

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA

**EFEECTO DE LA OSTEOPOROSIS SUBCONDRA
EN LA EVOLUCIÓN DE LA ARTROSIS EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE ARTROSIS EN
CONEJOS**

TESIS DOCTORAL

SANTOS CASTAÑEDA SANZ
MADRID, 2007

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**EFECTO DE LA OSTEOPOROSIS SUBCONDRA
EN LA EVOLUCIÓN DE LA ARTROSIS EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE ARTROSIS EN
CONEJOS**

TESIS DOCTORAL

**SANTOS CASTAÑEDA SANZ
LICENCIADO EN MEDICINA Y CIRUGÍA**

**DIRECTORES: GABRIEL HERRERO-BEAUMONT CUENCA Y
EMILIO CALVO CRESPO**

**LABORATORIO DE PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ**



Don Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca, Especialista en Reumatología, Doctor en Medicina y Profesor titular de Medicina en la Universidad Autónoma de Madrid, y Don Emilio Calvo Crespo, Especialista en Cirugía Ortopédica y Traumatología y Doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN

Que D. Santos Castañeda Sanz, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valladolid, ha realizado en el laboratorio de Patología Osteoarticular de la Fundación Jiménez Díaz, bajo nuestra tutela y dirección, la presente Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid, a 20 de Abril de 2007.

Dr. Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Dr. Emilio Calvo Crespo

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Aunque parezca un tópico y un objetivo imposible, al final ha llegado el momento de los agradecimientos. Es la última página que escribo de mi tesis tras tres meses de intenso trabajo, y más de cuatro años detrás llenos de vicisitudes, que es difícil resumir en pocas palabras, pero cuyo contenido - marcado por momentos de alegría y desánimo - queda especialmente en el corazón y la memoria de la persona que los ha vivido. Y por ello, quiero dar gracias sinceras y de corazón a todas las personas, y no son pocas, que de alguna manera me han ayudado y estimulado durante estos años.

En primer lugar, a mis compañeros, amigos y directores de tesis, los Dres. G. Herrero-Beaumont y E. Calvo, con los que he compartido y aprendido muchas cosas durante estos años. El Dr. G. Herrero, generador de ideas y trabajador incansable, es el principal y verdadero artífice del proyecto ideológico del trabajo, y quien más me ha soportado y animado en los momentos bajos. El Dr. E. Calvo, cirujano ortopeda atípico y de mente brillante, es también una parte esencial e imprescindible del trabajo, no sólo por su ayuda y soporte técnico, sino el que la investigación hubiera resultado imposible, sino también por sus ideas siempre concretas y constructivas, y su mentalidad científica y rigurosa, que ha supuesto un aval fundamental para la culminación del trabajo. A los dos, mi más sincero agradecimiento.

Aunque al principio constituyó una novedad y un reto difícil, y me estoy refiriendo a combinar el trabajo asistencial y el laboratorio en dos Centros distintos, con diferentes planteamientos y en horarios distintos, hoy me alegro de la experiencia compartida y la posibilidad de conocer a otros y otras profesionales ajenos a mi ámbito cotidiano, con una enorme riqueza científica y sobre todo humana, que me han ayudado a mejorar como médico y como persona.

En particular, quiero expresar mi agradecimiento a Raquel Largo, responsable del Laboratorio, por sus comentarios y ayuda desde el primer momento, y aguantar el “rollo” que siempre le dí. A Olga Sánchez y Carlos Acebes, que me animaron desde el principio, sin apenas conocerme y a pesar de ser un “intruso en su territorio”. Ambos me hicieron sentir siempre como en casa. A Esther Marcos, que me enseñó el manejo y cuidado básico de los animales, pero esencial para introducirme en el animalario. A M^a Angeles y Miriam, que me han ayudado y soportado en horas bajas, y siempre fueron mi punto de apoyo en los temas básicos. A Juan, que en los últimos tiempos también me ha ayudado en temas de logística básica. Y a Fredi, que siempre tuvo palabras de ánimo y comentarios estimulantes para que siguiera adelante. Tampoco quiero dejar de recordar a Jesús González, que nos dejó hace ya unos meses, pero que supuso un gran apoyo en todo momento. Jesús era de los últimos que se iba y siempre me brindó su ayuda y amistad de forma generosa y desinteresada.

Quiero agradecer también de manera especial al Dr. M Díaz Curiel y a Miguel Torralbo, técnico de la Densitometría. El Dr. Díaz Curiel, responsable de la densitometría me acogió como a un médico de la Fundación, a pesar de estar fuera desde hace ya bastantes años. Miguel me ayudó especialmente en mis comienzos, me resolvió todas mis dudas técnicas en el manejo de la densitometría y me animó siempre a llegar al final. A los dos, mi más sincero agradecimiento.

A muchos de los becarios del Laboratorio del Dr. Egido, especialmente Alberto, Julio y Óscar, que me animaron y ayudaron cuando los necesité. Y a Concha de la Piedra y su gente, que me ayudaron en los momentos más difíciles de los inicios, cuando procesábamos las cenizas de los animales y utilizaba “el horno crematorio”, cuyos resultados no fueron muy productivos, pero sí muy estimulantes.

A Marien Fernández y Elena Sáez, del Instituto Pluridisciplinar de la U.C.M. que pusieron a punto y realizaron las RM con gran interés y entusiasmo, a pesar de los múltiples inconvenientes que fueron surgiendo, y que resolvieron siempre de manera magistral “hasta que el aparato dijo ya”.

También quiero mencionar y agradecer a mis compañeros de Reumatología de la Princesa, con los que he compartido la labor clínica durante todos estos años. A todos ellos, los que están y los que ya no, agradezco su apoyo y estímulo durante estos años. También sus palabras y comentarios me han sido de gran ayuda para llegar a la meta. A Juan Pedro, en particular, por su interés y apoyo constante, y ser un referente en investigación básica y en modelos animales. Sus palabras siempre fueron un aliento positivo para continuar. A Armando Laffon, que ya no está, pero que siempre mostró gran interés por todos los avances relacionados con la Especialidad. A Isidoro y Ana, por sus ayudas informáticas; a Alicia, Txaro, Josemaria, Cuca, Macu, Irene y E Patiño. A todos gracias por vuestro apoyo y aguantarme en los momentos difíciles e ingratos que haya podido tener en estos años.

Quiero agradecer de forma especial a Alberto García Vadillo por su confianza y apoyo constante e incondicional. Alberto fue uno de los impulsores para que colaborara con la Fundación y “me metiera” en esta singladura, me animó desde el principio y aportó ideas para mejorar nuestro modelo.

También a Paco Rodríguez y sus chicas de la extinta Unidad de Epidemiología, especialmente a Rocío González y María Jesús. Paco ha sido clave en todo el apoyo logístico y estadístico, aunque siempre pensó que eran ratas en vez de conejos, y es que es muy difícil creer sin ver. Es una pena que, por razones ajenas a todos, no ejerza ya de epidemiólogo... Y Rocío, que sí aprendió pronto que eran conejos en vez de ratas, y que además siempre estaba accesible para resolverme todas mis latas y dudas. Es también una lástima haya tenido que migrar a otro Centro.

En fin, estoy llegando al final, aunque siempre olvidaré a alguien, pero quiero recordar y agradecer también a mis hermano/as, cuñados y sobrino/as por sus palabritas de apoyo, y en especial a mi hermana Inés por su estímulo y apoyo todos estos años.

A Pablo, Pauli y Cecilia Pilar, que además de animarme, siempre estuvieron ahí cuando los necesité, con mis dudas informáticas, aunque fuera por teléfono.

A María Dolores, secretaria de la Fundación, por su apoyo; y a Carlos Castilla, jefe del animalario por su ayuda.

Y a todo el personal auxiliar del animalario de la Fundación, especialmente a Pilar, María Luisa y Juani, pues a pesar de ser su trabajo, siempre están disponibles a echar una mano y ayudar de forma generosa y con excelente disposición.

Finalmente, a Esther Vicente que siempre creyó y confió en que sacaría adelante lo que me propusiese. Su apoyo ha sido fundamental en estos cuatro años. Sin su ayuda probablemente no hubiera llegado al final.

A todos gracias,

Madrid, 30 de abril de 2007.

La osteoporosis (OP) y la artrosis (OA) son dos de las enfermedades más prevalentes del aparato locomotor, y con frecuencia coinciden en el mismo paciente. Aunque no está bien definida la influencia que cada una puede ejercer sobre la otra, parece existir una relación entre ambas. Es posible que el hueso subcondral desarrolle un papel fundamental en la progresión de la artrosis, pero todavía no se ha estudiado esta relación de manera experimental.

En la presente investigación hemos caracterizado un nuevo modelo experimental de OP en conejos mediante una doble intervención consistente en ovariectomía (OVX) e inyecciones de metilprednisolona (MPH) a dosis variables durante 4 semanas. Hemos estudiado regiones anatómicas con diferente proporción de hueso trabecular y cortical como la columna lumbar, la rodilla y el hueso subcondral. Mediante esta doble manipulación hemos obtenido importantes variaciones en el contenido mineral óseo en todas las regiones evaluadas, en tan sólo 6 semanas, especialmente con la dosis de 1 mg/kg/d de MPH. Además, el modelo era reproducible y las pérdidas se mantenían constantes a los 4 meses de la OVX.

Simultáneamente, hemos seleccionado 12 animales para inducirles una OA en la rodilla mediante meniscectomía medial parcial y sección del ligamento cruzado anterior, y hemos estudiado la evolución de la OA en conejos previamente sanos o previamente osteoporóticos. Para comprobar que no existían otras alteraciones en el hueso subcondral diferentes a la OP, se realizó una RM experimental de alto campo (4,7 T) antes y después de cada intervención. En esta situación, hemos comprobado que la OP incrementaba la gravedad de la lesión artrósica. Así, la histología macroscópica mostró un mayor índice de gravedad en las rodillas artrósicas y en las artrósicas y osteoporóticas frente a las OP y controles a las 16 semanas, mediante evaluación semicuantitativa. Los resultados histológicos mostraron una gradación creciente de lesión en las rodillas OP, OA y OPOA, tanto en su estructura, como en la celularidad y en la tinción de la matriz, evaluados mediante la escala de Mankin. Asimismo, pudimos demostrar una correlación inversa entre DMO y lesión histopatológica en las 3 regiones evaluadas. La OVX más MPH *per se* indujo también alteraciones en la tinción de la matriz y en el índice global de valoración histopatológica de las rodillas no sometidas a la meniscectomía vs controles. El modelo propuesto plantea nuevas hipótesis y abre vías de investigación para la utilización de fármacos antirresortivos y osteomoduladores en el tratamiento futuro de la artrosis.

Summary

Osteoporosis (OP) and osteoarthritis (OA) are two of the more prevalent musculoskeletal diseases. Both are frequently present in the same patient. Although it is not well known the influence of each one on the other, a relationship between them seems much more than probable. It is likely that subchondral bone develops a key role in the OA progression, but this theoretical relationship is not yet experimentally demonstrated.

In our investigation, we have characterized a new experimental model of OP in the rabbit, through a double experimental intervention consistent in ovariectomy (OVX) and variable dose of methylprednisolone (MPH) injections for 4 weeks. We have evaluated different anatomical regions with variable ratio of trabecular: cortical bone as: lumbar spine, global knee and subchondral bone of the knee. By this combined manipulation, we have obtained important variations in the bone mineral content at all analyzed regions in only 6 weeks, especially with the 1 mg/kg/d MPH dose. Moreover, our model was reproducible and losses were maintained unchanging at 4 months.

Simultaneously, we have selected 12 animals to induce them a knee OA through medial meniscectomy with anterior cruciate ligament transection, and we have studied the progression of the OA in healthy and in previously osteoporotic rabbits. In order to prove that there is not other alterations at subchondral bone different to the OP induced, a high resolution experimental MRI (4.7 T) just before and after each experimental intervention was done. In this situation, we have demonstrated that OP increased the OA severity. So, macroscopical histology showed a higher severity score in OA and OPOA knees versus only OP and healthy knees at 16 weeks, by semiquantitative evaluation. The microscopical results showed an increasing gradation of lesions in OP, OA and OPOA knees, as much in the structure as in the cellularity and in the matrix staining, by Mankin scale evaluation. Moreover, we have also demonstrated an inverse correlation between BMD and histopathological lesions at three analyzed regions. OVX with MPH administration *per se* induced small, but significant changes, in the cartilage matrix staining and in total Mankin score in not subjected to meniscectomy knees vs healthy knees. Our model raises new hypothesis and opens new investigation ways to rationalize the utilization of antiresortive and bone-modulator drugs in the future treatment of OA.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

Artrosis: concepto y fisiopatología.....	1
Cambios articulares en la artrosis.....	2
Estudio clínico de la OA	4
Estudio de la OA experimental	5
1. Estudio mediante RM	5
2. Estudio histológico en la artrosis.....	6
Osteoporosis: concepto y epidemiología.....	7
Diagnóstico de la OP humana	9
1. Radiología simple.....	9
2. Biomarcadores óseos	9
3. Absorciometría ósea	9
4. Ultrasonidos y ultrasonografía cuantitativa	10
5. Otras técnicas de imagen	10
Densitometría ósea con fuente de rayos X (DXA).....	11
Estudio de la OP experimental.....	12
1. Densitometría ósea.....	13
2. Técnicas de imagen.....	13
3. Histomorfometría.....	14
4. Otras técnicas de estudio.....	14
Modelos animales de artrosis y osteoporosis.....	15
Modelos experimentales de artrosis.....	16
1. Artrosis experimental por agresión química.....	16
2. Artrosis inducida por manipulación mecánica o quirúrgica de la articulación	17
3. Artrosis espontánea y artrosis por manipulación genética.....	18
Modelos experimentales de osteoporosis.....	21
1. Requisitos de los modelos.....	21
1.1. Crecimiento y madurez esquelética.....	22
1.2. Periodicidad estral.....	22
1.3. Menopausia natural.....	22
1.4. Desarrollo de fracturas.....	23
1.5. Remodelado óseo.....	23
2. Mecanismos de inducción de OP.....	23

2.1. Castración médica o quirúrgica.....	23
2.2. Dieta y drogas.....	24
2.3. Inmovilización.....	24
2.4. Selección de razas.....	24
3. Modelos animales.....	25
3.1. Rata.....	25
3.2. Ratón.....	26
3.3. Conejo.....	26
3.4. Perro.....	27
3.5. Cerdo.....	27
3.6. Oveja.....	27
3.7. Primates.....	28
4. Métodos de evaluación ósea en los modelos animales.....	28
Papel del hueso subcondral en la patogenia de la OA.....	31
Relación entre osteoporosis y artrosis.....	32
Hipótesis de trabajo.....	35
II. OBJETIVOS	36
III. MATERIAL Y MÉTODOS	
Animales.....	37
Densitometría ósea: regiones de interés.....	38
Valoración de la precisión de las DXAs.....	43
Modelo de osteoporosis en el conejo.....	44
Evolución de la pérdida a medio plazo.....	45
Modelo experimental de artrosis.....	45
Evaluación por RM.....	48
Estudio anatomopatológico.....	51
1. Histología macroscópica.....	51
2. Histología microscópica.....	52
Determinaciones analíticas.....	53
Estudio estadístico.....	54

IV. RESULTADOS

Estudios densitométricos.....	56
1. Análisis descriptivo de valores densitométricos.....	56
2. Precisión de las DXA. Efecto del reposicionamiento.....	59
Cálculo del T-score en el primer experimento.....	59
Caracterización del modelo de osteoporosis.....	61
Determinaciones analíticas.....	65
Estudios de resonancia magnética.....	65
Histología del cartílago articular.....	69
1. Histología macroscópica.....	69
2. Histología microscópica.....	71
Correlación de las DXA con los hallazgos histopatológicos.....	72

V. DISCUSIÓN

Determinación de la masa ósea en nuestra población de conejos.....	78
Caracterización de nuestro modelo de OP combinado.....	81
Influencia de la OP en la evolución de la OA en nuestro modelo combinado	85
3.1. Estudios epidemiológicos.....	85
3.2. Estudios mediante RM.....	89
3.3. Resultados histopatológicos.....	92
Resumen final.....	98

VI. CONCLUSIONES..... 100**VII. BIBLIOGRAFÍA.....** 102**VIII. APORTACIONES CIENTÍFICAS.....** 137**IX. ADDENDA.....** 141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras:

1. Estructura estratificada del cartílago articular (página 3)
2. Histología microscópica normal del cartílago articular (página 4)
3. Esquema de hueso normal y osteoporótico (página 8)
4. Representación esquemática de la patogenia de la osteoartritis (página 34)
5. Densitómetro Hologic® 1000 utilizado en el estudio (página 39)
6. Posicionamiento de los conejos para la DXA (página 41)
7. DXA de columna lumbar y rodilla global (página 42)
8. DXA que muestra las subregiones evaluadas a nivel subarticular (página 42)
9. Coeficiente de variación *in vitro* de la DMO (página 43)
10. Técnica quirúrgica de la ovariectomía (OVX) (página 44)
11. Diagrama que muestra el calendario de intervenciones experimentales (página 46)
12. Técnica de la meniscectomía medial parcial y sección del LCA (página 47)
13. Aspecto general del espectrómetro Bruker Biospec de la RM de alto campo (p. 48)
14. Cortes sagitales del cóndilo femoral por RM (página 49)
15. Curva característica de intensidad de señal “pico-valle” correspondiente al cartílago hialino articular (página 50)
16. Distribución de la DMO en columna lumbar y rodilla global (página 57)
17. Correlación lineal de la DMO entre las distintas regiones anatómicas (página 58)
18. Cálculo del tamaño muestral hipotético (página 61)
19. Diagrama que muestra la variación de la DMO a las 6 sem de la OVX (página 63)
20. Variación temporal de la masa ósea a las 22 semanas de la OVX (página 64)
21. Curvas que muestran el característico pico de intensidad de señal con RM (p. 66)
22. Evolución del espesor del cartílago evaluado con RM durante el seguimiento (página 68)
23. Macrofotografías de la histología macroscópica en las rodillas OA y OPOA (p. 70)
24. Evaluación histopatológica del daño articular mediante la escala de Mankin (p.72)
25. Hallazgos histopatológicos mediante tinción con azul Alcian (página 74)
26. Correlación lineal entre la DMO y los hallazgos histopatológicos (página 75)

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

ACR	American College of Rheumatology
AO	Área ósea proyectada o superficie de tejido óseo analizado con la densitometría (en dos dimensiones)
CIH	Ácido clorhídrico
CL	Columna lumbar; en nuestro trabajo equivalente a L3-L4
CMO	Contenido mineral óseo (habitualmente se expresa en g o en mg)
CMIA	Inmunoensayo con micropartículas por quimioluminiscencia
COMP	Proteína oligomérica de la matriz del cartílago
CTX	C-telopéptido del colágeno tipo I (marcador de resorción ósea)
CV	Coefficiente de variación
2D / 3D	Dos o tres dimensiones
DE	Desviación estándar o típica
DMO	Densidad mineral ósea (se expresa en g/cm ² o mg/cm ²)
DXA	Densitometría ósea; dual X-ray energy absorptiometry (frecuentemente expresado como DEXA en la literatura)
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
EEM /ES	Error estándar de la media /Error estándar
FATR	Fosfatasa ácida tartrato resistente (marcador de resorción ósea)
FDA	Food and Drug Administration
FOV	En RM, campo de visión, “field of view” (en centímetros)
GC	Glucocorticoides
HC	Hueso cortical o compacto
HS	Hueso subcondral
IC	Intervalo de confianza
IDL	Lenguaje interactivo de datos
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina -1
IGF-BP-3	Proteína de unión al factor de crecimiento insulínico -3
IL-1; IL-6	Interleucinas 1 y 6
LCA	Ligamento cruzado anterior
LSC	Menor cambio significativo, mínima diferencia detectable
MEC	Matriz extracelular del cartílago
MMP	Metaloproteasas de matriz
MPH	Hemisuccinato de 6 α -metilprednisolona
mSv	Milésima parte del Sievert (ver Sievert)
NEX	Número medio de experimentos, medidas o excitaciones (en RM)
NO	Óxido nítrico

NTX	N-telopéptido del colágeno tipo I (marcador de resorción ósea)
OA	Artrosis, osteoartrosis u osteoartritis en terminología anglosajona
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
OP	Osteoporosis
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ooforectomía, ovariectomía
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PICP	Procolágeno tipo I C-terminal propéptido (marcador de formación ósea)
PNCP	Procolágeno tipo I N-terminal propéptido (marcador de formación ósea)
QUS	Ultrasonografía cuantitativa, siglas originales
RANK	Receptor-activador del factor NF-kappa β
RANKL	Ligando del receptor-activador del factor NF-kappa β
RG	Rodilla global
RM	Resonancia magnética
μ RM	Micro resonancia magnética
ROI	Región o regiones de interés, aquí referido a la DXA
SAM	“Senescence acceletated mice”; cepa transgénica de ratones que muestran signos de envejecimiento prematuro
SPGR	Secuencia de eco de gradiente con saturación grasa
Sv	Sievert. En Radioprotección, unidad de dosis equivalente. Su valor equivale a 100 rems; mSv: milésima parte del Sievert
T	Teslas, medida de potencia del imán de RM
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasas
T-score	Índice T: transformación matemática equivalente al número de DE que un individuo se separa de la media poblacional sana adulta o madura
TC	Tomografía computarizada
μ TC	Micro tomografía computarizada
T1/T2	Tipos de secuencia de la RM
TE	Tiempo de eco (en milisegundos)
TGF β	Factor transformador del crecimiento beta
TR	Tiempo de repetición (en el texto en milisegundos)
UE	Unión Europea
WOMAC	Western Ontario & McMaster Universities Osteoarthritis Index

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Artrosis: Concepto y fisiopatología

La artrosis, osteoartritis en terminología anglosajona (OA), es una de las enfermedades más prevalentes del aparato locomotor, y constituye una de las causas más frecuentes de incapacidad, especialmente en el anciano. Se estima que afecta al 14% de la población y que más del 80% de los mayores de 65 años presentan signos radiográficos de artrosis, al menos, en una articulación (Felson DT, 1987; Felson DT, 2000; Carmona L, 2000). Su impacto socio-económico se incrementará en las próximas décadas de manera paralela al envejecimiento de la población (Tornero J, 1992; Elders MJ, 2000).

La OA no es una enfermedad única, sino que constituye un grupo heterogéneo de enfermedades con características comunes, secundarias a alteraciones bioquímicas y biomecánicas que afectan al metabolismo del cartílago (Brandt K, 1998). La OA es la consecuencia de un desequilibrio en la homeostasis condrocitaria, cuyo resultado final produce una falta de acoplamiento entre la degradación y la síntesis de los distintos componentes de la matriz extracelular (MEC), con un claro predominio de los procesos catabólicos (López Armada MJ, 2004). Aunque se considera al condrocito como el elemento clave en el mantenimiento de dicha homeostasis, otras estructuras intervienen también en el desencadenamiento y progresión de la enfermedad. De hecho, actualmente se piensa que en OA están implicadas todas las estructuras articulares, desde el cartílago hasta la cápsula y los ligamentos, y tiene especial importancia la interacción entre estos tres elementos: cartílago, hueso subcondral y membrana sinovial, ésta última especialmente en las fases más evolucionadas de la enfermedad (Brandt K, 1998; Blanco-García FJ, 2004).

Aunque la etiología de la OA se conoce de forma incompleta, en las últimas décadas se han conseguido importantes avances en el conocimiento de su patogenia. Hoy día, se conocen mejor algunos de los factores (mecánicos, genéticos, etc.) y moléculas involucrados en su patogénesis: citocinas proinflamatorias, prostaglandinas (PGE₂...), prostanoïdes, radicales libres (óxido nítrico, NO), metaloproteasas (MMP), etc. (Benito-Ruiz P, 2000; Di Cesare PE, 2005; López Armada MJ, 2004).

La OA se clasifica en primaria o secundaria en función de la presencia o no de una causa o factor predisponente subyacentes. Clínicamente, se manifiesta por dolor, pérdida de movilidad, limitación funcional, crepitación, derrames ocasionales e inflamación sin alteraciones sistémicas, aunque no siempre existe una buena correlación entre la clínica y los hallazgos detectados en las radiografías (Kuettner KE, 1995; Dougados M, 2005).

Cambios articulares en la artrosis

En las etapas iniciales y desde un punto de vista macroscópico, la superficie del cartílago artrósico pierde su aspecto liso y brillante, se vuelve irregular y aparecen pequeñas hendiduras en las capas superficiales. Según progresa la enfermedad, las irregularidades se hacen más profundas, aparecen “fisuras verticales” que se extienden a las capas más profundas, el cartílago articular se erosiona, apareciendo ulceraciones que, en los estadios avanzados, dejan expuesto el hueso subcondral (Meachim G, 1972). Las lesiones en la OA suelen ser focales, y son más pronunciadas en las zonas de mayor carga, donde las fuerzas de compresión y cizalladura son más acusadas. Con frecuencia, los condrocitos adyacentes a las zonas de fibrilación y hendiduras muestran fenómenos de “apoptosis” (Meachim G, 1972; Blanco FJ, 1995), con evidente disminución de la celularidad (Pelletier JP, 2001). Junto a estas zonas, y en un intento de reparación, coexisten otras de proliferación condrocitaria, con formación de clones o racimos e hipertrofia celular (Poole CA, 1991).

