáusicas al actuar como modulador selectivo del receptor estrogénico (SERM), sin embargo, no se ha comprobado eficacia alguna en fracturas de cuello de fémur. Y aunque se ha probado como tratamiento preventivo eficaz contra el cáncer de mama, no se recomienda su uso durante más de 8 años.
- Ranelato de estroncio: disminuye la reabsorción y aumenta la formación en el proceso de remodelado. Después de 3 años de uso reduce en un 40% las fracturas vertebrales y en un 30% el resto de las fracturas (Schurman, 2013).
- Denosumab: es un anticuerpo monoclonal contra el RANKL. Disminuye las fracturas vertebrales en un 68% y en un 40% las del cuello del fémur, pero posee los mismos efectos secundarios que los bifosfonatos. Sin embargo, estos efectos adversos tienen mejor pronóstico ya que, a diferencia de los bifosfonatos, no se acumula en la matriz ósea ni es antiangiogénico (Farroki, Fornier y Boland, 2015).
- Teriparatide: péptido 1-34 de la PTH. Es el único fármaco anabólico que ha sido aprobado para el tratamiento de la osteoporosis. Sin embargo, su uso no debe superar los 18-24 meses por el riesgo de desarrollar osteosarcoma, según se ha visto en modelos animales (Vahle et al., 2004).

### 3.3. HORMONA DEL CRECIMIENTO

#### *Generalidades*

La hormona de crecimiento (somatotropina, GH, del inglés *growth hormone*), es una hormona peptídica de 191 aminoácidos que se secreta en la hipófisis o glándula pituitaria. La GH estimula el crecimiento de todos los tejidos del organismo, incluyendo cartílago y hueso. Por un lado, la GH junto con los esteroides gonadales, estimula la proliferación y diferenciación de los condrocitos del cartílago epifisario (Prieto y Prieto, 2010). Respecto al hueso, es capaz de estimular la proliferación y diferenciación de los osteoblastos (Kassem et al, 1993), pero también de los osteoclastos (Brixen et al, 1995). Existen receptores de GH en los condrocitos, osteoblastos y osteoclastos. Pero se sabe que también puede actuar de forma indirecta, a través de la síntesis de IGF-I (Kenkre y Bassett, 2018). Cuando existe un déficit de GH en el niño va a producir baja estatura, y su exceso gigantismo. En el adulto, un déficit causaría una disminución de la masa ósea y su exceso, acromegalia (Prieto y Prieto, 2010; Kenkre y Bassett, 2018).

#### *Receptores*

La GH pertenece al grupo de hormona peptídicas, esto quiere decir, que puede circular de forma libre en el plasma, aunque a diferencia del resto, puede circular también unida a proteínas plasmáticas y así aumentar su vida media (Ohlsson et al., 1998; Fernández-Tresguerres, 1999).

Para llevar a cabo sus efectos, es necesario que la GH se una a un receptor específico GHR. Esta unión desencadena una cascada de transducción, que es la responsable de la acción de la GH en los tejidos periféricos (Baumann et al., 1986; Gevers et al, 2002; Lindsey RC y Mohan, 2016). GHR, expresado por condrocitos y osteoblastos (Leung et al, 1996) es una proteína compuesta por un dominio extracelular, otro transmembrana y un tercero intracelular, situada de manera ubicua en la membrana de las células de casi todos los tejidos, sobre todo en hígado, tejido adiposo, corazón, riñones, intestino, pulmón, páncreas, cartílago y músculo esquelético (Fisker, 2006; Lanning y Carter-Su, 2006). Cuando GHR se activa se produce un cambio conformacional que induce a la activación del sistema enzimático Janus Kinasa II (JAK2). Esto conduce a la autofosforilación y a la fosforilación a las proteínas STAT que actúan también como

factores de transcripción uniéndose directamente a secuencias de ADN que producen como resultado, una regulación positiva de la expresión de IGF-I (Takeda y Akira 2000; Brooks et al, 2014; Lindsey y Mohan, 2016).

El GHR es un receptor de citoquinas clase 1. Se ha observado que cada molécula de GH se uniría a dos moléculas de receptor y para que se produzcan los efectos biológicos, debe existir una cantidad adecuada de GH que permita la dimerización de los receptores (Fernández-Tresguerres, 1999). Y, a diferencia de otras hormonas peptídicas, la GH tras la unión a GHR puede penetrar en el interior de la célula llegando hasta el núcleo intacta, o como producto degradado por los lisosomas.

### ***Eje GH/IGF***

La GH se secreta de forma pulsátil y actúa de forma directa o indirecta sobre los tejidos periféricos. Para ello estimula la síntesis y secreción de IGF-I fundamentalmente en el hígado (Tritos NA y Klibanski A, 2016). Además, la GH puede actuar directamente sobre los condrocitos, de tal manera que el tejido condral también estaría involucrado en la síntesis de IGF-I. La GH es capaz de estimular directamente a los condrocitos del cartílago de conjunción para producir el crecimiento del hueso (Issaksson et al, 1982; Schlechter et al., 1986) Gran parte de las acciones de la GH están mediadas por IGF-I, el cual ha sido reconocido como regulador clave en el crecimiento, desarrollo y metabolismo esquelético (Locatelli y Bianchi, 2014; Mohan y Kesayan 2012; Yakar et al, 2010).

Además de la GH, otras hormonas como la PTH y el  $17\beta$ -estradiol, regulan de forma positiva la expresión de IGF-I en los osteoblastos. En contraposición, glucocorticoides y  $1,25-(OH)_2D_3$  la regularían negativamente (Bikle y Wang, 2012; Xing et al, 2012; Canalis, 2005).

Los efectos de IGF-I están mediados por la unión a su receptor IGF-IR. Tanto IGF-I como IGF-II se unen a este receptor produciendo su efecto sobre los osteoblastos. IGF-IR posee una estructura muy similar al receptor de insulina (IR), al igual que IGF posee una gran analogía con la molécula de insulina y de ahí su nombre, de inglés "*Insulin-like Growth Factor*" (Centrella et al, 1990; Tresguerres, 1992). Además, la mayor parte de las IGF-I (99%) circulan en el plasma unidas a proteínas transportadoras (IGFBPs) aumentando su vida media. Se conocen 6 IGFBPs, entre las cuales destaca IGFBP-3 por formar

complejos con IGF-I e IGF-II, siendo su principal forma de transporte, controlado por GH (Rosen et al, 1994; Fernández-Tresguerres, 1999).

Las acciones de IGF-I pueden ser autocrinas y/o paracrinas, pero por lo general, el efecto agudo sería similar al de la insulina, mientras que el efecto crónico se produce sobre el hueso (Fernández-Tresguerres, 1999; Lindsey y Mohan, 2016).

### ***Efectos sobre el hueso***

Al disponer de receptores en prácticamente todas las células del organismo, la GH posee gran cantidad de funciones biológicas a nivel metabólico, cardiovascular, a nivel del sistema inmunitario, efectos en la proliferación celular, efectos sobre la masa muscular...etc. A nivel óseo, la GH estimula la proliferación de osteoblastos (Kassem et al, 1993), siendo necesaria la intervención de IGF-I y actuando sobre él de manera directa o indirecta. IGF-I estimula la función del osteoblasto maduro. Además, estimula la expresión de proteínas morfogénicas óseas, importantes para la diferenciación de osteoblastos y formación de hueso (Canalis, Economides y Gazzero, 2003) y estimula la carboxilación de la osteocalcina, marcador de la función de los osteoblastos (Tsuji et al, 2006).

En el proceso de remodelado, existe un equilibrio entre formación y reabsorción gracias a que los osteoblastos rellenan con matriz neoformada los espacios reabsorbidos. Además, son los propios osteoblastos los que lanzan las señales de reabsorción resultando un proceso perfectamente coordinado. Para estos eventos, son críticos RANKL y OPG. OPG se une a RANKL y compite con RANK, que se encuentra en la superficie de los osteoclastos, por lo tanto, OPG afecta a la osteoclastogénesis (Lacey et al, 1998). En todo este proceso, la GH intervendría en la estimulación de la producción de OPG y su acumulación en la matriz ósea que tendría un efecto negativo sobre la reabsorción (Rubin et al, 2002; Mrak et al, 2007; Giustina, Mazziotti y Canalis, 2008).

Otra función de la GH es la de estimular el crecimiento longitudinal del hueso de manera directa tras actuar sobre los condrocitos de la capa germinal de la placa epifisaria (Green, Morikawa y Nixon, 1985); o de manera indirecta mediado por IGF-I en las etapas posteriores de maduración (Ohlsson et al, 1992). Mientras que IGF-II participaría en el crecimiento longitudinal del hueso durante el periodo embrionario, es IGF-I el

responsable de ello durante el crecimiento (Baker et al, 1993; Liu et al, 1993). Sin embargo, el sistema GH/IGF también puede contribuir a la pérdida ósea debido a su disminución progresiva con la edad debido a una serie de factores asociados al envejecimiento como la disminución de esteroides sexuales, descenso de la actividad física, falta de sueño, nutrición inadecuada y aumento de la regulación negativa de GH e IGF (Lindsay y Mohan, 2016).

