



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**“Evaluación del efecto antiosteoporótico de un  
inhibidor del factor estimulante de colonias de  
macrófagos en ratones de la cepa BALB/c  
geriátricos”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Medica Veterinaria y Zootecnista**

**P R E S E N T A :**

**Ana Lilia Martínez Cortés**

**ASESOR:**

**Dra. Ma. Enriqueta Muñoz Islas**

**CO-ASESOR:**

**M. en C. Rubén Arturo Torres de León**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES-CUAUTITLAN



ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

DEPARTAMENTO DE

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

"Evaluación del efecto antiosteoporótico de un inhibidor del factor estimulante de colonias de macrófagos en ratones de la cepa BALB/c geriátricos"

Que presenta la pasante: ANA LILIA MARTÍNEZ CORTÉS

Con número de cuenta: 41003215-0 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de octubre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M.V.Z. Rafael Pérez González	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Javier Froylan Lazcano Reyes	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Rubén Arturo Torres León	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Crisóforo Mercado Márquez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M.V.Z. Agatha Elisa Miranda Cortés	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/ntm\*

## ARADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán y a su Directora Dra. Rosa Issel Acosta González por acogerme como parte de su alumnado.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Farmacología de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán y al Dr. Juan Miguel Jiménez Andrade, por dejarme ser parte de su proyecto y por darme tantas lecciones de vida.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Farmacología Neurovascular, en especial a la Dra. Martha Beatríz Ramírez Rosas, Mariela, Nelly y Brenda, por su invaluable apoyo para la terminación de esta tesis.

A la Dra. Enriqueta Muñoz Islas, porque todo este tiempo no ha soltado mi mano y crecimos juntas desde mi primer día en el laboratorio hasta el día de hoy.

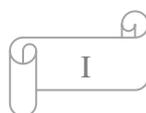
A mi alma máter, la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, la primera que me retó, me abrió sus puertas y me ha recompensado con cada uno de los conocimientos adquiridos a lo largo de mi carrera.

Al M. en C. Rubén Arturo Torres de León, por su apoyo para la presentación de mi tesis.

Al M. en C. Crisóforo Mercado Márquez, por su apoyo y sus atenciones desde siempre.

Al Instituto Nacional de Perinatología, porque todo comenzó allí y me dio la oportunidad de explorar nuevos caminos y horizontes.

Por último quiero agradecer al M.V.Z y M. en C. Ismael Hernández Avalos, por su paciencia y apoyo en la revisión de ésta tesis.



## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia. A mis papás, que siempre estuvieron al pendiente de mí y de mi bienestar en todas esas mal pasadas durante la carrera. Mami gracias por siempre apoyarme y no dejarme sola, sin tu amor y tu devoción no habría podido llegar hasta el final de este capítulo. Apa, gracias por sacarme siempre una sonrisa y apoyarme con el material de la escuela (amo mi estetoscopio rosa). Gracias a ambos por ser mi fuente de inspiración.

A mi hermano Luis, gracias por no mandarme a volar cuando te pedía dibujos para ayer, gracias por tu apoyo y tu cariño.

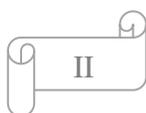
A Madre, Bety, Alexa y mi tía Pimi, por aguantarme en este tiempo de enojos y vaivenes durante la realización de mi tesis. Madre, infinitas gracias por abrazarme cuando ya no podía más, cuando me sentía un fracaso, gracias por ser mi hombro para llorar y por todo lo que has hecho por mí. Gracias familia, los amo con todo el corazón.

También dedico esta tesis a mis amigos Fernanda, Yunnuen, Silvano, Amaury, Luis, Sergio y Erika, porque sin su compañía no hubiese podido acabar la carrera, ustedes hicieron la Universidad un lugar increíble y la mejor etapa de mi vida. Gracias por su invaluable apoyo y por brindarme siempre su amistad.

A mis amigos del INPer, Moni, Pau y Elías, que tuve la fortuna de conocer en el momento indicado y que me hicieron crecer tanto. Los admiro muchísimo y me honra ser su amiga. Gracias por tantos consejos, tantos abrazos y tanto conocimiento que me han dado. No habría cambiado nada de mi vida solo por volverlos a conocer. Gracias los quiero muchísimo.

Gracias a mi segunda familia Sra. Susana, Sr. Carlos, Karen y Carlos, que me recibieron con los brazos abiertos en su casa y que son parte importante de este logro. Infinitas gracias por quererme tanto.

Por último, te dedico a ti Jonathan, amor de mi vida, todos mis logros, a través de estos años nunca me dejaste rendir, siempre has estado conmigo en las buenas y en las malas. Sobran las palabras para decirte lo que significas para mí. Eres mi motor, mi todo, mí antes y mí después. Gracias por tomar mi mano, por darme la fuerza para seguir, por apoyarme, por ser parte de mi vida, gracias por amarme tanto. Te amo.



## ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Histología y fisiología general del hueso .....	1
1.1.1	Tejido óseo.....	1
1.1.2	Osteoblastos .....	5
1.1.3	Osteocitos.....	6
1.1.4	Osteoclastos .....	7
1.1.5	Remodelado óseo.....	10
1.2	Osteoporosis .....	18
1.2.1	Clasificación .....	19
1.2.2	Fisiopatología de la osteoporosis.....	20
1.2.3	Diagnóstico .....	22
1.3	Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y sus aplicaciones terapéuticas .....	25
2	JUSTIFICACIÓN.....	26
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Objetivo general .....	27
3.2	Objetivos específicos .....	27
4	HIPÓTESIS .....	27
5	METODOLOGÍA.....	28
5.1	Generalidades .....	28
5.2	Procedimientos .....	29
5.2.1	Administración de fármaco y vehículo.....	29
5.2.2	Eutanasia de los animales y extracción de vértebra L5, fémur y tibia.....	30
5.2.3	Análisis por microtomografía computarizada (Micro-CT).....	30
5.2.4	Análisis y modelo estadístico .....	33
6	RESULTADOS .....	34
6.1	Parámetros de hueso trabecular y cortical en la metafisis distal del fémur .....	36
6.2	Parámetros de hueso trabecular a nivel de cuello de fémur .....	38
6.3	Parámetros de hueso trabecular a nivel de vértebra L5.....	40

6.4	Parámetros de hueso trabecular y cortical a nivel de tibia .....	42
7	DISCUSIÓN.....	45
8	CONCLUSIONES.....	49
9	REFERENCIAS .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Anatomía del hueso largo.....	2
<b>Figura 2.</b> Principales características de la microestructura del hueso laminar maduro .....	3
<b>Figura 3.</b> Fibras de colágeno.....	4
<b>Figura 4.</b> Diagrama que muestra los tipos de células transicionales entre los preosteoblastos y osteocitos durante la transformación de los osteoblastos y sus relaciones entre sí durante la segunda fase de osificación intramembranal.....	7
<b>Figura 5.</b> Osteoclastogénesis. ....	9
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática de la remodelación ósea .....	12
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática del ciclo de control hormonal para el metabolismo y la función de la vitamina D.....	17
<b>Figura 8.</b> Comparación entre hueso sano y hueso osteoporótico.....	19
<b>Figura 9.</b> Ratones geriátricos hembra cepa BALB/c. ....	28
<b>Figura 10.</b> Administración del anticuerpo 2G2 y el vehículo por vía intraperitoneal .....	30
<b>Figura 11.</b> Micro-CT SakyScan 1272 .....	31
<b>Figura 12.</b> Procesamiento de datos .....	32
<b>Figura 13.</b> Reconstrucción tridimensional de hueso trabecular de la metáfisis distal del fémur, obtenida mediante microtomografía computarizada .....	36
<b>Figura 14.</b> Microarquitectura ósea trabecular a nivel de metáfisis distal en fémur .....	37
<b>Figura 15.</b> Microarquitectura ósea cortical a nivel de metáfisis distal en fémur .....	38
<b>Figura 16.</b> Reconstrucción tridimensional del cuello de fémur, obtenida mediante microtomografía computarizada .....	38
<b>Figura 17.</b> Microarquitectura ósea trabecular a nivel de cuello de fémur .....	39
<b>Figura 18.</b> Reconstrucción tridimensional de la vértebra L5, obtenida mediante microtomografía computarizada .....	40
<b>Figura 19.</b> Microarquitectura ósea de vértebra lumbar 5.....	41
<b>Figura 20.</b> Reconstrucción tridimensional de la tibia obtenida mediante microtomografía computarizada.....	42
<b>Figura 21.</b> Microarquitectura ósea de hueso trabecular de tibia.....	43
<b>Figura 22.</b> Microarquitectura ósea cortical a nivel de tibia .....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Factores locales reguladores del remodelado óseo. ....	13
<b>Tabla 2.</b> Diferentes tipos de pruebas DXA .....	23
<b>Tabla 3.</b> Valores de evaluación para el diagnóstico de osteoporosis a través de la densidad mineral ósea .....	24
<b>Tabla 4.</b> Registro de pesos .....	34
<b>Tabla 5.</b> Valores de probabilidad obtenidos mediante la prueba estadística de Fisher.....	35

## RESUMEN

Se evaluó el efecto antiosteoporótico de un inhibidor del factor estimulante de colonias de macrófagos en ratones de la cepa BALB/c geriátricos, mediante la determinación de la densidad y microarquitectura ósea de fémur, tibia y vértebra L5 por medio de microtomografía computarizada. Se utilizaron 12 ratones hembras (*Mus musculus*) cepa BALB/c de 12 meses de edad. Los animales se separaron en dos grupos: grupo experimental y grupo control; el tamaño de muestra (n) para cada grupo fue de 6 animales, respectivamente. Se administró un anticuerpo anti CFMS-1 (2G2) y un vehículo por vía intraperitoneal, a razón de 10 mg/kg, cada 7 días, durante 6 semanas. Los resultados obtenidos en el presente estudio, reflejan una diferencia estadísticamente significativa en la densidad mineral ósea ( $p=0.0081$ ) y de grosor cortical (Ct.Th) ( $p=0.0132$ ) a nivel de metáfisis distal de fémur, no así con grosor trabecular (Tb.Th), separación trabecular (Tb.Sp), índice de volumen óseo (BV.TV), número de trabéculas (Tb.N), grado de anisotropía (AD), densidad mineral ósea cortical (DMOc) y área cortical (CT.Ar), en los cuales obtuvieron valores de  $p>0.05$ . En el caso de los valores de probabilidad obtenidos para cuello de fémur, solo se reflejaron diferencias estadísticamente significativas en el grosor trabecular (Tb.Th) ( $p=0.0496$ ); en los parámetros de vértebra L5 se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas solo en el grosor trabecular (Tb.Th) ( $p=0.0002$ ). No hubo diferencias en los parámetros de densidad mineral ósea (DMO), índice de volumen óseo (BV.TV), número de trabéculas (Tb.N), separación trabecular (Tb.Sp) y grado de anisotropía (AD), en ambos casos. De igual manera, no hubo diferencias en densidad mineral ósea cortical (DMOc), área cortical (CT.Ar), grosor cortical de fémur. En la evaluación de hueso cortical y trabecular de tibia, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en ningún caso ( $p >0.05$ ). Éstos resultados en su conjunto, permiten sugerir que la administración del anticuerpo contra el receptor CSF-1R, puede llegar a revertir de manera parcial la pérdida ósea en un modelo múdo geriátrico cepa BALB/c. Sin embargo, es prioritario en un futuro esclarecer ampliamente los mecanismos fisiopatológicos de la osteoporosis senil, así como búsqueda de diferentes modelos experimentales para proponer nuevos tratamientos asociados con la inhibición del receptor CSF-1R.

# 1 INTRODUCCIÓN

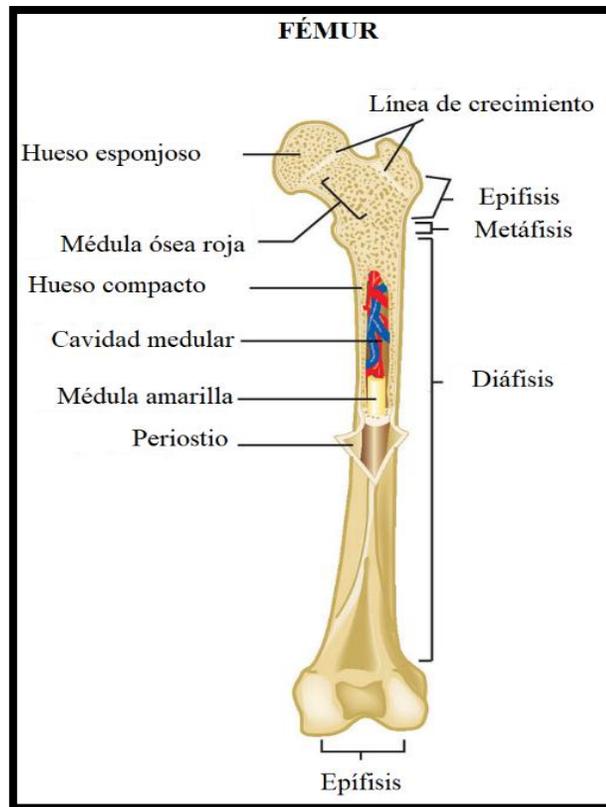
## 1.1 HISTOLOGÍA Y FISIOLOGÍA GENERAL DEL HUESO

### 1.1.1 Tejido óseo

El hueso es un tejido complejo compuesto de dos partes; el componente inorgánico, principalmente fosfato cálcico en forma de hidroxapatita cálcica, y la matriz orgánica, de los cuales hasta el 90% consiste en colágeno tipo I, el resto incluye proteínas no colágenas como osteopontina y osteocalcina. A lo largo de la vida, el esqueleto de los vertebrados se encuentra en un estado de rotación constante, necesaria para la maduración esquelética normal, incluyendo el crecimiento y la formación de huesos, la homeostasis de calcio y el mantenimiento de un soporte estructuralmente sólido del cuerpo (1).

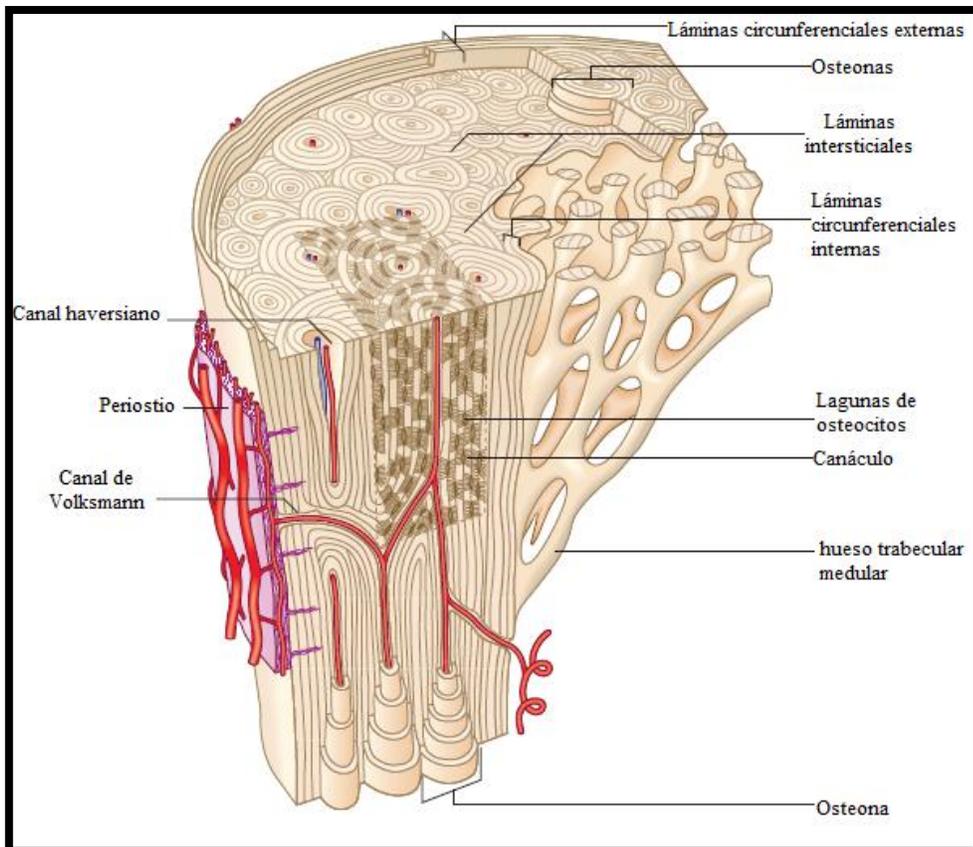
Desde un punto de vista histológico, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. La disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso. Ambos están constituidos por osteonas u osteones. El hueso cortical o compacto se estructura en conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos. El hueso esponjoso o trabecular lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades areolares en cuyo interior se encuentra médula ósea (2).