En la matriz se aprecian alteraciones de la tinción que traducen modificaciones en la producción y degradación de la misma. En condiciones fisiológicas, puede encontrarse una cierta multiplicación del frente de mineralización, “*tidemark*” o línea limitante basófila, en determinadas zonas anatómicas. En la artrosis, este fenómeno se hace mucho más evidente, especialmente en las zonas donde el cartílago se encuentra más erosionado. Además, el “*tidemark*” se ve invadido por capilares vasculares, que son vía de entrada de factores angiogénicos y de crecimiento que estimulan a su vez la reparación del cartílago (Burr DB, 2004). En las zonas lesionadas, proliferan fibrocitos que inducen una metaplasia del cartílago hialino hacia fibrocartílago, con un

comportamiento biomecánico de calidad inferior (Bullough PG, 1983). En las figuras 1 y 2 se puede apreciar la estructura estratificada e histología de un cartílago normal.

Los cambios característicos del hueso subcondral en la OA incluyen la aparición de quistes rellenos de tejido mucoso, esclerosis subcondral y formación de osteofitos marginales. En esos márgenes hay proliferación de fibroblastos, que sintetizan un tejido fibroso que posteriormente experimenta una metaplasia a hueso, dando lugar a la aparición de osteofitos (Grynblas MD, 1991; Di Cesare PE, 2005).

La membrana sinovial experimenta una reacción inflamatoria y aparece engrosada e hiperémica, especialmente en las fases avanzadas de la enfermedad (Schumacher HR, 1995; Saito I, 2002). Igualmente, la cápsula y los ligamentos desarrollan una reacción inflamatoria que puede evolucionar hacia una excesiva laxitud o, más frecuentemente, a fibrosis. Ambos fenómenos contribuyen a distorsionar la biomecánica articular. Los meniscos muestran pequeños desgarros en los que, como en otros tejidos articulares, se evidencian intentos reparativos, con proliferación e hipertrofia de fibroblastos (Fahmy NR, 1983).

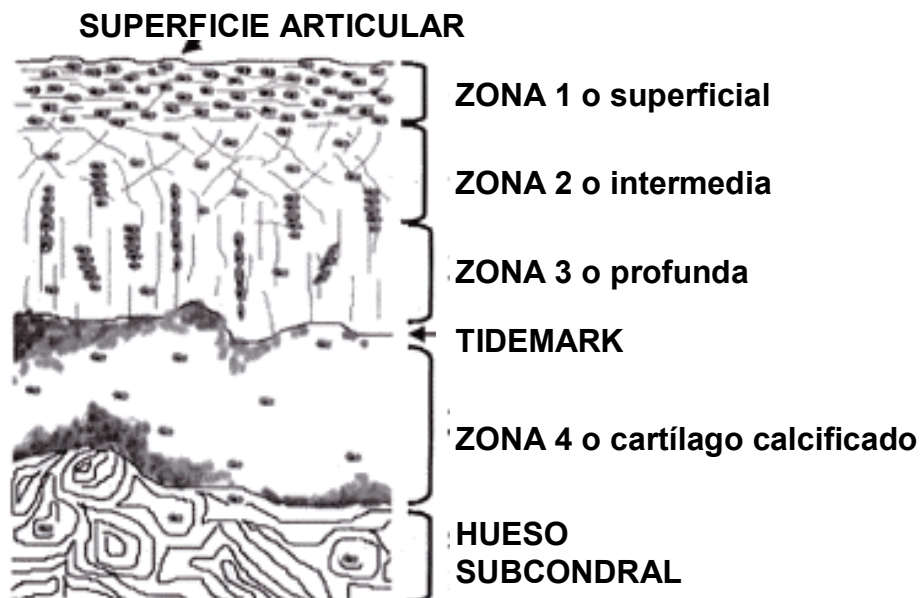


Figura 1. Esquema de la estructura estratificada de un cartílago articular normal que muestra su disposición en diferentes niveles.

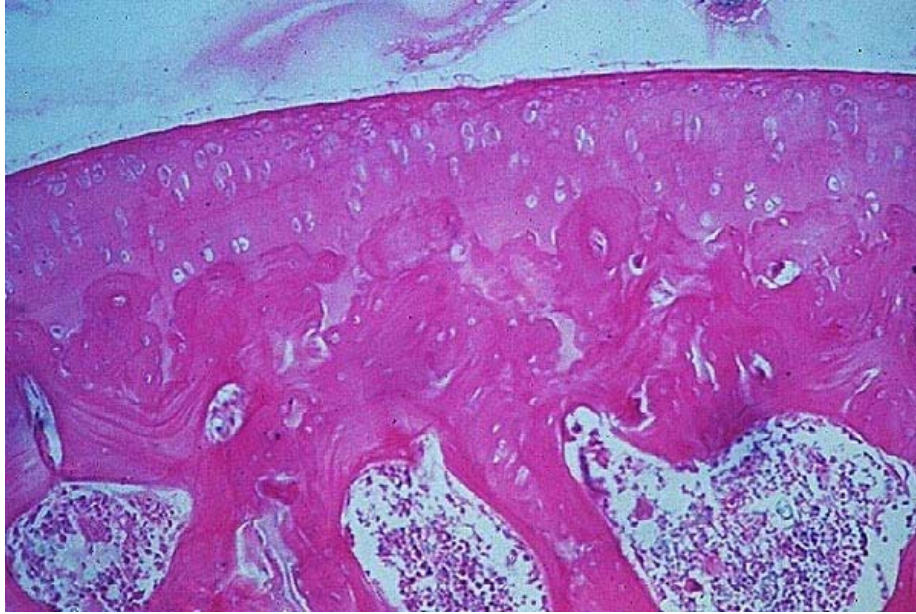


Figura 2. Histología microscópica normal del cartílago articular (azul Alcían).

Estudio clínico de la OA

El diagnóstico actual de la OA se basa principalmente en la clínica y en la radiología convencional, lo que conlleva ciertas limitaciones en el diagnóstico y conocimiento de su fisiopatología, especialmente en las fases tempranas (Dougados M, 2005). Esta pobreza de métodos diagnósticos en las etapas iniciales dificulta también la valoración adecuada de su progresión y la monitorización de los tratamientos disponibles en la actualidad.

El diagnóstico radiológico de la OA se basa principalmente en la medida del espacio articular y en el estudio de los signos indirectos de afectación ósea secundaria (Kellgren JH y Lawrence JS, 1957). Sin embargo, la cuantificación del espacio articular proporciona sólo una estimación indirecta del deterioro articular y se ha mostrado ineficaz para detectar lesiones precoces (Messner K, 2001).

Existen algunas técnicas emergentes, utilizadas con más o menos éxito, como la ultrasonografía, la artroscopia para la valoración directa del cartílago (condroscopia) y la resonancia magnética (RM) (Calvo E, 2001b). Otros métodos utilizados con una menor frecuencia son: la gammagrafía ósea con bisfosfonatos marcados con tecnecio,

como predictora de lesión activa o de mal pronóstico, y la tomografía computarizada (TC).

También se han utilizado, a nivel analítico, biomarcadores de degradación del cartílago, especialmente los péptidos de degradación del colágeno tipo II y/o la proteína oligomérica de la matriz (COMP) como variables indirectas de la evolución y monitorización de la OA, con resultados variables (Poole AR, 2003). Ninguna de ellas está actualmente validada para su utilización en la práctica clínica diaria.

Estudio de la OA experimental

A nivel experimental nos interesan especialmente dos técnicas que fueron utilizadas en esta investigación y que expondremos con más detalle en la metodología empleada, a saber: la RM experimental de alta resolución y el estudio histopatológico de las muestras obtenidas tras el sacrificio de los animales.

1. Estudio mediante RM:

La obtención de imágenes mediante RM de alta resolución constituye un método ideal para la evaluación del cartílago a nivel experimental. Proporciona una definición anatómica y clara de los tejidos blandos, tiene una resolución espacial muy alta, obtiene imágenes en múltiples planos y permite una visualización directa del cartílago. Desde el punto de vista experimental no es destructiva, por lo que puede utilizarse para realizar estudios secuenciales (Peterfy CG, 1996; Loeuille D, 1998; Disler DG, 2000; McCauley TR, 2001; Calvo E, 2001b). Los trabajos publicados en la literatura muestran una gran variabilidad en la imagen del cartílago por RM, consecuencia de su compleja estructura histológica y bioquímica (Xia Y, 2000).

La RM obtiene también imágenes de gran calidad del hueso subcondral, especialmente con las secuencias eco-espín (Watson PJ, 1996). En la RM, la placa subcondral se ve como una línea hipointensa nítida situada por debajo del cartílago, que continúa por las corticales del hueso, y en el hueso esponjoso se definen las trabéculas con claridad, que muestran la misma intensidad de señal (Carpenter TA, 1995).

En los estadios más precoces de la OA, se puede apreciar una alteración en la intensidad de señal del cartílago en las imágenes de la RM, debida a cambios en el contenido del agua de la matriz. Estos cambios pueden manifestarse como aumento o disminución en la intensidad de señal y/o como variaciones en el grosor del cartílago (Adams ME, 1991; Paul PK, 1991; Herberhold C, 1998; Calvo E, 2004). Otras alteraciones, como las erosiones y ulceraciones condrales aparecen más tardíamente.

Respecto al hueso subcondral, uno de los cambios morfológicos más precoces en la artrosis es la aparición de áreas de edema medular, hiperintensas en T2 e hipointensas en T1. Se desconoce si son debidas a una sobrecarga del mismo por alteración de la biomecánica articular (Nolte-Ernstring CCA, 1996) o a trastornos vasculares (Imhof H, 1997). En las fases más avanzadas, podemos detectar esclerosis subcondral, la presencia de quistes subcondrales o la aparición de osteofitos. También pueden analizarse, mediante RM, los cambios en el resto de las estructuras articulares, como la existencia de lesiones asociadas en los meniscos y ligamentos, y si existe inflamación sinovial y/o derrame articular (Dawson J, 1999).

2. Estudio histológico en la artrosis

Para valorar desde un punto de vista histopatológico la lesión del cartílago en la artrosis, habitualmente se utiliza la escala propuesta por Mankin y cols. (Mankin HJ, 1971). En ella se asigna una puntuación histológica a cada caso, resultado de sumar los valores correspondientes a las alteraciones en la estructura del cartílago, en su celularidad, en la tinción de la matriz y en el “*tidemark*” o línea limitante basófila. De este modo, a un cartílago normal le corresponden 0 puntos, y a la afectación más grave del cartílago le corresponderían 14 puntos. La escala de Mankin ha demostrado buena correlación inter e intraobservador (van der Sluijs JA, 1992; Ostergaard K, 1997), refleja adecuadamente el nivel de alteración metabólica condrocitaria (Bulstra SK, 1989) y constituye el “patrón oro” para la evaluación histopatológica del cartílago hialino articular (para detalles de la escala, ver material y métodos).

Osteoporosis: concepto y epidemiología

La OP es una enfermedad multifactorial, en cuya patogenia intervienen múltiples factores genéticos (herencia poligénica) y ambientales. Actualmente se define la osteoporosis (OP) como “*enfermedad esquelética diseminada y caracterizada por una resistencia ósea disminuida que incrementa el riesgo de padecer fracturas*” (NIH, 1993; NIH, 2001). El concepto de resistencia ósea viene determinado por una disminución de la masa o contenido mineral óseo y por un trastorno en sus características cualitativas. Estas últimas incluyen desde las propiedades de las fibras colágenas hasta las geométricas y de la microarquitectura ósea (Figura 3). El proceso final común que subyace a ambos fenómenos es una alteración del remodelado óseo. Podríamos entonces definir la OP como una enfermedad generalizada del remodelado óseo, y más exactamente como una enfermedad del remodelado óseo que determina una pérdida de la masa ósea (González-Macías J, 2004). Nos interesa especialmente resaltar la condición de generalizada o difusa de la enfermedad, lo que implica que la OP afecta en mayor o menor medida todos los compartimentos óseos, a saber: hueso trabecular y cortical, así como al hueso subcondral y subarticular, lo cual tiene una especial relevancia en nuestra investigación, como luego comentaremos.

Es habitual afirmar que la masa ósea es el mejor índice relacionado con las fracturas, o al menos, el mejor “índice objetivable”. De hecho, fue el criterio elegido por la OMS para el diagnóstico de OP postmenopáusica (WHO, 1994). Sin embargo, la relación entre la masa ósea y las fracturas es relativamente pobre. Téngase en cuenta que la densidad ósea de una población fracturada y no fracturada sólo se diferencian en 0,5-1 desviaciones estándar (DE), equivalentes a un 5-10% de diferencia. El gradiente de riesgo de la densidad mineral ósea (DMO) para las fracturas es alrededor de 2 por cada disminución de una DE en la DMO (González-Macías J, 2004).

Siguiendo el criterio densitométrico, la prevalencia de OP en las mujeres de raza blanca caucásica de más de 50 años, es del orden del 15% cuando la DMO se mide solamente en una de las tres localizaciones convencionales (columna, cadera o muñeca), y del 30% cuando se mide en todas ellas (Melton LJ, 1995; Melton LJ, 2003). En España, la medición en estas 3 localizaciones proporciona valores algo más elevados

(35-40%), a expensas de un mayor porcentaje de mujeres con OP de columna (30%) (Díaz Curiel M, 2001).

No obstante, y aunque la definición de OP basada únicamente en el criterio densitométrico tiene bastantes limitaciones, seguimos utilizando los conceptos de masa ósea y DMO en la clínica diaria. Además, son muy útiles en los estudios epidemiológicos de prevalencia, para tomar decisiones terapéuticas, monitorizar tratamientos y/o valorar nuevas alternativas terapéuticas en los ensayos clínicos con nuevos fármacos. Sin embargo, su definición y prevalencia en base a criterios exclusivamente densitométricos no está bien establecida en otras poblaciones, como ancianos, varones o población infantil.

Más difícil aún es definir la OP en animales, donde no existen estudios poblacionales ni puntos de corte para seguir un criterio determinado, además de la dificultad añadida que entraña la colocación de los mismos y el hecho de demostrar fracturas en cualquier especie animal distinta a la humana. A pesar de todo, la utilidad de medir el contenido mineral y la DMO como variable indirecta es incuestionable y sigue vigente en los estudios experimentales (Turner RT, 2001).

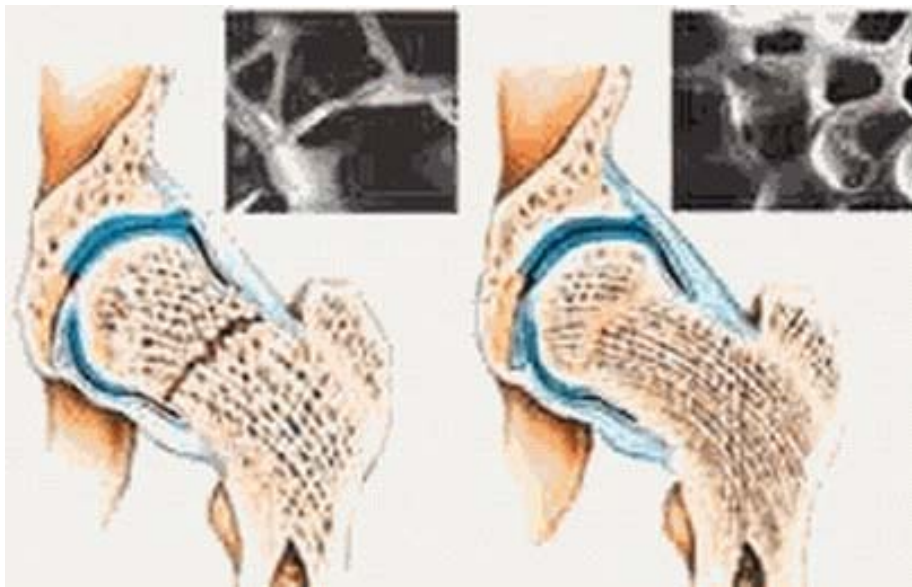


Figura 3. Esquema de hueso osteoporótico (izquierda) y hueso normal (derecha).

Diagnóstico de la OP humana

En esta apartado mencionaremos los principales medios disponibles en la actualidad para el diagnóstico de la osteoporosis.

1. Radiología simple:

La radiología convencional es poco sensible para la detección de las pérdidas óseas en las fases tempranas. En general, se acepta que hace falta una pérdida al menos del 30% del mineral óseo para que pueda detectarse osteopenia con la radiología convencional. Cuando la pérdida sobrepasa este porcentaje, aparece inicialmente un aumento de la radiotransparencia, y posteriormente aparecerán otros signos radiográficos como: enmarcación de los cuerpos vertebrales, presencia de nódulos de Schmörl, deformidad vertebral o aparición de acuñaamientos a nivel del esqueleto axial; y osteopenia yuxta-articular, adelgazamiento cortical y agrandamiento del canal medular, a nivel del esqueleto apendicular. En fases más avanzadas, aparecerán fracturas axiales o periféricas (van Kuijk C, 1995; Lane NE, 2005).

2. Biomarcadores óseos:

Prácticamente, casi todos los marcadores tanto de formación como de resorción óseos han sido investigados para probar su aplicación al diagnóstico precoz y sobre todo monitorización de tratamientos. Los más estudiados han sido: osteocalcina, PINP, PICP, fosfatasa alcalina ósea, FATR, piridinolina y desoxipiridinolina, NTX, CTX y β -C-telopéptido. Aunque muy interesantes en los estudios de investigación y los ensayos clínicos, ninguno ha demostrado su utilidad en la práctica clínica diaria hasta la actualidad (Blumsohn A, 2003).

3. Absorciometría ósea:

Se incluyen en este apartado las técnicas cuyo fundamento físico está basado en la absorción por el hueso de distintos tipos de radiación (fotones, radiación ionizante, etc.)

cuando es atravesado por ellas. De todas, la más extendida en la actualidad para el diagnóstico y monitorización de la OP, es la densitometría ósea mediante tecnología radiológica dual (DXA). A ella la dedicaremos un apartado más adelante.

Otras técnicas empleadas serían la radiogrametría, la densitometría radiográfica, la densitometría fotónica simple o de doble haz, y la activación neutrónica cálcica. En general, la reproducibilidad de estas técnicas es más baja que con la DXA, por lo que - por ésta y otras limitaciones - su uso ha quedado relegado hoy día a un segundo plano.

4. Ultrasonidos y ultrasonografía cuantitativa:

Los ultrasonidos constituyen una técnica inocua, cómoda y sencilla de realizar. Sin embargo, no ha sido hasta estos últimos años cuando esta técnica se ha desarrollado para el estudio de la OP como método alternativo para la estimación de la densidad mineral ósea, denominándose ultrasonografía cuantitativa (QUS) (Glüer CC, 1997; Bauer DC, 1999; Gonnelli S, 2002).

Además, la ecografía parece dar una idea de algunos aspectos de la calidad del hueso mejor que la DXA. La QUS se ha mostrado como técnica perfectamente válida para determinar el riesgo de fractura (Barkmann R, 2000; Glüer CC, 2003). Por el contrario, su precisión es escasa y no es válida para estudios longitudinales. Además, su correlación con la DXA es relativamente baja, en torno a 0,4 en la mayoría de estudios realizados (Vogel JM, 1988; Nicholson PH, 2000; Barkmann R, 2000; Hoffmeister BK, 2002). Por todo ello, todavía no ha sido aprobada por la FDA para el estudio diagnóstico de la OP.

5. Otras técnicas de imagen:

La tomografía computarizada (TC) es una modalidad diagnóstica capaz de evaluar la masa ósea trabecular y cortical por separado, así como las propiedades geométricas del hueso, facilitando el cálculo de las fuerzas mecánicas (Link TM, 1998; Jiang Y, 1998; Cortet B, 1999). Sin embargo, la técnica es costosa y expone al paciente a altas dosis de radiación ionizante. Últimamente, se está desarrollando una tomografía

periférica con una excelente precisión y menor dosis de radiación, que puede tener bastante interés para su aplicación en los próximos años.

Otra técnicas útiles para predecir y estudiar las propiedades biomecánicas del hueso son la micro-TC (μ TC) y la micro-RM (μ RM) tridimensional, la RM de alta resolución aplicada sobre muestras de biopsia ósea, o el llamado análisis de elementos finitos, que pueden aportar aspectos muy interesantes de la biomecánica ósea (Majumdar S, 1999; Borah B, 2000; Newitt DC, 2002a y 2002b; Laib A, 2002; van Rietbergen B, 2002; Vokes TJ, 2003).

Densitometría ósea con fuente de rayos X o absorciometría radiológica dual / de doble energía (DXA)

Es la técnica más empleada en la práctica asistencial. Como ya hemos comentado, constituye la técnica de referencia o “patrón oro” para el diagnóstico de la OP y la valoración indirecta de la resistencia ósea. Además, la DXA ha sido y continúa siendo una herramienta valiosísima en la investigación clínica y básica (Kanis JA, 2000).

El propósito de este método es medir cuantitativamente los depósitos minerales en el hueso, asumiendo que mantienen una composición química constante. Su principio físico fundamental es medir la transmisión de radiación ionizante (rayos X) con dos fuentes distintas de energía, con diferente poder de absorción y atenuación por los diversos tejidos que atraviesa, permitiendo de esta manera discriminar el hueso de los tejidos blandos (Nolla Solé JM, 2004; del Río L, 2004).

Un densitómetro convencional de rayos X consta de: a) una unidad de exploración integrada por una mesa estática que contiene el generador de rayos X y donde encima se sitúa al paciente, un brazo detector móvil que se desplaza a lo largo de la mesa de exploración, y un ordenador que se encarga de digitalizar y analizar la imagen con un software específico; b) una consola de control con un monitor para la visualización de las imágenes, teclado, videoimpresora y sistema de conservación de datos. En los estudios experimentales, se utiliza un software específico que es diferente al utilizado en humanos.

Los resultados de las mediciones con DXA se suelen ofrecer en forma de valores absolutos y relativos, en relación con una población determinada de referencia. Los

datos absolutos que se miden son: el área, o superficie proyectada por el hueso (en dos dimensiones) que está siendo explorado, y que se expresa en cm^2 ; el contenido mineral óseo (CMO) o masa ósea, que se ofrece en gramos (g) o miligramos (mg) equivalentes de hidroxapatita; y la densidad mineral ósea (DMO), en g/cm^2 , que es el parámetro más conocido, y que realmente constituye una falsa densidad, ya que se trata de una “densidad areal” y no volumétrica.

La precisión de la DXA se expresa como coeficiente de variación (CV), que es una forma de indicar el error de precisión para el equipo utilizado, y se sitúa en el 0,5% para exploraciones *in vitro*, y en torno al 1-2% para las exploraciones *in vivo*. Para muestras pequeñas, en experimentación animal, un CV *in vivo* aceptable oscilaría entre 3-6%. Para conseguir una buena precisión *in vivo* es preciso mantener un adecuado entrenamiento de los operadores y utilizar procedimientos de trabajo normalizados tanto para la exploración como para el análisis de las imágenes (Blake GM, 1997; Bonnick SL, 2001; Lenchik L, 2002; Leslie WD, 2006; Blank RD, 2006).

La exactitud de la técnica oscila entre el 93-97% y puede verse influenciada por factores intrínsecos (calcificaciones, osteofitos, aplastamientos vertebrales y/o alteraciones de la estática vertebral: escoliosis, etc.) o extrínsecos (contrastes, clips, botones metálicos, etc.). La dosis de radiación que recibe el paciente es muy baja, y oscila entre 0,5 y 2,4 mSv, equivalente a un décimo de la radiación que recibe un paciente al realizarse una Rx simple de tórax en proyección pósterio-anterior (Lewis MK; 1994; Patel R, 1996; Baim S, 2005).

Estudio de la “OP experimental”

Dado que es difícil obtener modelos animales con fracturas por fragilidad, y que los valores poblacionales de la masa ósea no están bien estudiados en la mayoría de especies animales, el término de OP en animales debería usarse con “extrema cautela”. Aunque a lo largo del texto utilizaremos inevitablemente dicho término en múltiples ocasiones, sería más correcto el de “esqueleto con baja densidad mineral” o algo similar, cuando nos refiramos a cualquier modelo animal al que se ha realizado alguna manipulación experimental con objeto de disminuirle la masa ósea (Turner RT, 2001).

Por ello, deberíamos hablar de “Evaluación del esqueleto con baja densidad mineral” en este apartado:

1. Densitometría ósea:

La densitometría radiológica ósea ha sido también el método más popular y ampliamente utilizado en investigación animal. Es una técnica tan fiable como en humanos, tanto en su modalidad monoenergética como en la de doble energía. Ambas se han utilizado con éxito en animales grandes y pequeños. La densitometría ósea permite obtener valores tanto del CMO como de la DMO. Como regiones anatómicas, se ha empleado en columna y en extremidades en animales medianos o grandes, y en el esqueleto total en animales pequeños. Debido a dificultades inherentes en la interpretación de la DMO en los animales de laboratorio, parece más adecuado utilizar el CMO como variable principal de medida de variación ósea. Los mayores problemas surgen en la interpretación de la DMO en animales en crecimiento, por lo que en general sería ideal utilizar animales esqueléticamente maduros, salvo que nos interese el estudio específico del esqueleto en crecimiento.