### **3.4. ESTRÓGENOS**

#### ***Generalidades***

El principal regulador endocrino del remodelado óseo en hombres y mujeres son los esteroides sexuales. Los estrógenos inhiben la actividad de los osteoclastos y aumentan su apoptosis. Además, aumentan la diferenciación de osteoblastos y la formación ósea, al menos en parte a través de la inhibición de la secreción de esclerostina por los osteocitos (O'Brien et al, 2013) y protegen a los osteocitos contra la apoptosis inducida por los corticoides (Guo y Bonewald, 2009). Durante la menopausia, la pérdida de estrógenos es la causa del desequilibrio del remodelado en las mujeres mayores de 65 años a favor de la reabsorción. Cuando disminuyen los estrógenos, se estimula el gen SOST y aumenta la esclerostina, disminuyendo la masa ósea (Guo y Bonewald, 2009).

#### ***Receptores en el hueso***

Los estrógenos actúan de manera fisiológica a nivel de casi todos los tejidos del organismo, tanto en hombres como en mujeres (Wend et al, 2012), interactuando con receptores de estrógenos (ER)  $\alpha$  y  $\beta$  (ER  $\alpha$  y ER  $\beta$ ). ER  $\alpha$  se identificó por primera vez en 1960 y ER  $\beta$  en 1996 (Kuiper et al, 1996). Ambos receptores se han detectado en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Bord et al, 2001; Crusode de Souza et al, 2009). Además, también se expresan en células inmunitarias como son las células T y los monocitos, con un papel importante en la regulación del hueso (Harkonen y Vaananen, 2006; Pacifici et al, 2008; Kovats et al, 2015).

### ***Efecto de los estrógenos en el hueso***

Desde los años 40, Fuller Albright asoció la deficiencia de estrógenos en las mujeres con pérdida de hueso y osteoporosis (Albright, 1940). Gracias a estos estudios, actualmente se considera al estrógeno como el principal regulador sistémico del metabolismo óseo en mujeres y también en hombres (Khosla et al, 2011). Al principio se pensó que al ser el estrógeno clave en la regulación del metabolismo óseo en mujeres, la testosterona, de manera análoga, lo sería en los hombres. Sin embargo, Falahati-Nini et al, demostraron que el estrógeno contribuye con el 70% al efecto total de los esteroides sexuales sobre la pérdida de hueso en hombres de edad avanzada, mientras que la testosterona no llegaría al 30% (Falahati-Nini et al, 2000). Los estrógenos son anabólicos para el hueso, mediante la inhibición de la diferenciación de osteoclastos, al inhibir TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 (Compston, 2001) y favoreciendo la liberación de OPG por parte de los osteoblastos (Bord et al, 2003). Por tanto, la deficiencia de estrógenos induce la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, que estimulan la osteoclastogénesis directamente y por medio de la producción de RANKL en las células precursoras de la médula ósea.

### ***Efecto de los estrógenos en los osteoclastos***

Como se ha mencionado anteriormente, los osteoclastos poseen receptores de estrógenos. Estudios recientes sitúan al osteoclasto como objetivo directo para el estrógeno, que estimula su apoptosis, produciendo una reducción de la pérdida de masa ósea (Nakamura et al, 2007; Martin-Millán et al, 2010).

Además, el estrógeno tras una serie de mecanismos suprime la diferenciación de osteoclastos inducida por RANKL (Huber et al, 2001). Además de estos efectos directos sobre los osteoclastos, parece que los estrógenos también pueden regular indirectamente su formación y actividad. Eghbali-Fatourehchi et al, en 2003 demostraron que el estrógeno suprime la producción de RANKL por los osteoblastos y aumenta la producción de OPG (Khosla et al, 2001). Además, produce una disminución de la secreción de citoquinas proabsorción, como IL-1, IL-6. Pacifici et al, propusieron que la rápida pérdida ósea tras la pérdida de estrógenos podría ser debida a un incremento de las células T que aumentaría los niveles de TNF- $\alpha$  y con ello aumentaría la osteoclastogénesis de manera indirecta (Roggia et al, 2001; Cenci et al, 2000).

### ***Efecto del estrógeno en la formación ósea***

Como se ha descrito, en un estado de deficiencia de estrógenos hay un aumento tanto de reabsorción como de formación, pero llega un momento en el que la formación no es suficiente para compensar las áreas de hueso perdidas, lo que resulta en una pérdida neta de hueso (Khosla et al, 2012).

Existen tres mecanismos clave por los cuales la deficiencia de estrógenos provoca una menor producción de hueso: 1) aumento de la apoptosis de osteoblastos, 2) aumento del estrés oxidativo y 3) aumento de la actividad de RANKL (Koshla et al, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que el estrógeno inhibe la apoptosis de osteoblastos aumentando su vida media y así su capacidad funcional formadora de hueso (Kousteni et al, 2001). Manolagas et al, en 2007, demostraron que las personas de edad avanzada experimentaban un aumento del estrés oxidativo en el hueso. Los productos resultantes de ese estrés oxidativo, incluido el oxígeno reactivo, (ROS) producen una disminución en la osteoblastogénesis y una reducción de la vida media de osteoblastos y osteocitos. Por el contrario, ROS favorece la generación, función y supervivencia de los osteoclastos (Manolagas et al, 2007). Por lo tanto, la combinación de envejecimiento y deficiencia de estrógenos conlleva a un deterioro en la formación ósea (Almeida et al, 2007).

Por último, en cuanto al aumento de la actividad de RANKL, hay estudios que demuestran que la deficiencia de estrógenos está relacionada con un aumento importante en la actividad de RANKL en los osteoblastos (Chang et al, 2009).

#### 4. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Al ser la osteoporosis la enfermedad ósea más prevalente y ante la posibilidad de que se vean afectados pacientes subsidiarios de tratamientos implantológicos, bien por la propia enfermedad o por los efectos adversos de los fármacos que actualmente están aprobados para su tratamiento, creemos justificado llevar a cabo la investigación de nuevas alternativas en la terapia contra la osteoporosis sistémica.

La GH es una de las hormonas que regula el crecimiento y el remodelado óseo. Se sabe que la GH es anabólica para el hueso, pero además favorece el proceso de remodelado, es decir, favorece la proliferación y diferenciación de osteoblastos y osteoclastos. Se sabe que es capaz de aumentar las propiedades biomecánicas tras una fractura tibial experimental, tanto en ratas jóvenes como en ratas viejas (Bak y Andreassen, 1991).

Existen estudios que demuestran que la deficiencia de GH durante la niñez, conduce a una disminución de la DMO en el hueso adulto, aumentando el riesgo de fractura (Boer et al, 1994; Holmes et al, 1994; Rosen et al, 1997; Simpson et al, 2002). Igualmente, se ha demostrado, que la administración de GH exógena aporta efectos beneficiosos en el hueso de aquellos pacientes que tienen un déficit de GH, (Landin-Wilhelmsen et al, 1999).

La prevalencia de la osteoporosis sufre un incremento a medida que aumenta la edad, tanto en mujeres como en hombres. Este hecho puede ser explicado por la consecuente disminución de peso, ejercicio físico y masa muscular, así como una falta de aporte de ciertos nutrientes importantes a la dieta (Krantz, et al, 2015). Además, con la edad también disminuye la secreción de GH, que suele ser medida como IGF-1 sérico. De hecho, hay autores que hablan de la “somatopausia”, como un déficit de GH que se produce con la edad (Toogood, 1996).

Por otro lado, la deficiencia de estrógenos en mujeres postmenopáusicas se relaciona muy estrechamente con la aparición y gravedad de la osteoporosis. Un estudio de Turner et al., en 1994 demuestra que IGF-I es más bajo en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis y en concreto, en aquellas que no recibían terapia de remplazo hormonal de estrógeno (TRH), en comparación con los controles (Turner et al, 1994). Sin embargo, en aquellas mujeres que, sí que estaban bajo esta terapia, se reducía notablemente el riesgo de fractura. Además, el estrógeno mejoraba la diferenciación osteoblástica de las células madre osteoprogenitoras mediante la activación de Wnt/  $\beta$ -Catenina (Hong et al, 2006; Bhukhai et al., 2012).

Durante la última década, el uso de TRH estuvo controvertido debido a su relación con ciertos efectos adversos como el desarrollo de cáncer de mama, tromboembolismo venoso, accidente cerebrovascular y enfermedad coronaria (Rossouw et al, 2002). Sin embargo, un análisis más reciente de la *Women's Health Initiative* (WHI) asegura que el comienzo de la TRH de forma temprana tras la menopausia y mantenerla durante un tiempo limitado podría conseguir efectos beneficiosos sin aumentar el riesgo de desarrollo de efectos adversos (Sassarini y Lumsden, 2015).

Por todo ello, y dado que no se ha investigado aún el efecto de la GH asociada a los estrógenos para mejorar el hueso osteoporótico, se plantea este estudio piloto como Trabajo de Investigación del Máster de Ciencias Odontológicas.

## 5. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Respecto a todo lo expuesto anteriormente, nos planteamos como HIPÓTESIS DE TRABAJO: Si administráramos GH (2 mg/kg/día durante 10 semanas), estradiol (125 µg/semana durante 10 semanas) en ratas osteoporóticas, tanto por separado, como de manera conjunta, mejorarían las condiciones del hueso osteoporótico.