El hueso cortical es denso y sólido y rodea el espacio de la médula, mientras que el hueso trabecular se compone de una red semejante a panal de placas y varillas trabeculares intercaladas en el compartimento de la médula ósea. Tanto el hueso cortical como el trabecular están compuestos de osteones (3).



*Figura 1. Anatomía del hueso largo. (Adaptado de: Médical dictionary, 2009)(4).*

Los osteones corticales se llaman sistemas Haversianos. Mismas que son de forma cilíndrica, tienen aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  de largo y 200  $\mu\text{m}$  de ancho en su base, y forman una red de ramificación dentro del hueso cortical. Las paredes de los sistemas de Havers se forman de láminas concéntricas. El hueso cortical es típicamente menos activo metabólicamente que el hueso trabecular, pero esto depende de la especie. Se estima que hay  $21 \times 10^6$  osteones corticales en adultos humanos sanos, con un área total de remodelación Haversiana de aproximadamente 3,5  $\text{m}^2$ . La porosidad ósea cortical suele ser  $<5\%$ , pero esto depende de la proporción de remodelación activa de los sistemas de Havers a los osteones corticales inactivos. El aumento de la remodelación cortical causa un aumento en la porosidad cortical y disminución de la masa ósea cortical. Los adultos envejecidos sanos experimentan normalmente el adelgazamiento de la corteza y el aumento de la porosidad cortical (3).



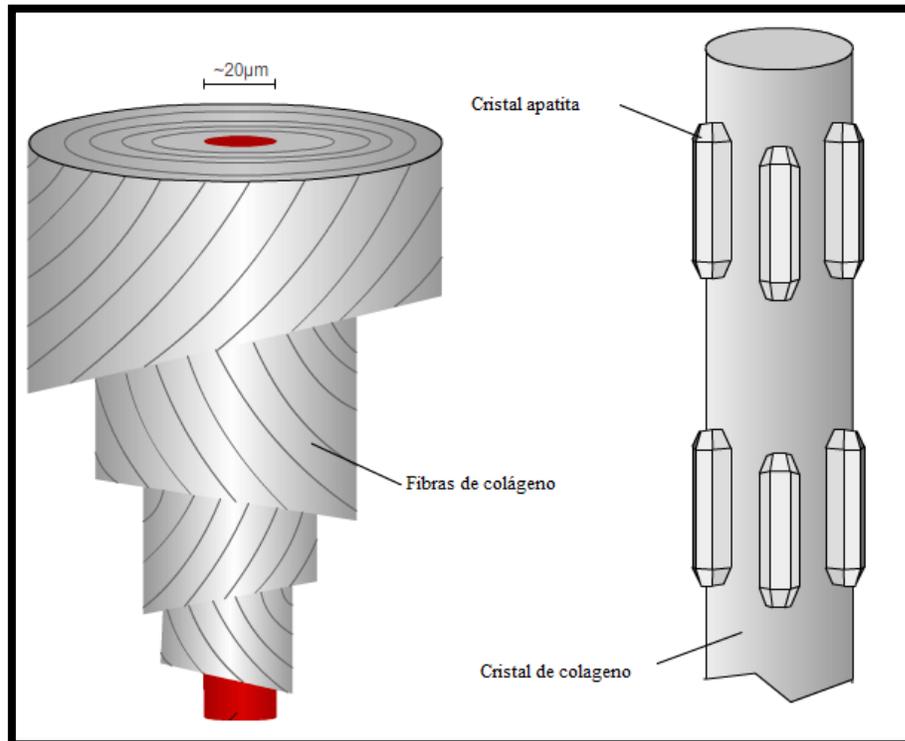
**Figura 2.** Principales características de la microestructura del hueso laminar maduro. Se incluyen áreas de hueso compacto y trabecular (esponjoso). Nótese la construcción general de los osteones; Distribución de las lagunas de los osteocitos; Los canales de Havers y sus contenidos; Espacios de resorción. Diferentes puntos de vista de la base estructural de la laminación ósea. (Adaptada de: Gray's Anatomy, 2008)(5).

El hueso cortical tiene una superficie periosteal externa y una superficie endosteal interna. La actividad de la superficie periosteal es importante para el crecimiento aposicional y la reparación de la fractura. La formación ósea típicamente excede la resorción ósea en la superficie periosteal, por lo que los huesos aumentan de diámetro con el envejecimiento. Normalmente, la reabsorción ósea supera la formación ósea en la superficie endosteal, por lo que el espacio de la médula se expande con el envejecimiento.

Los osteones trabeculares se llaman paquetes. El hueso trabecular se compone de placas y varillas con un espesor promedio de 50 a 400  $\mu\text{m}$ . Los osteones trabeculares son de forma semilunar, que mide aproximadamente 35  $\mu\text{m}$  de espesor, y compuestos por laminillas concéntricas. Se estima que hay  $14 \times 10^6$  osteones trabeculares en adultos humanos sanos, con un área trabecular total de aproximadamente 7  $\text{m}^2$ .

El hueso cortical y el hueso trabecular se forman en un patrón lamelar, en el que las fibrillas de colágeno se colocan en orientaciones alternas. El mecanismo por el cual los osteoblastos depositan fibrillas de colágeno en un patrón lamelar no se conoce, pero el hueso laminar tiene una fuerza significativa como resultado de las orientaciones alternas de las fibrillas de colágeno, similar a la madera contrachapada. El patrón lamelar normal está ausente en la matriz ósea, en el que las fibrillas de colágeno se depositan de manera desorganizada, por lo que ésta matriz ósea, es más débil que el hueso lamelar.

El hueso tejido se produce normalmente durante la formación del hueso primario y también puede observarse en estados de alto recambio óseo tales como osteítis fibrosa quística, como resultado del hiperparatiroidismo y enfermedad de Paget o durante la formación de hueso durante el tratamiento temprano con fluoruro.



**Figura 3.** Fibras de colágeno. Los cristales de hidroxapatita tienen aproximadamente 225 nm de largo y 10 nm de grosor. Incorporan sales inorgánicas como el hidróxido de magnesio, fluoruro y sulfato, ya que cristaliza, o calcifica, en las fibras de colágeno. Los cristales de hidroxapatita dan a los huesos su dureza y resistencia, mientras que las fibras de colágeno les dan flexibilidad. (Adaptada de: Bone and Spine, 2016)(6).

El periostio es una envoltura fibrosa de tejido conectivo que rodea la superficie cortical externa del hueso, excepto en las articulaciones donde el hueso está revestido por cartílago articular, que contiene vasos sanguíneos, fibras nerviosas, osteoblastos y osteoclastos. El periostio está estrechamente unido a la superficie cortical externa del hueso por fibras colágenas gruesas, llamadas fibras de Sharpeys, que se extienden hasta el tejido óseo subyacente. El endostio es una estructura membranosa que cubre la superficie interna del hueso cortical, el hueso trabecular y los canales de los vasos sanguíneos (canales de Volkman) presentes en el hueso. El endostio está en contacto con el espacio de la médula ósea, el hueso trabecular y los canales de los vasos sanguíneos así como osteoblastos y osteoclastos (3).

### ***1.1.2 Osteoblastos***

Desde hace tiempo se sabe que los osteoblastos juegan un papel central en el desarrollo esquelético. Derivados de células madre mesenquimales pluripotentes (MSCs) de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares, maduran a lo largo de un linaje específico para convertirse en células sintéticas altamente especializadas. Como tal, los osteoblastos responden a muchos estímulos mecánicos, locales y sistémicos que facilitan la mineralización mientras orquestan la remodelación ósea. Los osteoblastos también forman parte del sistema de soporte de la célula estromal en la médula ósea, pero se sabe poco sobre su relevancia funcional para las células madre hematopoyéticas. Actualmente, se sabe que: 1.- sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, 2.- dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, 3.- contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a que expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina (FAS), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2  $\mu\text{m}$  por día. 4.- median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y 5.- sintetizan factores de crecimiento (7).

Los osteoblastos son células grandes (20-30  $\mu\text{m}$ ), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3  $\mu\text{m}$  por día, es decir, el colágeno tipo I, pequeñas cantidades de colágeno tipo V, y numerosas otras macromoléculas involucrados en la formación y reabsorción ósea. La síntesis de colágeno

ocurre en el retículo endoplasmático áspero y el aparato de Golgi, el colágeno tipo I se secreta como monómeros que se ensamblan en el procolágeno triple helicoidal extracelularmente. Otros productos de glicoproteína incluyen la osteocalcina, que es necesaria para la mineralización ósea, hidroxapatita y calcio, por lo que se ha utilizado como marcador de formación de hueso nuevo (8).

La función más importante de los osteoblastos es formar huesos mineralizados, ya que expresan receptores para varias hormonas incluyendo PTH,  $1\alpha, 25$ - dihidroxicolecalciferol [ $1\alpha, 25$  (OH) $_2$  D $_3$  ], estrógeno y glucocorticoides, que están involucrados en la regulación de la diferenciación osteoblástica. Ésta última también está regulada por diversos factores locales en forma parácrina y / o autócrina (9).

### ***1.1.3 Osteocitos***

El osteoblasto se convierte en un osteocito formando una matriz alrededor de sí mismo, quedando enterrado o sumergido. Los osteocitos jóvenes se asemejan así a un osteoblasto activo; mientras que los más viejos tienen cuerpos más pequeños y aplanados (10).

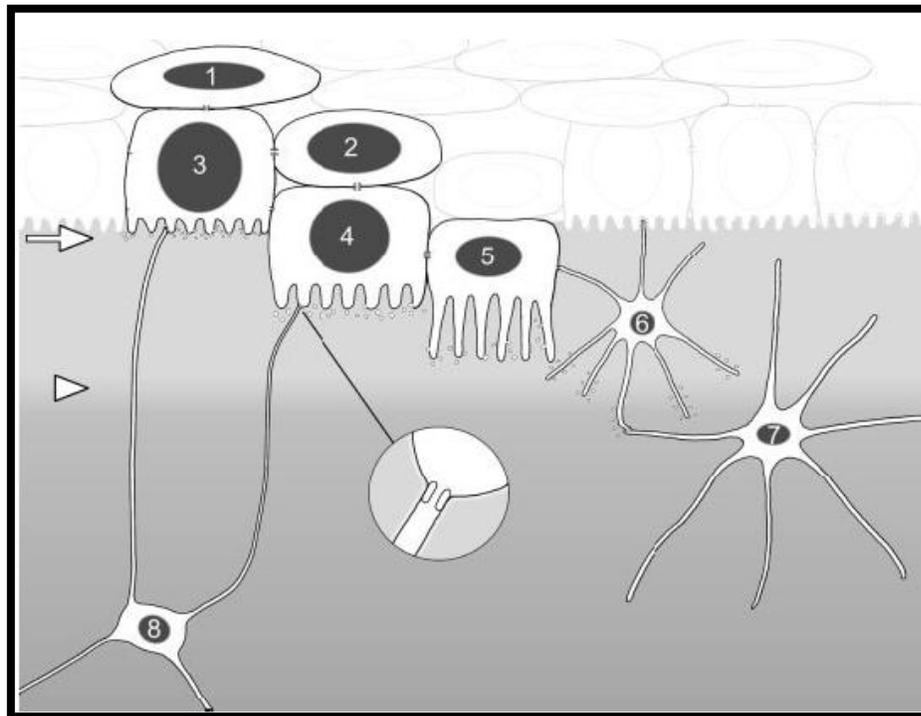
Los osteocitos se organizan formando un sincitio de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurar oxígeno y nutrientes. Cuando se produce un trauma en el hueso el cese de la circulación sanguínea origina hipoxia y necrosis de los osteocitos que estén a más de 0.1 mm de un capilar intacto.

Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción.

Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse. Poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero tienen como marcador específico el CD44, receptor de membrana que se expresa fuertemente en osteocitos y es negativo en osteoblastos y células limitantes (2).

Al final de la fase de formación de hueso, los osteoblastos tienen uno de tres destinos diferentes: 1.- están incrustados en el hueso como Osteocitos, 2.- se transforman en una superficie inactiva de Osteoblastos llamados células de revestimiento óseo, o 3.- sufren

muerte celular programada (apoptosis). Algunas de las características pre-osteoblástica y osteoblástica permanecen detectables en estas células (osteopontina, integrina  $\beta 3$ ). Durante el proceso de formación ósea, algunos osteoblastos son dejados atrás en el creciente avance de la recién formada matriz osteoide y quedan sepultados en la matriz como "Osteocito osteoide". Durante el proceso de "entierro", el futuro osteocito mantiene contacto con los Osteoblastos en la superficie mediante la extensión de procesos celulares, mientras que la matriz osteoide circundante se convierte en mineralizada (11).



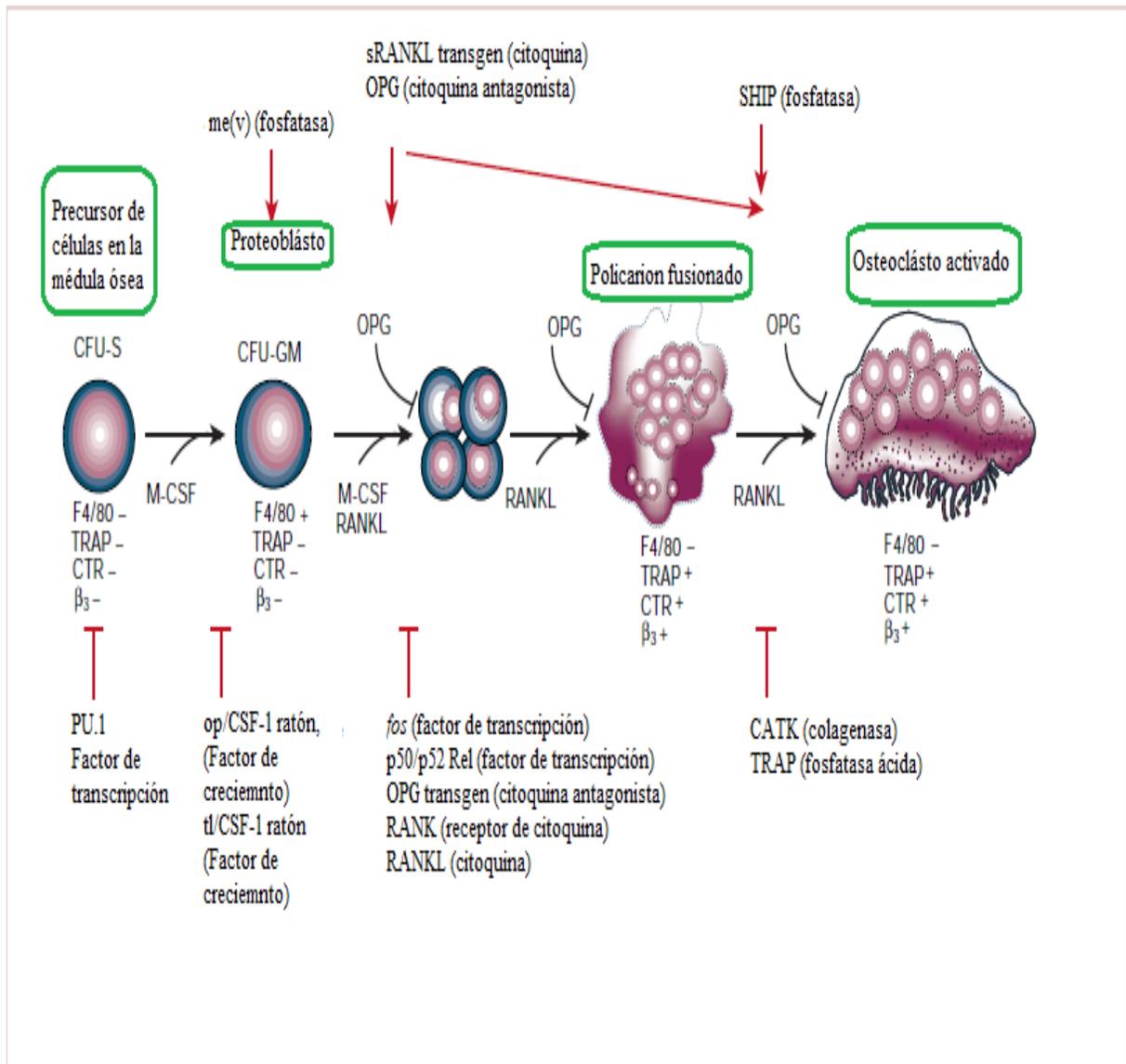
**Figura 4.** Diagrama que muestra los tipos de células transicionales entre los preosteoblastos y osteocitos durante la transformación de los osteoblastos y sus relaciones entre sí durante la segunda fase de osificación intramembranal. La punta de flecha indica el frente de la mineralización. 1. preosteoblastos, 2. Osteoblastos preosteoblásticos, 3. osteoblastos, 4. osteocitos osteoblásticos (preosteocitos tipo I), 5. osteocitos osteoideos (preosteocitos tipo II), 6. preosteocitos tipo III, 7. osteocitos jóvenes, 8. Osteocitos maduros/viejos. (Adaptado de Tamara A. Franz-Odenaal, 2005)(12).