En cuanto a las pérdidas detectadas con la DXA, éstas van a depender de la especie utilizada, de la manipulación experimental empleada, así como de la región anatómica elegida para el análisis. Así por ejemplo, las pérdidas en primates sometidos a OVX sola oscilan entre el 2 y el 11% en cabeza de fémur o en columna respectivamente; en ratas sometidas a deprivación hormonal (OVX u orquiectomía según sean hembras o machos) están en torno al 10% a nivel femoral; en un 14% a nivel corporal total en la raza SAMP6 de ratones “osteopénicos genéticamente”; y hasta en un 33% a nivel del radio distal en ovejas sometidas a una doble intervención con OVX más corticoides (Mosekilde L, 1993; Kasra M, 1994; Li B, 1997; Simmons A, 1997; Jerome CP, 1997; Lill CA, 2002; Vanderschueren D, 1993; Chen H, 2004).

2. Técnicas de imagen:

Aunque la densitometría ósea sea la técnica más utilizada hasta la actualidad en los modelos experimentales, actualmente se recomiendan otras técnicas de imagen con

mayor poder de resolución siempre que sea posible. En este sentido, tanto la TC periférica, como la μ -TC o la μ -RM de alta resolución tienen más poder resolutivo, permitiendo además una mejor distinción entre hueso trabecular y cortical, lo que tiene un especial interés en el estudio de los modelos animales. Sin embargo, estas técnicas son mucho más costosas y requieren laboratorios altamente especializados (Rosen HN, 1995; Genant HK, 1997; Guglielmi G, 1997; Lane NE, 1999; Ritman EL, 1998).

3. Histomorfometría:

La histomorfometría ósea es el estudio de las características histológicas del hueso sin decalcificar. La valoración histomorfométrica aporta más información que la densitometría ósea. Permite además valorar de forma dinámica la osteoformación mediante el marcaje con fluorocromos. La histomorfometría ósea tiene, sin embargo, importantes limitaciones impuestas en gran medida por la escasez del tamaño de las muestras obtenidas, y la dificultad para conseguir muestras repetidas (Cavolina JM, 1997; Turner RT, 2001), lo que unido a problemas derivados del procesamiento y análisis de las muestras, limitan su uso a laboratorios muy especializados. La histomorfometría molecular combina la histología convencional con técnicas moleculares para detectar la presencia de moléculas específicas y genes concretos dentro de la célula ósea, cuando se asocia a técnicas de inmunohistoquímica e hibridación in situ.

4. Otras técnicas de estudio:

Otros métodos utilizados para estudiar las pérdidas óseas en los modelos animales incluyen el estudio de los biomarcadores óseos, los tests de resistencia biomecánica y los estudios para determinar la consolidación de fracturas.

En cuanto a los biomarcadores del metabolismo óseo, se han utilizado prácticamente los mismos que en humanos, aunque su aplicabilidad en animales es aún menor, como también la especificidad y sensibilidad del método empleado. La interpretación de resultados en los animales en crecimiento entraña aún mayor dificultad. Por el contrario,

el análisis de la homeostasis mineral (Ca, P, Mg) mediante radioisótopos, etc. puede ser medido con más facilidad y fiabilidad en los modelos animales (Turner RT, 2001).

Los estudios biomecánicos nos permiten medir las propiedades biomecánicas del hueso mediante estudios de compresión, torsión y/o inclinación tanto en el esqueleto axial como en las diáfisis de los huesos largos, lo que nos dará una idea más apropiada de la resistencia ósea. Actualmente, existen también modelos bien caracterizados para el estudio de la reparación / consolidación de las fracturas (Barnes GL, 1999; Sogaard CH, 1999).

MODELOS ANIMALES DE ARTROSIS Y OSTEOPOROSIS

Los modelos animales son una herramienta indispensable para estudiar la etiopatogenia y desarrollar estrategias terapéuticas en muchas enfermedades. Permiten llevar a cabo experimentos imposibles de realizar en los seres humanos, por razones tanto éticas como metodológicas. Nuestros conocimientos en fisiopatología humana se basan en gran medida en la experimentación previa en modelos animales. Además, constituyen la primera fase de los ensayos de fármacos in vivo. Los modelos animales son especialmente relevantes en el estudio patogénico y fisiopatológico de la OA y la OP (Atlman RD, 1990; Kimmel DB, 2001). Actualmente, existen modelos bastante homologados y estandarizados para el estudio de estas dos enfermedades.

Desde un punto de vista filogenético, cuanto más cercano a la especie humana sea el modelo estudiado, más parecidas y mayores serán las similitudes encontradas. En este sentido, el modelo “ideal” para el estudio de una enfermedad concreta es aquél que remede la condición humana con absoluta fidelidad. Desafortunadamente, esto constituye una quimera difícil de conseguir. En otras palabras, intentar buscar un paralelismo completo entre un modelo animal, aunque sea cercano en la escala evolutiva, y la enfermedad humana, resulta poco creíble y realista (Roach HI, 1989).

Otro concepto básico en experimentación animal es que, cuanto menos se manipule un modelo animal, más aceptables y exportables serán los resultados obtenidos. Por este motivo, se evitarán en lo posible condiciones poco fisiológicas que reducirían la relevancia de un modelo concreto. Debemos también mencionar que cada modelo tiene sus propias ventajas y limitaciones, de las que el experimentador debe ser consciente en

todo momento, y la interpretación de los resultados tampoco debe ir más allá de las limitaciones impuestas por el propio modelo en estudio.

Modelos experimentales de artrosis

Los modelos experimentales de OA ofrecen claras ventajas sobre la investigación en humanos. En ellos puede determinarse con precisión el comienzo y la duración de la enfermedad, así como su gravedad y progresión en el tiempo. Estas cualidades permiten hacer estudios secuenciales de la enfermedad, y cuantificar y categorizar con rigor los cambios patológicos encontrados. Obviamente, es imprescindible que cualquier modelo experimental de OA reproduzca razonablemente la enfermedad tal y como la conocemos en el humano; pero además debe cumplir una serie de condiciones de reproducibilidad, disponibilidad, costes y facilidad de estudio (Moskowitz RW, 1988; Altman RD, 1990). A continuación, haremos un breve repaso de los más relevantes:

1. Artrosis experimental por agresión química:

La mayoría de los modelos de artrosis inducida por agentes químicos se basan en la inyección intraarticular de sustancias irritantes. La administración intra-articular de enzimas proteolíticas, como papaína, tripsina o colagenasa, desencadena una artrosis por degradación química de las proteínas de la MEC (Havdrup T, 1977 y 1979; van der Kraan PM, 1990 y 1992; Kalbhen DA, 1987; Williams JM, 1984; Weissman G, 1967). En otras ocasiones, se ha utilizado la inflamación de la membrana sinovial como agente agresor del cartílago. Así, la artrosis se produce de forma secundaria a la sinovitis. Es el caso de la artrosis producida tras la inyección intra-articular de colchicina o de ácido ósmico (Legier R, 1976; Frankl V, 1983) (Tabla 1).

Todos estos modelos de artrosis están muy cuestionados, dado que en ellos se produce una reacción inflamatoria precoz inducida por el agente irritante que secundariamente produce degeneración articular, lo que guarda poca relación con la etiopatogenia de la artrosis idiopática humana.

2. Artrosis inducida por manipulación mecánica o quirúrgica de la articulación:

Las diferentes aproximaciones descritas para provocar OA por manipulación mecánica o quirúrgica de la articulación han intentado reproducir en el animal varios de los mecanismos principales que podrían estar implicados en la artrosis humana.

Uno de estos mecanismos constituye la modificación en las líneas de fuerza a las que se somete la rodilla. La reproducción experimental de esta alteración se ha realizado mediante osteotomía tibial (Johnson RG, 1988), un modelo bastante relacionado con la etiopatogenia de la enfermedad humana. Las lesiones que este modelo provoca suelen ser leves y de lenta progresión, lo que permite estudiar los estadios precoces, así como la evolución de la enfermedad (Reimann I, 1973). También se han descrito modelos en los que el daño es provocado por inmovilización e inmovilización-compresión. La inmovilización prolongada produce contractura capsular y anquilosis (Hall MC, 1963; Saamanen AM, 1990), y más tardíamente hiperplasia y proliferación sinovial, con cambios degenerativos en el cartílago.

Otro modelo de OA experimental utilizado ha sido la artrosis por denervación, fundamentado en los cambios degenerativos secundarios a la pérdida de sensibilidad de una extremidad (O'Connor BL, 1989).

La mayor parte de los modelos descritos anteriormente están ya en desuso. Actualmente, los modelos quirúrgicos más frecuentemente utilizados se basan en la lesión de las estructuras fundamentales para la estabilidad y función articulares. La OA que provocan es muy similar a ciertas formas de artrosis humana. En concreto, los más utilizados son los que se inducen por inestabilización de la rodilla tras la sección del ligamento cruzado anterior (LCA) y/o por meniscectomía parcial, fundamentalmente en perros y conejos (Brandt KD, 2002; Bendele AM, 2002).

Las alteraciones que se producen son progresivas y totalmente superponibles a las que acontecen en el humano, sobre todo en cuanto a las lesiones del cartílago. La meniscectomía parcial del menisco interno en el conejo es un modelo con una evolución más lenta, lo que permite estudiar los estadios más tempranos de la enfermedad (Moskowitz RW, 1973; Calvo E, 2004). La combinación de meniscectomía y sección de ligamentos, permite una progresión mucho más rápida y agresiva, que en el caso del conejo es apreciable ya a las 4-6 semanas de la cirugía (Hulth A, 1970).

3. Artrosis espontánea y artrosis por manipulación genética:

Los modelos sistémicos son los ideales para el estudio de la artrosis generalizada. Se ha estimado que existe un componente genético en el 40-65% de los pacientes con OA. De hecho, la presencia de mutaciones en los genes que codifican varias proteínas de la matriz (sobre todo para los diferentes tipos de colágeno) induce la aparición de artrosis. Varias cepas de roedores desarrollan espontáneamente artrosis, como los ratones STR/ort, C57BL y NZY (Mason RM, 2001; Helminen HJ, 2002). Aún no se han descrito cuáles son las razones moleculares para que esto ocurra. En la mayoría de estos modelos espontáneos, el desarrollo de la OA es lento, y los cambios que aparecen son susceptibles de ser confundidos con cambios debidos al envejecimiento.

Los modelos de ratones transgénicos han demostrado ser muy útiles en la investigación biomédica. En la literatura existe ya un considerable número de modelos de manipulación genética para el estudio de la OA. Así, mediante una delección en el gen de la cadena $\alpha 1$ del colágeno XI, se ha diseñado una cepa de ratones con condrodisplasia autosómica recesiva (Helminen HJ, 2002). También se ha descrito un modelo de ratones con micromelia por delección en el gen del procolágeno II, en el que los ratones desarrollan una OA con erosiones en las zonas superficial y de transición del cartílago articular (Rodríguez RR, 2004). Además, existen ratones con anquilosis progresiva debido a una mutación en el gen ANK, cuyo producto regula la concentración de pirofosfato intra y extracelular (Helminen HJ, 2002). La mayor parte de modelos descritos para el estudio de la condrodisplasia y OA avanzada en ratones en los que no hay envejecimiento, se han relacionado con alteraciones en los genes para los distintos colágenos (fundamentalmente II, IX, X, XI) (Helminen HJ, 2002; Nakata K, 1993; Kwan KM, 1997; Li SW, 2001).

También en los animales domésticos existe la OA espontánea. Así, uno de los más estudiados es el de la OA secundaria a la displasia de cadera en perros, sobre todo en el pastor alemán, en la raza labrador y en los beagles (Lust G, 1973; Lagier R, 1988; Olsewski JM, 1983). Las articulaciones de estos perros suelen ser normales al nacimiento, pero un elevado porcentaje desarrollan displasia entre los 4 y 10 meses debido a una incongruencia entre el acetábulo y la cabeza femoral.

Ciertas especies de monos, como *macaca mulatta*, desarrollan OA de rodilla con una incidencia y semiología muy similar al humano. Tiene el interés añadido de que al tratarse de animales bípedos y desarrollarse en su edad adulta, comparte unas características afines a las de la OA humana (De Rousseau CJ, 1985; Kessler MJ, 1986; Carlson CS, 1996; Jiménez SA, 1995).

De todos los modelos comentados, los más utilizados hoy día para el estudio patogénico de la OA siguen siendo los modelos de OA inducida quirúrgicamente en animales medianos y de fácil manejo; y en un futuro cercano, ciertas cepas de ratones transgénicos cuando lo que nos interese sea la evaluación y desarrollo de nuevos fármacos. La utilización simultánea de varios de estos modelos, nos facilitaría estudiar aspectos diferentes y complementarios de la enfermedad (Calvo E, 2001a).

Tabla 1. Principales modelos animales de artrosis según la manipulación experimental practicada.

<i>Tipo de modelo</i>	<i>Agente inductor de la artrosis</i>	<i>Especie</i>	<i>Otras especies</i>
Artrosis química	Papaína	Conejo Ratón	Cobaya, Perro
	Tripsina	Conejo	
	Colagenasa	Ratón	
	Colchicina	Rata	
	Ácido ósmico	Conejo	
	Iodoacetato	Pollo Cobaya	
	Vitamina A	Conejo	
	Filipina	Conejo	
	Cartílago y hueso	Conejo	
	Interleucina-1 TGF- β 2	Ratón Conejo	
Artrosis mecánica / quirúrgica	Osteotomía tibial	Perro Conejo	
	Inmovilización	Rata Perro	Conejo
	Denervación	Perro Conejo	
	Patelectomía	Conejo	Perro
	Sección ligamento anterior (LCA) cruzado	Perro Conejo	Rata, Cobaya
	Meniscectomía	Conejo Perro	
	Meniscectomía + sección LCA	Conejo	
Artrosis espontánea / manipulación genética	Predisposición genética	Ratón STR Ratón C57B	Ratón NZY, Ratón D11, Cobaya
	Condrodisplasia autosómica	Ratón	
	Micromelia + OA erosiva	Ratón	
	Anquilosis progresiva	Ratón	
	Artrosis avanzada precoz:		
	Alteración Col II	Ratón	
	Alteración Col IX	Ratón	
Alteración Col X	Ratón		
Alteración Col XI	Ratón		

Modelos experimentales de osteoporosis

La FDA americana establece en sus guías clínicas una serie de criterios para la utilización de los modelos animales en la evaluación preclínica de fármacos para el tratamiento de la OP (Guías FDA, 1994). La FDA reconoce que la rata madura ovariectomizada constituye el “patrón oro” de referencia para el estudio de la OP postmenopáusica humana, y aconseja utilizar además otra especie diferente, preferiblemente no roedora con presencia de remodelado cortical, para la evaluación de nuevos agentes terapéuticos (Guías FDA, 1994).

No obstante, existen múltiples factores que determinan la inexistencia de un modelo ideal de OP que remedie completamente la enfermedad humana, en gran medida porque no es fácil provocar fracturas en los distintos modelos estudiados. En este sentido, y para obviar este inconveniente, existen estudios biomecánicos de fragilidad ósea que se utilizan como una variable indirecta de fractura osteoporótica (Chesnut CH, 1991; Bellino FL, 2000; Turner AS, 2001; Kimmel DB, 2001).

Recientemente, se han implementado las aplicaciones de estos modelos para estudiar la respuesta reparadora del hueso osteopéxico fracturado, la osteointegración de los implantes articulares o dentales en el “hueso osteoporótico”, la utilidad de las proteínas morfogenéticas óseas en las fracturas, o los resultados de la implantación de cerámicas bioactivas a nivel vertebral (vertebroplastias) (Turner AS, 2001).

En esta sección repasaremos brevemente los: 1) requisitos que debe cumplir un modelo animal para el estudio de la OP; 2) mecanismos de inducción de OP habitualmente empleados; 3) principales modelos animales utilizados: ventajas e inconvenientes; 4) algunos métodos disponibles para evaluar la pérdida de la masa ósea en los modelos experimentales.

Finalmente, recordar que aunque por comodidad utilizemos continuamente el término de osteoporosis, no deja de ser incorrecto, pues como tal éste concepto no está definido en animales, y sería más adecuado el de “animales osteopéxicos” o “modelos con bajo contenido o densidad mineral”.

1. Requisitos que debe cumplir un modelo animal: Enfatizaremos aquí algunos de los principales aspectos que se deben tener en cuenta al estudiar un modelo concreto:

1.1. Crecimiento y madurez esquelética definidos:

Está claro que toda especie animal tiene un período de crecimiento, pero no todas alcanzan una verdadera “madurez esquelética”, entendida ésta como el cierre de la placa fisaria. La importancia de estas dos fases radica en que los procesos de modelado y remodelado óseo son radicalmente diferentes, predominando el modelado durante la fase de crecimiento y el remodelado en la madurez. La mayoría de razas de ratas y ratones, por ejemplo, no alcanza plena madurez, o lo hacen sólo parcial y tardíamente. Un modelo ideal de OP debería contener ambos periodos (crecimiento y madurez) con una duración bien establecida de cada uno. Asimismo, la existencia de un teórico pico de masa ósea es otro criterio que está recibiendo creciente atención para estudiar la fisiopatología de la OP (Chesnut CH, 1991).

1.2. Periodicidad estral:

La especie humana es la única con menarquia y ciclos ovulatorios frecuentes y regulares que experimenta una disminución clara de la masa ósea tras el cese espontáneo de la función ovárica. Sólo algunos mamíferos con ovulaciones cíclicas y frecuentes e importantes oscilaciones en los niveles de estradiol, pueden tener también algún grado de pérdida ósea por depleción estrogénica de manera espontánea.

1.3. Menopausia natural:

La mayoría de modelos de depleción estrogénica son por OVX médica o quirúrgica. Sólo los primates presentan un proceso biológico similar al climaterio y menopausia humana, por lo que en teoría constituyen el mejor modelo para el estudio de la OP postmenopáusica humana (Bellino FL, 2000). Sin embargo, no existen diferencias significativas entre las consecuencias a nivel óseo de una menopausia natural y una quirúrgica, por lo que la OVX y la orquiectomía son dos de los mecanismos más utilizados para inducir OP.

1.4. Desarrollo de fracturas:

En su definición más estricta, la OP viene marcada por la aparición de fracturas tras traumatismos de bajo impacto. A pesar de disponer hoy día de buenos modelos animales de OP postmenopáusica, son escasos los que presentan fracturas espontáneas como ya hemos comentado. El único modelo actual con disminución del pico de masa ósea y fracturas por fragilidad es el modelo murino SAM/P6 (Matsushita M, 1986).

1.5. Remodelado óseo:

Constituye un complejo proceso por el que el hueso maduro es continuamente renovado, que ocurre tanto en el hueso trabecular como en el cortical. Sin embargo, y aunque mucho más activo en el hueso trabecular y superficies endocorticales tras la menopausia, el hueso cortical juega un papel esencial en la estructura y fortaleza del esqueleto. Por tanto, un adecuado modelo animal debería presentar un remodelado cortical o Haversiano bien desarrollado. Así, la rata Ovx es un buen modelo para el estudio del hueso trabecular, pero carece de remodelado cortical, por lo que la FDA recomienda el empleo de una segunda especie con remodelado cortical demostrado en los estudios preclínicos para la evaluación de nuevos fármacos (Guías FDA, 1994).

2. Mecanismos de inducción de OP: La OP sólo ocurre de forma natural en humanos y en algunos primates. Por tanto, una revisión de los modelos animales de OP no sería completa sin revisar los “mecanismos artificiales” utilizados (Egermann M, 2005). A continuación comentaremos los más empleados:

2.1. Castración médica o quirúrgica:

Incluye la OVX en animales hembra y la orquiectomía en machos, siendo la OVX quirúrgica el más ampliamente utilizado para el estudio de la OP humana. El cese de la función ovárica parece el mecanismo más importante para inducir OP. La rata OVX es el modelo animal más ampliamente estudiado, dado que reproduce de forma bastante fidedigna lo que ocurre en la mujer tras la menopausia. También se ha utilizado este

procedimiento de manera exitosa en otros modelos animales, como la oveja y algunos primates.

2.2. Dieta y drogas:

Múltiples estudios han ensayado el efecto combinado de la dieta baja en calcio y la OVX. Sin embargo, pocos son los modelos basados exclusivamente en el efecto de la dieta. Spencer y cols. publicaron un modelo de OP basado sólo en una restricción rigurosa del calcio y fósforo de la dieta en cerdas de 7 semanas (Spencer GR, 1979).

La utilización de ciertos fármacos, en particular los glucocorticoides (GC), ha sido ampliamente empleada para producir OP con un éxito variable según la especie estudiada. Aunque la OP inducida por GC difiere ampliamente de la OP postmenopáusica y/o senil, constituye el modelo ideal para estudiar ciertos aspectos sobre fragilidad ósea y sobre fijación de implantes. La incompetencia biomecánica que provocan es mucho más pronunciada que en otros modelos estudiados (Lill CA, 2002).

2.3. Inmovilización:

La inmovilización prolongada origina pérdidas en hueso trabecular y cortical (Uthoff HK, 1978; Young DR, 1986). Se han ensayado modelos de inmovilización mediante tenotomía, sección nerviosa, sujeción de extremidades, fijaciones articulares y vuelos espaciales. Debido a los diferentes métodos y periodos empleados, los resultados no son equiparables ni resultan adecuados para el estudio de la OP humana.

2.4. Selección de razas:

Las razas de ratón SAM y SAMP6 de senescencia acelerada (SAM: “senescence accelerated mice”) se caracterizan por un envejecimiento acelerado y anticipado e incluyen pérdida de masa ósea con cambios que remedan la OP senil humana (Takeda T, 1999; Watanabe K, 2005). En concreto, la disminución en la formación ósea en la raza SAMP6 se ha puesto en relación con una alteración en el linaje de las células estromales osteoformadoras (Hishiya A, 2004).

Otra vía interesante y prometedora es la del gen que codifica la leptina. La leptina es una hormona segregada por los adipocitos, que controla el peso corporal, la reproducción y el remodelado óseo. La leptina inhibe la formación ósea a través de un efecto central a nivel hipotalámico (Ducy P, 2000; Takeda S, 2002). Esta función es dominante, por lo que una deficiencia en leptina origina un fenotipo “osteopetrósico”, a pesar del hipogonadismo que caracteriza a estos animales. Por el contrario, los ratones con sobre-expresión de leptina tendrían un fenotipo osteoporótico.

3. Modelos animales: En este apartado describiremos las ventajas y limitaciones de los modelos más utilizados para el estudio de la OP humana (Rodgers JB, 1993). En las tablas 2 y 3 se exponen las principales características de estos modelos.

3.1. Rata:

Las ratas y ratones son los modelos más utilizados para el estudio de la OP humana. La rata madura OVX constituye el “patrón oro” en el estudio de la OP postmenopáusica (Guías FDA, 1994; Turner AS, 2001; Kimmel DB, 2001). Ha sido el modelo más ampliamente estudiado en cuanto a marcadores bioquímicos, histomorfometría, metodología densitométrica y evaluación biomecánica (Wronski TJ, 1985; Wronski TJ, 1986; Kalu DN, 1991; Frost HM, 1992). Asimismo, presenta una excelente respuesta al tratamiento estrogénico sustitutorio. No obstante, conviene diferenciar entre rata joven y rata madura (>12 meses). La rata en crecimiento resulta útil para estudiar los factores nutricionales, endocrinos y ambientales que influyen en la adquisición del pico de masa ósea. El principal inconveniente de las ratas radica en que prácticamente carecen de remodelado haversiano endocortical, y no llegan a alcanzar una “verdadera madurez esquelética” (Wronski TJ, 1991). Tampoco constituye un modelo adecuado para ensayos longitudinales que requieran sueros o biopsias repetidas o evaluación de implantes sobre hueso osteopénico.

3.2. Ratón:

El ratón tiene unas características de crecimiento similares a la rata. Constituye el principal animal de laboratorio para el estudio de la contribución genética en la adquisición del pico de masa ósea y en la pérdida ósea relacionada con la edad (Beamer WG, 1996; Ducy P, 2000; Takeda S, 2002). Representa la especie ideal para los estudios de manipulación genética. Actualmente, la tecnología transgénica permite anular o sobre-expresar diferentes genes que intervienen en el metabolismo óseo, existiendo en la actualidad una lista creciente de ratones transgénicos con el metabolismo óseo perturbado (Turner RT, 2001). La OVX en el ratón produce también osteopenia trabecular e incremento del turnover óseo. El ratón es un modelo prometedor para el estudio de la OP relacionada con la edad (Matsushita M, 1986; Okamoto Y, 1995; Takeda T, 1999; Hishiya A, 2004; Watanabe K, 2005). De hecho, existen razas de senescencia acelerada (SAM: “senescence accelerated mice”), como la raza SAM/P6, que es de las pocas que presentan fracturas espontáneas por fragilidad (Matsushita M, 1986; Takeda T, 1999; Hishiya A, 2004; Watanabe K, 2005).

3.3. Conejo:

El conejo es una especie muy utilizada en el laboratorio por su tamaño, disponibilidad, temperamento y bajo coste. Constituye un buen modelo para estudiar la enfermedad cardiovascular y la artrosis (Moskowitz RW, 1973; Moskowitz RW, 1988; Moskowitz RW, 1990; Hernández-Presa MA, 2002). Desde el punto de vista óseo, alcanza la “madurez esquelética” en torno a los 8-10 meses. Ostenta un verdadero remodelado cortical, con un “turnover óseo” más acelerado que el de otras especies (Gilsanz V, 1988). Sin embargo, ha sido poco utilizado para estudiar la OP postmenopáusica. En cirugía maxilofacial se ha empleado para estudiar la osteointegración de los implantes mandibulares (Southard TE, 2000; Cao T, 2004). Es también un modelo aceptable para estudiar la OP inducida por GC (Grardel B, 1994).