Por lo tanto, teniendo como referencia la hipótesis planteada, este trabajo se propone los siguientes objetivos generales y específicos:

Generales:

1. Evaluar el efecto que produce la retirada de estrógenos en el hueso viejo
2. Investigar el efecto de la administración sistémica de GH, de estrógenos o de ambos en el hueso osteoporótico
3. Valorar las diferencias que se producen en el hueso osteoporótico con la administración de GH, de estrógenos y de GH + estrógenos

Específicos:

1. Estudiar mediante análisis morfométrico si la ovariectomía bilateral afecta al área ósea, área cortical, área trabecular y la porosidad cortical de la tibia de ratas viejas.
2. Estudiar mediante análisis morfométrico si hay diferencias respecto al área ósea, área cortical, área trabecular y la porosidad cortical del hueso de las ratas a las que se les administra GH en comparación con el hueso de las ratas ovariectomizadas sin tratamiento.
3. Estudiar mediante análisis morfométrico si hay diferencias respecto al área ósea, área cortical, área trabecular y la porosidad cortical del hueso de las ratas a las que se les administra estrógenos en comparación con el hueso de las ratas ovariectomizadas sin tratamiento.
4. Estudiar mediante análisis morfométrico si hay diferencias respecto al área ósea, área cortical, área trabecular y la porosidad cortical del hueso de las ratas a las que se les administra GH + estrógenos en comparación con el hueso de las ratas ovariectomizadas sin tratamiento.
5. Estudiar mediante análisis morfométrico si existen diferencias en las áreas estudiadas, entre la administración de GH, de estrógenos y de GH + estrógenos.

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

### Animales

En este estudio piloto se emplearon 25 ratas Wistar hembras viejas de 22 meses de edad y alrededor de 300 g de peso. Se clasificaron aleatoriamente en 5 grupos experimentales: 5 ratas se consideraron como grupo control. Los 20 animales restantes se sometieron a ovariectomía bilateral (ovx). 5 de éstas se consideraron como grupo control ovx, otras 5 se trataron con estrógenos (valerianato de estradiol) a dosis de 125 µg/semana, otro grupo se trató con GH a dosis de 2 mg/kg/día y el cuarto grupo se trató con GH (2 mg/kg/día) más estrógenos (125 µg/semana). Todos los tratamientos se llevaron a cabo durante 10 semanas (Tabla II).

Por tanto, los grupos quedaron constituidos de la siguiente forma:

- Grupo control: ratas viejas sin tratamiento (n=5)
- Grupo control ovariectomía: ratas viejas sometidas a ovariectomía (ovx) (n=5)
- Grupo estrógenos: ratas viejas, sometidas a ovariectomía (ovx) y con tratamiento con estradiol (125 µg/semana durante 10 semanas) (n=5)
- Grupo GH: ratas viejas, sometidas a ovariectomía (ovx) y con tratamiento de GH (2 mg/kg/día durante 10 semanas) (n=5).
- Grupo GH+ estrógenos: ratas viejas, sometidas a ovariectomía (ovx) y con tratamiento de GH (2 mg/kg/día durante 10 semanas) más estradiol (125 µg/semana, durante 10 semanas) (n=5).

Todos los animales recibieron los cuidados necesarios de acuerdo con el Comité de Experimentación animal de la UCM y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de la UCM.

Al cabo de las 10 semanas, los animales se sacrificaron por decapitación y la sangre se recogió y centrifugó para analizar diferentes parámetros séricos mediante ELISA.

### Análisis morfométrico

Se llevó a cabo un estudio morfométrico para cuantificar áreas óseas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares. Tras el sacrificio de los animales, se

extrajeron las tibias y se eliminaron los tejidos blandos. Se fijaron en formaldehído al 10% y tamponado a pH 7 y se cortaron en bloques de 2 cm que se incluyeron en metacrilato (2-hidroxietil-metacrilato). Esta forma de inclusión está basada en el trabajo de Donath y Breuner (1982), que permite el corte del hueso sin decalcificar. El estudio histológico se realizó a nivel de la unión entre la diáfisis y la metáfisis proximal de cada tibia. Los bloques iniciales se cortaron de nuevo mediante el sistema de corte y pulido Exakt® (Norderstedt, Alemania), que permite cortes de 200 micras. Cada muestra se pulió hasta un grosor de 50-80 micras. Las muestras se tiñeron con tricrómico de Masson y hematoxilina-eosina y se observaron al microscopio óptico. De cada tibia se obtuvieron 5 medidas y se realizó la media aritmética de las mismas. El estudio morfométrico se realizó mediante el analizador de imagen MIP-4 (Barcelona, España), que permite la medición de áreas en mm<sup>2</sup>. Los parámetros morfométricos medidos fueron Área Ósea, Área Cortical y Área Trabecular, siguiendo el método descrito previamente (Tresguerres et al, 2002). Tabla III. Y, además, la porosidad cortical, medida en porcentajes.

### **Análisis Estadístico**

Se calculó la media de cada grupo  $\pm$  la desviación estándar. El análisis estadístico de las medias se realizó mediante el software SPSS 22.0. Se utilizó el análisis multifactorial de la varianza (ANOVA) para buscar significatividad estadística. Se consideró significativo si  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### Resultados morfométricos

#### *Análisis de medidas y desviación estándar*

Realizadas las medidas morfométricas se realizaron las medias  $\pm$  la desviación estándar de los valores de área ósea, área ósea cortical, área ósea trabecular (medidas en mm<sup>2</sup>) y porosidad cortical (medida en porcentaje).

#### *Análisis de diferencias entre grupos*

Para obtener las diferencias de las medias entre los diferentes grupos, se realizó la prueba estadística de ANOVA tras realizar pruebas de normalidad, considerando valores estadísticamente significativos aquellos en los que la  $p < 0,05$ . Los resultados se representan en las figuras 1-4.

#### *Efecto de la ovariectomía bilateral en el hueso viejo*

Se observa una disminución del área ósea en el hueso de las ratas viejas ovx ( $4,53 \pm 0,17$ ) respecto al grupo control de ratas viejas sin ovx ( $5,05 \pm 0,15$ ), aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. Lo mismo ocurre con el área ósea cortical y trabecular, que disminuyen con la ovx, pero las diferencias no son estadísticamente significativas. En cuanto a la porosidad, aumenta en las ratas ovx respecto al grupo control ( $0,63 \pm 0,04$  vs  $0,47 \pm 0,09$ ) pero también de manera no significativa.

#### *Efecto de la GH*

Se pudo observar que la GH aumentaba el área ósea ( $5,47 \pm 0,13$  vs  $4,53 \pm 0,17$ ), el área cortical ( $5,34 \pm 0,16$  vs  $0,42 \pm 0,20$ ) y el área trabecular ( $0,13 \pm 0,03$  vs  $0,11 \pm 0,03$ ) en ratas ovx respecto a las ratas ovx sin tratamiento. Sin embargo, las diferencias solo fueron significativas para el área ósea ( $p=0,0001$ ) y para el área cortical ( $0,003$ ). En cuanto a la porosidad cortical, los cambios producidos no fueron significativos respecto al grupo ovx control ( $1,09 \pm 0,14$  vs  $0,63 \pm 0,04$ ), sin embargo, la porosidad cortical aumentó significativamente respecto a las ratas sin ovx ( $p=0,01$ ).

### *Efecto de los estrógenos*

Solo se observaron discretos incrementos del área ósea ( $4,77 \pm 0,14$  vs  $4,53 \pm 0,17$ ) y del área ósea cortical ( $4,69 \pm 0,12$  vs  $4,42 \pm 0,20$ ) en ratas ovx tratadas con estrógenos respecto a ratas ovx sin tratamiento. El área trabecular disminuye ligeramente ( $0,09 \pm 0,02$  vs  $0,11 \pm 0,03$ ) y la porosidad se mantiene constante ( $0,63 \pm 0,18$  vs  $0,63 \pm 0,04$ ), pero ningún parámetro alcanzó significatividad estadística.

### *Efecto de GH+ estrógenos*

La combinación de GH+estrógenos en ratas ovx aumentó el área ósea ( $5,18 \pm 0,60$  vs  $4,53 \pm 0,17$ ) de manera significativa respecto a las ratas ovx sin tratamiento ( $p=0,02$ ). El área ósea cortical ( $4,92 \pm 0,08$  vs  $4,42 \pm 0,20$ ), el área ósea trabecular ( $0,26 \pm 0,06$  vs  $0,11 \pm 0,03$ ) aumentan sin diferencias significativas y la porosidad disminuye ( $0,45 \pm 0,07$  vs  $0,64 \pm 0,04$ ) también sin alcanzar significatividad estadística.

### *Diferencias entre los grupos de tratamiento estudiados*

Respecto al área ósea, se encuentran diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo tratado con GH y el grupo tratado con estrógenos ( $5,47 \pm 0,13$  vs  $4,77 \pm 0,14$ ), siendo  $p=0,01$ . Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas con el grupo que combina GH+estrógenos, ni entre este grupo y el grupo tratado con estrógenos.

Respecto al área ósea cortical y al área ósea trabecular no se encuentran diferencias significativas entre las formas de tratamiento. Sin embargo, en cuanto a la porosidad, se encuentran diferencias significativas entre las ratas ovx tratadas con GH y las ratas ovx a las que se les aplica tratamiento combinado de GH+ estrógenos ( $1,09 \pm 0,13$  vs  $0,45 \pm 0,07$ ), siendo  $p=0,007$ .