#### 1.1.4 Osteoclastos

Los osteoclastos son células polimórficas grandes (40  $\mu\text{m}$  o más) que contienen 20 núcleos ovalados, estrechamente empaquetados. Proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y

Macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos. Se encuentran en contacto con la superficie de las bahías de resorción (lagunas de Howship). Su citoplasma contiene numerosas mitocondrias y vacuolas, muchas de las cuales son lisosomas que contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP). El retículo endoplasmático rugoso es relativamente escaso dado el tamaño de la célula, pero el complejo de Golgi es extenso. El citoplasma contiene también numerosas vesículas de transporte recubiertas y matrices de microtúbulos implicadas en el transporte de las vesículas entre las pilas de Golgi y la membrana voluminosa altamente invaginada, de la superficie celular de los osteoclastos activos en los sitios de resorción ósea local. Una zona bien definida de filamentos de actina y proteínas asociadas, se encuentran debajo de la membrana voluminosa, alrededor de la circunferencia de la bahía de reabsorción, en una región denominada zona de sellado (8). El estrecho contacto entre los tipos celulares del estroma y de la médula ósea es esencial para la osteoclastogénesis y sugiere que los factores derivados del estroma estimulan este proceso (13).

La diferenciación de los osteoclastos depende del factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) y del activador del receptor del ligando  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (RANKL). RANKL estimula la activación de las quinasas 1 y 2, reguladas por la señal extracelular (ERK1 / 2), p38 y c-Jun N-terminal quinasa (JNK) después de la contratación de TNF receptor-factor asociado 6 (TRAF6), un adaptador clave de proteínas, al receptor activador de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (RANK). En última instancia, estas señales activan el factor nuclear de las células T activadas, el citoplasmático 1 (NFATc1), el factor de transcripción maestro de la osteoclastogénesis. NFATc1, en cooperación con factor de transcripción asociado a la microftalmia y PU-1, facilita la transcripción de genes para la fosfatasa ácida resistente al tartrato, las metaloproteinasas de la matriz y las enzimas de la catepsina K, que son importantes para las funciones de los osteoclastos (14).



**Figura 5.** Osteoclastogénesis. Esquema de desarrollo de la célula precursora hematopoyética y los diversos factores implicados en su diferenciación. M-CSF (CSF-1) y RANKL son esenciales para la osteoclastogénesis, y se muestra su acción durante la asignación de linaje y la maduración de osteoclastos (Adaptado de: Boyle, William J, 2003)(13).

### ***1.1.5 Remodelado óseo***

Una vez formado, el hueso sufre un proceso denominado remodelación que desintegra (reabsorción) y acumulación (síntesis) de hueso; esto ocurre en escala micro a través del esqueleto. El remodelado óseo es el proceso metabólico predominante que regula la estructura ósea y la función durante la vida adulta, siendo clave la participación de los osteoclastos. Desequilibrios durante la remodelación puede dar lugar a grandes perturbaciones en la estructura y función del esqueleto, y potencialmente a la morbilidad y acortamiento de la vida útil (13).

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases:

**Fase quiescente:** Se dice del hueso en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no son conocidos.

**Fase de activación:** El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. El cuerpo celular de osteoclastos es polarizado, y en respuesta a la activación de RANK por su ligando, sufre cambios estructurales internos que lo preparan para resorber el hueso, justo como los remanentes del citoesqueleto de actina, la formación de una estrecha unión entre la superficie ósea y la membrana basal para formar un compartimento sellado.

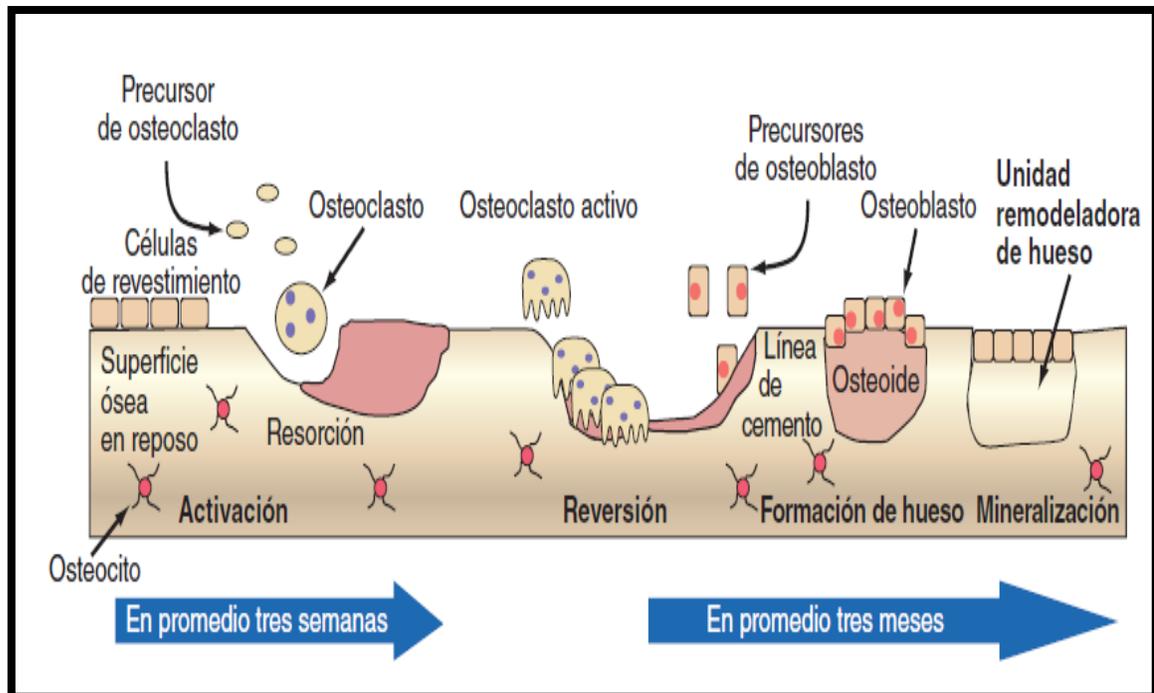
**Fase de resorción:** Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos. RANKL puede activar osteoclastos maduros en una dosis dependiente de forma *in vitro*, y puede conducir rápidamente a la reabsorción del hueso *in vivo* mediante la activación de osteoclastos preexistentes. La supervivencia del osteoclasto maduro y su participación en sucesivas rondas de reabsorción ósea, son reguladas en parte por hormonas y citocinas (13).

Seguidamente, los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es acabado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente el TGF- $\beta$  (factor transformante del crecimiento  $\beta$ ), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II). Esta “vacuola” externa, es acidificada por la exportación de iones de hidrógeno generados por el complejo ATP6i. La secreción continúa con la exportación de las enzimas líticas TRAP y pro-CATK en una reabsorción en laguna (lagunas de Howship). A través de este proceso el osteoclasto erosiona el hueso subyacente. Productos de degradación (Fragmentos de colágeno y calcio solubilizado y fosfato) son procesados dentro del osteoclasto y se liberan en la circulación.

**Fase de formación:** Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas.

**Fase de mineralización:** A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular.

Y de nuevo empieza fase quiescente o de descanso (15).



**Figura 6.** Representación esquemática de la remodelación ósea. El ciclo de remodelación ósea es llevado a cabo por la unidad multicelular básica (BMU), que consiste en un grupo de osteoclastos y osteoblastos. En el hueso cortical, las BMU se túnel a través del tejido, mientras que en el hueso esponjoso, se mueven a través de la superficie trabecular. (Adaptado de: Bringham, Richard F, 2015)(16).

#### 1.1.5.1 Factores determinantes del balance negativo en el remodelado óseo

En el adulto joven existe un balance óseo “cero” ya que la cantidad de hueso que forman los osteoblastos en cada unidad de remodelación ósea es igual a la que han destruido previamente los osteoclastos (17).

El balance entre la reabsorción y la formación óseas está influido por una serie de factores, interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales (La hormona somatotropa (GH) y las hormonas calcitrópicas: paratohormona, calcitonina y metabolitos de la vitamina D), factores locales (Factores de crecimiento), insulina (IGF-I y II: Insulin-like Growth Factor I y II) y citoquinas (IL’s y PG’s) (15).

**Tabla 1.** Factores locales reguladores del remodelado óseo.

	<b>Estimulan formación</b>	<b>Estimulan reabsorción</b>	<b>Inhiben reabsorción</b>
<b>Factores de crecimiento</b>	BMP-2 (proteína morfogenética ósea-2) BMP-4 (proteína morfogenética ósea-4) BMP-6 (proteína morfogenética ósea-6) BMP-7 (proteína morfogenética ósea-7) IGF-I (factor análogo a la insulina I) IGF-II (factor análogo a la insulina II) TGF- $\beta$ (factor transformante de crecimiento $\beta$ ) FGF (factor de crecimiento fibroblástico) PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial)	TNF (factor de necrosis tumoral) EGF (factor de crecimiento epidérmico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos) GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)	
<b>Citoquinas</b>		IL-1 Interleucina -1) IL-6 Interleucina -6) IL-8 Interleucina -8) IL-11 Interleucina -11) PGE <sub>2</sub> (Prostaglandina E-2) PGE <sub>1</sub> (Prostaglandina E-1) PGG <sub>2</sub> (Prostaglandina G-2) PGI <sub>2</sub> (Prostaglandina I-2) PGH <sub>2</sub> (Prostaglandina H-2)	IFN- $\gamma$ (Interferón $\gamma$ ) IL-4 (Interleucina -4)

(Adaptada de: Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, 2006)(15).

Los factores hormonales, son muy importantes en el desarrollo normal del esqueleto; cualquier desequilibrio endócrino provoca estragos en la resorción ósea.

Las principales hormonas que intervienen en la fisiología ósea son:

### **Hormona de crecimiento (GH)**

GH es una hormona polipeptídica secretada por la glándula pituitaria anterior, cuya síntesis está bajo el control de señales centrales y periféricas. Su sitio de acción primario es el

hígado en el que estimula la producción de IGF-1 (factor de crecimiento insulínico-1). La GH tiene un efecto directo sobre diversos tejidos, incluyendo hígado, riñón, hueso y músculo, donde induce la síntesis de IGF-I y II, factores favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función. En el hueso, actúa directamente sobre receptores de la hormona en el osteoclasto, estimulando su actividad y aumentando la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina (18).

Existe una respuesta osteoblástica y osteoclástica normal a la GH también en mujeres posmenopáusicas osteopénicas. El IGF-1 reduce la apoptosis de osteoblastos y promueve la osteoblastogénesis mediante la estabilización de  $\beta$ -catenina, potenciando la actividad dependiente de Wnt (Wingless e Int, sin alas). La familia Wnt (sin alas y INT-1) de proteínas de señalización influye en la mayoría de los aspectos del desarrollo embrionario y la homeostasis del tejido postembrionario. Los osteoclastos expresan los receptores de IGF-1 y el IGF-1 tiene efectos directos sobre su función. In vitro, el IGF-1 induce la síntesis de RANK-L (receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B) y, como consecuencia, la osteoclastogénesis. La inducción de RANK-L por IGF-1 puede explicar los efectos estimuladores de IGF-1 sobre la resorción ósea, mientras que la inducción de la osteoprotegerina por GH puede moderar estos efectos (19).

### **PTH (paratohormona)**

La hormona paratiroidea (PTH) es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del calcio mediante sus acciones para regular la remodelación ósea. La PTH estimula tanto la formación ósea como la resorción ósea, la duración y la periodicidad de la exposición a PTH rige el efecto neto sobre la masa ósea, es decir si es catabólico o anabólico. La señalización del receptor de PTH en osteoblastos y osteocitos puede aumentar la relación RANKL / OPG, aumentando tanto el reclutamiento de osteoclastos como la actividad de los mismos, estimulando de este modo la resorción ósea (20).

### **Estrógenos**

Los estrógenos protegen el esqueleto adulto contra la pérdida ósea al disminuir la velocidad de remodelación ósea y al mantener un equilibrio focal entre la formación ósea y la reabsorción (21).

Normalmente, los estrógenos pueden inhibir la formación y actividad de los osteoclastos aumentando la producción de osteoprotegerina (OPG) o el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF -  $\beta$ ). La OPG es un receptor de señuelo soluble para el activador del receptor del ligando kappa-B del factor nuclear (RANKL) y TGF- $\beta$  induce la apoptosis de los osteoclastos. In vitro y en estudios in vivo también han demostrado que el estrógeno suprime la producción de RANKL por las células osteoblásticas y los linfocitos T y B. El estrógeno también estimula directamente la apoptosis de células precursoras de osteoclastos y disminuye la diferenciación de precursores de osteoclastos bloqueando la transcripción dependiente de la proteína activadora activada por el factor estimulante de colonias RANKL / macrófago (M-CSF) mediante la reducción de la actividad c-jun. Indirectamente, el estrógeno puede suprimir la producción de citoquinas reabsorbentes de hueso tales como interleuquina (IL) -1, IL-6, TNF- $\alpha$ , M-CSF y prostaglandina. Finalmente, los estrógenos también son capaces de inhibir la actividad de los osteoclastos maduros por mecanismos directos mediados por receptores. Además de los cambios en los niveles de estrógenos, una reducción de la inhibina ovárica B a través de la transición de la menopausia y la hormona folículo estimulante elevada (FSH) perimenopáusicas también aumentan la rotación ósea (22).

### **Progesterona**

Los receptores nucleares de progesterona (nPR) están presentes en osteoblastos y osteoclastos humanos (23). La progesterona no ha demostrado tener actividad antirresortiva después de la menopausia, pero puede estimular la formación ósea cuando se usa como co-terapia con estrógeno. Estas hormonas causan un marcado aumento en la densidad mineral ósea a partir de la menarquia, que alcanza su pico de densidad ósea a los 25-35 años (24).

### **Calcitonina**

Producida en las células C o parafoliculares de la tiroides, la calcitonina es una hormona peptídica reguladora del calcio. Está compuesta por 32 aminoácidos e inhibe directamente la actividad osteoclástica de forma transitoria (25).

Los osteoclastos maduros expresan el receptor de calcitonina en su superficie, que se conoce desde hace décadas como un controlador negativo destacado de la resorción ósea.