3.4. Perro:

Presenta un remodelado endocortical que le hace adecuado para estudiar dicho compartimento. A diferencia de otras especies, los perros son di-estros, por lo que sólo tienen dos ovulaciones al año, generalmente en primavera y otoño (Fox RR, 1970), por lo que no resulta adecuado para estudiar la OP postmenopáusica dada la resistencia del esqueleto canino a los cambios producidos por la deprivación estrogénica (Yamaura M, 1993). Sin embargo, es extremadamente útil para evaluar problemas relacionados con la consolidación de fracturas, efectos de la inmovilización o el efecto a largo plazo de determinados agentes osteoactivos: aloinjertos, osteointegración y problemas derivados del remplazo articular (Chesnut CH, 1991; Grynblas MD, 1994; Forwood MR, 1995; Boyce RW, 1996; Kimmel DB, 2001).

3.5. Cerdo:

El cerdo tiene algunas ventajas sobre otras especies animales, pero los estudios de OP tras OVX son escasos y generalmente en animales inmaduros. Sin embargo, el ciclo reproductor del cerdo es continuo y similar a la especie humana en duración (18-21 días). Su esqueleto presenta un remodelado multicelular similar al humano. Posee un pico de masa ósea bien definido a los 2,5-3 años (Bouchard GF, 1995). En algunas razas se han detectado fracturas vertebrales espontáneas (Spencer GR, 1979). Sin embargo, su tamaño, costes y agresividad, son serios inconvenientes que limitan su uso. Estos problemas se han intentado reducir con la introducción del cerdo enano ("*minipig*"), pero los costes son aún más elevados.

3.6. Oveja:

La oveja presenta algunas ventajas interesantes (Pastoureau P, 1989; Hornby SB, 1994; Geusens P, 1996; Thorndike E, 1998). Se trata de un animal dócil, de fácil manejo, naturaleza pasiva y un coste no demasiado elevado. En determinados países como Nueva Zelanda, se utilizan en granjas con gran número de ejemplares para estudios poblacionales. La oveja tiene un remodelado cortical similar a los humanos

(Newman E, 1995; Turner AS, 2001). Se ha utilizado también como modelo de OP inducida por GC (Fortune CL, 1989; O'Connell SL, 1993). Es ideal para seguimientos longitudinales (biopsias, etc.) e implantación de prótesis articulares. No obstante, presenta algunas desventajas: alimentación herbívora con marcadas diferencias al humano, diferente homeostasis mineral especialmente en el metabolismo del fósforo, ovulaciones y variaciones hormonales cíclicas pero estacionales, e importantes dificultades técnicas en el posicionamiento del animal para realizar las densitometrías.

3.7. Primates:

Los primates presentan ventajas evidentes sobre otras especies: tienen un aparato digestivo, sistema endocrino y metabolismo óseo parecidos a la especie humana, lo que les convierte en un modelo ideal para estudiar la OP humana. Las especies más utilizadas son los papiones o babuinos y algunos macacos (*rhesus* y *cynomolgus*) (Pope NS, 1989; Jayo MJ, 1990; Jayo MJ, 1991). Los primates desarrollan un descenso de su masa ósea tras el cese de la función ovárica (Miller LC, 1986; Mann DR, 1990). Además, son los únicos que presentan una menopausia natural similar a los humanos, con pérdida espontánea de la masa ósea; aunque estos cambios suelen ser más tardíos, generalmente alrededor de los 30 años (Bellino FL, 2000; Kimmel DB, 2001). No obstante, y a pesar de estas ventajas indiscutibles, su utilización está muy restringida por su elevado coste, larga vida media, agresividad, dificultades de manejo y los problemas éticos y legislativos que conllevan. No hay que olvidar que además pueden transmitir enfermedades infecciosas (zoonosis) y ser reservorio de agentes peligrosos, como retrovirus (SIDA, virus de Ébola, etc.) (Newman E, 1995; Weiss RA, 1998).

4. Métodos de evaluación ósea en los modelos animales: Ya fueron comentados en el apartado del “Estudio de la OP experimental”.

De todo lo expuesto, podríamos acabar diciendo que los modelos animales de OP son una vía esencial para continuar avanzando en el conocimiento de la etiología, genética y fisiopatología de la OP humana, y constituyen una herramienta fundamental para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

Tabla 2. Características principales de los modelos animales de osteoporosis, modificada de Kimmel DB (2001) y Bellino FL (2000).

<i>Atributo</i>	<i>Rata</i>	<i>Ratón</i>	<i>Conejo</i>	<i>Perro</i>	<i>Cerdo</i>	<i>Oveja</i>	<i>Primates</i>	<i>Humanos</i>
Pico masa ósea (en meses o años)	8 -10 m	4 - 6 m	8 - 10 m	2 - 3 a	2,5 - 3 a	3,5 a	9 -12 a	25 - 30 a
Periodicidad estral	Poliestro (4-5 días)	Inducible	Inducible	Diestro (estacional)	21 días	21 días (estacional)	21-28 días	28 días
Menopausia natural	No	No	No	No	No	No	Sí	Sí
Desarrollo fracturas	No	SAM/P6	No	No	Alguna raza	No	Alguna especie	Sí
Remodelado trabecular	Sí	Algunos	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Remodelado cortical	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Conveniencia	Sí	Sí	Sí	Débil	Débil	Débil	Relativa	
Manejo / necesidad personal adiestrado	Adecuado / + / -	Adecuado / + / -	Dócil / no	Adecuado / no	Agresivo / sí	Dócil / no	Agresivo / sí	
Precio de compra €	10	6,6	66	200-250	300	140	2.500	
Mantenimiento € / día	0,5	0,5	1	3,5	3,5	3,5	4,5	
Disponibilidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Regular	Regular	Limitada	

SAM/P6: Ratón con senilidad acelerada, raza P6 (SAM: “senescence accelerated mice”). Los costes de compra y mantenimiento están basados en precios del año 2000 en euros (€), tomando como referencia o valor de cambio 0,83 euros por cada dólar americano.

Tabla 3. Modelos animales para la investigación de la etiología, prevención y tratamiento de la osteoporosis (OP), modificada de Turner RT y cols. (2001).

<i>Modelo</i>	<i>Recomendado</i>	<i>Condicionado</i>
Determinación pico masa ósea	Ratón, rata	
Otros determinantes genéticos	Ratón	
Dimorfismo sexual del esqueleto	Rata	Ratón ¹
OP postmenopáusica	Rata	Perro ² , ratón ³ , primates ⁴
Reparación de fracturas	Perro, rata	Oveja, cerdo ²
OP por desuso	Perro, rata	Ratón ²
OP por corticoides	Conejo	Ratón ² , rata ²⁻³
OP por exceso alcohol	Rata	
OP senil	Ratón (SAM, SAM /P6)	Rata ²⁻³ , primates ⁴

¹Variable según raza; ²Caracterización insuficiente y/o controvertida; ³Diferencias marcadas con la especie humana; ⁴Limitado a centros especializados; SAM: Ratón con senilidad acelerada (SAM: “senescence accelerated mice”); SAM /P6: ídem raza P6.

Papel del hueso subcondral en la patogenia de la OA

El hueso subcondral (HS) comprende el tejido subarticular mineralizado que se extiende desde el “*tidemark*” (frente de mineralización o calcificación) hasta el inicio de la médula ósea. Sus funciones principales consisten en dar soporte al cartílago articular suprayacente, distribuir la carga mecánica a la diáfisis cortical subyacente, absorber la tensión continua de los impactos mecánicos que se producen en la vida ordinaria, y nutrir las capas profundas del cartílago hialino, especialmente en el período de crecimiento (Burr DB, 1998).

El HS incluye al menos tres estructuras bien diferenciadas: el cartílago calcificado, un hueso laminar corticalizado y el hueso subcondral trabecular propiamente dicho. El cartílago calcificado junto con el hueso laminar corticalizado son conocidos en la bibliografía como ***placa subcondral*** (Clark JM, 1990a; Burr DB, 1998; Burr DB, 2004). Algunos autores incluyen también un hueso trabecular subarticular cuyos límites no están bien definidos. El espesor del HS varía en función de la especie animal, edad, masa corporal, localización y tipo de articulación referida. El HS está muy vascularizado, aunque la mayoría de los vasos no alcanzan el cartílago calcificado y, excepto en la enfermedad, ninguno penetra en el cartílago hialino (Ogata K, 1978; Noble J, 1985; Clark JM, 1990 b; Milz S, 1994; Burr DB, 1998).

El cartílago calcificado puede aumentar de espesor mediante osificación endocondral, contribuyendo a la esclerosis subcondral observada en las radiografías de los pacientes con OA. El HS puede también incrementar su grosor por aposición directa de hueso (modelado) y/o aumentar su densidad a través del remodelado, factores ambos que incrementan la densidad aparente de dicha esclerosis subcondral (Burr DB, 1997; Brandt K, 1998). En condiciones fisiológicas, el crecimiento, modelado y remodelado óseos, ocurren constantemente, pero su actividad varía en diferentes grados en los tres tejidos mineralizados mencionados, con diferente resultado sobre la masa y geometría del hueso y diferentes consecuencias en la mecánica articular (Burr DB, 2004) (Tabla 4). Sin embargo, el contenido mineral y las características densitométricas del HS no están bien definidos en la literatura.

El proceso de osificación endocondral ocurre normalmente a lo largo de toda la vida, dando lugar en la OA a un avance y aplanamiento del “*tidemark*”, con pérdida de su perfil ondulado, duplicidad del frente de mineralización y engrosamiento del cartílago calcificado, que puede alcanzar hasta un 25% del espesor total del cartílago (en condiciones fisiológicas la relación entre ambos suele ser 10 a 1) (Burr DB, 1997). Estos cambios confieren una mayor

rigidez al cartílago calcificado, lo que en opinión de algunos autores provocaría una mayor sobrecarga del cartílago suprayacente (Radin EL, 1972; Radin EL y Rose RM, 1986).

Llegados a este punto, conviene matizar que existe una distinción entre “densidad ósea aparente”, definida como masa ósea/volumen total, y “densidad ósea mineral”, definida como masa ósea/volumen óseo. Li y Aspden muestran que, aunque la densidad aparente del HS es significativamente mayor en los pacientes artrósicos que en los individuos normales u osteoporóticos, la densidad mineral ósea real es significativamente menor debido a una hipomineralización de dicho tejido (Li y Aspden, 1997). Es esta densidad aparente la que normalmente vemos en las radiografías de los pacientes con OA y esclerosis subcondral.

Tabla 4. Adaptación biomecánica de los diferentes componentes mineralizados del hueso subcondral (adaptada de Burr DB, 2004).

<i>Compartimiento óseo</i>	<i>Tipo de adaptación</i>	<i>Mecanismo predominante</i>	<i>Consecuencia biomecánica</i>
Cartilago calcificado	Crecimiento	Formación de hueso	Incremento masa ósea
Placa subcondral corticalizada	Modelado óseo	Activación- Formación / Activación- Resorción	Incremento masa ósea + Cambio de forma o geometría
Hueso subcondral trabecular	Remodelado óseo	Activación - Resorción- Formación (acoplamiento)	Mantenimiento de forma y masa ósea

Relación entre osteoporosis y artrosis

Hoy día, y aunque existen opiniones contrapuestas, la mayoría de estudios clínicos sugiere una relación inversa entre OP y OA (Byers PD, 1970; Foss MV, 1972; Carlson A, 1979; Solomon L, 1982; Weintraub S, 1982; Pogrund H, 1982; Dequeker J, 1985; Verstraeten A, 1991; Sowers M, 1991; Hart DJ, 1994; Nevitt MC, 1995; Burger H, 1996).

En el estudio Framingham, la DMO de cadera fue un 5-9% mayor en mujeres con OA grado 1-2 que en controles sin OA (Hannan MT, 1993). Esta relación inversa entre osteoporosis y artrosis podría reflejar una diferencia cualitativa en cuanto a la calidad ósea entre ambas entidades. Existen, no obstante, algunas variables de confusión que podrían explicar *per se* esa relación mutuamente excluyente, como la raza, el sobrepeso y la actividad física, entre otras (Cooper C, 1991; Felson DT, 1998; Zhang Y, 2000). Así, las personas obesas o con mucha actividad física tendrían mayor riesgo de padecer OA a la vez que un incremento de la masa ósea. Sin embargo, en algunos de estos estudios, existen sesgos de selección que invalidan o crean cierta incertidumbre en cuanto a los resultados obtenidos. Así, la mayoría de estos estudios no son aleatorizados, en algunos incluso faltan controles pareados, los tamaños muestrales fueron a veces extremadamente pequeños y el diagnóstico de OA se basaba exclusivamente en la clínica, sin confirmación radiológica en algunos de ellos (Burr DB, 1998). Algunos autores apuntan la posibilidad de que los resultados obtenidos en algunos de estos trabajos pudieran estar modificados por artefactos en las densitometrías practicadas (v. gr. osteofitosis a nivel vertebral) o mal posicionamiento de pacientes (Reid DM, 1984; Orwoll ES, 1990; Dawson-Hughes B, 1990; Laitinen K, 1991; Haddaway MJ, 1992; Masud T, 1993; Peel NF, 1995).

Radín y cols. propusieron una teoría según la cual, el incremento en la densidad ósea del HS aumentaría paralelamente la rigidez de dicho tejido (Radín EL, 1972; Radín EL, 1986). Esto produciría una disminución o pérdida de sus propiedades viscoelásticas, reduciendo su capacidad amortiguadora, con la consiguiente sobrecarga y deterioro del cartílago suprayacente (Burr DB, 1998; Burr DB, 2004). Es la llamada teoría biomecánica. Posteriormente, y según progresa la artrosis, se iría produciendo una desmineralización y osteoporosis subarticular multifactorial que ocasionaría la aparición de microfracturas en el HS y *microcracks* en el cartílago calcificado (Mori S, 1993; Sokoloff L, 1993), y cuyo intento reparador potenciaría la angiogénesis, con formación e invasión de nuevos vasos que irían penetrando en el cartílago calcificado, ocasionando un aumento de su espesor, esclerosis subcondral y progresión de la OA (Woods CG, 1970; Lane LB, 1977; Radín EL, 1984). Este crecimiento vascular iría asociado a la producción de factores angiogénicos que a su vez activarían diferentes metaloproteasas (MMP)

inactivas, que ocasionarán mayor resorción del cartílago y calcificación de la placa subcondral (Martel-Pelletier J, 1984; Dean DD, 1989; Okada Y, 1992; Shibakawa A, 2005; Bloom AB, 2007). Todos estos fenómenos darían lugar a un hueso y cartílago aún más rígidos, con autoperpetuación del proceso degenerativo.

De una forma resumida, de los estudios existentes, podríamos concluir que la OP podría prevenir o retardar el inicio de la artrosis, pero posteriormente tendría un efecto contrario, pudiendo empeorar y progresar la enfermedad de manera más evidente.

Recientemente, Reginster y cols. han sugerido una hipótesis interesante que postula un incremento en el remodelado óseo del HS como base patogénica de la artrosis (Reginster JY, 1999). Siguiendo el esquema de estos autores, un aumento del remodelado óseo subcondral conduciría a un deterioro de la MEC cartilaginosa e iniciaría una reparación estructural por parte tanto del propio cartílago (condrocitos), como del HS subyacente. En este punto crítico, puede ocurrir que los procesos anabólicos y restauradores controlen/ reparen el daño establecido, o se vean sobrepasados, aumentando el daño articular y la progresión de la OA (Figura 4).

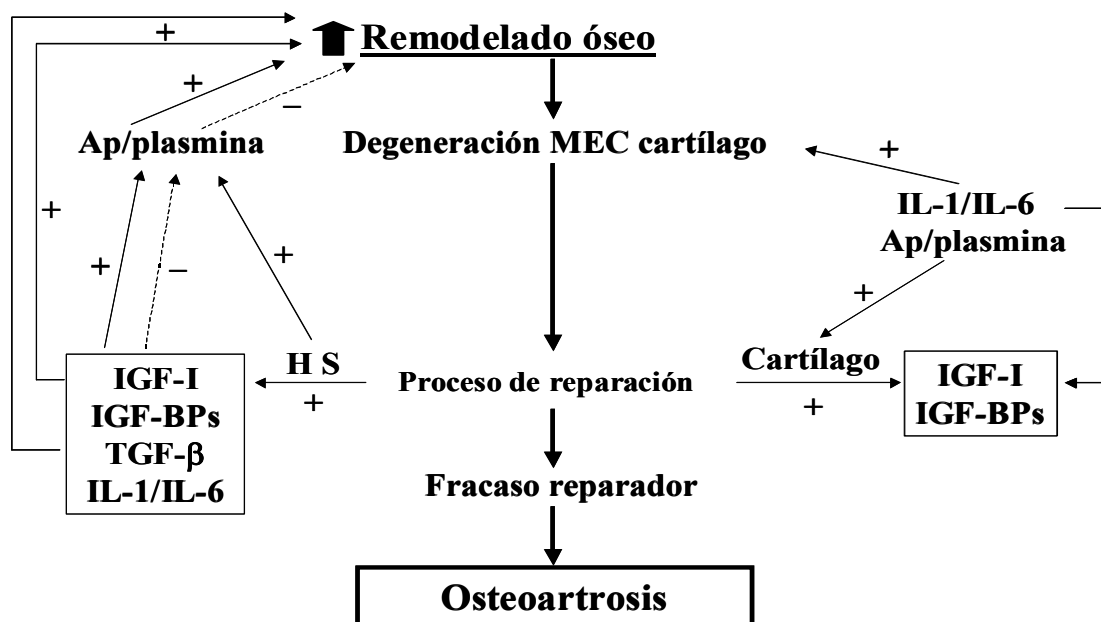


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos implicados en el remodelado del hueso subcondral artrósico y posible interacción con el cartílago (modificada de Lajeneusse D, 2004). MEC: matriz extracelular del cartílago; Ap/plasmina: activador del plasminógeno - plasmina; IGF-I: factor de crecimiento insulínico 1; IGF-BPs: proteínas de unión al IGF-I; TGF-β: factor transformador del crecimiento β; IL-1 y 6: interleucinas 1 y 6; HS: hueso subcondral.

La confirmación de esta secuencia de hechos, podría tener importantes implicaciones terapéuticas, ya que abre la posibilidad de utilizar fármacos antirresortivos en un intento de frenar dicho remodelado. De hecho, existen estudios observacionales que demuestran la utilidad de los estrógenos para ralentizar la progresión de la OA tras la menopausia, aunque más interés tendría el empleo de bisfosfonatos y de algunos antiinflamatorios no esteroideos con capacidad de inhibir la resorción ósea (Cocco R, 1999; Pelletier JP, 2000; Fujita T, 2001; Spector TD, 2003; Arboleya L, 2004; Agnello KA, 2005; Doschak MR, 2005).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La OP y la OA son dos de las enfermedades musculoesqueléticas más prevalentes, que con frecuencia coinciden en el mismo paciente. Ambas son enfermedades de lenta instauración, donde no suele conocerse el momento de inicio. Tras revisar la literatura, parece existir una relación evidente entre ambas, aunque no está claro si se trata de una relación favorable o por el contrario negativa, dado que la mayoría de estudios al respecto son observacionales o de corte transversal, con muchas variables de confusión y sin un seguimiento adecuado. La posibilidad de estudiar de manera secuencial y desde su inicio las dos enfermedades constituiría una hipótesis muy atractiva para conocer su relación fisiopatológica.

Los modelos animales nos permiten desarrollar enfermedades eligiendo el momento de inicio y controlar muchas de las variables implicadas, al no existir la heterogeneidad fenotípica que ocurre en humanos. Nuestra hipótesis de trabajo se basa en poner a punto un modelo de OP y OA en conejos, con el objeto de analizar la influencia de la OP en la evolución de la OA desde su inicio.

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Determinar la distribución de la masa ósea en una población sana de conejos hembra maduros y cuantificar la densidad mineral ósea en regiones anatómicas con diferente contenido mineral y una proporción variable de hueso trabecular y cortical.
2. Caracterizar un nuevo modelo experimental de osteoporosis en conejos mediante la combinación de dos intervenciones experimentales como la ovariectomía y la administración de corticoides, con el objeto de conseguir un modelo adecuado de osteoporosis con la menor dosis efectiva de corticoides.
3. Analizar el efecto que la osteoporosis pueda ejercer en la evolución del daño del cartílago en un modelo de artrosis experimental de rodilla en una población de conejos osteoporóticos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se estudiaron dos grupos de conejos albinos de raza Nueva Zelanda hembras esqueléticamente maduras (3,7-6,3 kg de peso) suministrados por Granja Universal (Pamplona). Antes de iniciar los diferentes experimentos, se aclimató a los animales durante dos semanas mediante su manejo en jaulas individuales de 50 x 40 x 40 cm. Las condiciones ambientales fueron mantenidas de manera constante a lo largo de todo el estudio, consistiendo en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad a temperatura ambiente, con acceso *ad libitum* al agua y comida comercial estándar para conejos (Panlab ®, Barcelona).

Se realizaron tres experimentos diferentes de manera secuencial con los siguientes objetivos: 1) Estudio de distribución de la masa ósea en una población inicial de conejos sanos, variabilidad de la densitometría en el conejo y estimación del número mínimo necesario de animales para definir un modelo de OP; 2) Caracterización del modelo de OP mediante diferentes manipulaciones osteopenizantes; 3) Comportamiento de nuestro modelo en presencia de artrosis de rodilla inducida quirúrgicamente, y estudio de la influencia de la OP en la evolución posterior de la OA.

En el primer experimento se incluyeron 29 animales ($4,3 \pm 0,5$ kg de peso), a los que se realizaron determinaciones basales de la masa ósea mediante absorciometría dual de Rx (DXA) en columna lumbar y rodilla, con objeto de determinar los valores de normalidad en nuestra población. Quince de ellos se reservaron para la inducción de un modelo combinado de OP mediante ooforectomía bilateral (OVX) y administración de metilprednisolona (MPH) y cálculo del T-score.

En un segundo experimento, se estudiaron 36 conejos ($4,4 \pm 0,6$ kg de peso), que se distribuyeron en seis grupos sometidos a diferentes intervenciones y diferentes dosis de MPH para caracterizar mejor nuestro modelo de OP (ver tabla 5).

Posteriormente, se seleccionaron 12 animales del experimento previo (6 del grupo OVX + MPH a dosis media y 6 controles), induciéndoles una artrosis quirúrgica de rodilla, según describiremos más adelante, con objeto de determinar si existían diferencias de comportamiento entre estos dos grupos.

Todas las exploraciones densitométricas así como las técnicas quirúrgicas se realizaron previa anestesia general mediante inyección intramuscular de una combinación de 2 ml/kg de xylazina (Rompun®, Bayer, Madrid) e hidrocloreuro de ketamina (Ketolar®, Parque-Davis, Barcelona) en proporción 3:1 (Benito MJ, 2000). Terminados los experimentos, los animales fueron sacrificados mediante la administración intracardiaca de pentobarbital sódico (50 mg/kg) (Pentotal ®, Abbott, Madrid) previa anestesia general según acabamos de describir.

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité ético local y en todos los procedimientos se respetó la normativa de la UE (BOE 223/1988 y 265/1990) para la manipulación de animales de experimentación.

Tabla 5. Distribución por grupos de los conejos según el tipo de intervención experimental seguido en el segundo experimento.

Grupos (número de conejos)	Tipo de intervención experimental
OVX (n: 7)	Ooforectomía bilateral aislada
OVX + MPH baja (n: 5)	Ooforectomía + 0,5 mg /kg /día de metilprednisolona
OVX + MPH media (n: 7)	Ooforectomía + 1 mg /kg /día de metilprednisolona
OVX + MPH alta (n: 5)	Ooforectomía + 2 mg /kg /día de metilprednisolona
MPH (n: 5)	1,5 mg /kg /día de metilprednisolona exclusivamente
Control (n: 7)	Ninguna

OVX: ooforectomía; MPH: metilprednisolona, hemisuccinato.

Densitometría ósea: Definición de las regiones de interés

Los análisis densitométricos se realizaron mediante un densitómetro de primera generación con fuente de Rx de doble energía Hologic® QDR-1000/WTM, basado en tecnología *pencil-beam* (Hologic Inc., Waltham, MA, USA), añadiendo un colimador de 1 mm de diámetro en la salida del tubo de rayos Rx (Figura 5). El densitómetro se calibraba diariamente con el objeto de mantener unas óptimas condiciones de reproducibilidad y calidad en la medida, siempre dentro del rango de los valores

recomendados por el fabricante. Se utilizó un software específico para el análisis de animales pequeños, que incrementa considerablemente la resolución espacial (espacio interlineado de 0,0254 cm y resolución por punto de 0,0127 cm; versión 6.2). En todos los casos se midieron el área ósea proyectada (AO), el contenido mineral óseo (CMO) y la densidad mineral ósea (DMO) en columna lumbar (CL) y en rodilla izquierda.



Figura 5. Densitómetro Hologic® QDR-1000 utilizado en el estudio.

Las mediciones se realizaron *in vivo* con los animales colocados en decúbito supino bajo anestesia general según la técnica descrita previamente (Figura 6A). De las 7 vértebras que componen la CL del conejo, se eligieron aleatoriamente dos vértebras centrales, L3 y L4, que era lo máximo que permitía la ventana de exploración. Para el centrado del densitómetro a nivel L3-L4, y después de varias pruebas con radiología digital convencional, se tomó como referencia un punto situado 3 cm por debajo del ombligo del animal. En la figura 7A se puede observar una densitometría tipo de CL (L3-L4).