## 8. DISCUSIÓN

En este estudio piloto se estudia en primer lugar el efecto que produce la deprivación estrogénica debida a la ovx bilateral sobre el hueso viejo de rata Wistar. La ovx bilateral en ratas constituye el modelo experimental de osteoporosis internacionalmente aceptado (Turner et al, 2001). Se sabe que la rata, a diferencia de la mujer, sigue teniendo estrógenos toda su vida, aunque en pequeñas concentraciones plasmáticas, por eso debe ser ovariectomizada para simular la menopausia humana. La rata adquiere su máxima masa ósea a los 12 meses y a los 22 meses ya se considera rata vieja desde el punto de vista del esqueleto. La rata de 22 meses equivale a 60 años de edad en el humano y 10 semanas de tratamiento equivalen a 6 años (Sengupta, 2013).

Lo que hemos investigado en este estudio piloto es si es necesario realizar la ovx a la rata vieja para apreciar diferencias en las distintas áreas óseas y en la porosidad cortical.

### *La ovariectomía no influye en las áreas óseas ni en la porosidad cortical*

En este estudio piloto no se han encontrado diferencias significativas en el área ósea, área cortical, área trabecular, ni porosidad cortical en las ratas viejas ovx respecto a las ratas viejas sin ovx.

Se sabe que el déficit de estrógenos conduce a la pérdida de masa ósea, contribuyendo al desarrollo de la osteoporosis (Manolagas, O'Brien y Almeida, 2013) como ocurre en estudios de otros autores (Spalding et al., 2014). En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas, lo que puede ser debido al pequeño tamaño de la muestra (5 ratas por grupo) dado que es un estudio piloto. Si hubiéramos empleado 8-10 ratas por grupo, las diferencias seguramente serían significativas.

Los efectos de los estrógenos sobre el hueso se deben básicamente a su acción sobre osteoclastos, osteoblastos y osteocitos. Cuando hay deficiencia de estrógenos, aumenta el número de UMB produciendo una mayor penetración trabecular y mayor porosidad cortical. Además, el balance negativo en las UMB contribuye a la pérdida ósea y a un cambio en la estructura (Almeida et al, 2017). Este equilibrio negativo puede ser debido a una cantidad excesiva de osteoclastos en relación con la necesidad de reparación (Sims y Martin, 2015; Almeida et al, 2017).

### *La GH aumenta el área ósea y el área cortical*

El segundo objetivo de este estudio piloto es estudiar el efecto que la administración exógena de GH podría tener sobre el hueso osteoporótico de un animal. Aunque la GH se ha utilizado en algunos estudios con excelentes resultados para tratar la osteoporosis posmenopáusia (Krantz et al, 2015), su uso está controvertido en la actualidad.

En este estudio piloto, se ha comprobado que la GH, administrada de forma subcutánea a dosis de 2 mg/kg/día (en dos inyecciones diarias) durante 10 semanas, tiene la capacidad de aumentar el área ósea, el área ósea cortical y el área ósea trabecular, aunque solo las dos primeras de manera estadísticamente significativa. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios, en los que la GH aumenta el área ósea cortical (Andreassen y Oxlund, 2000; Banu et al, 2001; Wang et al, 2001). Además, estos estudios corroboran que la GH tendría más efecto sobre el hueso cortical que sobre el hueso trabecular. Sin embargo, estos autores usan dosis algo más altas, entre 2,5 mg/kg y 2,7 mg/kg. Mosekilde et al., en 1998, compara diferentes dosis de GH en diferentes sitios óseos de ratas ovariectomizadas concluyendo que únicamente la dosis más baja (50 microg/kg) no tenía efecto significativo en ningún sitio probado. El resto de las dosis (1.25, 2.5, 5 mg/kg) tendrían efecto sobre el hueso cortical pero no sobre el trabecular (Mosekilde et al, 1998).

La GH tiene la capacidad de estimular el número y la función de los osteoblastos e interviene de manera activa en la regulación del remodelado óseo. Además, puede inducir a la liberación de IGF-I por parte de diferentes órganos y por los osteoblastos, estimulando la síntesis de colágeno (Martín-Monge et al, 2017). A su vez, IGF-1, estimula osteoblastos y osteoclastos y así la formación y reabsorción ósea, resultando más predominante la formación (Kenkre y Bassett, 2018) afirmaciones que contrastan nuestros resultados. Han sido muchos los estudios que comprueban la eficacia del tratamiento con GH sobre el metabolismo óseo aumentando la densidad mineral y la resistencia ósea cuando existe un déficit de GH y en pacientes con osteoporosis (Wüster et al, 1998; Landin-Wilhelmsen et al, 2003). Toogood en 1996, anunciaba la “teoría de la somatopausia” en la que expresaba que los cambios en la composición corporal, la bajada de la DMO, el menor rendimiento físico y el aumento del riesgo cardiovascular, estaban relacionados con la disminución del eje GH/IGF-1. Ancianos y personas con deficiencia de GH experimentarían cambios similares por lo que ambos grupos se beneficiarían de terapias con GH.

Respecto a la porosidad, en este estudio la GH provocó un ligero incremento en la porosidad cortical en las ratas ovx respecto a las ratas ovx sin tratamiento, aunque las diferencias no alcanzaron significatividad estadística. Sin embargo, la administración de GH indujo un aumento en la porosidad cortical de forma significativa respecto a las ratas sin ovx. Esto podría explicarse por el hecho de que la GH es capaz de favorecer primero la reabsorción y después la formación. Es posible que ese aumento de porosidad pueda deberse a un estímulo en el proceso de remodelado. Otra explicación es que esos poros (medidos por el morfómetro como espacios vacíos) puedan deberse en realidad a nuevos frentes de osteoblastos. Futuros estudios serán necesarios para confirmar estos resultados. En este estudio no se observaron efectos secundarios después de la administración de GH durante 10 semanas (equivalentes a 6 años en edad humana).

#### *Los estrógenos no producen cambios significativos en el hueso osteoporótico*

El tercer objetivo es valorar los efectos de los estrógenos en el hueso osteoporótico a dosis de 125 µg/semana de estradiol de forma subcutánea durante 10 semanas. En este estudio solo se observan cambios discretos en cuanto a área ósea y a área ósea cortical sin ser estas diferencias estadísticamente significativas. En el estudio de Alaam y Hussien, (2016) se muestra que las ratas ovariectomizadas que recibían estradiol a una dosis de 0,5 mg/kg/día durante 8 semanas experimentaban una disminución significativa de la osteocalcina sérica, la fosfatasa alcalina y la actividad de RANKL, sufriendo un aumento significativo de niveles de calcio sérico y OPG. Todo ello sugiere que los estrógenos pueden producir un efecto antirresortivo debido al incremento de OPG, factor que inhibe la reabsorción ósea y la diferenciación de osteoclastos (Alaam y Hussien, 2016). Los estrógenos se unirían directamente a los osteoblastos para incrementar la producción de OPG. Además, al disminuir RANKL se disminuye la activación de osteoclastos maduros. Bord et al, en 2003, documentaron que los osteoblastos humanos respondían a tratamientos con estrógenos a bajas dosis, disminuyendo RANKL y manteniendo OPG, que, a su vez, inhibe la unión RANK-RANKL reduciendo la reabsorción osteoclástica. De manera inversa, esto explica el mecanismo por el cual las ratas ovx sufrirían un aumento de reabsorción ósea al disminuir la producción de OPG y con ello facilitando la unión entre RANK y RANKL que estimularía la diferenciación de osteoclastos maduros (Okman-Kilic, 2015). Otros estudios (Sun et al, 2015; Spalding et al, 2014) demostraban que la terapia de reemplazo con estrógenos protegía frente a la pérdida de hueso en ratas

ovariectomizadas pero de manera transitoria. Indican que el momento en el que comienza la terapia es importante y que, pese a sus efectos preventivos, estos no serían suficientes para restaurar el nivel de hueso perdido. Sin embargo, estos estudios tenían una diferente metodología en cuanto a la edad de las ratas (12 semanas y 3 semanas respectivamente), y dosis distintas de estradiol, (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso y  $5\mu/100\text{g}$  de peso, respectivamente). White et al, en 2014, describen que los estrógenos no produjeron cambios significativos en la resistencia a la flexión de los huesos de ratas ovx ni mejoraron la porosidad de los mismos, apelando a la necesidad de estudios a largo plazo que determinen si los beneficios de la terapia con estrógenos superan a los riesgos asociados a la misma.

#### *La combinación de GH + estrógenos aumenta el área ósea*

El cuarto objetivo es lo más novedoso de este trabajo, ya que, para nuestro conocimiento, es la primera vez que se investiga el efecto de la administración sistémica de GH y de estrógenos conjuntamente en el hueso de un animal con osteoporosis inducida.

Como ya es conocido, la terapia de reemplazo hormonal (TRH) con estrógenos previene la pérdida ósea en la menopausia (Compston, 2001) y es por ello, que comparamos la terapia con GH con la terapia con estrógenos y un último grupo con una terapia combinada de ambas.

En este estudio se observó que la combinación de GH + estrógenos en ratas ovx aumentaba el área ósea de manera significativa respecto a las ratas ovx sin tratamiento. El resto de las áreas óseas aumentan y la porosidad disminuye, pero sin resultados significativos. Si ambos tratamientos por separado aumentan el área ósea podría suponerse que lo hicieran también de manera conjunta. Sin embargo, en este estudio, no se consiguen resultados significativos, posiblemente por el escaso tamaño de la muestra, los resultados parecen ir dirigidos a un aumento del área ósea, que ya es significativo con este escaso tamaño muestral y a la disminución de la porosidad. Sin embargo, serían necesarios estudios con un mayor tamaño muestral para confirmar estos resultados, puesto que, hasta el momento, no hay nada escrito.