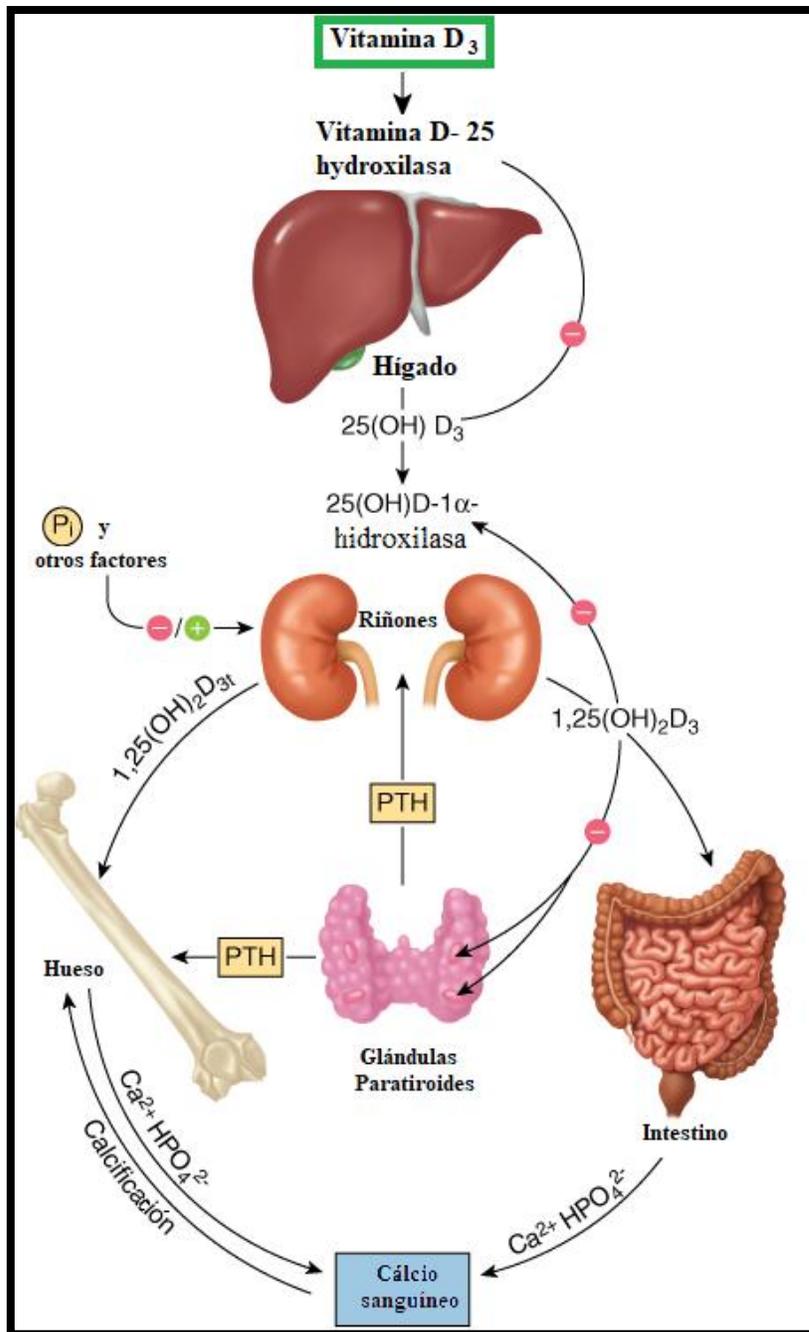
La activación del receptor de calcitonina sobre los osteoclastos, por su ligando calcitonina, induce rápidamente la pérdida del borde ondulado y la inmovilidad, seguida de retracción celular y detención de la resorción ósea. La señalización del receptor de calcitonina también altera la distribución del transportador de iones, deteriora la actividad de la enzima e inhibe los efectos osteoclastogénicos de RANKL (26).

La calcitonina se ha usado durante mucho tiempo como agente terapéutico debido a sus propiedades antirresortivas, efectuadas por segundos mensajeros intracelulares después de unirse a receptores acoplados a proteínas G específicos en osteoclastos (que comprenden siete dominios de receptores transmembrana), lo que resulta en una inhibición no apoptótica de la actividad osteoclástica (27).

### **1,25(OH)<sub>2</sub> colicalciferol o calcitriol**

La vitamina D<sub>3</sub>, o colecalciferol, se sintetiza en la piel. Su precursor, el 7-deshidrocolesterol, es convertido por la luz ultravioleta del sol (UVB 290-315 nm) en una pre-vitamina D<sub>3</sub>, que se isomeriza lentamente a la vitamina D<sub>3</sub>. La proteína de unión a la vitamina D (DBP) se une a la vitamina D y sus metabolitos para transportarlos en el torrente sanguíneo. Algunos nutrientes también contienen vitamina D<sub>3</sub>.

La vitamina D es hidroxilada en el hígado en 25-hydroxicolicalciferol [25 (OH) D], que es el principal metabolito circulante. La hidroxilación adicional en 1,25-dihydroxicolicalciferol [1,25- (OH)<sub>2</sub> D] ocurre principalmente en el riñón. La hidroxilación en el riñón es estimulada por PTH y suprimida por fosfato. Mientras que el 25 (OH) D tiene una actividad biológica limitada, el 1,25- (OH)<sub>2</sub> D es el metabolito más activo que estimula la absorción de calcio y fosfato desde el intestino. La producción de 1,25- (OH)<sub>2</sub> D está bajo control de retroalimentación estricta, directamente por calcio sérico y fosfato e indirectamente por calcio a través de una disminución de PTH en suero (28, 29).



**Figura 7.** Representación esquemática del ciclo de control hormonal para el metabolismo y la función de la vitamina D. Una reducción del calcio sérico por debajo de 2,2 mmol / L (8,8 mg / dl) aumenta la secreción de la hormona paratiroidea (PTH), movilizándolo del hueso y del intestino, y regula la síntesis de PTH por retroalimentación negativa. (Adaptado de: McKean S, 2008)(30).

### **GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor)**

El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es un factor de crecimiento hematopoyético que tiene una estructura glicoproteica y regula la formación de células de origen mieloide y su activación funcional, adicionalmente, puede intervenir en la patogenia de la osteopetrosis (15).

Se ha reportado que la interleucina-6 (IL-6) y el GM-CSF están implicados en la formación de osteoclastos. El GM-CSF es un fuerte inhibidor de la osteoclastogénesis, alto niveles de este factor han sido identificados en el líquido sinovial en la artritis inflamatoria, así como en la artritis reumatoide, además, en presencia de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), las células mieloides se diferencian por el GM-CSF a osteoclastos y se identificó que estas células precursoras de osteoclastos eran específicas para la artritis inflamatoria; por lo anterior, GM-CSF podría ser un mediador en la inhibición de la osteoclastogénesis dependiente de (TNF- $\alpha$ ) (31).

### **M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor)**

El CSF-1, también conocido como factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), es una citoquina glicoproteica homodimérica. El CSF-1 existe en tres isoformas: glicoproteína segregada, proteoglicano secretado y glicoproteína de superficie celular. El CSF-1 es producido por fibroblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos, osteoblastos, microglia, queratinocitos, células estromales de médula ósea, natural killer, células B y células T. El papel fisiológico principal del CSF-1 es como un factor de crecimiento hematopoyético responsable de la supervivencia, proliferación, diferenciación y motilidad de las células del linaje de los monocitos. Además, CSF-1 desempeña un papel importante en la remodelación ósea y en la osteoclastogénesis (32).

## **1.2 OSTEOPOROSIS**

La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por una insuficiencia de masa ósea y un deterioro estructural del tejido óseo que provoca un aumento de la susceptibilidad a las fracturas, por lo general de cadera, columna y muñeca (33).



*Figura 8. Comparación entre hueso sano y hueso osteoporótico. Representación esquemática de trabéculas óseas normales y con osteoporosis. (Adaptado de: A visual guide to Osteoporosis, 2016)(34)*

### **1.2.1 Clasificación**

#### **1.2.1.1 Osteoporosis primarias**

Constituye el grupo más amplio e incluye los casos de osteoporosis en los que no se identifica ninguna enfermedad que la justifique directamente. Se distinguen las siguientes:

#### **OP idiopática juvenil y OP del adulto joven**

Afecta a niños o adultos jóvenes de ambos sexos con función gonadal normal.

La osteoporosis juvenil idiopática es una condición poco frecuente, con una incidencia estimada de 1 en 100.000, que se presenta característicamente en la pubertad temprana con dolor de espalda, dificultad para caminar y fracturas de compresión vertebral. Su etiología precisa no está clara, aunque hay una evidencia de reducción de la formación ósea en la histología ósea (35).

### **Osteoporosis postmenopáusica. Tipo I**

Se observa disminución de la actividad PTH para compensar el aumento de la reabsorción ósea. Ocurre en un subgrupo de mujeres de 51 a 75 años y se caracteriza por una pérdida acelerada y desproporcionada de hueso trabecular (alta remodelación ósea).

### **Osteoporosis Senil. Tipo II**

Se detecta en algunas mujeres y varones de más de 70 años como consecuencia de un déficit de la función de los osteoblastos (bajo remodelado óseo). Otros factores etiopatogénicos son sedentarismo-inmovilización, mala absorción intestinal de calcio, menor exposición al sol y trastornos nutricionales que ocasionan déficit de vitamina D e hiperparatiroidismo secundario. Se asocian fracturas de cuello femoral, porción proximal del humero y pelvis, por afectarse tanto el hueso cortical como el trabecular (36).

#### 1.2.1.2 Osteoporosis secundaria

Aquellos que pueden llegar a ocasionar OP y son una consecuencia o bien, una manifestación acompañante de otras enfermedades o de su tratamiento. Los corticoesteroides pueden producir un riesgo entre un 30-50% mayor de fractura por fragilidad al reducir en un 30% el reemplazo de hueso durante el remodelado, siendo la causa de osteoporosis secundaria debida a fármacos más frecuente (37).

#### ***1.2.2 Fisiopatología de la osteoporosis***

La pérdida ósea relacionada con el envejecimiento comienza en torno a la cuarta o quinta década y se prolonga durante el resto de la vida, en esta fase las pérdidas se estiman en un 20-30% de hueso cortical y trabecular. La cantidad de hueso formada por los osteoblastos comienza a ser algo menor que la destruida por los osteoclastos. Esta situación se describe como de “balance negativo” y su consecuencia, es la disminución de la cantidad total de la masa ósea (17). Tanto el balance negativo, la presencia del hiperparatiroidismo secundario y la deficiencia de estrógenos han sido mecanismos patogénicos ligados a la pérdida ósea propia del envejecimiento (38).

En la osteoporosis establecida, el adelgazamiento del hueso cortical se combina con delgadez y reducción del número de trabéculas óseas. En adultos mayores, el dolor de huesos y las fracturas, en particular cadera (cuello de fémur) y vertebras, son síntomas comunes de osteoporosis (39).

Las fracturas osteoporóticas, se producen debido a una combinación de lesión y fragilidad ósea intrínseca. La propia fragilidad ósea es un compuesto de geometría, baja densidad de masa, separación de las conexiones de microarquitectura en trabéculas y alteración de la calidad del material óseo (resultado del daño acumulado), pero las reticulaciones reducidas del colágeno y otros defectos intrínsecos del material pueden jugar también un papel importante. La reducción de la masa ósea, a su vez, es el resultado de diversas combinaciones de deficiencia de la hormona gonadal, la ingesta inadecuada de calcio y vitamina D, la disminución de la actividad física, baja absorción intestinal, la comorbilidad y los efectos de los medicamentos utilizados para tratar varias condiciones médicas no relacionadas (40).

#### 1.2.2.1 Hiperparatiroidismo secundario y deficiencia de Vitamina D

La deficiencia de vitamina D se distingue claramente con una concentración baja de 25 (OH) D en suero, misma que conduce a una pequeña disminución de la absorción sérica de 1,25- (OH) 2D y del calcio. La menor concentración sérica de calcio provoca un aumento de la secreción de PTH, que estimula la producción de 1,25- (OH) 2D. Mediante este mecanismo, el suero 1,25- (OH) 2D se mantiene a niveles (casi) normales a expensas de una concentración sérica de PTH más alta, que se denomina "hiperparatiroidismo secundario". Implica que la PTH sérica es relativamente alta para la concentración sérica de calcio asociada, aunque todavía puede estar dentro de los límites normales de referencia. El aumento de la PTH en suero provoca un aumento de la rotación ósea, que suele asociarse con una pérdida ósea (principalmente cortical). Como es sabido de estudios en hiperparatiroidismo primario, el hueso trabecular se conserva relativamente la densidad mineral ósea en la mayoría de los pacientes con hiperparatiroidismo primario, es normal en la columna lumbar, mientras que es más baja en el cuello femoral. Se ha propuesto el hiperparatiroidismo secundario como el mecanismo principal por el cual la deficiencia de vitamina D podría contribuir a la patogénesis de las fracturas de cadera. Muchos

investigadores han observado un aumento de las concentraciones séricas de PTH en ancianos con o sin fracturas de cadera asociadas con deficiencia de vitamina D (28).

Con la edad, una serie de otros factores también pueden causar un aumento de los niveles de PTH. Entre los factores comunes se incluyen el deterioro de la función renal, el uso de diuréticos de bucle como la furosemida y la deficiencia de estrógenos.

#### 1.2.2.2 Estrógenos

A partir de los 10 años siguientes a la menopausia, hay una reducción considerable de la masa ósea, lo que denota una influencia hormonal de los estrógenos en el mantenimiento de la misma. La reducción del estrógeno sistémico favorece el desarrollo de un medio que es perjudicial para el mantenimiento óseo aumentando los factores locales tales como las interleucinas, el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor estimulante de colonias de macrófagos, favoreciendo así la formación de osteoclastos y la inhibición de la apoptosis osteoclástica. Este aumento en el número de osteoclastos activos con un aumento de la esperanza de vida de los osteoclastos resulta en el desacoplamiento de la rotación ósea. Otro fenómeno asociado con una reducción del volumen del hueso trabecular es que se observa un aumento recíproco en la adiposidad de la médula ósea (41).

Los estrógenos también pueden modular el balance cálcico favoreciendo su absorción intestinal y limitando su eliminación renal. Además, se ha descrito una influencia activa de los estrógenos en el metabolismo de la vitamina D y su capacidad para disminuir la reserva secretora de parathormona (PTH) (38). Por lo anterior, se sabe que la deficiencia de estrógenos durante la menopausia constituye uno de los factores patogénicos más importantes de la pérdida ósea asociada a la osteoporosis (15).

#### **1.2.3 Diagnóstico**

Existen muchas técnicas disponibles para evaluar el mineral óseo en múltiples sitios, incluyendo aquellos donde predominan las fracturas osteoporóticas. La técnica más ampliamente validada es la absorciometría de rayos X de doble energía (DXA) aplicada a sitios de relevancia biológica, incluyendo la cadera, la columna vertebral y el antebrazo.

El requisito fundamental para el uso de pruebas de minerales óseos en el diagnóstico y evaluación de la osteoporosis son sus características de rendimiento para la predicción de fractura (42). Los hombres y las mujeres mayores de 60 años de edad corren mayor riesgo de osteoporosis que los más jóvenes. Sin embargo, es posible tener osteopenia (masa ósea baja) u osteoporosis a una edad mucho más temprana.

La densidad mineral ósea (DMO) debe medirse mediante técnicas más especializadas. Existen diferentes tipos de pruebas BMD, pero la más comúnmente utilizada es DXA (absorciometría de rayos X de doble energía). La técnica más común para evaluar el riesgo de osteoporosis es un DXA, que se utiliza para medir la densidad ósea de la columna vertebral y la cadera.(43)

*Tabla 2. Diferentes tipos de pruebas DXA. Absorciometría de rayos X de doble energía (DXA) es una radiografía de baja radiación capaz de detectar porcentajes muy pequeños de pérdida ósea. Se utiliza para medir la densidad ósea en todo el esqueleto.*

<b>Tipo de prueba</b>	<b>Función</b>
DXA (DXA periférico)	Mide la masa ósea en el antebrazo, el dedo y el talón.
SXA (absorciometría de rayos X de energía única)	Mide el talón o la muñeca.
DPA (doble fotón absorciometría)	Mide la columna vertebral, la cadera o el cuerpo total.
SPA (absorciometría de un solo fotón)	Mide la muñeca.
QCT (Quantitative Computed Tomography)	Mide la columna vertebral o la cadera.
PQCT (QCT periférico)	Mide el antebrazo.
QUS (ultrasonido cuantitativo)	Utiliza ondas de sonido para medir el talón o el dedo.

*(Adaptado de: WHO, 2004) (42)*

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha definido un conjunto de valores umbral (medidas) para la osteoporosis. La medida de referencia se deriva de las mediciones de densidad ósea en una población de adultos jóvenes sanos (denominada puntuación T). La osteoporosis se diagnostica cuando la DMO de una persona es igual o superior a 2,5

desviaciones estándar por debajo de esta medida de referencia. La osteopenia se diagnostica cuando la medición está entre 1 y 2,5 desviaciones estándar por debajo de la medida de referencia para adultos jóvenes (44).

Estado de la cadera de la DMO	
T-score normal	de -1 o superior
Osteopenia puntuación T	menor que -1 y mayor que -2,5
Osteoporosis T-score	de -2,5 o inferior
Osteoporosis grave T-score	de -2,5 o inferior, y la presencia de al menos una fractura frágil

**Tabla 3.** Valores de evaluación para el diagnóstico de osteoporosis a través de la densidad mineral ósea.

(Adaptada de: Kanis, JA 2002)(44)

### 1.3 FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE MACRÓFAGOS (M-CSF) Y SUS APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Dadas las características del factor estimulante de macrófagos, se sabe que participa ampliamente en diversos mecanismos celulares. La expresión de CSF-1 y / o CSF-1R ha sido documentada en una serie de tumores malignos humanos, incluyendo cáncer de mama, próstata, ovario y linfoma de Hodgkin clásico (cHL). En diversos trabajos se ha estudiado el papel de este sistema de receptores de citoquinas en la transformación maligna utilizando un tratamiento in vitro con un anticuerpo monoclonal que inhibe la activación del receptor CSF-1 (CSF-1R) dando como resultado la muerte celular de macrófagos diferenciados con CSF-1. En modelos animales, la inhibición del LCR-1R reduce fuertemente los macrófagos asociados a tumores F4 / 80 + acompañados por un aumento del CD8 +, lo que se tradujo en respuestas clínicas objetivas en pacientes con tumor de células gigantes (32).