Para el estudio de la rodilla, los conejos eran colocados sobre un molde de metacrilato específicamente diseñado para el estudio, con 30 grados de angulación lateral con objeto de obtener una visión pósterio-anterior lo más anatómica posible de la

articulación (Figuras 6 B y C). Las DXA de rodilla fueron realizadas con la pata en extensión completa y rotación interna, con el haz enfocado inmediatamente distal a la interlínea articular. Las imágenes con superposición de los cóndilos femorales fueron excluidas del análisis (Figura 7B). El tiempo medio de las dos exploraciones con el correspondiente reposicionamiento del animal fue de 30 minutos por conejo.

Una vez definidas las localizaciones de interés, se procedió al análisis densitométrico de la CL y de las diferentes subregiones seleccionadas de la rodilla con distinto contenido de hueso trabecular y cortical. Para la CL, calculamos la media de los valores densitométricos de la tercera y cuarta vértebras lumbares. Respecto a la rodilla, se seleccionaron 3 áreas anatómicas con diferente proporción de hueso trabecular y cortical: a) rodilla global (RG), con una ventana o región de interés (ROI) de 266 líneas y una anchura de 22 líneas simétricas por encima y debajo de la interlínea articular. Esta zona fue considerada representativa de hueso trabecular y cortical (Figura 8); b) cuatro subregiones dentro de las epífisis, correspondientes a los dos cóndilos femorales y a ambas mesetas tibiales (17 x 11 píxeles con 0,06 cm² cada una), localizadas respectivamente 1 mm por encima y debajo de la interlínea articular en las zonas de máximo contacto entre los cóndilos femorales y ambos platillos tibiales. Los valores medios del CMO y de la DMO de estas zonas fueron considerados representativos de hueso subcondral (HS); c) finalmente, analizamos un área de 15 x 9 píxeles (0,04 cm²) a nivel del córtex de la metáfisis proximal de la tibia, inmediatamente distal a la articulación tibio-peronea superior, como teórico paradigma de hueso cortical (HC).

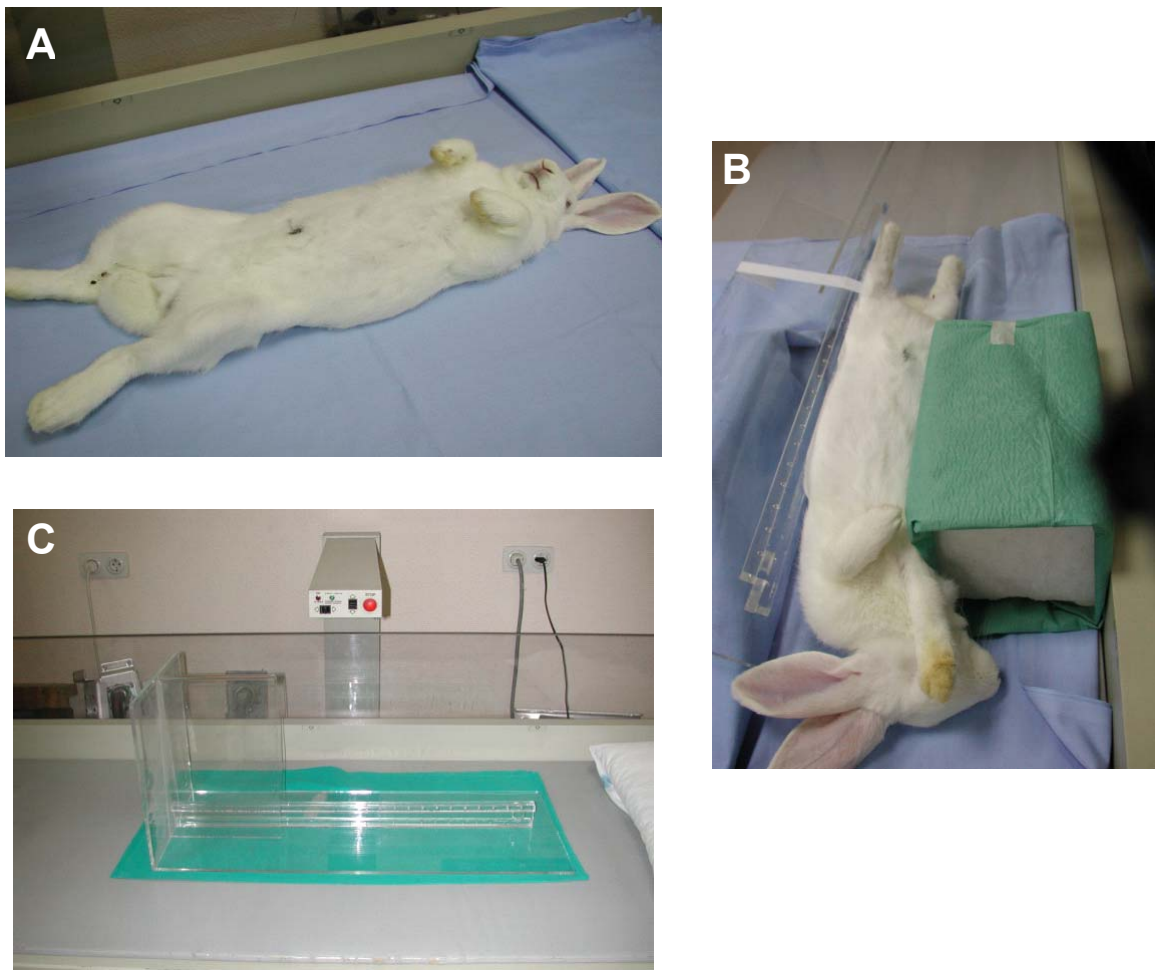


Figura 6. Posicionamiento de los animales. Las densitometrías (DXA) se realizaron con los animales colocados en decúbito supino bajo anestesia general. A: Como referencia para la DXA de columna lumbar a nivel de L3-L4, se utilizó un punto situado 3 cm por debajo del ombligo (marcado en negro). B: Posición del conejo para la DXA de rodilla. C: Soporte de metacrilato específicamente utilizado para la obtención de las DXA de rodilla.

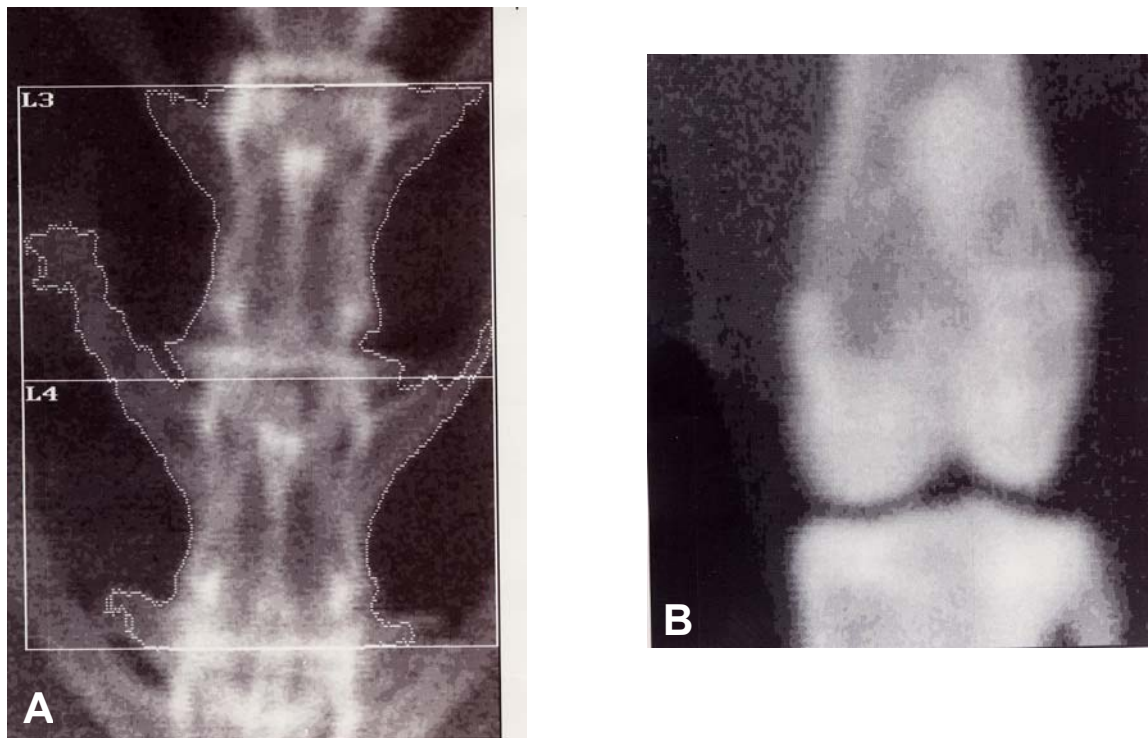


Figura 7. DXA de columna y rodilla. A: DXA de columna lumbar, proyección pósterio-anterior. Se pueden apreciar las vértebras seleccionadas para el análisis (L3 y L4). B: DXA de rodilla izquierda, vista general.

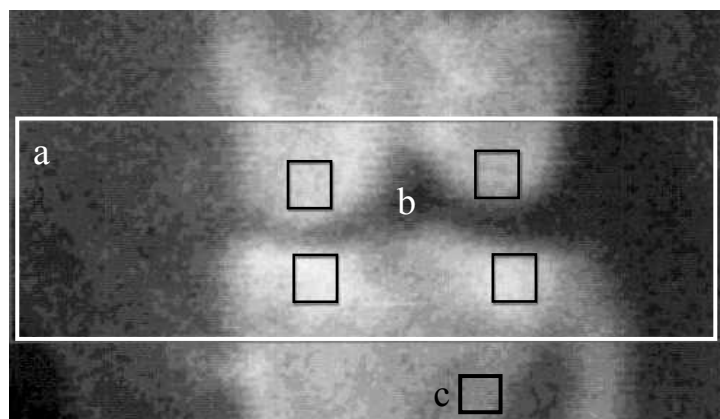


Figura 8. Estudio de rodilla: subregiones. Se muestran las regiones de interés seleccionadas (ROIs) para el análisis de la rodilla: a) rodilla global; b) subregiones seleccionadas para la evaluación del hueso subcondral; c) ventana para la valoración del hueso cortical.

Valoración de la precisión de las DXAs

Para evaluar el efecto del reposicionamiento de las DXAs, se repitieron tres densitometrías de CL y otras tres de rodilla en 10 animales sanos consecutivos durante la misma semana, y antes del inicio de los diferentes experimentos. Se calculó de esta manera el error de precisión, expresado en % como coeficiente de variación (CV). Este CV nos permitirá calcular el llamado menor cambio significativo (“least significant change”, LSC) de acuerdo con la fórmula de Glüeer y cols., que valora los cambios del CMO y la DMO que sobrepasan $2\sqrt{2}$ veces el error de precisión de la técnica utilizada (Glüeer CC, 1995).

La reproducibilidad de las mediciones *in vitro* fue testada mediante un fantoma antropomórfico de composición mineral conocida (s/n Q-239, Hologic®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El CV *in vitro* durante el periodo de estudio fue de 0,58 % para la DMO y 0,60 % para el CMO (Figura 9).

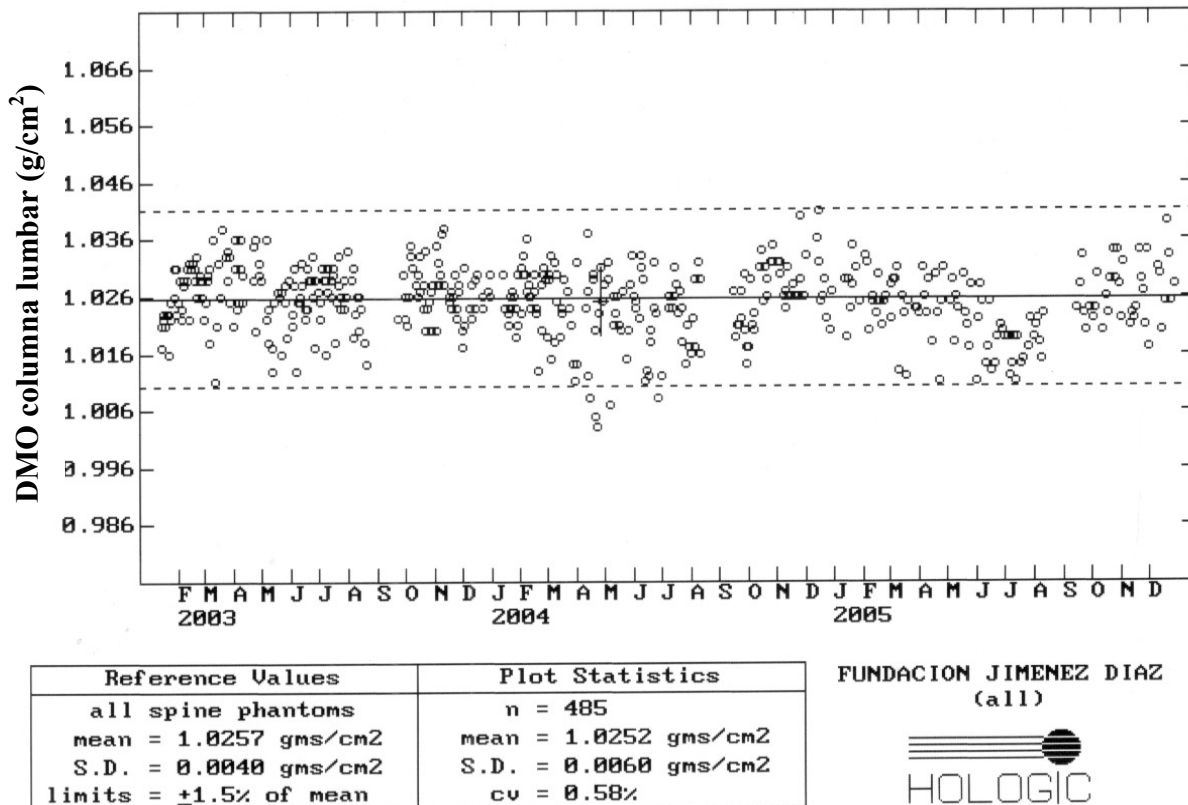


Figura 9. Coeficiente de variación *in vitro* de la DMO durante el estudio.

Modelo de osteoporosis en el conejo

Inicialmente se estudiaron 29 conejos para calcular el T-score. Quince fueron sometidos a OVX y posterior administración de 1 mg /kg /día de MPH i. m. durante 4 semanas. Se utilizaron 5 conejos como controles. Las inyecciones de GC se iniciaron siempre 2 semanas tras la OVX para evitar complicaciones de la cirugía.

En el segundo experimento se incluyeron 36 conejos distribuidos en seis grupos de forma aleatoria que fueron sometidos a diferentes intervenciones y dosis de corticoides para caracterizar mejor el modelo, de acuerdo al siguiente esquema: siete conejos fueron sometidos exclusivamente a OVX bilateral (grupo OVX); 17 conejos fueron sometidos a OVX y administración posterior de hemisuccinato de metilprednisolona (Urbason®, Hoechst M Roussel, Madrid) (MPH) vía intramuscular (i.m.), a las dosis de 0,5, 1 y 2 mg /kg /día durante 4 semanas (grupos OVX + MPH a dosis baja, media o alta respectivamente); 5 animales recibieron exclusivamente MPH a la dosis de 1,5 mg/kg/día sin previa OVX (grupo MPH) y 7 conejos se utilizaron como controles (grupo control) (ver tabla 5). Un animal del grupo OVX + MPH baja murió a mitad del experimento, por lo que fue excluido del estudio. La OVX bilateral fue realizada bajo anestesia general según técnica estándar y en condiciones de asepsia (Kaplan HM, 1979) (Figura 10). Se realizó profilaxis antibiótica con cefonicid i.m. (100 mg /kg) (Monocid ®, Smith and Beecham, Madrid) antes de la cirugía y los 5 días siguientes.

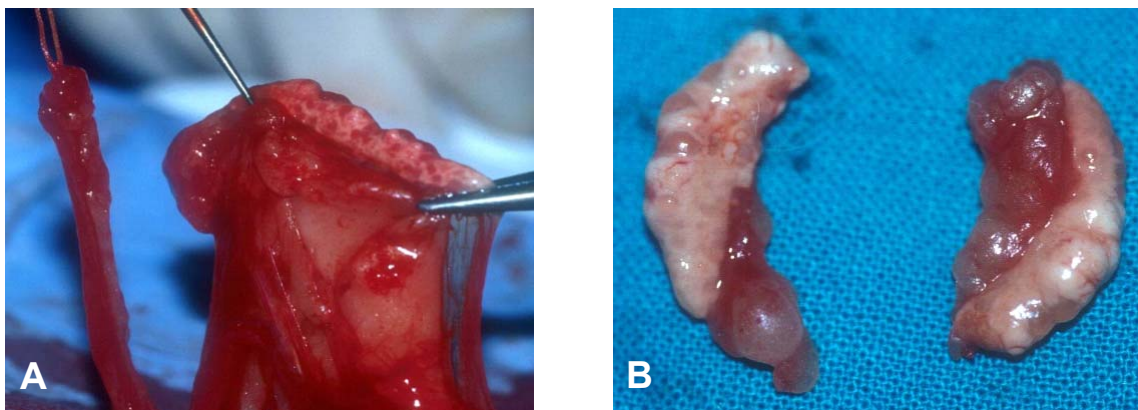


Figura 10. Ovariectomía. A: identificación de uno de los ovarios del animal justo antes de su extirpación. B: ovarios extirpados.

Modelo experimental de artrosis

En 12 animales del segundo experimento, 6 del grupo OVX + MPH a dosis media y 6 controles, se provocó una artrosis de la rodilla izquierda seis semanas después de la OVX en el primer grupo (grupo OP) o en un tiempo equivalente en los controles sanos (grupo control). A los conejos del grupo OP, se les practicó cirugía de rodilla izquierda (rodillas OP+OA), considerando la rodilla derecha como OP sin artrosis (rodillas OP). A los conejos del grupo control, se les realizó la misma intervención de rodilla izquierda (rodillas OA sin OP), siendo las rodillas derechas consideradas como controles sanas (rodillas control) (Figura 11).

La OA fue inducida experimentalmente mediante meniscectomía parcial medial más sección del ligamento cruzado anterior (LCA) en las rodillas izquierdas de cada grupo, siguiendo las mismas condiciones de anestesia descritas y la misma profilaxis antibiótica que para la OVX, antes de la cirugía y los tres días siguientes. Bajo estas condiciones de esterilidad, se abordó la rodilla izquierda mediante una incisión pararrotuliana interna. En primer lugar, se incidió el ligamento menisco-tibial con tijeras de iris, se disecó la inserción periférica de la mitad anterior del menisco medial y, una vez liberada, se resecó. A continuación, se seccionó el LCA en su inserción femoral con bisturí del número 11 (Hulth A, 1970; Moskowitz RW, 1973; Elmer RM, 1977) (Figura 12). Finalmente, la articulación se cerró por planos y se colocó un vendaje compresivo Robert-Jones con la rodilla a 90° durante cuatro días. Tras la cirugía se permitió que los animales se movieran libremente dentro de la jaula.

Evolución de la pérdida de masa ósea a medio plazo

Se seleccionaron 19 animales del segundo experimento, los 12 con OP y cirugía posterior de la rodilla, 4 del grupo OVX sola, y otros 3 con OVX + MPH a dosis baja, a los que se realizaron DXA secuenciales mensuales hasta el sacrificio 16 semanas tras la cirugía de rodilla, con objeto de determinar la variación de la masa ósea tras la supresión de los corticoides y su evolución en un periodo de tiempo más prolongado. La variación de la masa ósea se calculó midiendo la diferencia entre los valores de DMO

iniciales y finales, dividida por el periodo de tiempo de cada animal en días. Los resultados se multiplicaron por 10^3 días de tratamiento para facilitar el manejo de datos.

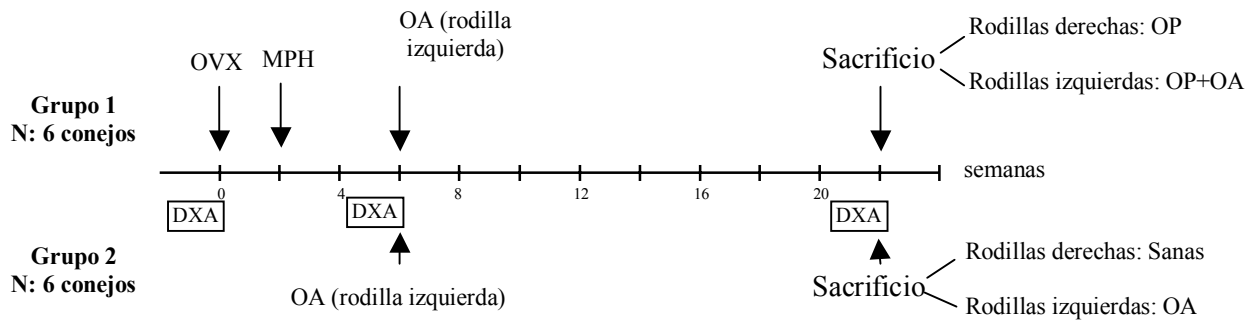


Figura 11. Diagrama que muestra el calendario de intervenciones experimentales.

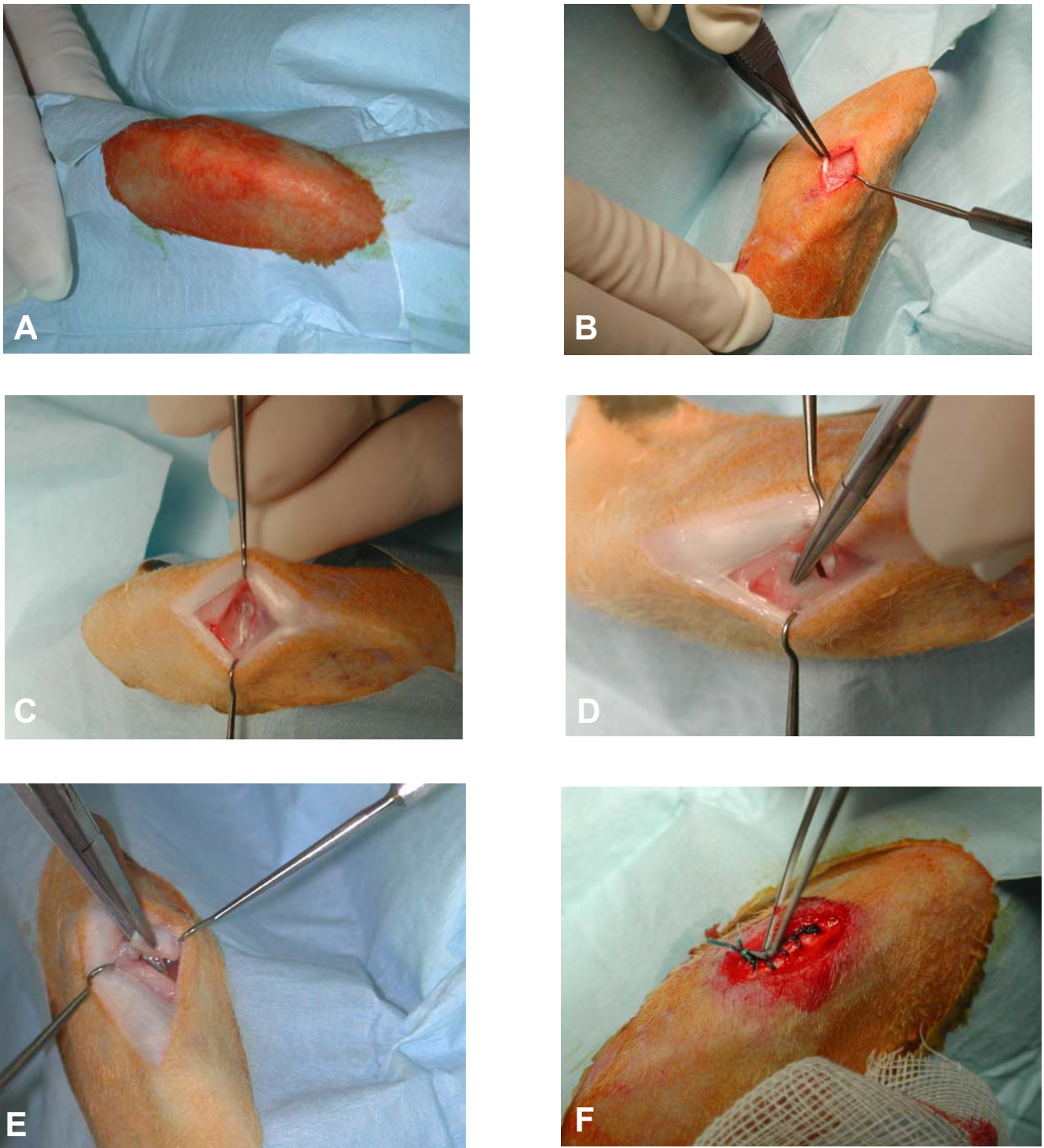


Figura 12. Modelo experimental de artrosis: técnica quirúrgica. A: Asepsia de la zona quirúrgica. B: Incisión para-rotuliana medial. C-E: Disección del menisco medial y del ligamento cruzado anterior y sección del mismo. F: Sutura de piel.