Además, solo se encuentran diferencias significativas entre el tratamiento con GH y el tratamiento con estrógenos en lo que respecta a área ósea. El resto de las áreas y el resto de los tratamientos no presentan diferencias significativas entre sí, lo que nos puede indicar que combinar los estrógenos con la GH, no supondría un aumento significativo

de hueso y que la GH podría ser suficiente para cumplir con este objetivo, eliminando los estrógenos y sus posibles efectos adversos.

## 9. CONCLUSIONES

- La ovariectomía bilateral no induce cambios significativos en el área ósea, el área cortical y el área trabecular en las ratas viejas.
- La porosidad cortical aumenta con la ovariectomía, pero de forma no significativa en este estudio.
- El tratamiento con GH a una dosis de 2 mg/kg/día durante 10 semanas, aumenta el área ósea y el área cortical de manera significativa, respecto al grupo control de ratas ovariectomizadas sin tratamiento.
- El tratamiento con GH en ratas ovx produce un aumento significativo en la porosidad cortical en comparación con las ratas no ovx e induce un aumento no significativo respecto a las ratas ovx control.
- El tratamiento con estradiol a dosis de 125 µg/semana durante 10 semanas, no produce aumentos significativos en las diferentes áreas óseas respecto al grupo control de ratas ovariectomizadas sin tratamiento.
- El tratamiento con estradiol no produce cambios significativos en la porosidad cortical.
- El tratamiento combinado de GH+estrógenos aumenta significativamente el área ósea respecto al grupo control de ratas ovariectomizadas sin tratamiento.
- El tratamiento combinado de GH+estrógenos no induce diferencias en cuanto a la porosidad cortical.
- Solo existen diferencias significativas en las áreas estudiadas entre la GH y el estradiol, ya que la administración de GH indujo diferencias significativas respecto al área ósea al comparar con el grupo de estrógenos.
- La administración de GH durante 10 semanas es capaz de mejorar las áreas de hueso estudiadas, sin producir efectos secundarios en este modelo de osteoporosis experimental.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Alaam MM, Hussien NI (2016). “A comparative study between the effect of 17- $\beta$  estradiol and angiotensin converting enzyme inhibitor on osteoporosis in ovariectomized rats”. *Gen Physiol Biophys*, 35(4):433-441.
2. Albright F, Bloomberg E, Smith PH (1940). “Postmenopausal osteoporosis”. *Trans Assoc Am Physicians*, 298–205.
3. Almeida M, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, Kousteni S, O'Brien CA, Bellido T, Parfitt AM, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC (2007). “Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids”. *J Biol Chem*, 282:27285–27297.
4. Almeida M, Laurent MR, Dubois V, et al (2017). “Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology”. *Physiological Reviews*, 97(1):135-187.
5. Andreassen TT1, Oxlund H (2000). “The influence of combined parathyroid hormone and growth hormone treatment on cortical bone in aged ovariectomized rats”. *J Bone Miner Res*, 15(11):2266-75.
6. Aryal R, Chen XP, Fang C, Hu YC (2014). “Bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in bone tissue regeneration: new insight and perspectives”. *Orthop Surg*, 6(3):171-8.
7. Assesment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Study Group, Geneva, WHO. 1994. No.843.
8. Bayliss L, Mahoney DJ, Monk P (2012). “Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation”. *Surgery*, 30(2): 47-53.
9. Banu MJ, Orhii PB, Wang L, Kalu DN (2001). “Separate and combined effects of growth hormone and parathyroid hormone on cortical bone osteopenia in ovariectomized aged rats”. *Aging*, 13(4):282-92.
10. Bak B, Andreassen TT (1991). “The effect of growth hormone on fracture healing in old rats”. *Bone* 12:151-154.
11. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993). “Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth”. *Cell*, 75:73–82.
12. Baumann G, Stolar MW, Amburn K, Barsano CP, DeVries BC (1986). “A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization”. *J Clin Endocrinol Metab*, 62:134–141.

13. Bellido T (2014). "Osteocyte-Driven Bone Remodeling". *Calcified Tissue International*, 94(1):25-34.
14. Bhukhai K, Suksen K, Bhummaphan N, Janjorn K, Thongon N, Tantikanlayaporn D, Piyachaturawat P, Suksamrarn A, Chairoungdua A (2012). "A phytoestrogen diarylheptanoid mediates estrogen receptor/Akt/glycogen synthase kinase 3beta protein-dependent activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway". *J Biol Chem*, 287(43):36168–36178.
15. Bikle DD, Wang Y (2012). "Insulin like growth factor-I: a critical mediator of the skeletal response to parathyroid hormone". *Curr Mol Pharmacol*, 5:135–142.
16. Biver E, Hardouin P, Caverzasio J (2013). "The "bone morphogenic proteins" pathways in bone and joint diseases: translational perspectives from physiopathology to therapeutic targets". *Cytokine Growth Factor Rev*, 24(1):69-81.
17. Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC (2010). "Prostaglandins in Bone: Bad Cop, Good Cop?" *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(5):294-301.
18. Bonewald LF, Johnson ML (2008). "Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. Bone", 42: 606-615.
19. Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J (2001). "Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone". *J Clin Endocrinol Metab*, 86(5):2309–14.
20. Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE (2003). "The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts". *Bone*, 32,136–141.
21. Brixen K, Kassem M, Nielsen HK, Loft AG, Flyvbjerg A, Mosekilde L (1995). "Short-term treatment with growth hormone stimulates osteoblastic and osteoclastic activity in osteopenic postmenopausal women: a dose response study". *J Bone Miner Res*, 10(12):1865-74.
22. Brooks AJ, Dai W, O'Mara ML, Abankwa D, Chhabra Y, Pelekanos RA, et al (2014). "Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor". *Science*, 344:1249783.
23. Burr, DB (2016). "Bone Biomechanics and Bone Quality: Effects of Pharmaceutical Agents Used to Treat Osteoporosis". *Clinic Rev Bone Miner Metab*, 14: 197.
24. Buza JA, Einhorn T (2016). "Bone healing in 2016". *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*,13(2):101-105.

25. Canalis E, Economides AN, Gaggero E (2003). "Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton". *Endocr Rev*, 24:218–235
26. Canalis E (2005). "Mechanisms of glucocorticoid action in bone". *Curr Osteoporos Rep*, 3:98–102.
27. Capulli M, Paone R, Rucci N (2014). "Osteoblast and osteocyte: games without frontiers". *Arch Biochem Biophys*, 1;561:3-12.
28. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R (2000). "Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- $\alpha$ ". *J Clin Invest*, 106:1229–1327.
29. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E (1990). "Receptors for insulin-like growth factors-I and -II in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone". *Endocrinology*, 126:39–44
30. Chang J, Wang Z, Tang E, Fan Z, McCauley L, Franceschi R, Guan K, Krebsbach PH, Wang C-Y (2009). "Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB". *Nat Med*, 15:682–689.
31. Charoenlarp P, Rajendran AK, Iseki S (2017). "Role of fibroblast growth factors in bone regeneration". *Inflammation and Regeneration*, 37:10.
32. Chen X, Wang L, Zhao K, Wang H (2018). "Osteocytogenesis: Roles of Physicochemical Factors, Collagen Cleavage, and Exogenous Molecules". *Tissue Eng Part B Rev*, 24(3):215-225.
33. Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, Rosen V, Erber W, Xu J (2013). "Angiogenic factors in bone local environment". *Cytokine Growth Factor Rev*, 24(3):297-310.
34. Compston JE (2001). "Sex steroids and bone". *Physiol Rev*, 81: 419-47.
35. Crane JL, Cao X (2014). "Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- $\beta$  signaling in bone remodeling". *The Journal of Clinical Investigation*, 124(2):466-472.
36. Crusode de Souza M, Sasso-Cerri E, Cerri PS (2009). "Immunohistochemical detection of estrogen receptor beta in alveolar bone cells of estradiol-treated female rats: possible direct action of estrogen on osteoclast life span". *J Anat*, 215(6):673–81.
37. Drazin D, Choi E, Garcia A, Rustagi T (2017). "Bone morphogenic proteins are a good choice for select spinal surgeries and merit further research". *Journal of Spine Surgery*, 3(1):119-121

38. Donath K, Breuner G (1982). "A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Saeger-Schiff technique". *J Oral Pathol*, 11:318-320.
39. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL (2003). "Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women". *J Clin Invest*, 111:1221–1230.
40. Eimar H, Tamimi I, Murshed M, Tamimi F (2013). "Cholinergic regulation of bone". *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 13(2):124-32.
41. Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S (2000). "Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men". *J Clin Invest*, 106:1553–1560.
42. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil Isabel (1999). *Efecto de la hormona de crecimiento en la osteointegración*. Tesis Doctoral. 1999. UCM, Madrid.
43. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I (2006) a. "Histology and physiology of bone tissue". *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 1;11(1): E47-51.
44. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II (2006) b. "The remodeling process". *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 1;11(2): E151-7. b
45. Fisker S (2006). "Physiology and pathophysiology of growth hormone-binding protein: methodological and clinical aspects". *Growth Horm IGF Res*, 16:1–28.
46. Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HJ, Duarte JA (2014). "Bone quality: the determinants of bone strength and fragility". *Sports Med*, 44(1): 37-53.
47. Garner P (2017). "The utility of biomarkers in osteoporosis management". *Mol Diagn Ther*, 21(4):401-418.
48. Gedmintas L, Solomon DH, Kim SC (2013). "Bisphosphonates and risk of subtrochanteric, femoral shaft, and atypical femur fracture: a systematic review and meta-analysis". *J Bone Miner Res*, 28 (8): 1729-37.
49. Gevers EF, Van der Eerden BC, Karperien M, Raap AK, Robinson IC, Wit JM (2002). "Localization and regulation of the growth hormone receptor and growth hormone binding protein in the rat growth plate". *J Bone Miner Res*, 17: 1408–1419.
50. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E (2008). "Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors, and the Skeleton". *Endocrine Reviews*, 29(5):535-559.