Además, el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) se utiliza como estrategia conjunta para tratar la neutropenia inducida por quimioterapia, y de igual manera se asocia con marcadores aumentados de la actividad osteoclástica y disminución de la densidad mineral ósea (DMO) (45).

En los últimos años, varios estudios han demostrado que el bloqueo del factor 1 de estimulación de colonias (CSF-1) o su receptor (CSF-1R), mediante la administración de un anticuerpo monoclonal, inhibe la progresión de la enfermedad en modelos de roedores y en muestras de pacientes con artritis reumatoide (AR) y osteoartritis (OA), anulando el daño del cartílago, la erosión ósea y la pérdida ósea sistémica, y esto se asoció con el agotamiento de los osteoclastos en ambos modelos. Estos estudios sugieren que el bloqueo de CSF-1R en el sitio de lesión inicial (articulación), podría representar una alternativa terapéutica para mejorar las discapacidades funcionales, atenuar el dolor y la inflamación en pacientes con AR y OA mediante el efecto protector del hueso y el cartílago ejercido por el anticuerpo (46, 47).

Por último, un reciente estudio de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, sugiere que la inhibición del CSF-1R revierte de manera parcial la pérdida ósea en un modelo múrido de osteoporosis tipo 1, obtuvieron resultados positivos recuperando y previniendo la densidad mineral ósea (DMO), índice de volumen óseo (BV/TV) y número de trabéculas (Tb.N); sin

embargo, no previno la disminución del grosor trabecular (Tb.Th), en la región de fémur distal (48).

## 2 JUSTIFICACIÓN

La pérdida ósea resultante en osteoporosis, es principalmente consecuencia del envejecimiento normal, pero también puede ocurrir debido a un deterioro del desarrollo de la masa ósea máxima o a la pérdida excesiva en la adultez. A medida que las poblaciones envejecen, aumentará el número de fracturas osteoporóticas en las personas de la tercera edad, con un impacto catastrófico en la discapacidad, en la mortalidad y en la economía.

Una de cada 12 mujeres y uno de cada 20 hombres mayores de 50 años sufrirán una fractura de cadera en la edad adulta. Dada las cifras de crecimiento demográfico y la prevalencia de fracturas osteoporóticas asociadas al envejecimiento, se estima que su incidencia crezca de manera acorde (49).

Las fracturas osteoporóticas se asocian con dolor, depresión y pérdida de bienestar; suelen implicar una serie de graves complicaciones y discapacidades que, a su vez, llevan a un enorme gasto y con frecuencia a la muerte (50). La osteoporosis vertebral se asocia con más de 500.000 fracturas anuales, la mayoría de las cuales ocurren en mujeres mayores de 65 años (51).

Con el envejecimiento existe además, una disminución importante en la formación ósea que se debe, fundamentalmente, a que en la médula la osteoblastogénesis pasa a un segundo plano cediendo a la adipogénesis su papel principal. Tanto RANKL y M-CSF activan numerosos caminos de señalización, es por ello que son potenciales objetivos para aplicaciones terapéuticas (52). Mientras numerosos estudios han mostrado la importancia del RANKL en la resorción ósea mediada por osteoclastos en artritis inflamatoria, artritis reumatoide y osteoporosis, la información ha sido muy limitada hasta la fecha sobre el rol que tiene el segundo factor esencial para la diferenciación osteoclástica: el factor estimulante de colonias de macrófagos 1 (CSF-1R; c-Fms) (46).

Por lo anterior, es prioritaria la búsqueda de diferentes formas de prevención, así como nuevas alternativas de tratamientos de la osteoporosis senil.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto antiosteoporótico de un inhibidor del factor estimulante de colonias de macrófagos en ratones de la cepa BALB/c geriátricos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la densidad y microarquitectura ósea de fémur, tibia y vértebra L5 en ratones BALB/c hembra de un año de edad, por medio de microtomografía computarizada.
2. Establecer si la administración del anticuerpo contra el receptor CSF-1R revierte la pérdida ósea.

### **4 HIPÓTESIS**

La administración sistémica y crónica de un anticuerpo contra el receptor CSF-1R previene la pérdida del sistema óseo debido al envejecimiento.

## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 GENERALIDADES

Se utilizaron 12 ratones hembras (*Mus musculus*) cepa BALB/c de 12 meses de edad. Los animales se mantuvieron con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, en un cuarto a temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad (50%) constantes, con agua y alimento *ad libitum*. Se implementó tiempo de adaptación de 2 semanas a partir de la llegada de los animales.

El protocolo de esta investigación fue revisado y aprobado por la Comisión de Investigación y por el Comité de Ética en Investigación de la Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas, basado en la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).



**Figura 9.** Ratones geriátricas hembra cepa BALB/c.

*Laboratorio de Farmacología Neurovascular de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.*

## 5.2 PROCEDIMIENTOS

### 5.2.1 Administración de fármaco y vehículo

Los animales se separaron en dos grupos: Grupo experimental y Grupo control, el tamaño de muestra (n) para cada grupo fue de 6 animales, respectivamente.

La dosis intraperitoneal de anti-CSF1R se basó en estudios anteriores en donde Alvarado y Urbina, señalan que la administración intraarticular de 10  $\mu$ g de anticuerpo anti-CSF-1R produce una disminución del número de osteoclastos (aproximadamente 70%) en un modelo de osteoclastogénesis inducida por lipopolisacárido en ratones (47); adicionalmente, de un estudio recientemente desarrollado en el laboratorio de Farmacología Neurovascular de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, donde se administró anticuerpo 2G2 a razón de 10 mg/kg, intraperitoneal (IP) cada 7 días, durante 6 semanas en un modelo de OVX produciendo un aumento en la densidad mineral ósea.

Dado lo anterior, el anticuerpo 2G2 y el vehículo, se administraron a razón de 10 mg/kg, IP c/7 días, durante 6 semanas a ratonas de 12 meses de edad. El vehículo se preparó con una solución buffer con cloruro de sodio (NaCl) a razón de 40.6mg/5mL, L-Histidina 6.3mg/5ml y L-Histidina monoclorohidratada 12.5mg /5 mL (Sigma-Aldrich, México).

El anticuerpo contra el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos-1 (2G2) fue adquirido gracias al convenio establecido con la empresa ROCHE Alemania y la Universidad Autónoma de Tamaulipas.



*Figura 10. Administración del anticuerpo 2G2 y el vehículo por vía intraperitoneal.*

### **5.2.2 Eutanasia de los animales y extracción de vértebra L5, fémur y tibia**

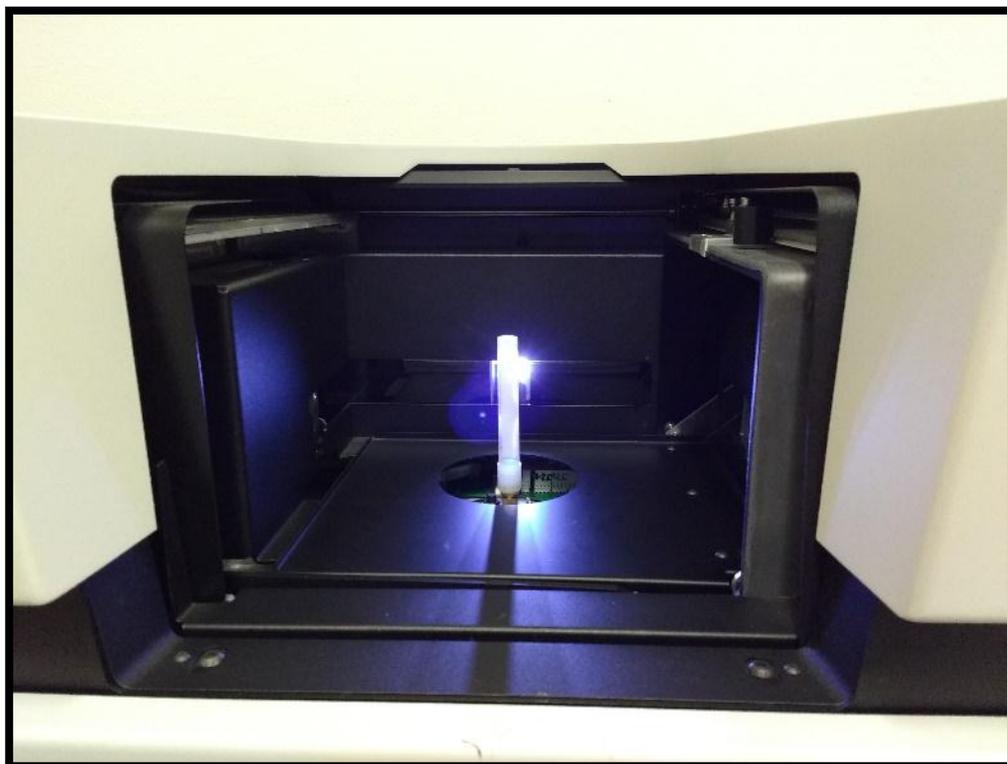
Al terminar la sexta semana de administración, se realizó eutanasia a los grupos experimentales, con sobredosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal a dosis mayor de 120 a 210 mg/kg (53).

Para la extracción de la vértebra L5, se realizó una incisión primaria ventral, de caudal hacia craneal, de tal manera que quedaron expuestas cavidad abdominal y una porción de cavidad torácica. Se retiraron órganos de la cavidad abdominal, y se localizaron vértebras lumbares de L1 a L6 para su posterior extracción con ayuda de tijeras mayo. Así mismo, se continuó con la extracción de fémur y tibia de ambas extremidades, separándolas del acetábulo de la articulación de la cadera, asegurándose de que la cabeza de fémur se encontrara íntegra. Todas las muestras se pusieron en tubos cónicos de 15 mL con solución salina fisiológica (SSF) y se conservaron a 4° C para su posterior análisis.

### **5.2.3 Análisis por microtomografía computarizada (Micro-CT)**

Para el análisis de parámetros óseos de fémur, tibia y vertebra L5, se envolvieron las muestras en un paño húmedo, se colocaron en un tubo cónico de 15 mL y se procedió a su análisis.

Se realizó la adquisición de imágenes en el equipo de microtomografía de rayos X de alta resolución Skyscan 1272, con una potencia de rayos X de 60 kV y 166  $\mu$ A, una resolución de imagen de 1344X2016 pixeles, un tamaño de voxel de 10  $\mu$ m, y un paso de rotación de 0.2 grados.

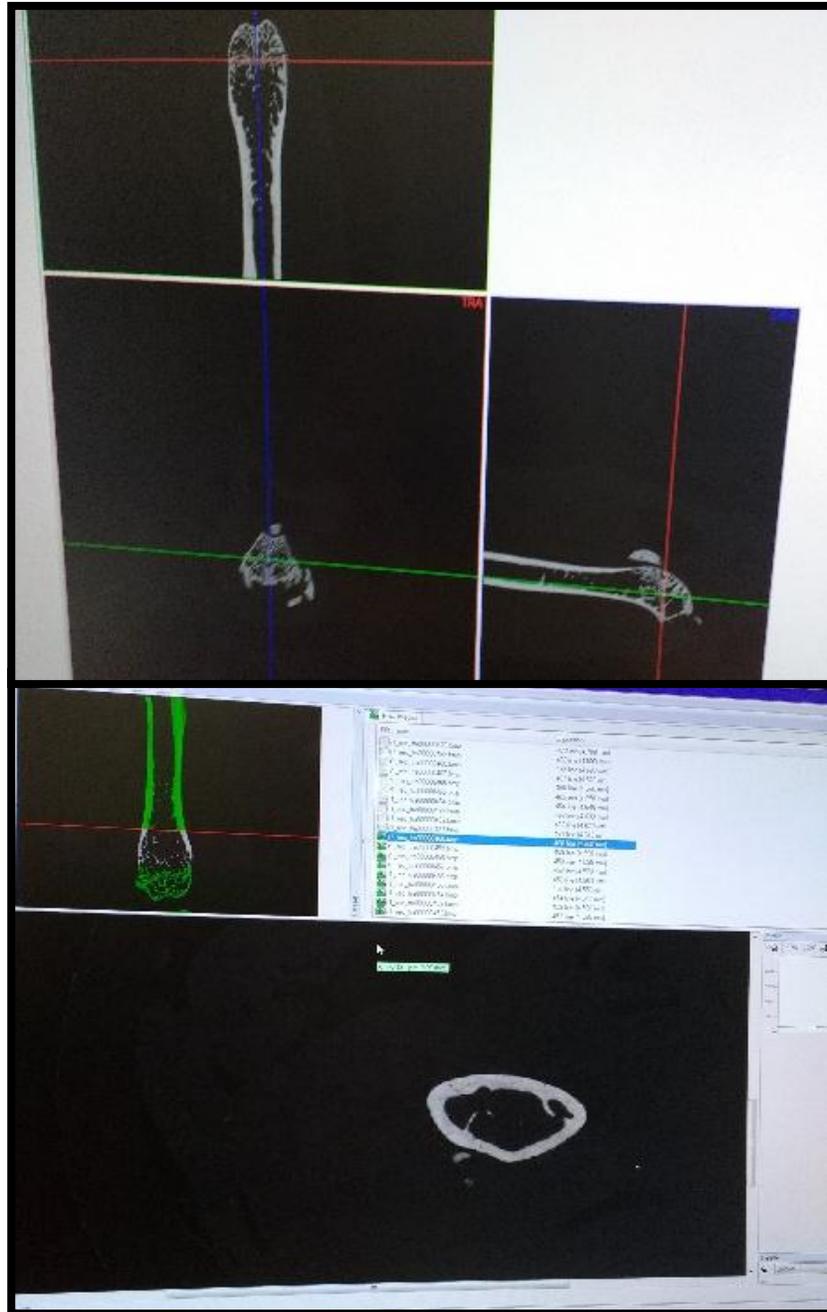


*Figura 11. Micro-CT SakyScan 1272. Colocación de la muestra para adquisición de imágenes.*

Una vez realizado el escaneo, se reconstruyeron imágenes con el programa NRecon, con una corrección de protones de energía del 30% y corrección de anillos de 5%. Inmediatamente después del escaneo, se procedió a su orientación con el programa DataViewer y finalmente se realizó el análisis con el programa CTAn.

Los parámetros analizados en el caso de fémur distal, tibia y L5 fueron: densidad mineral ósea (DMO), la cual se obtuvo mediante la calibración y análisis de dos piezas de hidroxapatita (250 mg y 750 mg), índice de volumen óseo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N), grosor trabecular (Tb.Th), separación trabecular (Tb.Sp) y grado de anisotropía (AD). Para la obtención de los parámetros trabeculares de fémur y tibia se analizó una región de interés de 2 mm, tomados a partir de 0.5 mm distales de la placa de crecimiento. En vértebra L5 se analizaron 2 mm tomados a partir de la región media del cuerpo de la vértebra (1 mm hacia arriba y 1 mm hacia abajo).

Los parámetros corticales para fémur y tibia fueron densidad mineral ósea cortical (DMOc), grosor (Ct.Th) y área cortical (Ct.Ar), se analizaron en una región de interés de 1 mm tomados a partir de 4 mm distal a la placa de crecimiento.



**Figura 12.** Procesamiento de datos. Orientación de las muestras con el programa Dataviewer (arriba) y análisis de las mismas mediante el programa CTan (abajo).

#### **5.2.4 *Análisis y modelo estadístico***

Para la prueba estadística se estableció la comparación de medias  $\pm$  el E.E.M (error estándar de la media), se realizó un análisis de varianzas prueba de Fisher y se calculó el valor de probabilidad para cada parámetro. El valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prisma versión 7.0 para Windows.

## 6 RESULTADOS

Los grupos experimentales se dividieron en dos, como se indica en la sección de metodología. Para el correcto seguimiento de los grupos, se procedió al registro del peso corporal de los animales al inicio del protocolo experimental, una vez por semana y antes de la eutanasia. Como se puede observar en la Tabla 3, no se registraron cambios en el peso de los animales tratados con el anticuerpo 2G2, desde el inicio de la administración hasta la eutanasia de los mismos.

**Tabla 4.** Registro de pesos. Se registró semanalmente el peso de los 6 animales de cada grupo y se sacó un promedio, no hubo variaciones en los pesos de ambos grupos.