Evaluación por RM

Con objeto de excluir cualquier efecto deletéreo de la OVX o los corticoides en el HS o sobre el cartílago articular se realizó una RM experimental al inicio y durante el seguimiento. Para ello, se realizó una RM con tecnología de alta resolución a 18 animales inmediatamente antes de cualquier intervención y a los 12 animales seleccionados para el modelo completo de OP + OA antes de la cirugía de rodilla y a las 6, 12 y 16 semanas de la meniscectomía y sección del LCA.

Las imágenes de RM se obtuvieron con un espectrómetro Bruker Biospec[®] 47/40 (Bruker Metzinttechnik GmbH, Ettlingen, Alemania) equipado con un imán superconductor de 4,7 teslas (Oxford Instruments LTD, Oxford, Reino Unido) y gradientes de alta resolución con una potencia máxima de 50 mT/m (Figura 13A), modificado de un protocolo previamente descrito (Calvo E, 2001b). Para la RM se siguió el mismo protocolo anestésico que para la cirugía. Una vez anestesiados, los animales se colocaron en decúbito supino sobre un lecho de plexiglás con la rodilla en extensión y se introdujeron en la bobina. La bobina utilizada fue de radiofrecuencia tipo “birdcage” (antena de cráneo) circular, que opera como sonda única de transmisión y recepción (Figura 13B). La antena de superficie empleada fue de 4 cm de diámetro.

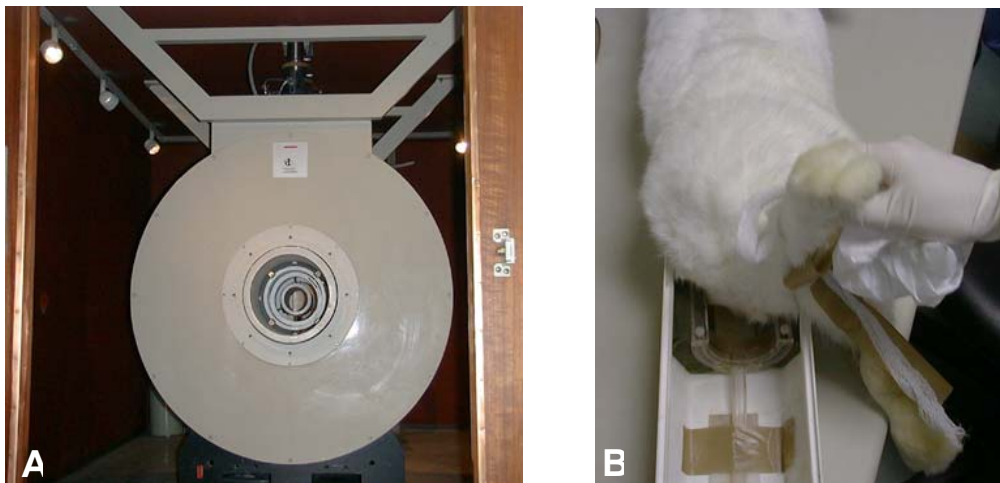


Figura 13. Equipo de RM. A: Imán superconductor de 4,7 teslas. B: Colocación del conejo anestesiado en el soporte de plexiglás con la rodilla sobre la antena tipo “birdcage” (antena de cráneo) circular utilizada.

Las alteraciones articulares fueron evaluadas en los cortes coronales obtenidos, mediante una secuencia eco-espín 2D ponderada en T1 con los siguientes parámetros: tiempo de repetición (TR) de 700 ms, tiempo de eco (TE) de 15 ms, campo de visión (FOV) de 5 cm y matriz de adquisición y reconstrucción de 256 x 256, que proporcionan una resolución espacial de $195 \mu^2$ para cortes de 1 mm de grosor.

Además, se midió el espesor del cartílago del cóndilo femoral medial, según se obtiene en las imágenes sagitales mediante secuencias SPGR. Las variaciones en el grosor del cartílago se midieron con un “software” específico, basado en el lenguaje computarizado “*Interactive Data Language*” (IDL Research Systems, Boulder, Co, USA), que analiza las variaciones en la intensidad de señal de la imagen digitalizada. Para ello, en la imagen sagital de la RM se dibujó de forma computarizada una semicircunferencia tangente a la superficie del cartílago femoral, y se utilizaron los radios perpendiculares a dicha superficie para cuantificar su grosor (Figura 14). Con este programa, cada radio detecta las variaciones de intensidad de señal a lo largo de su trayecto y éstas quedan reflejadas como una curva y expresadas en distancias. El tiempo necesario para una exploración completa de RM de cada rodilla fue 25-30 minutos.

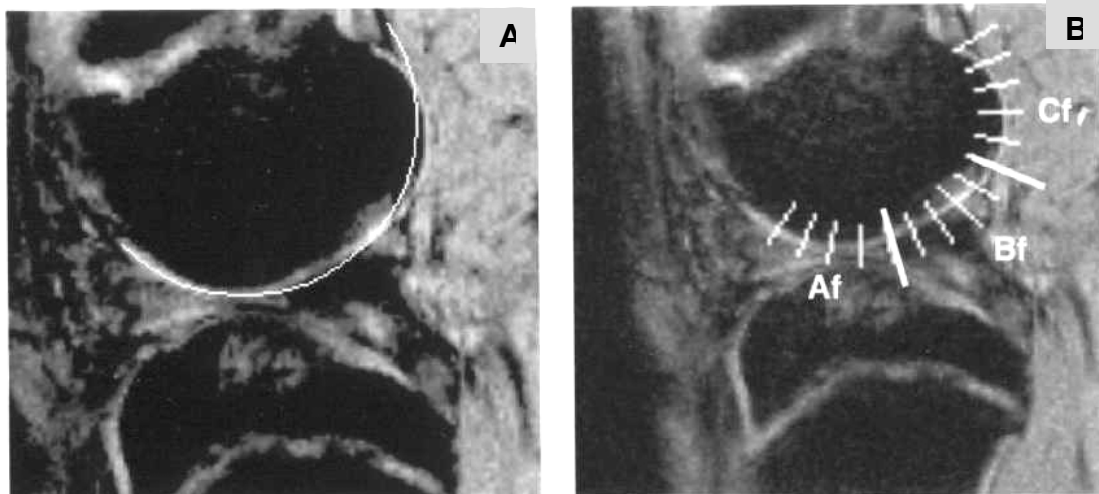


Figura 14. RM de rodilla. El grosor del cartílago se determinó en las imágenes sagitales de eco de gradiente del compartimento medial de la rodilla. A: La computadora definió una semicircunferencia tangente a la superficie articular del cóndilo femoral. B: Las variaciones de intensidad de señal de la superficie articular se recogieron en 15 líneas perpendiculares a ésta, que se correspondían con los radios de la semicircunferencia. Los datos de grosor del cartílago se analizaron de forma independiente en tres sectores iguales (anterior=Af; medio=Bf y posterior=Cf) de la semicircunferencia.

Como en la secuencia empleada el cartílago era el único tejido brillante en la imagen, aparecía como un “pico” en la curva. Por el contrario, las zonas “valle” correspondían a las caídas de intensidad de señal del hueso subcondral y del líquido sinovial adyacentes. Así, se localizaron exactamente los bordes superficial y profundo del cartílago, y su espesor se calculó midiendo la distancia entre los dos puntos “valle” que delimitan el “pico” de aumento de intensidad de señal (Figura 15). En cada corte se realizaron un total de 15 determinaciones femorales. Como el grosor del cartílago no es uniforme en toda la superficie articular y además se ha demostrado que en la artrosis pueden alterarse de forma diferente las distintas zonas de la articulación (Räsänen T, 1996; Calvo E, 2001b), se estudiaron de forma independiente los cambios en el grosor en tres sectores iguales (A = anterior, B = central, C = posterior) del compartimiento medial del fémur (Figura 14 B).

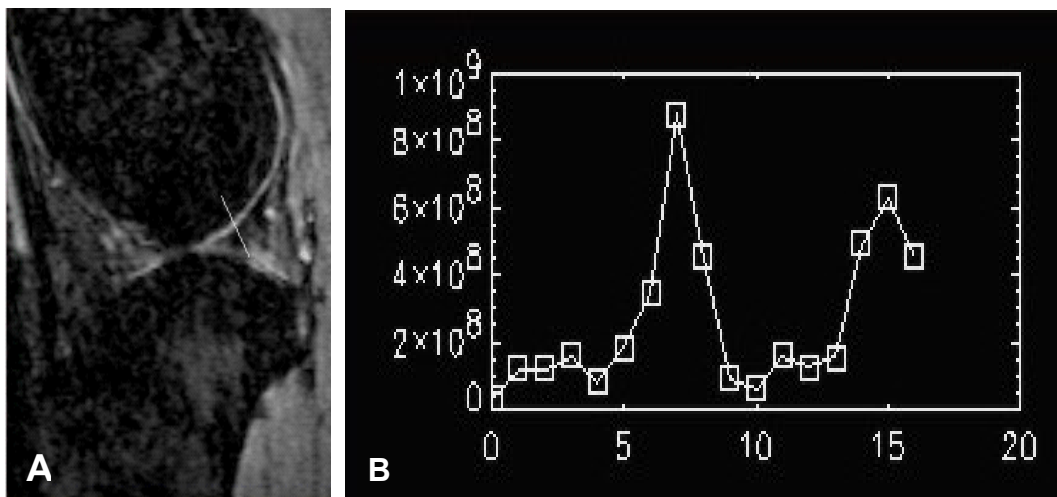


Figura 15. RM de rodilla: curva de intensidad de la señal del cartílago articular. A: Cada radio de la semicircunferencia cruza perpendicularmente el cartílago articular. B: Cada radio recoge las variaciones de intensidad de señal, que se expresan en una gráfica. En la curva representada se observa un “pico característico”, que corresponde al aumento de intensidad de señal del cartílago hialino. El grosor del cartílago se determinó midiendo la distancia entre los dos puntos “valle”, que indican la caída de intensidad de señal correspondientes al hueso subcondral y al líquido sinovial.

La secuencia adquirida para el análisis del grosor del cartílago fue 3D-SPGR con TR/TE =100/8 ms, un ángulo de excitación de 30°, Nex = 1 y grosor de corte de 1 mm. El FOV fue de 5 x 5 x 1,6 cm³ y el tamaño matriz para la reconstrucción de la imagen fue de 256 x 256 x 16. Para los análisis, hemos seleccionado las zonas que soportan máxima carga mecánica, porque está demostrado que es en estas zonas donde pueden detectarse las primeras alteraciones con la RM (Calvo E, 2001b). Las imágenes de la RM fueron interpretadas de forma ciega por dos observadores independientes, y se calculó la media de los valores obtenidos por los dos evaluadores.

Además de medir las variaciones en el grosor del cartílago en cada imagen de RM, se investigaron también signos característicos de artrosis, como: irregularidades en la superficie articular, esclerosis, quistes y osteofitos del HS, lesiones meniscales y cambios en la intensidad de señal en el hueso trabecular que pudieran expresar alteraciones del mismo en los estadios iniciales de la enfermedad (Imhof H, 1997).

Estudio anatomopatológico

1. Histología macroscópica:

Tras el sacrificio de los animales, se disecaron las dos rodillas de cada conejo (artrósica y no artrósica) y se inspeccionó detenidamente y de forma ciega el paquete sinovial infrarrotuliano, así como las superficies articulares del fémur y la tibia, siguiendo una escala semi-cuantitativa. Los cambios en la sinovial fueron cuantificados como 0 (sinovial normal) ó 1 (aspecto fibroso y/o proliferativo). La gravedad de las alteraciones macroscópicas encontradas a nivel del cartílago se clasificó como: 0 (normal), 1 (decoloración, irregularidades leves o punteado), 2 (desflecamiento o erosiones de espesor parcial) y 3 (erosión de espesor completo o/y osteofitos) (Tabla 6). Se puntuó por separado cada superficie articular (cóndilos femorales medial y lateral y ambos patillos tibiales), y finalmente se asignó una puntuación total a cada pieza, correspondiente a la suma de las puntuaciones del cartílago y la sinovial, con lo que se obtenía una apreciación de la gravedad y extensión del daño articular (Calvo E, 2001b).

Tabla 6. Escala semi-cuantitativa para la evaluación macroscópica del daño articular. Valoración de 0 a 13 puntos (Calvo E, 2001b).

<i>Tipo de Tejido</i>	<i>Apariencia</i>	<i>Puntuación</i>
ALMOHADILLA SINOVIAL	• Normal	0
	• Proliferativa / Fibrosa	1
CÓNDILOS FEMORALES (por separado)	• Normal	0
	• Decoloración / Punteado	1
	• Erosiones parciales	2
	• Erosiones profundas / osteofitos	3
PLATILLOS TIBIALES (por separado)	• Normal	0
	• Decoloración / Punteado	1
	• Erosiones parciales	2
	• Erosiones profundas / osteofitos	3

2. Histología microscópica:

El propósito de la evaluación histológica fue definir y cuantificar el grado medio de cambios en la articulación, puntuar las anomalías en las células, matriz, estructura y cartílago calcificado, así como intentar correlacionar cada alteración histopatológica con las variaciones encontradas en la DMO.

Para ello, y después de la evaluación macroscópica, se seccionaron y aislaron por separado los fémures y las tibias de cada animal. Inmediatamente después se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% durante 16 horas y posteriormente se decalcificaron sumergiéndolos en una solución de EDTA (2 mM de EDTA al 0,07 %; 0,5 mM de tartrato Na K al 0,014 % y CIH 9,92 ml /100 ml de agua destilada) durante 6 a 8 semanas. Una vez decalcificados, se cortó el compartimento medial del fémur en dos bloques de 3 mm definidos de dentro hacia fuera. Los bloques se tallaron para individualizar la zona central de soporte de carga de la articulación, se incluyeron en parafina y se cortaron secciones de 5 µm del bloque intermedio, que posteriormente se

fijaron al portaobjetos con poly-L-lisina. Para su descripción histológica, los cortes fueron rehidratados mediante un gradiente de alcoholes de concentración decreciente, teñidos con hematoxilina eosina (para la valoración de las alteraciones estructurales y celulares) o con azul Alcían para evaluar las anomalías de la matriz. Posteriormente, deshidratados con un gradiente de alcoholes de concentración creciente y montados con DPX.

El área mencionada seleccionada del cóndilo femoral medial fue delimitada y valorada mediante la escala de Mankin (Tabla 7) por un observador independiente experimentado en patología articular (Mankin HJ, 1971). Las preparaciones se observaron de forma ciega y aleatoria con respecto al grupo, lateralidad y descripción macroscópica. A cada estudio histológico se le asignó una puntuación global y otra parcial para cada una de las variables consideradas en la escala de Mankin (lesiones de la estructura, alteraciones en la celularidad, disminución de la tinción de la matriz, irregularidades de la línea limitante basófila). Las evaluaciones se realizaron en las superficies de carga de los cóndilos femorales mediales, debido a que es en éstas zonas donde se han descrito las alteraciones histológicas más tempranas (Calvo E, 2004).

Para el estudio histológico se empleó un microscopio convencional Nikon Eclipse ® E400 (Nikon, Tokio, Japón) con magnificaciones desde 4x hasta 100x. Las fotografías se realizaron con una cámara Nikon ® FDX-35 (Nikon, Tokio, Japón).

Determinaciones analíticas

La evaluación de las modificaciones metabólicas y hormonales a lo largo del periodo de estudio, se realizó mediante determinaciones seriadas de glucosa, colesterol total, triglicéridos y estradiol sérico a tiempo 0 (basal), y a las 6 y 20 semanas de la OVX. El estradiol fue medido mediante un inmunoensayo con micropartículas por quimioluminiscencia (CMIA; Architect System i2000 ®, Abbott Diagnostics, Abbott Park, Il, USA). La precisión de esta técnica expresada mediante los CV intra e inter ensayo fue de 5 y 9,5 %, respectivamente. La sensibilidad del método en nuestro laboratorio fue de 18 pg/ml. Los niveles de glucosa, colesterol total y triglicéridos fueron medidos mediante un método automatizado (Roche Modular D/P ®, Roche Diagnosis, Basilea, Suiza).

Tabla 7. Escala de Mankin para la evaluación histopatológica del cartílago articular (Mankin HJ, 1971).

<i>Subescalas</i>	<i>Alteraciones</i>	<i>Puntuación</i>
ESTRUCTURA	• Normal	0
	• Irregularidades en la superficie	1
	• Irregularidades en la superficie y pannus	2
	• Hendiduras hasta zona de transición	3
	• Hendiduras hasta zona radial	4
	• Hendiduras hasta zona calcificada	5
	• Desorganización completa	6
CELULARIDAD	• Normal	0
	• Hiper celularidad difusa	1
	• Presencia de clones	2
	• Hipocelularidad	3
TINCIÓN DE LA MATRIZ	• Normal	0
	• Reducción leve	1
	• Reducción moderada	2
	• Reducción severa	3
	• Ausencia de tinción	4
INTEGRIDAD TIDEMARK	• Intacta	0
	• Invasión de vasos	1

Estudio estadístico

Para calcular el índice T (T-score) de la población inicial utilizada, se realizó un análisis descriptivo de las medidas densitométricas basales practicadas: área, contenido y densidad mineral óseos, con su media (\bar{x}) y desviación típica /estándar (DE). Además, calculamos el coeficiente de variación (CV), definido como $DE/\bar{x} \times 100$, para estimar la variabilidad interindividual de la población. La hipótesis de normalidad de la distribución de datos fue definida mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. El análisis de correlación entre las diferentes regiones evaluadas se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r = correlación parcial) y su respectivo test de hipótesis.

La reproducibilidad de las medidas *in vivo* se evaluó en 10 conejos consecutivos calculando el CV de tres medidas repetidas de columna, rodilla global, subregiones de la rodilla y cortical de la metáfisis proximal de la tibia, realizadas a lo largo de una misma semana, como se ha explicado anteriormente.

Las variaciones en la DMO y en el T-score se calcularon mediante la diferencia entre los valores iniciales y finales tras la intervención experimental, así como la variación en el número de DE sobre los valores medios de referencia obtenidos en nuestra muestra de animales antes de cualquier intervención. Como justificación del tamaño muestral utilizado, relacionamos el tamaño empleado con las posibles diferencias de las medias poblacionales estimadas, para un error alfa de 0,05 y un poder del 80%. El análisis “a posteriori” de los resultados de comparar las DXA de las diferentes regiones anatómicas evaluadas fue realizado según el procedimiento descrito por Dupont y Plummer (Dupont WD, 1990; Dupont WD, 1998).

Para comparar las variaciones de la masa ósea, así como en los niveles séricos de estradiol, glucosa, colesterol y triglicéridos, antes y después del periodo de estudio, utilizamos el test de la “t de Student” para datos pareados. La comparación de los resultados densitométricos entre los diferentes grupos se realizó mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA de una vía) y el test de Dunnett *post hoc*, que se completó con un análisis multivariante para determinar el efecto independiente de la OVX. Los valores de CMO y DMO se expresaron como media estadística \pm desviación típica.

Las diferencias entre los resultados obtenidos de la RM y los derivados de los estudios macroscópicos e histológicos entre los dos grupos principales de conejos, osteoporóticos y osteoporóticos con artrosis, se calculó mediante un ANOVA para medidas repetidas, la prueba de Kruskal-Wallis o el test de Mann-Whitney para análisis no paramétricos. La correlación entre las variaciones de la DMO y las alteraciones del cartílago obtenidas mediante la escala de Mankin se calculó mediante el coeficiente de correlación de Spearman (r = correlación parcial).

Los datos se expresaron como media estadística \pm desviación típica (DE), o mediante el error estándar de la media (EEM), según se cita en el texto y dependiendo del tipo de análisis realizado. Se consideró siempre significativo un valor de $p < 0,05$. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS v. 11.0 para Windows® (SPSS, Chicago, IL, USA).

IV. RESULTADOS

RESULTADOS

Estudios densitométricos (DXA)

1. Análisis descriptivo de los valores densitométricos

En este apartado describiremos los resultados obtenidos con la DXA con respecto al área ósea proyectada (AO) o superficie analizada, al CMO y la DMO iniciales en nuestra población de conejos, en las diferentes localizaciones anatómicas evaluadas (Tabla 8). Cuando evaluamos la distribución estadística de datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, comprobamos que el CMO y la DMO seguían una distribución Normal (Figura 16), y que los cambios de estos parámetros tenían un comportamiento paralelo en las cuatro regiones anatómicas valoradas (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis descriptivo de los valores densitométricos basales en la población de inicio (n: 29).

	<i>Columna lumbar</i>	<i>Rodilla global</i>	<i>Hueso subcondral</i>	<i>Cortical metafisaria tibial</i>
AO (cm ²)	6,49 ± 0,46	1,93 ± 0,15	0,24 ± 0,01	0,04 ± 0,002
CMO (mg)	1934 ± 218	879 ± 83	149 ± 14	30 ± 7
DMO (mg/cm ²)	298 ± 24	455 ± 32	617 ± 60	678 ± 163
CV-DMO (%)	7, 8	7, 0	9, 6	24
p (K-S)	0,947	0,949	0,888	0,954

AO: Área de hueso analizada (cm²); CMO: Contenido mineral óseo (mg); DMO: Densidad mineral ósea (mg/cm²); CV-DMO: coeficiente de variación interindividual (%) para la DMO; p (K-S): valor de “p” de acuerdo al test de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresan como valores medios ± DE.

Nos parece interesante resaltar que la DMO aumentaba progresivamente desde la CL, a la RG y al hueso subcondral, y era máxima a nivel de la metafisis proximal de la tibia. Estas variaciones reflejaban la diferente proporción de hueso trabecular y cortical existente en las áreas analizadas.

Respecto a la correlación de los valores de DMO en las diferentes regiones estudiadas, se encontró una correlación significativa entre los valores de DMO en la CL, RG y HS en las distintas regiones evaluadas (Figura 17), mientras que los valores de DMO de la cortical metafisaria no se correlacionaron con las otras regiones analizadas.

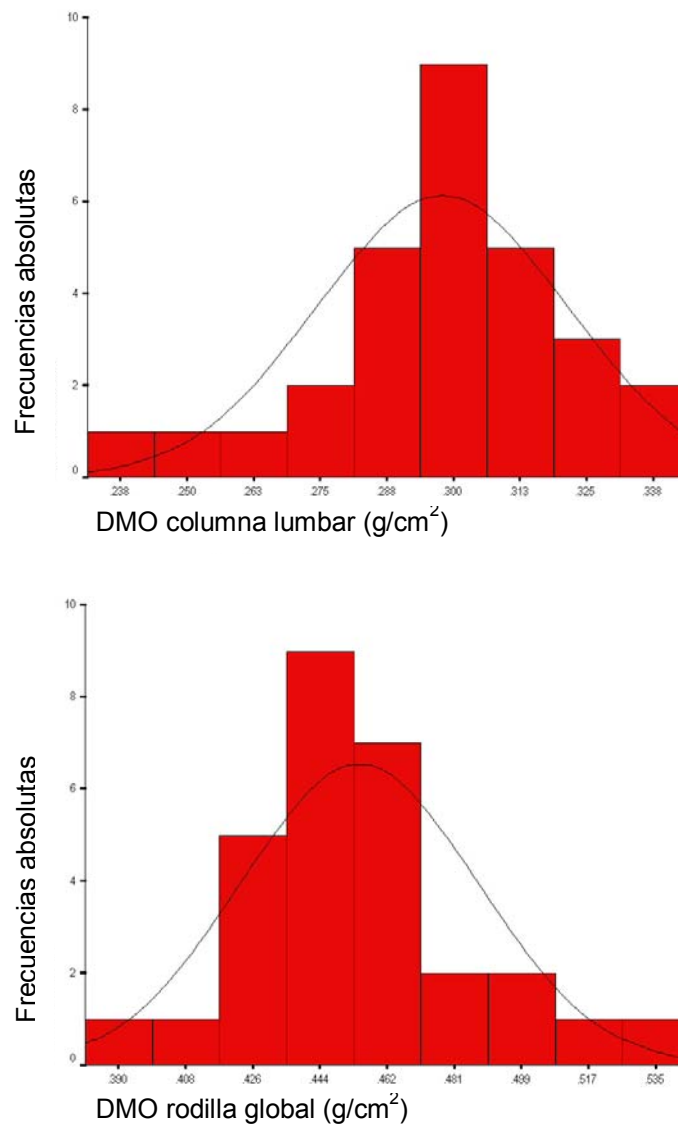


Figura 16. Distribución de la densidad mineral ósea (DMO, en g/cm^2). Gráficas de columna lumbar y rodilla global a tiempo cero, que muestran unas curvas de distribución normal. El comportamiento del contenido mineral óseo correspondiente a cada región, dibujaba unas curvas totalmente superponibles.