51. Green H, Morikawa M, Nixon T (1985). "A dual effector theory of growth-hormone action". *Differentiation*, 29:195–198.
52. Guo D, Bonewald LF (2009). "Advancing our understanding of osteocyte cell biology". *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Diseases*, 1(2): 87-96.
53. Harkonen PL, Vaananen HK (2006). "Monocyte-macrophage system as a target for estrogen and selective estrogen receptor modulators". *Ann N Y Acad Sci*, 1089:218–27.
54. Hemmatian H, Bakker AD, Klein-Nulend J, Van Lenthe GH (2017). "Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction". *Current Osteoporosis Reports*, 15(5):401-411.
55. Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, Lynch S, Friedlaender GE (2008). "Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications". *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 90 (Suppl 1):48–54.
56. Hong L, Colpan A, Peptan IA (2006). "Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells". *Tissue Eng*, 12(10):2747–2753.
57. Huber DM, Bendixen AC, Pathrose P, Srivastava S, Dienger KM, Shevde NK, Pike JW (2001). "Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor". *Endocrinology*, 142:3800–3808.
58. Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA (1982). "Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly". *Science*, 216:1237–1239.
59. Jung SM, Kim KW, Yang C-W, Park S-H, Ju JH (2014). "Cytokine-Mediated Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis". *Journal of Immunology Research*, 2014:263625.
60. Kassem M, Blum W, Ristelli J, Mosekilde L, Eriksen EF (1993). "Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro". *Calcif Tissue Int*, 52:222–226.
61. Kawai M, Rosen CJ (2012). The Insulin-Like Growth Factor System in Bone: Basic and Clinical Implications. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 41(2):323-33.
62. Kenkre JS, Bassett J (2018). "The bone remodelling cycle". *Ann Clin Biochem*, 55(3):308-327.
63. Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR, O'Fallon WM, Riggs BL (2001). "Estrogen and testosterone have opposite effects on circulating OPG levels following induction of

- hypogonadism and aromatase inhibition in normal elderly men: potential mechanism for differential effects of estrogen versus testosterone on bone resorption". *J Bone Miner Res*, 16(Suppl 1):S146.
64. Khosla S, Melton LJI, Riggs BL (2011). "The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed?" *J Bone Miner Res*, 26:441–451.
  65. Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG (2012). "Estrogen and the Skeleton". *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23(11):576-581.
  66. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al (2000). "Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the Odf/Rankl–Rank Interaction". *The Journal of Experimental Medicine*, 191(2):275-286.
  67. Komori T (2010). "Regulation of osteoblast differentiation by Runx2". *Adv Exp Med Biol*, 658:43-9.
  68. Komori T (2013). "Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass". *Cell and Tissue Research*, 352(2):191-198.
  69. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC (2001). "Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity". *Cell*, 104:719–730.
  70. Kovats S (2015). "Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways". *Cell Immunol*, 294(2):63–9.
  71. Krantz E, Trimpou P, Landin-Wilhelmsen K (2015). "Effect of Growth Hormone Treatment on Fractures and Quality of Life in Postmenopausal Osteoporosis: A 10-Year Follow-Up Study". *J Clin Endocrinol Metab*, 100(9):3251-3259.
  72. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12):5925–30.
  73. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J (2012). "An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level". *Clin Biochem*, 45(12):863-73.
  74. Landin-Wilhelmsen K, Wilhelmsen L, Bengtsson B-Å (1999). "Postmenopausal osteoporosis is more related to hormonal aberrations than to lifestyle factors". *Clin Endocrinol (Oxf)*, 51:387–394.

75. Landin-Wilhelmsen K, Nilsson A, Bosaeus I, Bengtsson BA (2003). "Growth hormone increases bone mineral content in postmenopausal osteoporosis: A randomized placebo-controlled trial". *J Bone Miner Res*, 18:393–405.
76. Lanning NJ, Carter-Su C (2006). "Recent advances in growth hormone signaling". *Rev Endocr Metab Disord*, 7:225–235.
77. Leung K, Rajkovic IA, Peters E, Markus I, Van Wyk JJ, Ho KK (1996). "Insulin-like growth factor I and insulin down-regulate growth hormone (GH) receptors in rat osteoblasts: evidence for a peripheral feedback loop regulating GH action". *Endocrinology*, 137:2694–2702.
78. Lindsey RC, Mohan S (2016). "Skeletal Effects of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-I Therapy". *Molecular and cellular endocrinology*, 432:44-55.
79. Little N, Roger B, Flannery M (2011). "Bone formation, remodeling and healing". *Surgery*, 29(4): 141-45.
80. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993). "Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (IGF-1) and type 1 IGF receptor (IGF1R)". *Cell*, 75:59–72.
81. Locatelli V, Bianchi VE (2014). "Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis". *Int J Endocrinol*, 2014:235060.
82. Mosekilde L, Thomsen JS, Orhii PB, Kalu DN (1998). "Growth hormone increases vertebral and femoral bone strength in osteopenic, ovariectomized, aged rats in a dose-dependent and site-specific manner". *Bone*, 23(4):343-52.
83. Martin-Monge E, Tresguerres IF, Clemente C, Tresguerres JA (2017). "Local Application of Growth Hormone to Enhance Osseointegration in Osteoporotic Bones: A Morphometric and Densitometric Study". *Int J Oral Maxillofac Implants*, 32(4):751-758.
84. Manolagas SC (2000). "Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis". *Endocr Rev*, 21(2):115-37.
85. Manolagas SC, Almeida M (2007). "Gone with the Wnts: beta-catenin, t-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism". *Mol Endocrinol*, 21:2605–2614.
86. Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M (2013). "The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease". *Nat Rev Endocrinol*, 9: 699–712.

87. Martin-Millan M, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Zhao H, Weinstein RS, Jilka RL, O'Brien CA, Manolagas SC (2010). "The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone". *Mol Endocrinol*, 24:323–334.
88. Matic I, Matthews BG, Wang X, et al (2016). "Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood". *Stem Cells*, 34(12):2930-2942.
89. Mikami T, Kitagawa H (2013). "Biosynthesis and function of chondroitin sulfate". *Biochim Biophys Acta*, 1830(10):4719-33.
90. Mrak E, Villa I, Lanzi R, Losa M, Guidobono F, Rubinacci A (2007). "Growth hormone stimulates osteoprotegerin expression and secretion in human osteoblast-like cells". *J Endocrinol*, 192:639–645.
91. Mohan S, Kesavan C (2012). "Role of insulin-like growth factor-1 in the regulation of skeletal growth". *Curr Osteoporos Rep*, 10(2):178-86.
92. Morgan S, Poundarik AA, Vashishth D (2015). "Do Non-collagenous Proteins Affect Skeletal Mechanical Properties?" *Calcif Tissue Int*, 97(3):281-91.
93. Murshed M (2018). "Mechanism of Bone Mineralization". *Cold Spring Harb Perspect Med*, pii: a031229.
94. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, et al (2007). "Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of fas ligand in osteoclasts". *Cell*, 130:811–823.
95. O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi, H (2013). "Osteocyte control of osteoclastogenesis". *Bone*, 54: 258-6.
96. Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O, Lindahl A (1992). "Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate". *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:9826–9830.
97. Okman-Kilic T (2015). "Estrogen deficiency and osteoporosis". In: *Advances in Osteoporosis*. Ed. Yannis Dionyssiatis, 7-18.
98. Pacifici R (2008). "Estrogen deficiency, T cells and bone loss". *Cell Immunol*, 252(1–2):68–80.
99. Prideaux M, Findlay DM, Atkins GJ (2016). "Osteocytes: The master cells in bone remodeling". *Curr Opin Pharmacol*, 28:24-30.
100. Prieto L, Prieto S (2010). Fisiología del hueso. Fisiología humana. En: Tresguerres JAF, editor. *Fisiología humana*. 4ª Ed. México DF: Mc Graw Hill, p. 1015-1030.