Semanas	1ea	2a	3a	4a	5a	6a
Grupo Control (peso $\bar{X}$ en gramos)	34	34	34	34	34	34
Grupo 2G2 (peso $\bar{X}$ en gramos)	34	34	34	34	34	34

$\bar{X}$  – Promedio de los pesos.

En la tabla 5 se muestran los valores de p obtenidos a partir de una prueba de Fisher para comparación de varianzas, en donde la densidad mineral ósea (DMO) y el grosor cortical (Ct.Th) del hueso trabecular de fémur, el grosor trabecular (Tb.Th) del cuello de fémur y el grosor trabecular (Tb.Th) de la vértebra L5, tuvieron diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0,05$ .

**Tabla 5.** Valores de probabilidad obtenidos mediante la prueba estadística de Fisher. \*  $p < 0,05$  vs control.

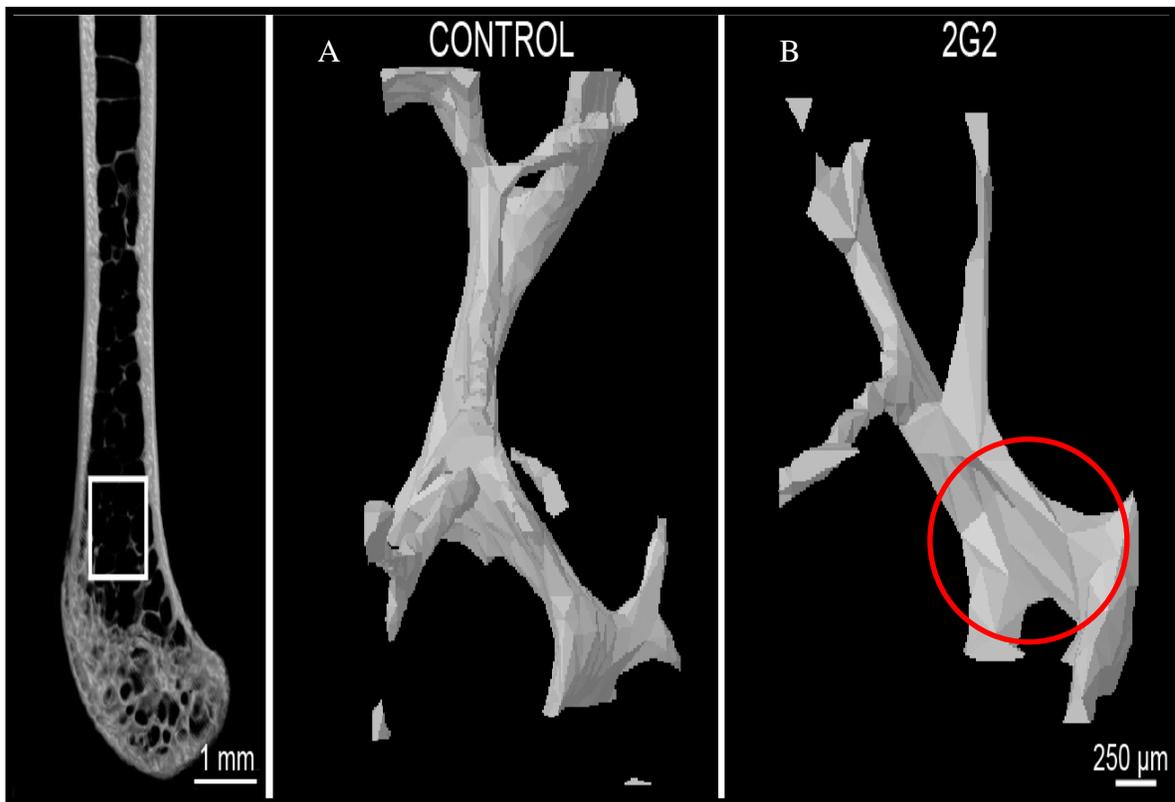
NA=no aplica.

	Densidad mineral ósea (DMO)	Índice de volumen óseo (BV.TV)	Grosor trabecular (Tb.Th)	Número de trabéculas (Tb.N)	Separación trabecular (Tb.Sp)	Grado de anisotropía (AD)	Densidad mineral ósea cortical (DMOc)	Área cortical (CT.Ar)	Grosor cortical (Ct.Th)
<b>Fémur</b>	0.0081*	0.1273	0.0708	0.2328	0.722	0.2652	0.8879	0.1958	0.0132*
<b>Cuello de fémur</b>	0.2651	0.2651	0.0496*	0.8888	0.4892	0.4123	NA	NA	NA
<b>Vértebra L5</b>	0.1236	0.1137	0.0002*	0.413	0.6261	0.2716	NA	NA	NA
<b>Tibia</b>	0.6198	0.1905	0.2743	0.2877	0.424	0.7023	0.8879	0.9109	0.2953

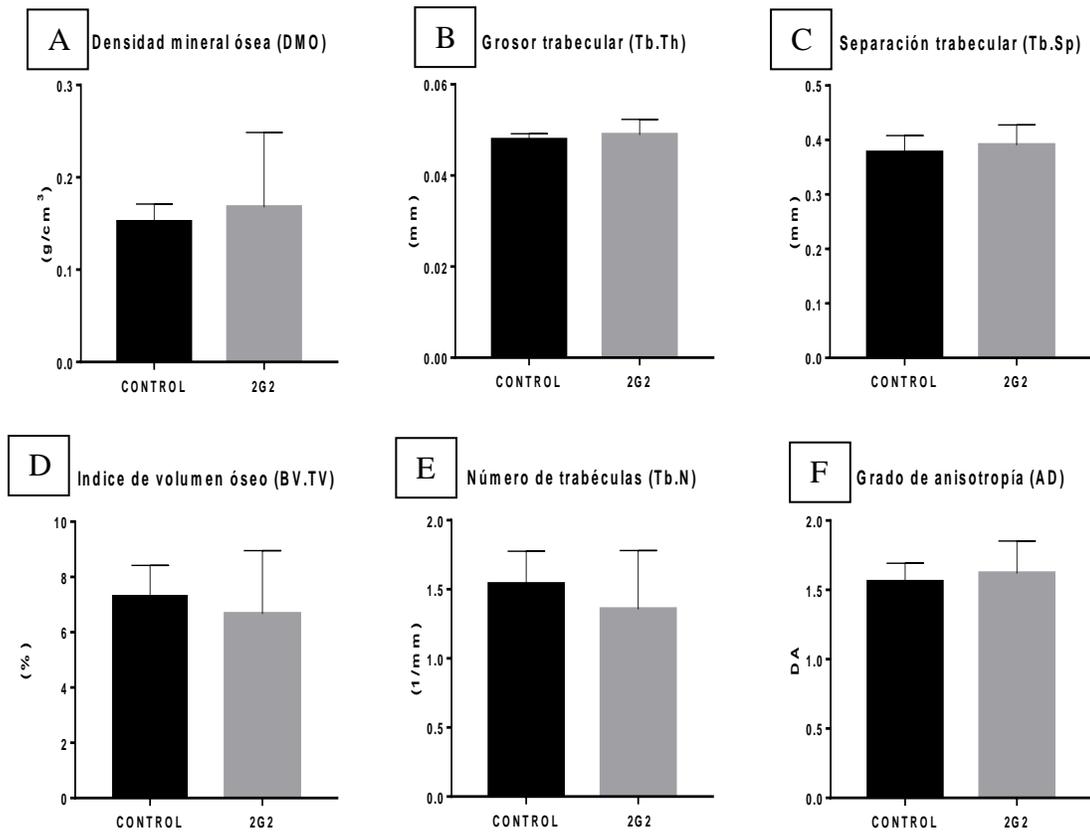
## 6.1 PARÁMETROS DE HUESO TRABECULAR Y CORTICAL EN LA METÁFISIS DISTAL DEL FÉMUR

El análisis por medio de microtomografía computarizada permitió el escaneo de la región trabecular y cortical en el fémur distal de ratones hembra geriátricos cepa BALB/c.

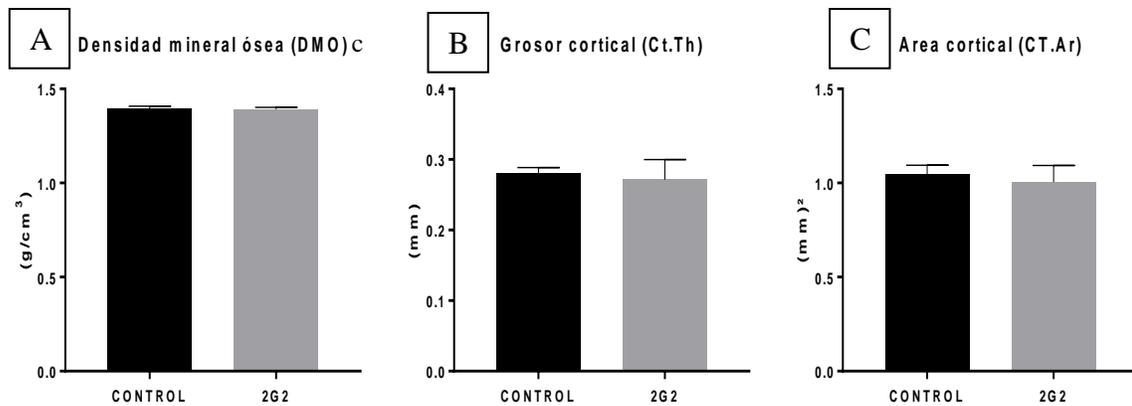
La figura 13, es una fotografía representativa de un corte transversal en tres dimensiones del fémur distal del grupo control (A) y grupo tratado con el anticuerpo 2G2 (B). De manera cualitativa, puede observarse en el panel B un aparente aumento del tejido óseo en la zona marcada con el círculo rojo, comparado con el panel A.



*Figura 13. Reconstrucción tridimensional de hueso trabecular de la metáfisis distal del fémur, obtenida mediante microtomografía computarizada. Se observa una comparación esquemática entre grupo control (panel A) y grupo tratado con anticuerpo 2G2 (panel B), resaltando en un círculo rojo un aumento aparente del tejido óseo en el grupo 2G2.*



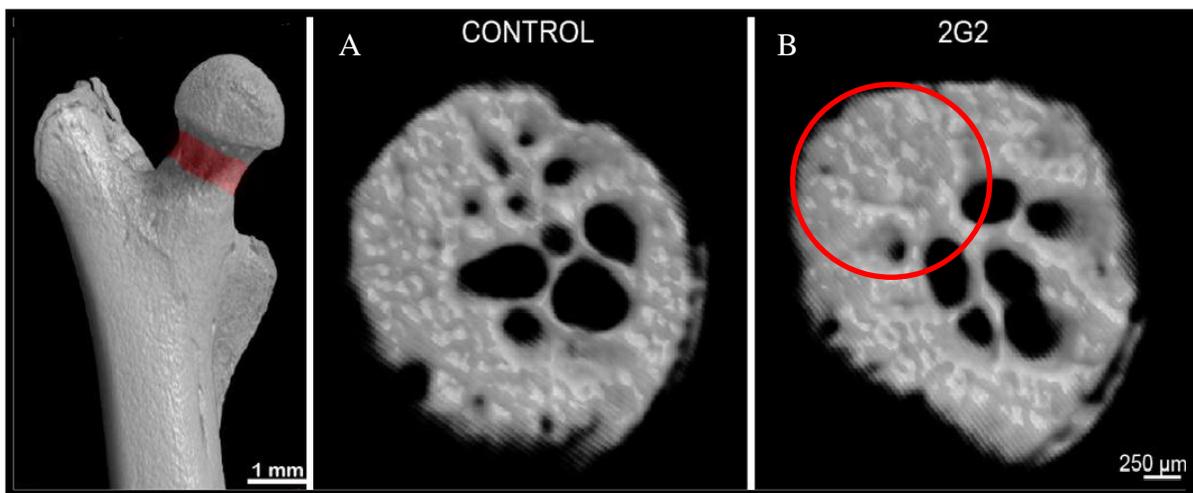
**Figura 14.** Microarquitectura ósea trabecular a nivel de metáfisis distal en fémur. Los parámetros de DMO trabecular (A), grosor trabecular (B), separación trabecular (C), índice de volumen óseo (D), número de trabéculas (E) y grado de anisotropía (F), de ambos grupos control y 2G2, no mostraron diferencias significativas  $p < 0,05$ . Los datos representan los valores de la media  $\pm$  el E.E.M.



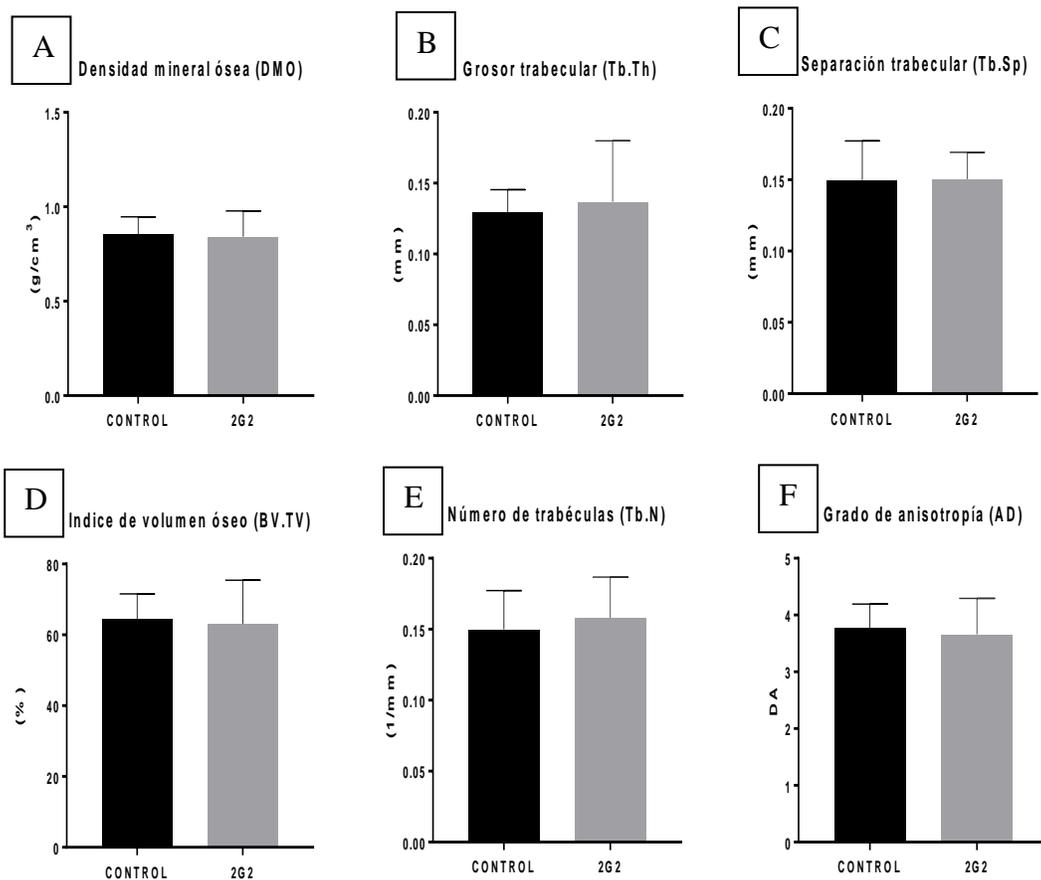
**Figura 15.** Microarquitectura ósea cortical a nivel de metáfisis distal en fémur. Los parámetros de DMO cortical (A), grosor cortical (B), área cortical (C), de ambos grupos control y 2G2, no mostraron diferencias significativas  $p < 0,05$ . Los datos representan los valores de la media  $\pm$  el E.E.M.

## 6.2 PARÁMETROS DE HUESO TRABECULAR A NIVEL DE CUELLO DE FÉMUR

La figura 14, es una fotografía representativa de un corte transversal en tres dimensiones del cuello de fémur del grupo control (A) y grupo tratado con el anticuerpo 2G2 (B). De manera cualitativa, puede observarse en el panel B un aparente aumento de grosor trabecular (Tb.Th) en la zona marcada con el círculo rojo, comparado con el panel A.