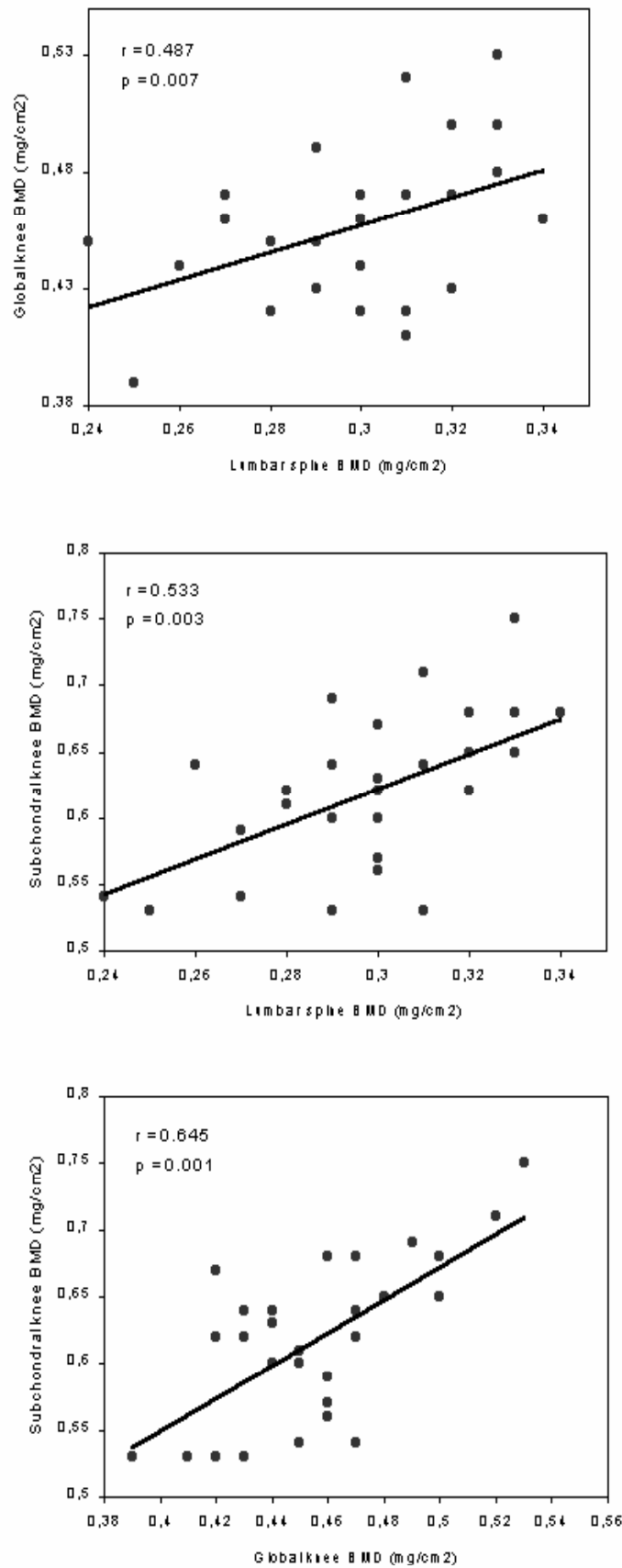


Figura 17. Correlación lineal entre los valores de DMO (en g/cm²) medida por DXA en columna lumbar, rodilla y hueso subcondral de la rodilla. En el vértice superior izquierdo de cada cuadro se muestran los respectivos coeficientes de correlación parcial y del “p” valor.

2. Precisión de las DXA. Efecto del reposicionamiento

Como hemos comentado en la sección de material y métodos, y para determinar la variabilidad intra-individuo, se realizaron tres determinaciones diferentes de cada región anatómica en cada conejo dentro de la misma semana. El CV de las DXA, después de un triple reposicionamiento de los animales, osciló de 2,6 % a 3,8 % según la región considerada, como puede verse en la tabla 9. Además, calculamos el LSC de la DMO, cuyo resultado osciló entre 7,3 % y 10,7 % en las mismas áreas consideradas (Tabla 9).

Tabla 9. Coeficientes de variación (CV) y menor cambio significativo (LSC) de la DMO detectada por DXA para tres medidas repetidas.

	<i>Columna lumbar</i>	<i>Rodilla global</i>	<i>Hueso subcondral</i>	<i>Cortical metafisaria de la tibia</i>
CV (%)	3,8 ± 2,6	2,6 ± 1,6	3,6 ± 3,6	3,1 ± 2,2
LSC (%)	10,7	7,3	10,2	8,7

Coeficiente de variación (CV) y menor cambio significativo detectable (LSC) expresados como porcentajes de variación tras tres medidas repetidas realizadas, después de reposicionar al animal, a 10 conejos consecutivos sanos. Los valores del CV son valores medios ± DE.

Cálculo del T-score en el primer experimento

Con objeto de cuantificar las pérdidas óseas y calcular el T-score, se seleccionaron veinte animales del primer experimento. A quince se les practicó la OVX con posterior administración de 1 mg/kg/día de dosis media de MPH durante 28 días, y 5 se utilizaron como controles. Los valores basales de DMO no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos en ninguna de las regiones evaluadas con respecto a los valores de la población general reflejados en la tabla 8. En la tabla 10 podemos apreciar las variaciones de la DMO y del índice T en los animales del grupo de intervención y los controles en CL, RG, HS y metáfisis tibial proximal. Como queda patente, se evidenció una disminución significativa de la DMO en los conejos del grupo experimental a las 6 semanas de la OVX. Además, los

cambios inducidos excedían claramente el LSC mencionado con anterioridad, y eran máximos a nivel de la cortical metafisaria de la tibia.

Tabla 10. Variaciones de la DMO en los animales osteoporóticos y controles: T-score.

Región anatómica	GRUPO OSTEOPORÓTICO (n:15)			GRUPO CONTROL (n: 5)		
	DMO (mg/cm ²)	Δ DMO (mg/cm ²)	T-score	DMO (mg/cm ²)	Δ DMO (mg/cm ²)	T-score
Columna lumbar	250 ± 34	- 48 ± 25 *	- 2,0 ± 1,1*	303 ± 15	- 14 ± 7	- 0,6 ± 0,3
Rodilla global	369 ± 80	- 70 ± 67 **	- 2,2 ± 2,1**	465 ± 50	28 ± 43	0,9 ± 1,4
Hueso subcondral	515 ± 33	- 111 ± 33 *	- 1,9 ± 0,6 *	633 ± 42	- 22 ± 13	- 0,4 ± 0,2
Cortical metafisaria de la tibia	366 ± 186	- 302 ± 165 *	- 5,7 ± 3,1 *	690 ± 229	39 ± 40	0,7 ± 0,8

DMO: Densidad mineral ósea (mg/cm²); Δ DMO: Variación de la DMO a las seis semanas de la OVX y cuatro de tratamiento con hemisuccinato de metil-prednisolona. La variación de la DMO se expresa en mg/cm² (Δ DMO) y como número de DE referido a los valores normales de referencia de la tabla 8 (T-score). Los datos se muestran como medias \pm DE; * y ** representan la significación estadística en la Δ DMO y en el T-score respecto al grupo control (* p < 0,05 y ** p < 0,01 respectivamente).

De acuerdo con estos datos, el menor número de animales necesario para demostrar diferencias estadísticamente significativas en la DMO antes y después de la intervención experimental propuesta fue de 8 animales para la CL y menor / igual a 6 para las tres localizaciones restantes (Figura 18).

Relación del tamaño muestral y las diferencias para varios niveles de DE

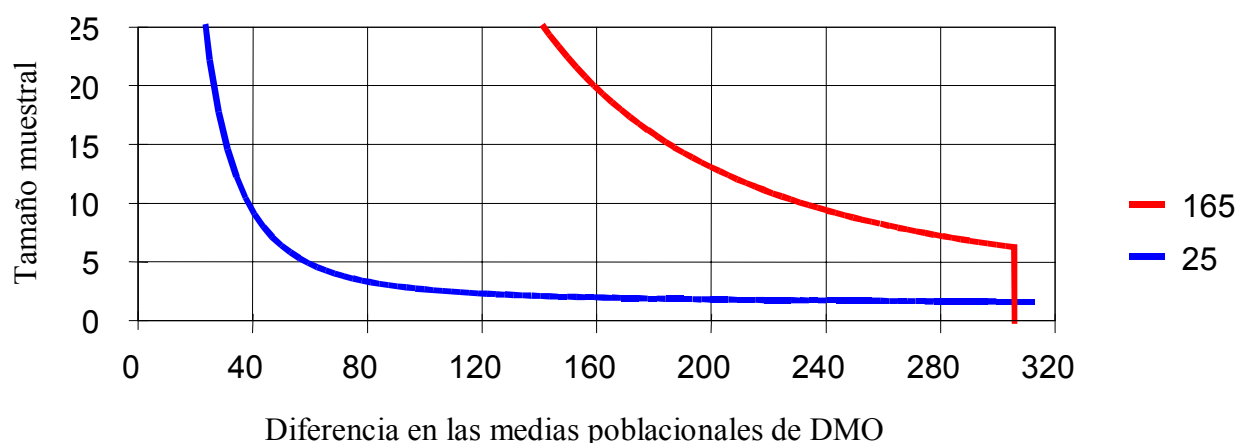


Figura 18. Cálculo del tamaño muestral. Las curvas representan el cálculo teórico del tamaño muestral según la variación estimada de la densidad mineral ósea, DMO, con unos valores que oscilan entre 48 y 302 mg/cm² en las diferentes regiones evaluadas, con sus correspondientes DE: 25 y 165, como se refleja en la figura.

Caracterización del modelo de osteoporosis

En la tabla 5 se mostró la distribución de los 36 animales incluidos en esta fase. De ellos, 29 animales fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos sometidos a diferentes intervenciones y dosis de MPH para caracterizar mejor nuestro modelo de OP (Tabla 5).

Todos los conejos del grupo OVX + MPH a dosis alta murieron prematuramente en las primeras semanas tras el inicio de las inyecciones de MPH como consecuencia de un sangrado gastrointestinal, probablemente en relación con las altas dosis de corticoides utilizadas, por lo que fueron excluidos del análisis final. La tabla 11 muestra los valores densitométricos en los restantes grupos y en las diferentes regiones estudiadas.

El grupo de animales que experimentó OVX aislada no mostró diferencias significativas en la DMO en ninguna de las regiones analizadas. Respecto a aquellos animales en los que se testó el modelo combinado, es interesante reseñar que las dosis bajas de MPH disminuyeron la DMO de manera significativa sólo en la RG y en el HS de la rodilla, mientras que las dosis medias provocaron pérdidas significativas de la masa ósea en las tres principales regiones exploradas (CL, RG y HS) respecto al grupo control. Asimismo, los animales del grupo MPH aislado mostraron también una reducción de la DMO en todas las regiones evaluadas (Tabla 11).

Tabla 11. Variación de la densidad mineral ósea (DMO) en mg/cm^2 entre los valores a tiempo 0 y los encontrados seis semanas después de cada intervención experimental: OVX y/o inyecciones de hemisuccinato de metilprednisolona (MPH) en las distintas regiones evaluadas y en los diferentes grupos estudiados.

GRUPOS	Columna lumbar			Rodilla global			Hueso subcondral		
	DMO pre - OVX	DMO 6 sem post - OVX	Δ x \pm DE (%)	DMO pre - OVX	DMO 6 sem post - OVX	Δ x \pm DE (%)	DMO pre - OVX	DMO 6 sem post - OVX	Δ x \pm DE (%)
Total (n: 36)	299 \pm 26	262 \pm 32	-36 \pm 25	450 \pm 35	406 \pm 53	-45 \pm 46	612 \pm 55	558 \pm 82	-54 \pm 57
Control (n:7)	297 \pm 34	287 \pm 20	-10 \pm 28 (- 3, 3)	456 \pm 36	458 \pm 43	-2 \pm 39 (- 0, 4)	659 \pm 33	637 \pm 32	-22 \pm 14 (-3, 3)
OVX (n: 7)	300 \pm 38	268 \pm 37	-32 \pm 16 (- 10, 6)	471 \pm 45	426 \pm 25	-47 \pm 30 (- 9, 9)	612 \pm 72	578 \pm 70	-34 \pm 28 (-5, 5)
OVX + MPH baja (n: 4)	285 \pm 21	264 \pm 22	-21 \pm 12 (- 7, 4)	436 \pm 33	352 \pm 38	-85 \pm 43 # (- 19, 5)	569 \pm 45	484 \pm 83	-85 \pm 69 * (-14, 9)
OVX + MPH media (n: 7)	295 \pm 13	246 \pm 24	-49 \pm 21 * (- 16, 6)	442 \pm 17	385 \pm 34	-58 \pm 33 * (- 13, 1)	610 \pm 39	533 \pm 43	-77 \pm 65 * (-12, 6)
MPH (n: 5)	316 \pm 11	261 \pm 29	-55 \pm 24 * (- 17, 4)	425 \pm 19	371 \pm 90	-54 \pm 71 * (- 12, 7)	561 \pm 40	506 \pm 167	-56 \pm 126 * (-10)

MPH: hemisuccinato de metilprednisolona a dosis bajas o medias, equivalentes a 0,5 ó 1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ de prednisona respectivamente; OVX: ovariectomía bilateral; Δ : variación experimentada en los valores de la DMO en mg/cm^2 (ver detalles en material y métodos). Los resultados representan la diferencia de las medias entre los valores antes y después de la OVX, expresados como media \pm DE. Los valores entre paréntesis representan el porcentaje de cambio respecto a la situación basal. Significación estadística: # $p < 0,005$; * $p < 0,05$ vs grupo control. Los 5 animales del grupo de altas dosis de MPH fueron excluidos del análisis final debido a que todos los conejos de este grupo murieron prematuramente como consecuencia de una hemorragia gastrointestinal. También se excluyó por muerte prematura un conejo del grupo OVX + MPH baja.

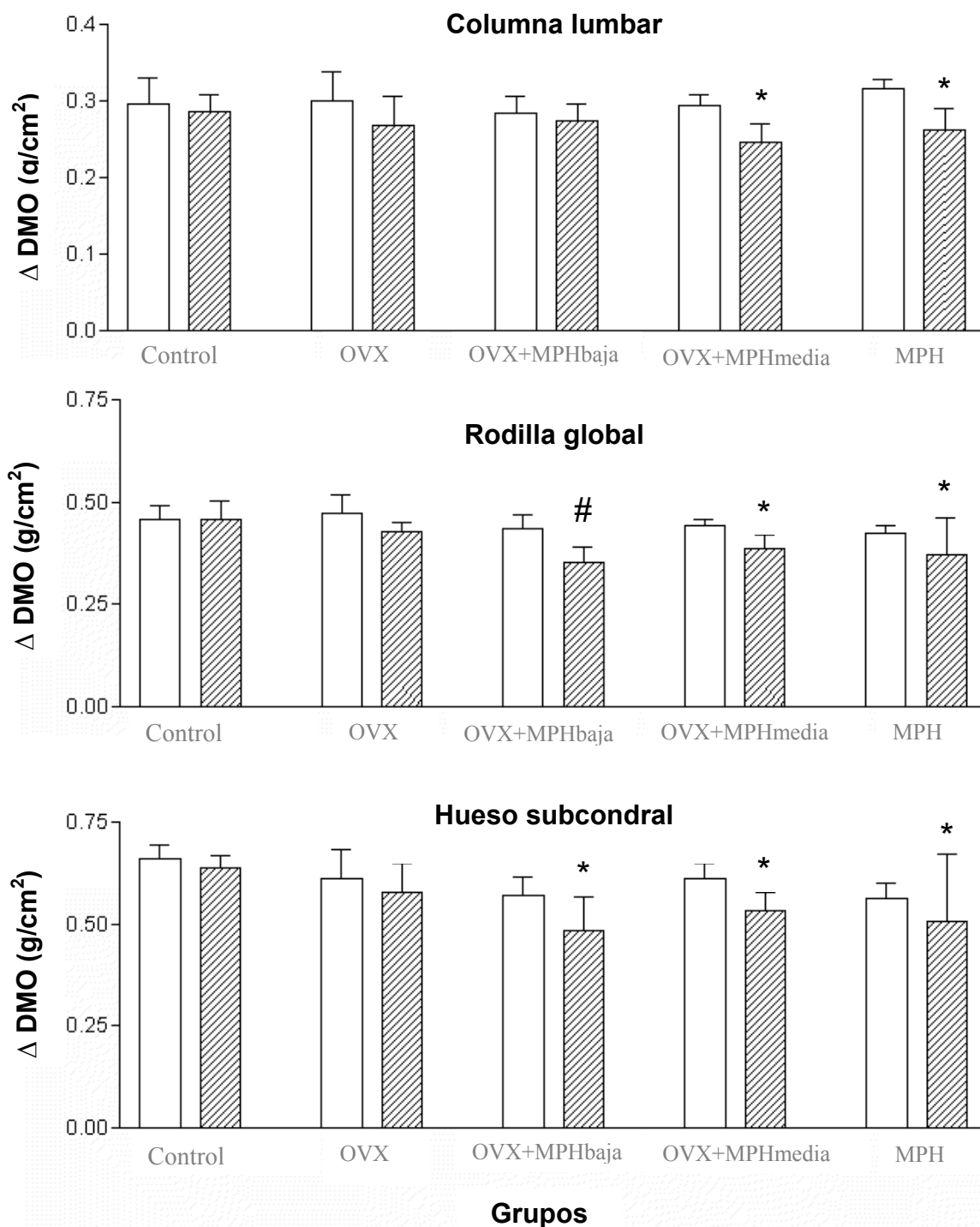


Figura 19. Variación de la densidad mineral ósea (DMO; g/cm²) entre los valores a tiempo 0 y los encontrados 6 semanas después de cada intervención experimental. Los valores presentados corresponden a los datos de la tabla anterior. MPH: hemisuccinato de metilprednisolona a dosis baja o medias, equivalentes a 0,5 ó 1 mg/kg/día de prednisona respectivamente; OVX: ovariectomía bilateral; Δ: variación experimentada en los valores de la DMO en g/cm² (ver detalles en material y métodos). Los resultados representan la diferencia de las medias entre los valores antes y después de la OVX (media ± DE). Significación estadística: # p < 0,005; * p < 0,05 vs grupo control.

En el estudio a medio plazo, 22 semanas después de la OVX (16 tras la cirugía de rodilla), pudimos comprobar que la reducción en la DMO se mantenía de manera constante en CL y RG en los conejos del grupo OVX + MPH a dosis media, cuando se comparaban con los OVX y el grupo control (Figura 20). Mientras que los conejos del grupo OVX + MPH a dosis baja mostraron también una disminución en los valores de DMO, ésta sólo alcanzó significación estadística en la RG. Es también importante resaltar que la pérdida ósea no revirtió tras la supresión de los corticoides en los grupos tratados con MPH.

Todos los grupos estudiados fueron homogéneos respecto al peso corporal, que osciló entre $4,2 \pm 0,5$ y $4,9 \pm 0,4$ al inicio, y permaneció estable a lo largo del seguimiento. Por tanto, las variaciones de la DMO no tendrían relación con variaciones en el peso de los animales.

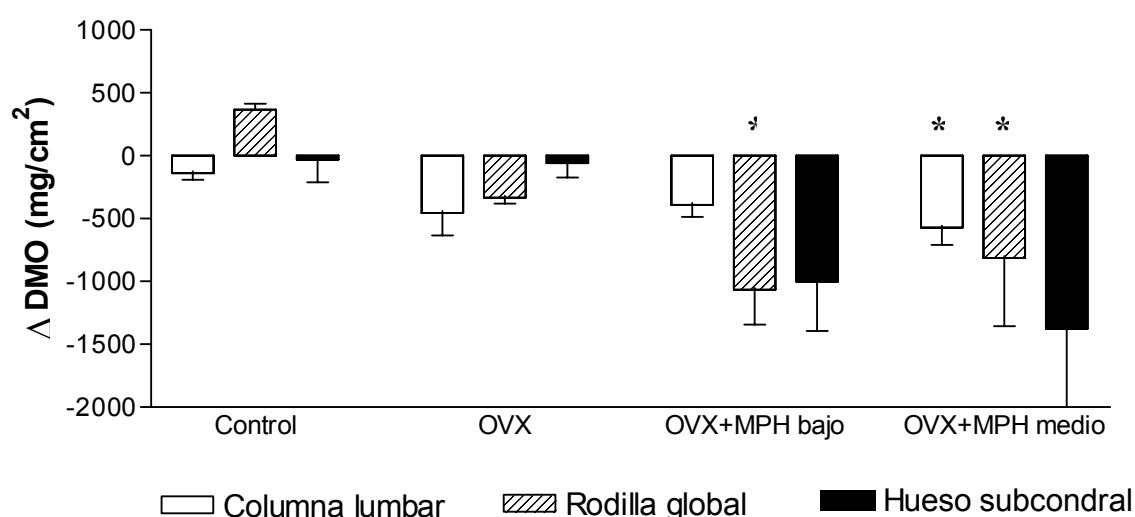


Figura 20. Variación de la DMO veintidós semanas después de la OVX en los grupos OVX, OVX+MPH a dosis media y baja y control en las tres regiones evaluadas.

Δ DMO: Variación de la densidad mineral ósea (en mg/cm²) respecto a las condiciones basales; OVX: ovariectomía bilateral; MPH bajo / medio: hemisuccinato de metilprednisolona a dosis baja o media, equivalentes a 0,5 ó 1 mg/kg/día de metilprednisolona, respectivamente. Como puede observarse, la pérdida de masa ósea no revirtió tras suspender las inyecciones de corticoides. Los valores se expresan como medias \pm EEM por 10^3 días de tratamiento (ver detalles en materiales y métodos). Significación estadística: * $p < 0,05$ entre los grupos OVX+MPH a dosis baja y media y los controles.

Determinaciones analíticas

La siguiente tabla muestra los niveles de estradiol, glucosa, colesterol y triglicéridos a tiempo cero y 20 semanas tras la OVX en todos los animales seguidos durante ese periodo. Como puede verse, los niveles de estradiol estaban significativamente más bajos 5 meses tras la OVX. En concreto, los niveles de estradiol se encontraban por debajo del límite inferior detectable en nuestro laboratorio en siete de trece animales (54%). Por el contrario, los niveles de triglicéridos aumentaron durante el seguimiento comparados con los valores iniciales. Los niveles de glucemia mostraron un claro incremento, aunque no alcanzaron significación estadística. El colesterol total no cambió durante el periodo de estudio (Tabla 12).

Tabla 12. Niveles de estradiol, glucosa, colesterol total y triglicéridos en suero antes y después de la ovariectomía.

	Basales pre-OVX (n: 30)	20 semanas post-OVX (n: 13) ^(a)	Significación ("p" valor)
Estradiol (pg/ml)	26 ± 7,2	13,9 ± 10,7	< 0,01
Glucosa (mg/dl)	126,2 ± 30,1	142,2 ± 50,8	NS
Colesterol total (mg/dl)	83 ± 38,2	74, 8 ± 46	NS
Triglicéridos (mg/dl)	55,6 ± 25,6	116,6 ± 68,7	< 0,01

OVX: ovariectomía; (a): 7 de 13 (54%) tuvieron niveles séricos de estradiol indetectables (<18 pg/ml). NS: no significativo.

Estudios de Resonancia Magnética

El estudio de RM practicado no mostró alteraciones morfológicas significativas ni diferencias de espesor a tiempo 0 ni a las 6 semanas de la OVX entre el grupo OVX + MPH a dosis media y los controles. El espesor medio del cartílago en la zona de carga del cóndilo femoral medial fue de 0,54 ± 0,03 mm y 0,57 ± 0,07 mm en los animales con o sin OVX, respectivamente (Tabla 13). La figura 21 muestra algunos picos característicos correspondientes a la intensidad de señal del cartílago femoral de varios conejos. Tampoco se

apreciaron alteraciones en el HS al inicio ni a lo largo del seguimiento de ambos grupos.

Por tanto, y con respecto al posible papel deletéreo de los corticoides sobre el HS, la RM de alta resolución no mostró alteraciones sugerentes de inflamación, edema óseo ni necrosis en ninguno de los grupos, cuando comparamos los resultados al finalizar la administración de GC. Sin embargo, y como puede apreciarse en la tabla 13, las variaciones del espesor del cartílago en el cóndilo femoral medial sí mostraron una diferencia significativa entre los conejos OA y los del grupo OPOA a las 16 semanas de la meniscectomía y sección del LCA. La comparación entre ambos grupos mostró una reducción en el espesor del cartílago mucho mayor en el grupo OPOA (Figura 22). Esta diferencia podría estar influenciada tanto por el factor tiempo como por la intervención practicada.

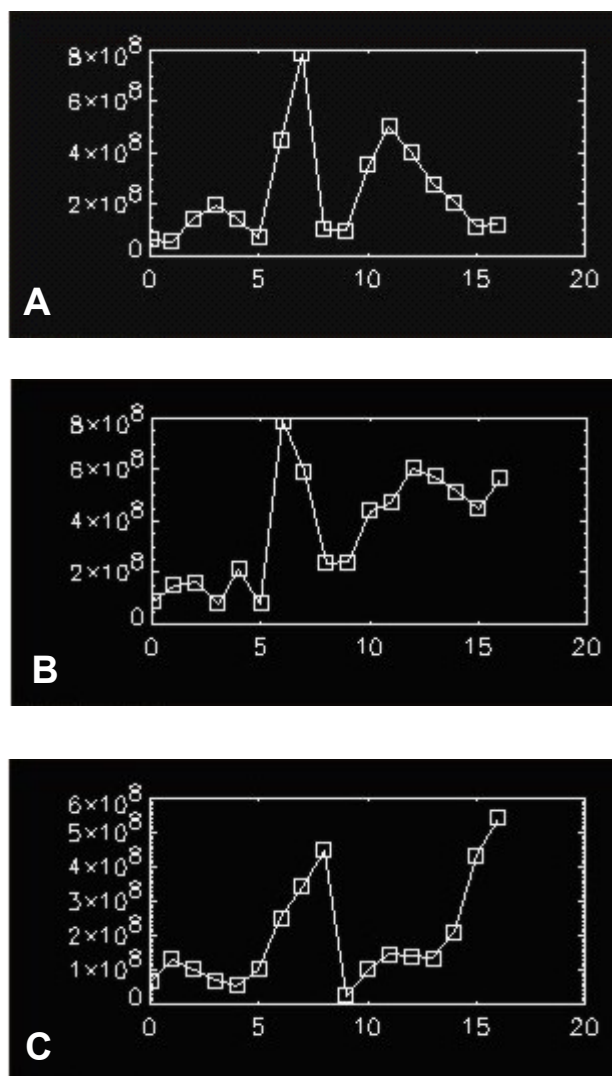


Figura 21. RM de rodillas: curvas de intensidad de señal. A/C: Curvas prototípicas que muestran el característico pico de la señal (entre los valores 5 y 10 del eje de abscisas) correspondientes a la intensidad de señal del cartílago hialino femoral.