101. Prisby RD (2017). "Mechanical, hormonal and metabolic influences on blood vessels, blood flow and bone". *J Endocrinol*, 235(3):R77-R100.
102. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ (1998). "A unitary model for involutional osteoporosis: Estrogen deficiency causes Type I and Type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men". *J Bone Miner Res*, 13:763-73.
103. Rizzoli R (2014). "Nutritional aspects of bone health". *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 28(6):795-808.
104. Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R (2001). "Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo". *Proc Natl Acad Sci*, 98:13960–13965.
105. Romanillos JO, Rodríguez EC (2003). Últimas investigaciones ortopédicas sobre osteoporosis y sus posibles aplicaciones prácticas. En: Rodríguez Merchan EC, Ortega Andreu M, Alonso Carro G, eds. *Fracturas osteoporóticas*. Prevención y tratamiento. Madrid: Médica Panamericana, 167-97.
106. Rosen CJ, Donahue LR, Hunter SJ (1994). "Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection". *Proc Soc Exp Biol Med*, 206(2):83-102.
107. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial". *JAMA*, 288:321–333.
108. Rubin J, Ackert-Bicknell CL, Zhu L, Fan X, Murphy TC, Nanes MS, Marcus R, Holloway L, Beamer WG, Rosen CJ (2002). "IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand in vitro and OPG in vivo". *J Clin Endocrinol Metab*, 87:4273–4279.
109. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia K, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al (2014). "American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw-2014 Update". *J Oral Maxillofac Surg*, 72(10) 1938-56.
110. Sassarini J, Lumsden MA (2015). "Oestrogen replacement in postmenopausal women". *Age Ageing*, 44: 551–558.

111. Sapir-Koren R, Livshits G (2011). "Bone mineralization and regulation of phosphate homeostasis". *Int Bone Miner Soc*, 8: 286-300.
112. Schurman L, Bagur A, Claus-Hermberg H, Messina OD, Negri AL, Sánchez A, et al (2013). "2012 Guidelines for the diagnosis, prevention and treatment of osteoporosis". *Medicina*, 73(1):55-74.
113. Sengupta P (2013). "The Laboratory rat: relating its age with human's". *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6):624-630.
114. Sims NA, Martin TJ (2015). "Coupling signals between the osteoclast and osteoblast: how are messages transmitted between these temporary visitors to the bone surface?" *Front Endocrinol*, 6:41.
115. Sosa Henriquez M (2003). "Protocolos de osteoporosis". *Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI)*.
116. Spalding M, Ferreira Amschlinger P, de Vasconcellos LM, de Moraes Gouvêa Lima G, Kerbauy WD, Balducci I, Carvalho YR (2014). "Evaluation of different periods of estrogen replacement onset in the tibia of ovariectomized rats". *Aging Clin Exp Res*, 26(5):465-71.
117. Sroga GE, Vashishth D (2012). "Effects of Bone Matrix Proteins on Fracture and Fragility in Osteoporosis". *Current Osteoporosis Reports*, 10(2):141-150.
118. Strachna O, Torrecilla D, Reumann MK, et al (2014). "Molecular Imaging of Expression of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF A) in Femoral Bone Grafts Transplanted Into Living Mice". *Cell Transplantation*, 23(7):901-912.
119. Sun X, Liang J, Wang C, Cao S, Hu Y, Xu X (2015). "Transient Effect of 17 $\beta$ -estradiol on Osteoporosis in Ovariectomized Rats Accompanied with Unilateral Disuse in the Early Phase". *Int J Med Sci*, 23;12(5):423-31.
120. Takeda K, Akira S (2000). "STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses". *Cytokine Growth Factor Rev*, 11:199-207.
121. Toogood AA, O'Neill PA, Shalet SM (1996). "Beyond the somatopause: Growth hormone deficiency in adults over the age of 60 years". *J Clin Endocrinol Metab*, 81:460-465.
122. Tresguerres JAF. "Somatomedinas (IGFs) y sus proteínas transportadoras". En: B Moreno Esteban y JAF Tresguerres, editor. *Retrasos del crecimiento*. 2ªEd. Madrid: Díaz de Santos SA; 1996. p. 71-72
123. Tritos NA, Klibanski A (2016). "Effects of Growth Hormone on Bone". *Prog Mol Biol Transl*, 138:193-211.

124. Truong MD, Choi BH, Kim YJ, Kim MS, Min BH (2017). "Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) significantly enhances articular cartilage repair potential by microfracture". *Osteoarthritis Cartilage*, 25(8):1345-1352.
125. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V (2006). "BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing". *Nat Genet*, 38:1424-1429.
126. Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD (2001). "Animal models for osteoporosis". *Rev Endocr Metab Disord*, 2(1): 117-27.
127. Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC (1994). "Skeletal effects of estrogen". *Endocr Rev*, 15:275-300.
128. Unal M, Creecy A, Nyman JS (2018). "The Role of Matrix Composition in the Mechanical Behavior of Bone". *Curr Osteoporos Rep*, 16(3):205-215.
129. Vahle JL, Long GG, Sandusky G, Westmore M, Ma YL, Sato M (2004). "Bone neoplasms in F344 rats given teriparatide [rhPTH (1-34)] are dependent on duration of treatment and dose". *Toxicol Pathol*, 32(4): 426-38.
130. Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G, Passi A (2014). "Hyaluronan: biosynthesis and signaling". *Biochim Biophys Acta*, 1840(8):2452-9.
131. Walsh, J (2015). "Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation". *Surgery*, 33(1); 1-6.
132. Wang L, Orhii PB, Banu J, Kalu DN (2001). "Effects of separate and combined therapy with growth hormone and parathyroid hormone on lumbar vertebral bone in aged ovariectomized osteopenic rats". *Bone*, 28(2):202-7.
133. Wang Y, Jia L, Zheng Y, Li W (2018). "Bone remodeling induced by mechanical forces is regulated by miRNAs". *Bioscience Reports*, 38(4): BSR20180448.
134. Wend K, Wend P, Krum SA (2012). "Tissue-Specific Effects of Loss of Estrogen during Menopause and Aging". *Front Endocrinol*, 3:19.
135. White J, Wilson G, Tucci MA, Benghuzzi HA (2014). "The effects of sustained delivery of estrogen on bone strength and cardiovascular panels in osteoporotic female rats". *Biomed Sci Instrum*, 50:336-44.
136. Wüster C, Härle U, Rehn U, et al (1998). "Benefits of growth hormone treatment on bone metabolism, bone density and bone strength in growth hormone deficiency and osteoporosis". *Growth Horm IGF Res*, 8:87-94.

137. Xing W, Govoni KE, Donahue LR, Kesavan C, Wergedal J, Long C, Bassett JHD, Gogakos A, Wojcicka A, Williams GR, Mohan S (2012). “Genetic evidence that thyroid hormone is indispensable for prepubertal insulin-like growth factor-I expression and bone acquisition in mice”. *J Bone Miner Res*, 27:1067–1079.
138. Xu X, Zheng L, Yuan Q, Zhen G, Crane JL, Zhou X, Cao X (2018). “Transforming growth factor- $\beta$  in stem cells and tissue homeostasis”. *Bone Research*, 6:2.
139. Yakar S, Courtland HW, Clemmons D (2010). “IGF-1 and bone: New discoveries from mouse models”. *J Bone Miner Res*, 25(12):2543-52
140. You L, Temiyasathit S, Lee P, Kim CH, Tummala P, Yao W, et al (2008). “Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading”. *Bone*, 42: 172-79.
141. Zhang X, Tamasi J, Lu X, Zhu J, Chen H, Tian X, Lee TC, Threadgill DW, Kream BE, Kang Y, Partridge NC, Qin L (2011). “Epidermal Growth Factor Receptor Plays an Anabolic Role in Bone Metabolism In Vivo”. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(5):1022-1034.
142. Zhu J, Shimizu E, Zhang X, Partridge NC, Qin L (2011). “EGFR signaling suppresses osteoblast differentiation and inhibits expression of master osteoblastic transcription factors Runx2 and Osterix”. *J Cell Biochem*, 112(7):1749-60.

**Tabla I.**

Diferencias entre la osteoporosis tipo I y tipo II



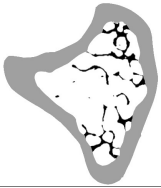

	Tipo I (postmenopáusica)	Tipo II (senil)
Edad	50-70	>75
Género M/V	6/1	2/1
Hueso afectado	Trabecular	Cortical y trabecular
PTH	Disminuida	Aumentada
Fracturas	Aplastamiento vertebral Cúbito y Radio	Cuello de femur Húmero
Etiología	Deficit de estrógenos	Envejecimiento

Modificado de Sosa Henriquez, 2003

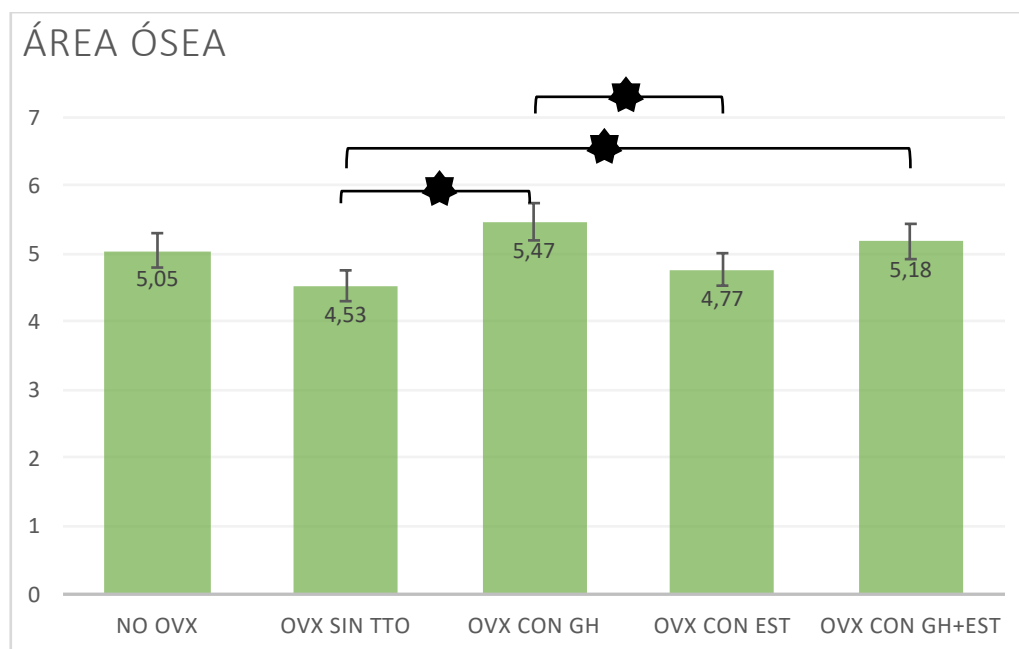
**Tabla II. Grupos experimentales y tratamientos**