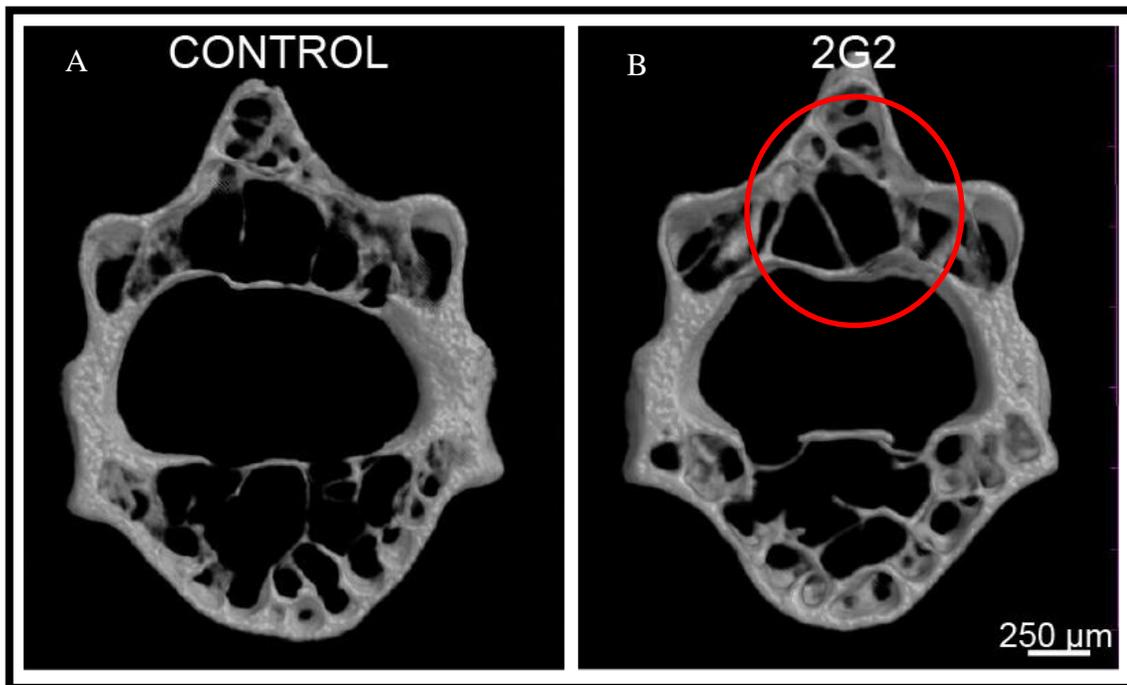
**Figura 16.** Reconstrucción tridimensional del cuello de fémur, obtenida mediante microtomografía computarizada. Se observa una comparación esquemática entre grupo control (panel A) y el grupo tratado con anticuerpo 2G2 (panel B), resaltando en el círculo rojo un aparente aumento de grosor trabecular (Tb.Th) en el grupo 2G2.



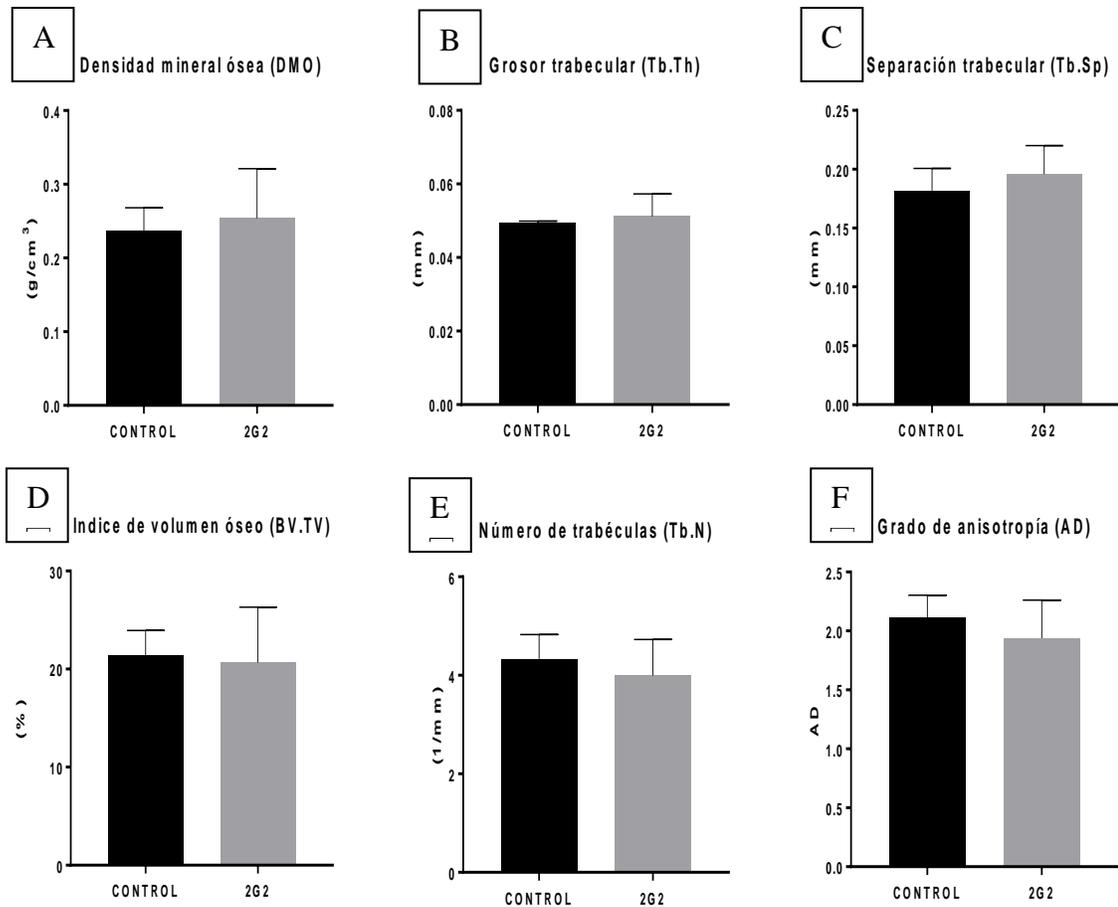
**Figura 17.** Microarquitectura ósea trabecular a nivel de cuello de fémur. Los parámetros de DMO trabecular (A), grosor trabecular (B), separación trabecular (C), índice de volumen óseo (D), número de trabéculas (E) y grado de anisotropía (F), de ambos grupos control y 2G2, no mostraron diferencias significativas  $p < 0,05$ . Los datos representan los valores de la media  $\pm$  el E.E.M.

### 6.3 PARÁMETROS DE HUESO TRABECULAR A NIVEL DE VÉRTEBRA L5

La figura 15, es una fotografía representativa de un corte transversal en tres dimensiones de la vértebra lumbar 5 del grupo control (A) y grupo tratado con el anticuerpo 2G2 (B). De manera cualitativa, puede observarse en el panel B un aparente aumento de grosor trabecular (Tb.Th) en la zona marcada con el círculo rojo, comparado con el panel A.



*Figura 18. Reconstrucción tridimensional de la vértebra L5, obtenida mediante microtomografía computarizada. Se observa una comparación esquemática entre grupo control (panel A) y grupo tratado con anticuerpo 2G2 (panel B), resaltando en el círculo rojo un aparente aumento de grosor trabecular (Tb.Th) en el grupo 2G2.*

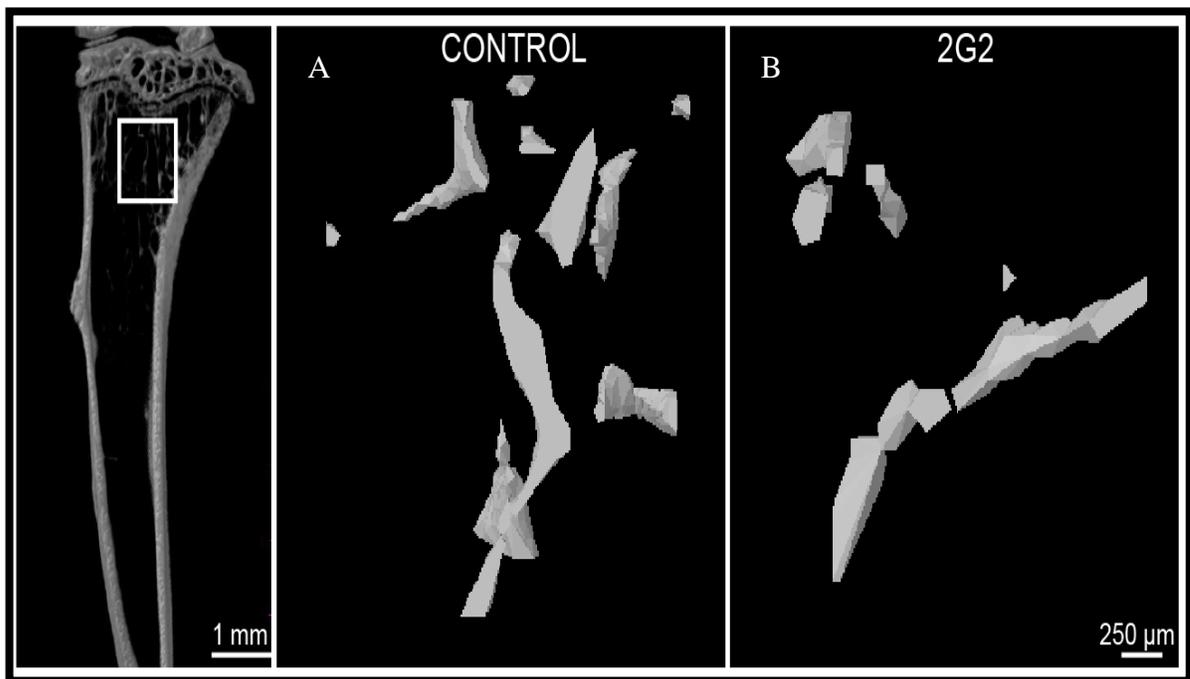


**Figura 19.** Microarquitectura ósea de vértebra lumbar 5. Los parámetros de DMO trabecular (A), grosor trabecular (B), separación trabecular (C), índice de volumen óseo (D), número de trabéculas (E) y grado de anisotropía (F), de ambos grupos control y 2G2, no mostraron diferencias significativas  $p < 0,05$ . Sin embargo, el grosor trabecular (Tb.Th) muestra una posible tendencia. Los datos representan los valores de la media  $\pm$  el E.E.M.

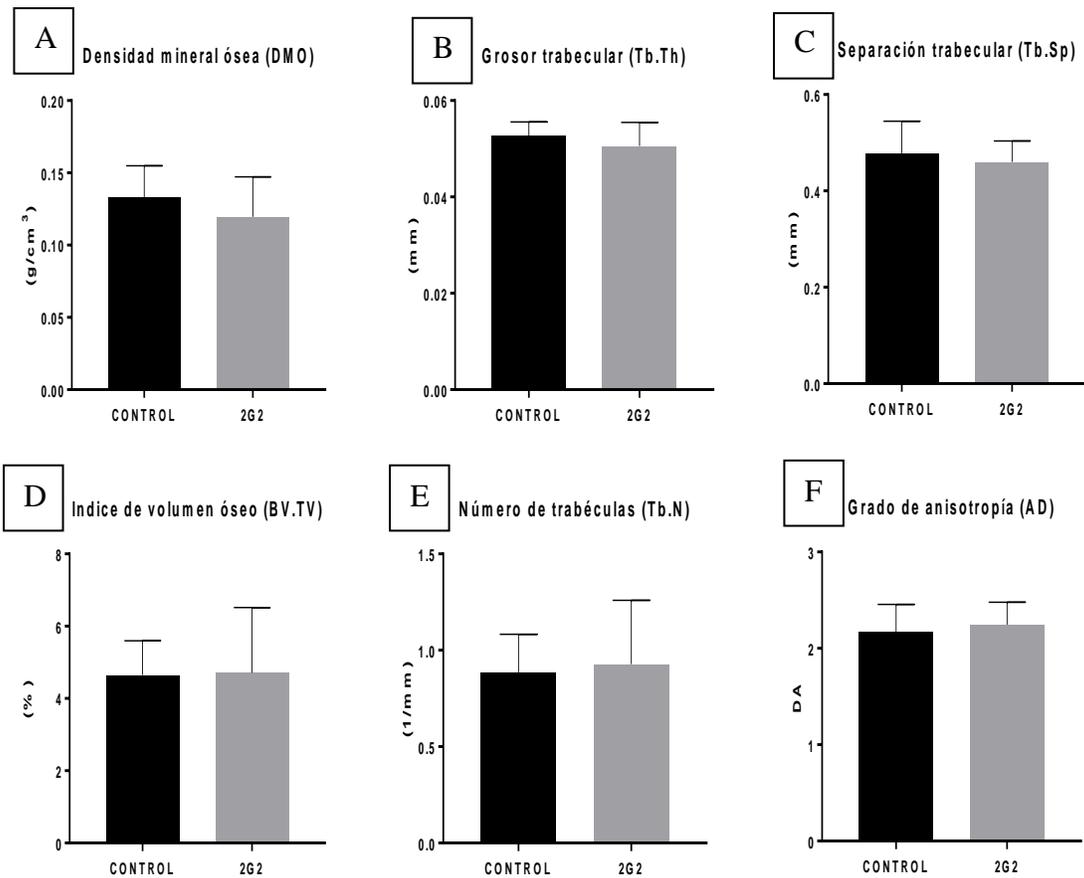
#### 6.4 PARÁMETROS DE HUESO TRABECULAR Y CORTICAL A NIVEL DE TIBIA

El análisis por medio de microtomografía computarizada permitió el escaneo de la región trabecular y cortical en la tibia de ratones hembra geriátricos cepa BALB/c.

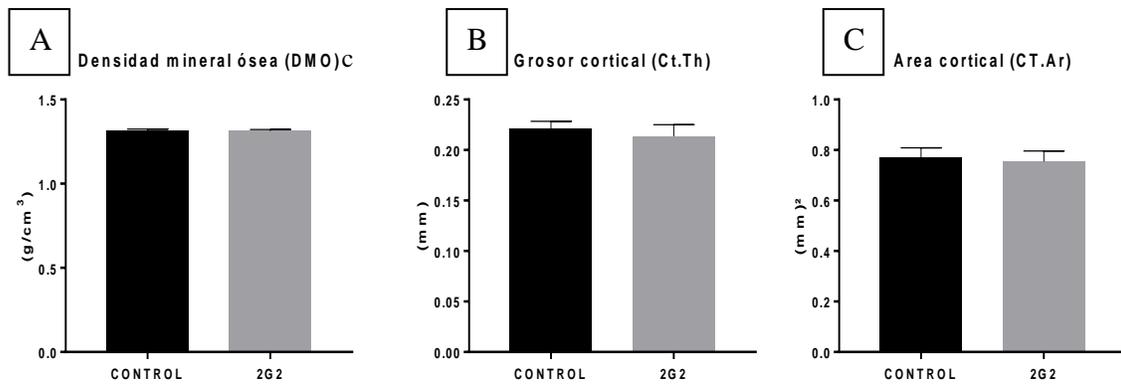
La figura 16, es una fotografía representativa de un corte transversal en tres dimensiones de la tibia del grupo control (A) y grupo tratado con el anticuerpo 2G2 (B). De manera cualitativa puede observarse que los paneles A y B poseen una cantidad y tamaño de trabéculas semejante, es decir, se aprecia una disminución de tejido óseo en ambas sin diferencias significativas entre sí.



*Figura 20. Reconstrucción tridimensional de la tibia obtenida mediante microtomografía computarizada. Se observa una comparación esquemática entre grupo control (panel A) y grupo tratado con anticuerpo 2G2 (panel B), resaltando una reducción del tejido óseo en ambos grupos, sin alguna diferencia aparente.*



**Figura 21.** Microarquitectura ósea de hueso trabecular de tibia. Los parámetros de DMO trabecular (A), grosor trabecular (B), separación trabecular (C), índice de volumen óseo (D), número de trabéculas (E) y grado de anisotropía (F), de ambos grupos control y 2G2, no mostraron diferencias significativas  $p < 0,05$ . Los datos representan los valores de la media  $\pm$  el E.E.M.



**Figura 22.** Microarquitectura ósea cortical a nivel de tibia. Los parámetros de DMO cortical (A), grosor cortical (B), área cortical (C), de ambos grupos control y 2G2, no mostraron diferencias significativas  $p < 0,05$ . Los datos representan los valores de la media  $\pm$  el E.E.M.

## 7 DISCUSIÓN

La pérdida ósea asociada a la osteoporosis está caracterizada por una insuficiencia de masa ósea y un deterioro estructural del tejido óseo que provoca un aumento de la susceptibilidad a las fracturas, por lo general de cadera, columna y muñeca (33).

Los mecanismos que subyacen la fisiopatología de la osteoporosis, están íntimamente ligados a la resorción ósea y las citoquinas involucradas en la diferenciación de las células óseas.

El M-CSF activa numerosos caminos de señalización en la diferenciación de los osteoclastos, es por ello que es un potencial objetivo para aplicaciones terapéuticas (52).

Varios estudios han demostrado que el bloqueo de la acumulación de estimulantes de factor 1 (CSF-1) o su receptor (CSF-1R) inhibe el progreso de la disfunción en el caso de la artritis reumatoide (AR) (46, 47); Sin embargo, la inhibición del CSF-1 / CSF-1R en modelos de osteoporosis senil permanece poco estudiada.

El presente trabajo evaluó el efecto antiosteoporótico de un inhibidor del factor estimulante de colonias de macrófagos en ratones de la cepa BALB/c geriátricos, mediante la determinación de la densidad y microarquitectura ósea de fémur, tibia y vértebra por medio de microtomografía computarizada.

El modelo biológico utilizado para este proyecto fueron ratones hembra BALB/c geriátricos de 12 meses de edad, debido a que presentan muchos de los cambios observados en los seres humanos y, por lo tanto, son un modelo clínicamente relevante para estudios de envejecimiento esquelético (54). Adicionalmente, se ha descrito que en la cepa BALB/c los niveles de densidad ósea adquiridos en la edad adulta se mantienen consistentes durante 12 meses. La densidad del fémur BALB/c parece alcanzar su máximo a los 8 meses para luego disminuir hasta los 12 meses comparado con los niveles observados a los 4 meses de edad, tal como lo describe Beamer (55).

Los resultados obtenidos mediante microtomografía computarizada en el presente estudio, reflejan una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), en la densidad mineral ósea (DMO) y de grosor cortical (Ct.Th) a nivel de metáfisis distal de fémur. En el caso de cuello de fémur y vértebra L5, éstas tuvieron diferencias estadísticamente significativas

solo en el grosor trabecular (Tb.Th), aunque no hubo diferencias en los parámetros de hueso cortical y trabecular de tibia.

Estos resultados, guardan relación con un reciente estudio de la Universidad Autónoma de Tamaulipas que sugiere que la inhibición del CSF-1R revierte de manera parcial la pérdida ósea en un modelo murino de osteoporosis tipo 1, donde se obtuvieron resultados positivos recuperando y previniendo la densidad mineral ósea (DMO), índice de volumen óseo (BV/TV) y número de trabéculas (Tb.N); sin embargo, no previno la disminución del grosor trabecular (Tb.Th) en la región de fémur distal, en contraste con el presente estudio en donde sí se observó diferencia estadística (48).

Para elucidar las diferencias entre los resultados obtenidos, se debe tomar en cuenta el papel que funge la fisiopatología de la osteoporosis senil y la ausencia de estrógenos en la menopausia.

Los ratones hembra envejecidos desarrollan deficiencia de estrógenos, aunque esto claramente no es tan profundo como el observado en las mujeres posmenopáusicas. Curiosamente, las disminuciones relacionadas con la edad en el hueso trabecular vertebral y femoral comienzan en ratones hembra a partir de los 2 meses de edad en un momento de suficiencia de esteroides sexuales, sugiriendo que la pérdida de hueso trabecular en ratones, como en humanos, puede ser relativamente independiente de esteroides sexuales (56).

Ucer y colaboradores, sugieren que los efectos de la deficiencia de esteroides sexuales y el envejecimiento en el esqueleto murino son independientes en los que el mecanismo prevaleciente de la pérdida ósea cortical en ambos sexos, es el aumento de la osteoclastogénesis causada por la deficiencia de estrógenos (57).

Por otra parte Syed y colaboradores, utilizaron un modelo experimental en el que mantuvieron niveles relativamente constantes de estrógenos durante la vida de los animales; los datos demuestran claramente que la pérdida de hueso trabecular relacionada con la edad en la columna lumbar es independiente de cualquier efecto de deficiencia de estrógenos en ratones hembra. Por el contrario, sus resultados son coherentes con un papel de los estrógenos en el mantenimiento de hueso cortical sobre la vida en este modelo de ratón.

Además de la prevención de la pérdida de hueso cortical en la tibia, también se encontró que el mantenimiento de los niveles constantes de estrógenos durante la vida evitó el aumento de la masa grasa relacionado con la edad.

Así, de ésta manera reportan que el estrógeno es más eficaz en la prevención de la pérdida ósea relacionada con la edad en un sitio de mayor carga (es decir, hueso cortical en la diáfisis tibial) en comparación con el peso relativamente ligero que lleva hueso trabecular (56).

Esto concuerda con lo reportado por Willingham y colaboradores (54), en donde se analizaron puntos de quiebre de fractura ósea en varios sitios en ratones BALB/c y encontraron que durante el envejecimiento (7-20 meses), el área cortical se mantuvo mientras que el momento de inercia continuó aumentando. Datos reportados en el mismo estudio indican que varios sitios de análisis óseo en ratones BALB/c muestran que la mineralización se mantiene o aumenta ligeramente durante los 20 meses de edad, sin evidencia de disminución. El análisis general de la estructura ósea trabecular reveló que los cambios relacionados con la edad dependían estrechamente del sitio de análisis (54).

A partir de los hallazgos encontrados, se puede establecer que la administración sistémica y crónica de un anticuerpo contra el receptor CSF-1R previene parcialmente la pérdida del sistema óseo debido al envejecimiento. La explicación más plausible para los hallazgos del presente trabajo, es la influencia directa de los mecanismos asociados a la senectud que forman un complejo conjunto íntimamente relacionado a la pérdida de masa ósea. La disminución de los osteoclastos, a través de la inhibición del receptor del CFMS-1 parece no ser suficiente para detener la pérdida de la densidad mineral ósea. Esto se puede atribuir a los muchos otros factores implicados en la osteoporosis senil, los cuales incluyen: una disminución de los progenitores osteoblásticos debido en parte a la disfunción mitocondrial, la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño al ADN, así como el aumento de la osteoclastogénesis causada por otros mecanismos de envejecimiento (independiente de la deficiencia de esteroides sexuales); Además, la acumulación de peróxido de hidrógeno en la célula del linaje de los osteoclastos, los nichos microambientales celulares, la presencia del sistema RANK y RANK/L-OPG, cambios moleculares, deficiencia de vitamina D, baja absorción intestinal de Ca<sup>+</sup>, entre otros factores. Además, los mecanismos compensatorios en el envejecimiento de los ratones que

conducen a un aumento de la señalización BMP y Wnt y la expresión de los osteoblastos, así como la proliferación en esta población de progenitores de la médula ósea y el aumento de la apoptosis de las células más maduras con el envejecimiento (19, 22, 41)

Por lo anterior, queda claro que la diferencia estadísticamente no significativa obtenida en los resultados de los parámetros óseos del hueso cortical, puede deberse a la presencia de estrógenos en las hembras de 12 meses de edad, en contraste al hueso trabecular, asociado a mecanismos de senectud y la acción propia del anticuerpo.

Reconociendo en las limitaciones, la utilización de un modelo más afín a la osteoporosis senil, proponiendo modelos como los reportados por Syed y colaboradores, quienes han trabajado con hembras ovariectomizadas a los 6 meses de edad y permitieron su desarrollo hasta los 18 a 22 meses, siendo una excelente opción, ya que se eliminan así los estrógenos como protector de hueso cortical y se pueden observar con más exactitud los cambios óseos propios de la senectud en una edad mayor a 12 meses.

Es difícil abarcar todos los factores asociados a la pérdida ósea; sin embargo, la utilización del anticuerpo anti CFMS-1, y sus efectos parcialmente positivos, proporciona un mayor entendimiento y optimización de nuevos blancos terapéuticos en el estudio de la osteoporosis.

## 8 CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto antiosteoporótico de un inhibidor del factor estimulante de colonias de macrófagos en ratones de la cepa BALB/c geriátricos, mediante la determinación de la densidad y microarquitectura ósea de fémur, tibia y vértebra por medio de microtomografía computarizada.

Se concluye que la administración del anticuerpo contra el receptor CSF-1R, puede llegar a revertir de manera parcial la pérdida ósea en un modelo múdo geriátrico cepa BALB/c. Sin embargo, es prioritario en un futuro esclarecer ampliamente los mecanismos fisiopatológicos de la osteoporosis senil, así como búsqueda de diferentes modelos experimentales para proponer nuevos tratamientos asociados con la inhibición del receptor CSF-1R.

## 9 REFERENCIAS

1. Stenbeck G. Formation and function of the ruffled border in osteoclasts. *Seminars in cell & developmental biology*. 2002;13(4):285-92.
2. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, Canto Pingarrón Md, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*. 2006;11:47-51.
3. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3 Suppl 3:S131-9.
4. Dictionary M. Parts of a long bone 2009 [cited 2017 10 junio]. Available from: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com>.
5. Susan S. Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice. 40th Edition ed: Elsevier Limited; 2008.
6. Singh AP. Bone Anatomy and Physiology 2016 [cited 2017 17 julio]. Available from: <http://boneandspine.com/bone-anatomy-and-physiology/>.
7. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005;105(7):2631-9.
8. Musculoskeletal system. In: Gray's Anatomy. 40 ed. Standring S NY, editor2008. 81-97 p.
9. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine reviews*. 2000;21(4):393-411.
10. E.F.Barinov ONS, B.P.Tereschuk, L.I.Khlamanova, E.V.Chreshneva,K.I.Gatina, I.A.Prylutsckaya. *General Histology* 2011.
11. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2010;21(9):1457-69.
12. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2006;235(1):176-90.

13. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
14. Lee YD, Yoon SH, Ji E, Kim HH. Caveolin-1 regulates osteoclast differentiation by suppressing cFms degradation. *Experimental & molecular medicine*. 2015;47:e192.
15. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, Canto Pingarrón Md, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: El proceso de remodelado. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*. 2006;11:151-7.
16. F. Richard Bringham MBD, Stephen M. Krane, Henry M. Kronenberg. Bone and Mineral Metabolism in Health and Disease. *Internal Medicine [Internet]*. 2015.
17. Sosa Henríquez M GDJ. La osteoporosis. Definición. Importancia. Fisiopatología y Clínica. *Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2010.
18. Krantz E, Trimpou P, Landin-Wilhelmsen K. Effect of Growth Hormone Treatment on Fractures and Quality of Life in Postmenopausal Osteoporosis: A 10-Year Follow-Up Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(9):3251-9.
19. Locatelli V, Bianchi VE. Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. *International journal of endocrinology*. 2014;2014:235060.
20. Silva BC, Bilezikian JP. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Current opinion in pharmacology*. 2015;22:41-50.
21. Martin-Millan M, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Zhao H, Weinstein RS, *et al*. The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Molecular endocrinology*. 2010;24(2):323-34.
22. Demontiero O, Vidal C, Duque G. Aging and bone loss: new insights for the clinician. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2012;4(2):61-76.
23. Yao W, Dai W, Shahnazari M, Pham A, Chen Z, Chen H, *et al*. Inhibition of the progesterone nuclear receptor during the bone linear growth phase increases peak bone mass in female mice. *PloS one*. 2010;5(7):e11410.
24. Clarke BL, Khosla S. Female reproductive system and bone. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2010;503(1):118-28.
25. Lafita J. Fisiología y fisiopatología ósea. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2003;26:7-17.

26. Newa M, Bhandari KH, Tang L, Kalvapalle R, Suresh M, Doschak MR. Antibody-mediated "universal" osteoclast targeting platform using calcitonin as a model drug. *Pharmaceutical research*. 2011;28(5):1131-43.
27. Binkley N, Bone H, Gilligan JP, Krause DS. Efficacy and safety of oral recombinant calcitonin tablets in postmenopausal women with low bone mass and increased fracture risk: a randomized, placebo-controlled trial. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2014;25(11):2649-56.
28. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocrine reviews*. 2001;22(4):477-501.
29. Dennis L. Kasper EB, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Kurt J. Isselbacher. *Principios de Medicina Interna*. 18th Edition ed. Mcgraw-hill, editor2011.
30. Sylvia C. McKean JJR, Daniel D. Dressler, Danielle B. Scheurer. *Principles and Practice of Hospital Medicine*. 17th ed. Mcgraw-hill, editor2008.
31. Abdullah Erman Yagiz RD, Ahmet Taner Sumbul, Erhan Yengil, Nilgul Ustun, Irfan Koca, Bulent Gogebakan, Ayse Dicle Turhanoglu. Effect of GM-CSF levels on osteoporosis in postmenopausal period. *Acta Medica Mediterranea*. 2014;30: 197.
32. Achkova D, Maher J. Role of the colony-stimulating factor (CSF)/CSF-1 receptor axis in cancer. *Biochemical Society transactions*. 2016;44(2):333-41.
33. OMS. Prevención y tratamiento de la osteoporosis. 114a Reunión del Consejo Ejecutivo en Ginebra. 2004;EB114/13.
34. Vigen V. Abovian M. A visual guide to Osteoporosis 2016 [24 Julio, 2017]. Available from: <https://medium.com/@DrAbovian/a-visual-guide-to-osteoporosis-535e54d42d58>.
35. Shaw NJ. Management of osteoporosis in children. *European Journal of Endocrinology*. 2008;159(suppl 1):S33-S9.
36. Hermoso de Mendoza MT. Clasificación de la osteoporosis: Factores de riesgo. Clínica y diagnóstico diferencial. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2003;26:29-52.
37. Manuel Mesa Ramos G. *Osteoporosis. Guía de práctica clínica*. 2010.

38. Sosa Henríquez M, Díez Pérez A. Osteoporosis. Concepto. Etiopatogenia. Clínica. Revista Clínica Española. 2009;209:3-9.
39. Stevens Alan; Lowe James SI. Patología Clínica. 3 ed. moderno M, editor2011.
40. Heaney RP. Pathophysiology of osteoporosis. Endocrinology and metabolism clinics of North America. 1998;27(2):255-65.
41. Chan GK, Duque G. Age-related bone loss: old bone, new facts. Gerontology. 2002;48(2):62-71.
42. Health OW. WHO Scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level. Summary Meeting Report. 2004 5-7 May.
43. Organization WH. Assessment of fracture risk and its implication to screening for postmenopausal osteoporosis: Technical report series 843. Geneva: WHO. 1994.
44. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. Lancet. 2002;359(9321):1929-36.
45. Hirbe AC, Uluckan O, Morgan EA, Eagleton MC, Prior JL, Piwnica-Worms D, *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor enhances bone tumor growth in mice in an osteoclast-dependent manner. Blood. 2007;109(8):3424-31.
46. Toh ML, Bonnefoy JY, Accart N, Cochin S, Pohle S, Haegel H, *et al.* Bone- and cartilage-protective effects of a monoclonal antibody against colony-stimulating factor 1 receptor in experimental arthritis. Arthritis & rheumatology. 2014;66(11):2989-3000.
47. Alvarado-Vazquez PA, Morado-Urbina CE, Castaneda-Corral G, Acosta-Gonzalez RI, Kitaura H, Kimura K, *et al.* Intra-articular administration of an antibody against CSF-1 receptor reduces pain-related behaviors and inflammation in CFA-induced knee arthritis. Neuroscience letters. 2015;584:39-44.
48. Villareal KJ. Evaluación del efecto anti-resortivo de un anticuerpo contra el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos-1 en un modelo murino de osteoporosis inducido por ovariectomía. Reynosa, Tamaulipas: Universidad Autónoma de Tamaulipas; 2016.
49. Zanchetta J, *et al.* The Latin America Regional Audit: Epidemiology, costs and burden of osteoporosis in 2012. International Osteoporosis Foundation. 2012.

50. Clark P, Tamayo JA, Cisneros F, Rivera FC, Valdes M. Epidemiology of osteoporosis in Mexico. Present and future directions. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2013;65(2):183-91.
51. Greenspan SL, Maitland-Ramsey L, Myers E. Classification of osteoporosis in the elderly is dependent on site-specific analysis. *Calcified tissue international*. 1996;58(6):409-14.
52. Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, Duong LT. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *European journal of clinical investigation*. 2012;42(12):1332-41.
53. SAGARPA. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 2016.
54. Willingham MD, Brodt MD, Lee KL, Stephens AL, Ye J, Silva MJ. Age-related changes in bone structure and strength in female and male BALB/c mice. *Calcified tissue international*. 2010;86(6):470-83.
55. Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, Baylink DJ. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone*. 1996;18(5):397-403.
56. Syed FA, Modder UI, Roforth M, Hensen I, Fraser DG, Peterson JM, *et al*. Effects of chronic estrogen treatment on modulating age-related bone loss in female mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25(11):2438-46.
57. Ucer S, Iyer S, Kim HN, Han L, Rutlen C, Allison K, *et al*. The Effects of Aging and Sex Steroid Deficiency on the Murine Skeleton Are Independent and Mechanistically Distinct. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2017;32(3):560-74.