<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>Ovx</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Tiempo</b>
Grupo CONTROL	n=5	No	No	-
Grupo CONTROL OVX	n=5	Si	No	12 meses
Grupo EST	n=5	Si	estradiol (125 µg/sem)	10 sem
Grupo GH	n=5	Si	GH (2 mg/kg/día)	
Grupo GH+EST	n=5	Si	GH+EST	

**Tabla III. Parámetros morfométricos medidos mediante el MIP-4**

	Área Total
	Área Ósea
	Área Trabecular
	Área Cortical

**Figura 1. Análisis de diferencias entre grupos en Área Ósea**



Medias ± Desviación estándar. \* $p < 0,05$

Respecto al área ósea no hay diferencias significativas entre el grupo ovx y el grupo no ovx.

El área ósea aumenta de forma significativa en las ratas ovx tratadas con GH, respecto al grupo ovx control.

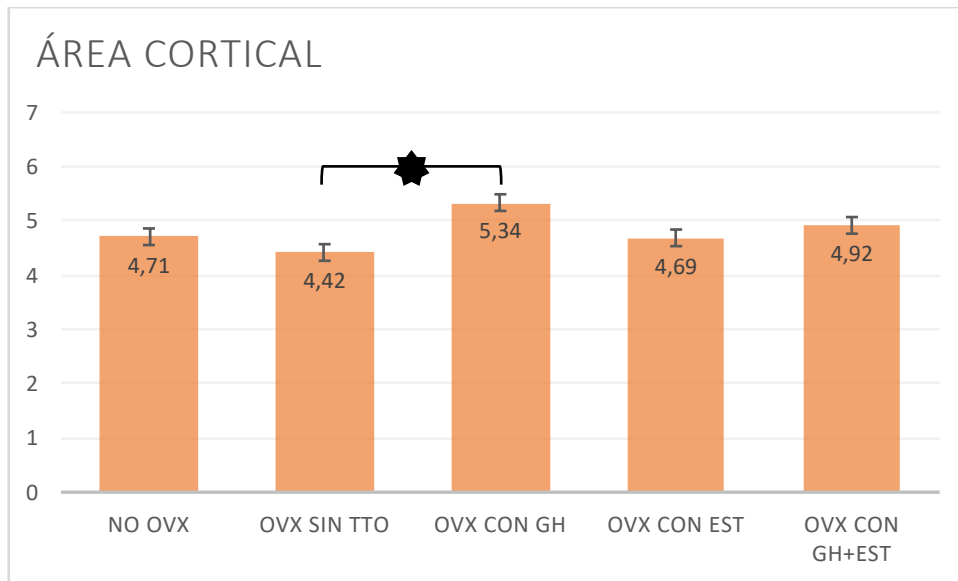
El área ósea aumenta de forma significativa en las ratas ovx tratadas con GH + estrógenos, respecto al grupo ovx control.

Hay diferencias estadísticamente significativas entre las ratas ovx tratadas con GH y las ratas ovx tratadas con estrógenos.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las ratas ovx tratadas con GH y las tratadas con GH + estrógenos.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las ratas ovx tratadas con estrógenos y las tratadas con GH + estrógenos.

**Figura 2. Análisis de diferencias entre grupos en Área Ósea Cortical**



Medias ± Desviación estándar. \*p<0,05

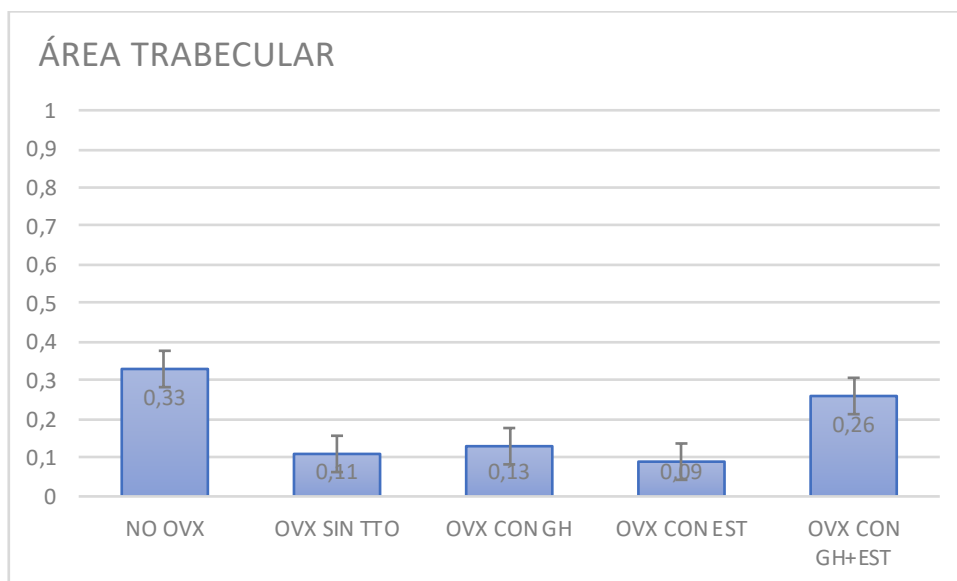
El área cortical no se ve afectada significativamente por la ovariectomía.

El tratamiento con GH aumenta significativamente el área cortical de las ratas ovx en comparación con las que no reciben tratamiento.

No existen diferencias significativas entre las ratas ovx tratadas con estrógenos, ni en las tratadas con GH + estrógenos respecto a las que no reciben tratamiento.

No existen diferencias significativas entre las diferentes modalidades de tratamiento.

**Figura 3. Análisis de diferencias entre grupos en Área Ósea Trabecular**



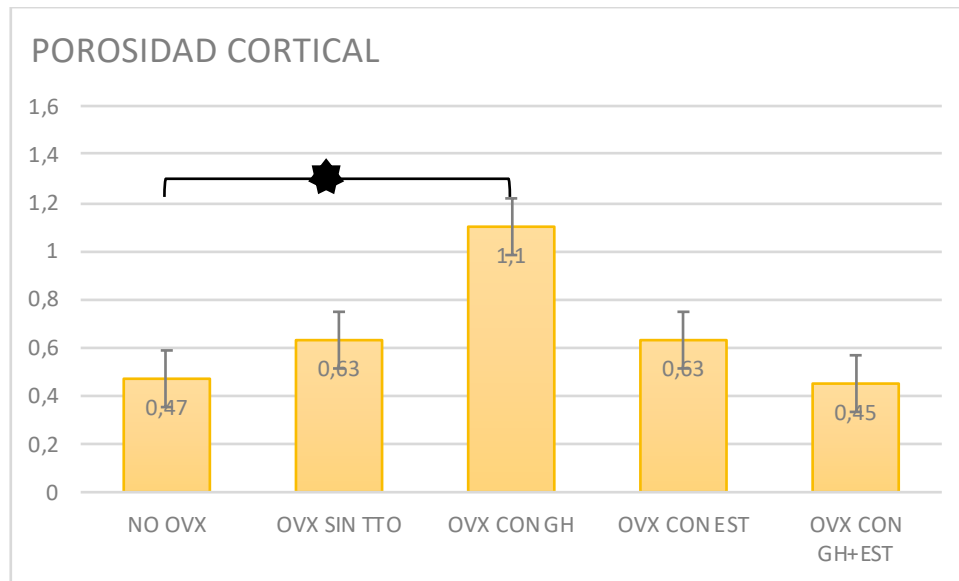
Medias ± Desviación estándar. \* $p < 0,05$

El área trabecular disminuye en las ratas ovx pero no de manera significativa.

El tratamiento con GH y con GH + estrógenos aumenta el área trabecular de ratas ovx pero no de manera significativa.

No hay diferencias significativas entre las distintas modalidades de tratamiento.

**Figura 4. Análisis de diferencias entre grupos en la Porosidad Cortical**



Medias ± Desviación estándar. \* $p < 0,05$

La porosidad cortical aumenta con la ovariectomía pero no de manera significativa.

La administración de GH aumenta la porosidad cortical respecto al grupo ovx control de forma no significativa y respecto al grupo sin ovx de forma significativa.

Con el tratamiento de estrógenos se mantiene constante y con GH+ estrógenos disminuiría, aunque ambas de forma no significativa.