Tabla 13. Espesor del cartílago del cóndilo femoral medial medido con RM de alta resolución durante el periodo de seguimiento.

Tiempo de evolución	Grupo experimental	Sector anterior (mm)	Sector medio (mm)	Sector posterior (mm)	Espesor completo (mm)
Semana 0	GRUPO OA	0,52 ± 0,03	0,52 ± 0,03	0,57 ± 0,07	0,54 ± 0,04
	GRUPO OPOA	0,54 ± 0,04	0,55 ± 0,04	0,54 ± 0,03	0,54 ± 0,03
Semana 6	GRUPO OA	0,54 ± 0,02	0,54 ± 0,06	0,58 ± 0,04	0,55 ± 0,03
	GRUPO OPOA	0,47 ± 0,03	0,49 ± 0,02	0,52 ± 0,05	0,49 ± 0,04
Semana 12	GRUPO OA	0,55 ± 0,05	0,54 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,55 ± 0,02
	GRUPO OPOA	0,48 ± 0,0	0,42 ± 0,01	0,51 ± 0,03	0,47 ± 0,01
Semana 16	GRUPO OA	0,53 ± 0,04	0,50 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,53 ± 0,02
	GRUPO OPOA	0,48 ± 0,06	0,25 ± 0,20 *	0,35 ± 0,10 *	0,36 ± 0,08 *

El espesor medio del cartílago completo y por sectores se expresa en milímetros (mm). Los valores de la tabla reflejan los valores medios ± DE. Significación estadística: * $p < 0,05$ respecto a los valores previos a la cirugía de rodilla (semana 0) de cada grupo (ANOVA para medidas repetidas). Las semanas 6, 12 y 16 están referidas al tiempo transcurrido tras la meniscectomía y sección del ligamento cruzado anterior.

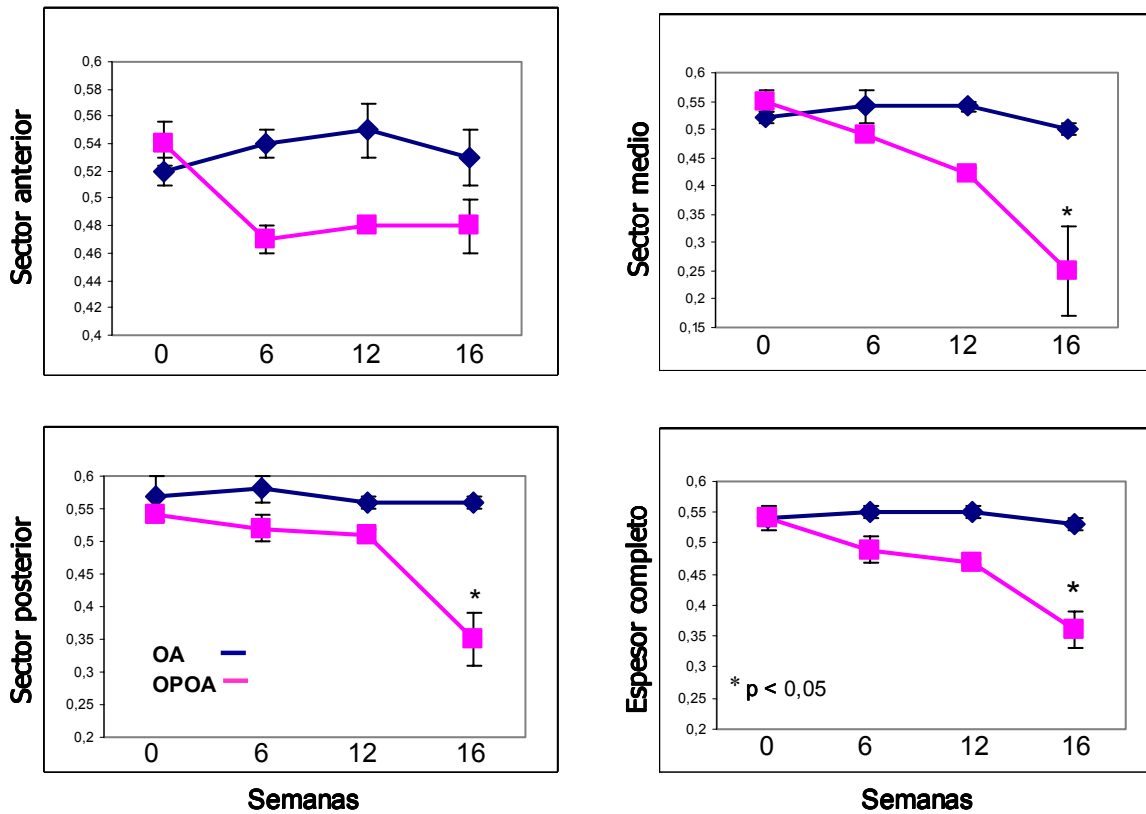


Figura 22. Espesor del cartilago del c6ndilo femoral medial evaluado mediante RM de alta resoluci6n. Los valores representan valores medios \pm error estandar (mm). Las semanas 6, 12 y 16 est1n referidas al tiempo transcurrido tras la meniscectomía y secci6n del ligamento cruzado anterior. Grupo OA en azul; OPOA en rosa. Significaci6n estadística: * $p < 0,05$ vs valores previos a la cirugía de rodilla (semana 0) (ANOVA para medidas repetidas). Los datos de esta figura se corresponden con los valores dados en la tabla 13.

Histología del cartílago articular

1. Histología macroscópica:

Los resultados de la valoración macroscópica del cartílago articular de los cóndilos femorales y de los platillos tibiales en las 22 rodillas del tercer experimento se muestran en la tabla 14. Mientras no se observaron diferencias entre las rodillas sólo OP y las rodillas derechas normales de los conejos OA a la inspección macroscópica grosera, las rodillas de los grupos donde la OA había sido previamente inducida, sí mostraron alteraciones evidentes consistentes en: engrosamiento sinovial, punteado y decoloración del cartílago, úlceras y aparición de osteofitos. Estas anomalías fueron más intensas en el compartimiento medial de la rodilla intervenida. Además, y aunque las alteraciones se distribuyeron a lo largo de toda la superficie articular, las lesiones cartilaginosas fueron más intensas en las zonas posteriores, que soportan una mayor carga mecánica tanto en el cóndilo femoral como en el platillo tibial (Figura 23). Aún más interesante resultó que los valores parciales dados individualmente a los compartimentos mediales del fémur y la tibia de las rodillas OPOA fueron significativamente más elevados que los obtenidos por las rodillas OP y controles ($p < 0,05$). El índice macroscópico total de las superficies articulares de las rodillas sólo OA fue también, lógicamente, más elevado que el encontrado en las rodillas OP y controles ($p < 0,05$).

Tabla 14. Evaluación macroscópica de las alteraciones del cartílago. Los cambios patológicos fueron evaluados siguiendo una escala semicuantitativa graduada de 1 a 3 para cada compartimento y calculando una puntuación final total (Calvo E, 2001b).

Grupo	Membrana sinovial	Fémur medial	Fémur lateral	Tibia medial	Tibia lateral	Índice total
Normal	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
OP	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
OA	0,8 ± 0,2	2,4 ± 0,6	0,6 ± 0,4	1,6 ± 0,7	0,6 ± 0,6	6 ± 1,7 *§
OPOA	0,5 ± 0,2	2,7 ± 0,3 *§	1 ± 0,6	3 ± 0 *§	0,8 ± 0,5	8 ± 1,4 *§

Normal: Rodillas derechas sanas de los conejos con sólo artrosis (OA) en la rodilla izquierda; OP: Rodillas derechas osteoporóticas de los conejos con OA en la rodilla izquierda a los que se había inducido previamente OP; OA: Rodillas izquierdas OA de conejos previamente sanos; OPOA: Rodillas izquierdas OA de los conejos a los que se había inducido previamente OP. Los datos se expresan como medias ± EEM. Significación estadística: * $p < 0,05$ vs. Normal, § $p < 0,05$ vs. OP.

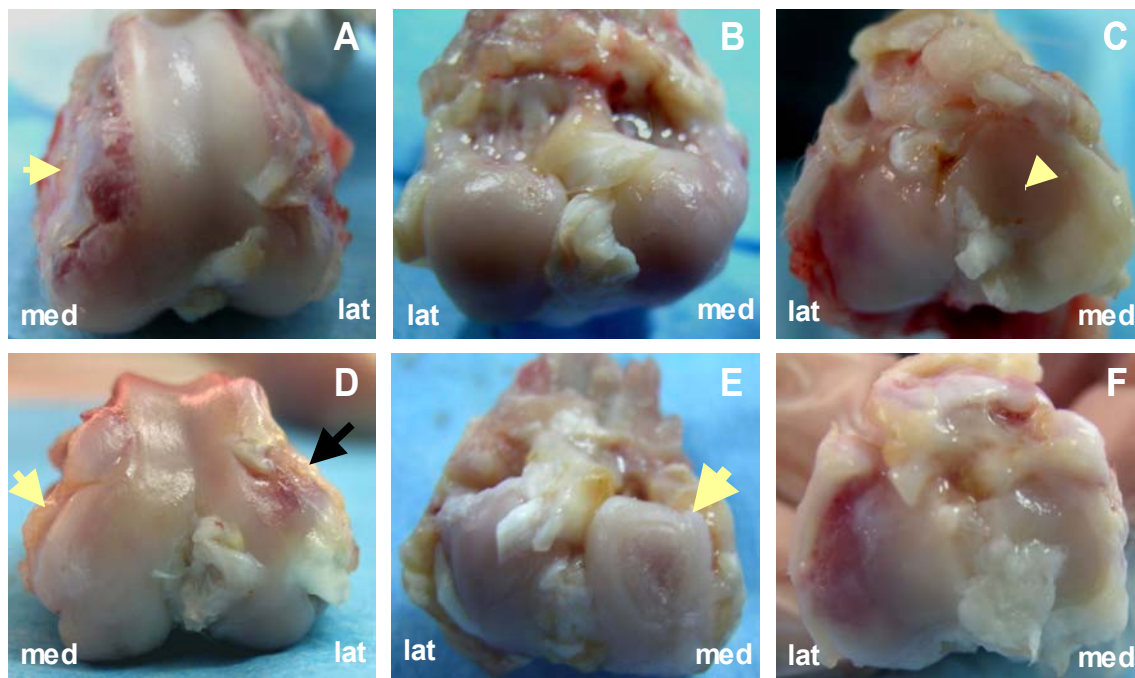


Figura 23. Histología macroscópica. Macrofotografías de las lesiones observadas a nivel de las rodillas artrósicas, OA (A, B, C) y artrósicas con osteoporosis, OPOA (D, E, F) inducida previamente mediante OVX e inyecciones de MPH. A: Rodilla OA en la que la superficie de los cóndilos femorales es normal, salvo un pequeño osteofito blanquecino en el borde interno del cóndilo femoral medial (flecha). B: Rodilla OA en la que se aprecia una pequeña úlcera de espesor parcial en el sector posterior del cóndilo medial, así como irregularidades y punteado en la superficie del cóndilo lateral. C: Platinos tibiales de rodilla OA en los que se aprecia una pequeña úlcera en la meseta medial (cabeza de flecha) y un osteofito en el margen de la meseta tibial lateral. D: Rodilla OPOA en la que ha desaparecido el brillo habitual del cartílago femoral y aparece un gran osteofito en el margen medial del cóndilo femoral homónimo (flecha amarilla). Nótese la presencia de una úlcera de espesor parcial en la región anterior del cóndilo femoral lateral (flecha negra). E: Úlcera que se extiende a todo el espesor del cartílago en la zona de carga del cóndilo femoral medial (cabeza de flecha). F: Se aprecia una úlcera extensa con componente inflamatorio periférico en la superficie tibial medial con osteofitos en los márgenes medial y lateral de ambas mesetas tibiales. med: cara medial; lat: cara lateral.

2. Histología microscópica:

En la figura 24 se representan las puntuaciones parciales y globales obtenidas en la valoración histopatológica del cartílago articular en los diferentes grupos estudiados según la escala de Mankin. Como queda patente, las rodillas con OA (rodillas izquierdas OA y OPOA) mostraron un índice global significativamente más elevado que las rodillas controles ($p < 0,05$). También se encontraron diferencias significativas cuando se comparó el índice de las rodillas OA de los conejos OVX (rodillas OPOA) con el de las rodillas OA.

El índice global alcanzado por las rodillas OA fue asimismo más elevado que el de las rodillas OP, pero ésta diferencia no fue significativa. Sin embargo, las rodillas sólo OA y sólo OP mostraron valores significativamente más elevados que las rodillas normales ($p < 0,05$), sugiriendo que la OP podría tener un efecto deletéreo sobre las lesiones artrósicas.

La mayoría de las rodillas OA y OPOA presentaban alteraciones en la estructura, celularidad y tinción de la matriz, pero no encontramos diferencias significativas en la valoración individual entre los dos grupos de rodillas, y la línea ondulante basófila o “*tidemark*” apareció normal en ambos grupos, sin apreciarse invasión vascular en la mayoría de las muestras evaluadas. Las principales alteraciones estructurales consistieron en irregularidades focales, con zonas de desflecamiento, hendiduras y/o úlceras que alcanzaban la zona radial. Sin embargo, el efecto nocivo de la OP sobre el cartílago era más acentuado en la tinción de la matriz con el azul Alcían (Figura 25). Mientras que las rodillas OA mostraron disminución en la tinción de la matriz de leve a moderada, su reducción fue de moderada a intensa en las OPOA, y los índices histológicos combinados utilizados para valorar la tinción de la matriz estaban significativamente más elevados en las rodillas OPOA y OP que en las controles ($p < 0,05$).

Con respecto a los cambios de la celularidad, las rodillas OA mostraron alteraciones leves a moderadas en los condrocitos con cierta hiper celularidad acompañante, pero el cartílago de las rodillas OPOA era habitualmente hipocelular con presencia ocasional de clones, más frecuentes que en las sólo OA. Los clones estaban localizados en las capas superficial y profunda del tejido (Fig. 25).

Sin embargo, y aunque los índices parciales de la tinción de la matriz y los cambios en la celularidad mostraron una tendencia claramente desfavorable en las rodillas OPOA respecto de las rodillas OA, las diferencias no alcanzaron significación estadística ($p=0,067$).

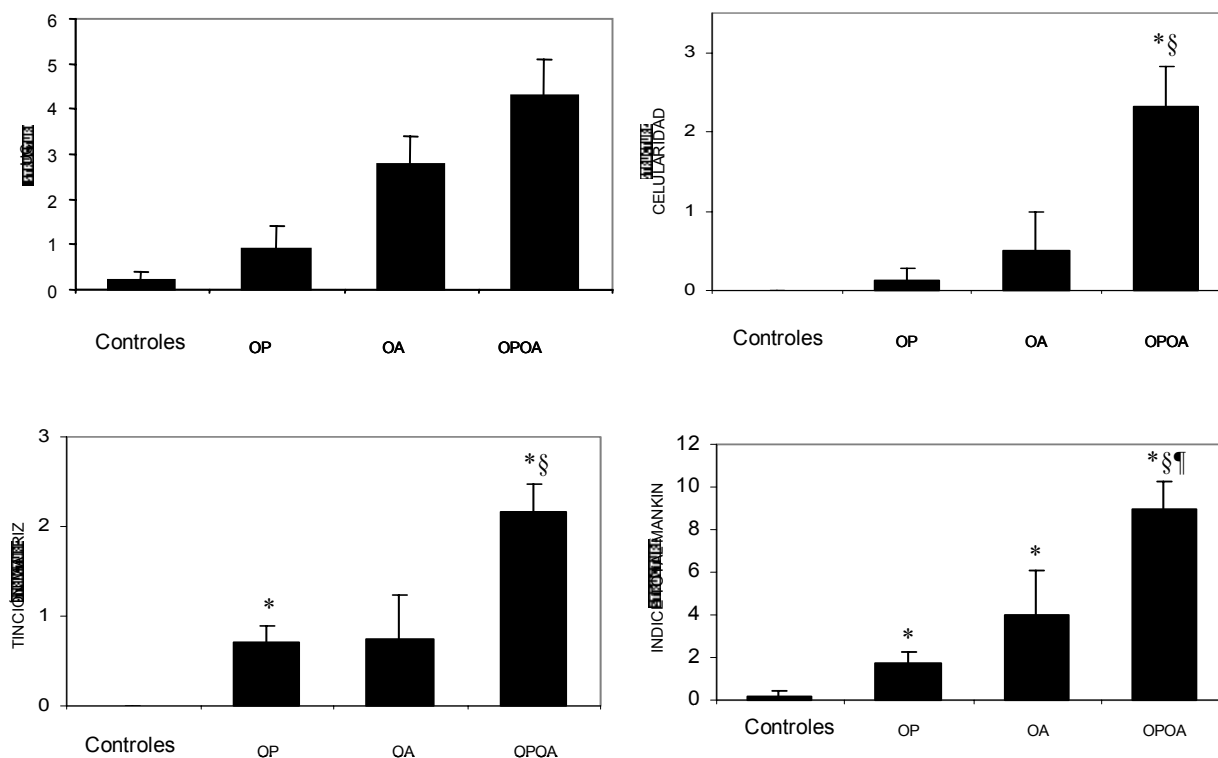


Figura 24. Evaluación histopatológica del daño articular cuantificado mediante la escala de Mankin. Gráfico de barras que muestra la alteración histopatológica en el sector posterior del cóndilo femoral medial, calculado mediante el índice total de Mankin y los índices parciales para cada categoría de la escala. Controles: rodillas sanas; OP: rodillas osteoporóticas; OA: rodillas artrósicas; OPOA: rodillas osteoporóticas y artrósicas. Significación: * $p < 0,05$ vs controles; § $p < 0,05$ vs OP; ¶ $p < 0,05$ vs OA.

Correlación de las DXA con los hallazgos histopatológicos

En la tabla 15 se muestran las determinaciones de la DMO para las diferentes regiones analizadas mediante DXA en los grupos de rodillas estudiados. Las rodillas de los conejos OP mostraron un descenso significativo en la DMO seis semanas tras la OVX respecto a la situación basal en las tres regiones mencionadas ($p < 0,05$). Asimismo, la DMO de estos

conejos, medida justo antes de la cirugía de la rodilla, fue también significativamente más baja que la de los conejos OA en los que no se indujo OP. Por el contrario, los valores de DMO en las rodillas OA sin OP se encontraron dentro de los límites de la normalidad, consistentes con los datos encontrados en los dos primeros experimentos.

Estos datos nos confirman que la OA fue provocada en conejos sanos y en conejos OP. Dieciséis semanas tras la inducción de la OA, los valores de DMO no mostraron una variación significativa, y las diferencias entre los dos grupos de animales (conejos con y sin OP) se mantenían constantes en las tres regiones evaluadas.

Con respecto a la relación entre los valores de DMO y la lesión histopatológica encontrada en el cartílago articular, es interesante resaltar que las alteraciones microscópicas detectadas en el cartílago, se correlacionaban bien con el descenso de la DMO en la columna lumbar [Figura 26 A: $r = -0,743$; $p = 0,014$]. También observamos la misma tendencia en la RG y en el HS de la rodilla [Figura 26 B y C: $r = -0,55$ y $-0,56$; $p = 0,10$ y $0,09$, respectivamente], aunque los datos aquí no alcanzaron significación estadística.

Tabla 15. Valores de DMO obtenidos mediante DXA en conejos osteoporóticos y artrósicos o sólo artrósicos.

	Basal	Pre OA¶		Post OA¶	
		OPOA	OA	OPOA	OA
Columna lumbar	300±15	248±27 *	302±21	233±39 *	305±12
Rodilla global	453±20	342±31 *	458±43	363±76 *	473±31
Hueso subcondral	625±30	483±73 *	637±32	489±97 *	642±47

Los valores de DMO están expresados en mg/cm^2 . Para los estudios DXA se utilizaron sólo las rodillas izquierdas. ¶ Valores de DMO antes y después de inducir la OA experimental de la rodilla. OPOA: conejos con OP provocada seguida de OA; OA: conejos con OA experimental sin OP previa. N= 5 (OA); 6 (OPOA). Los datos se expresan como medias \pm DE; * $p < 0,05$ vs valores iniciales.

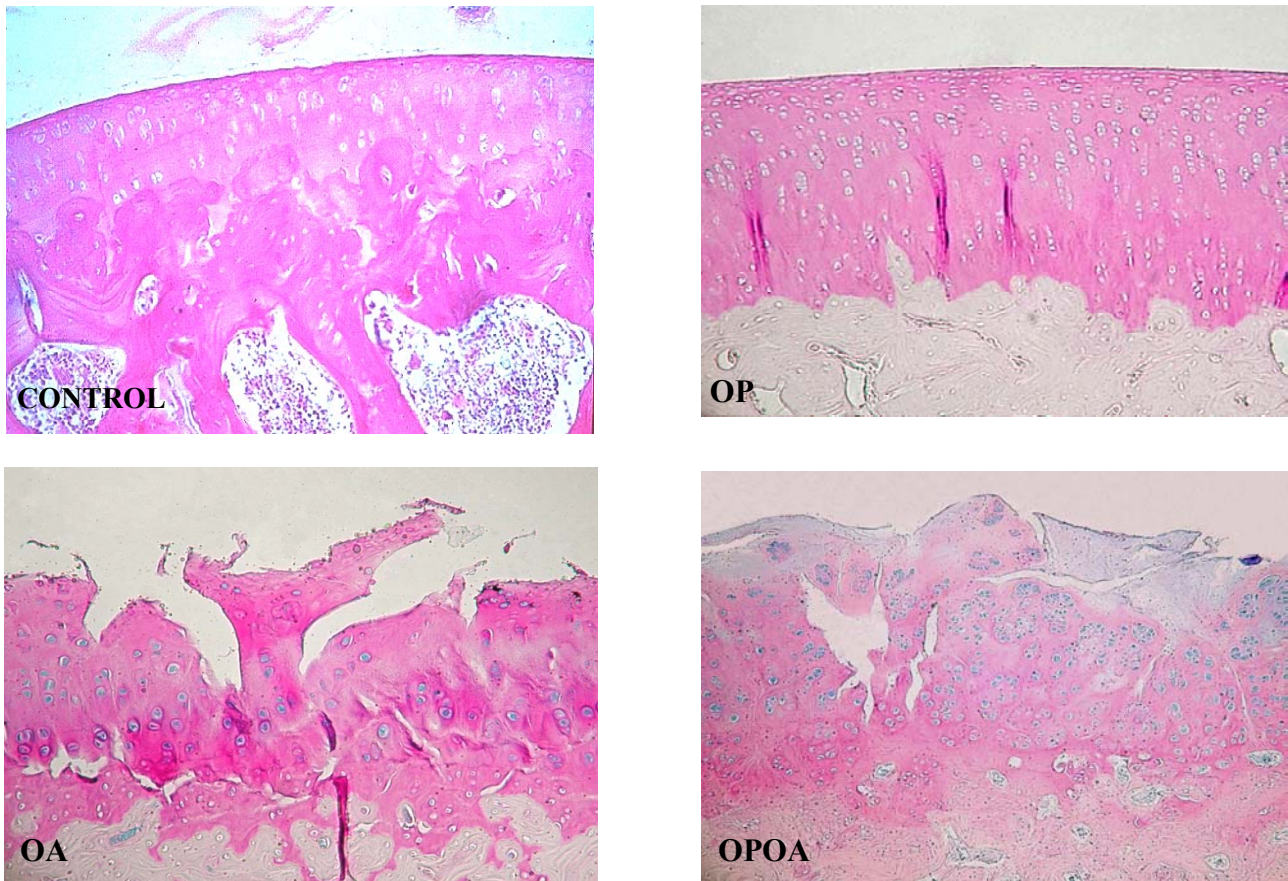


Figura 25. Histología microscópica. Histología microscópica del cartílago de los cóndilos femorales mediales, teñidos con azul Alcian. **CONTROL**: rodilla sana. **OP**: rodilla osteoporótica. El cartílago muestra una apariencia normal. La superficie es lisa, los condrocitos están presentes por igual en todas las capas, y la tinción de la matriz es homogénea (x 10). **OA**: rodilla artrósica. Las capas superficial e intermedia del cartílago están desestructuradas y las fisuras alcanzan la zona radial profunda en la zona de mayor sobrecarga mecánica. La celularidad está disminuida y el modelo normal de distribución en columnas se ha perdido (x 20). **OPOA**: rodilla con osteoporosis y artrosis. Se observan anomalías estructurales marcadas con hipocelularidad evidente. Los condrocitos están agrupados en clones y la tinción de la matriz, intensamente disminuida (x 20).

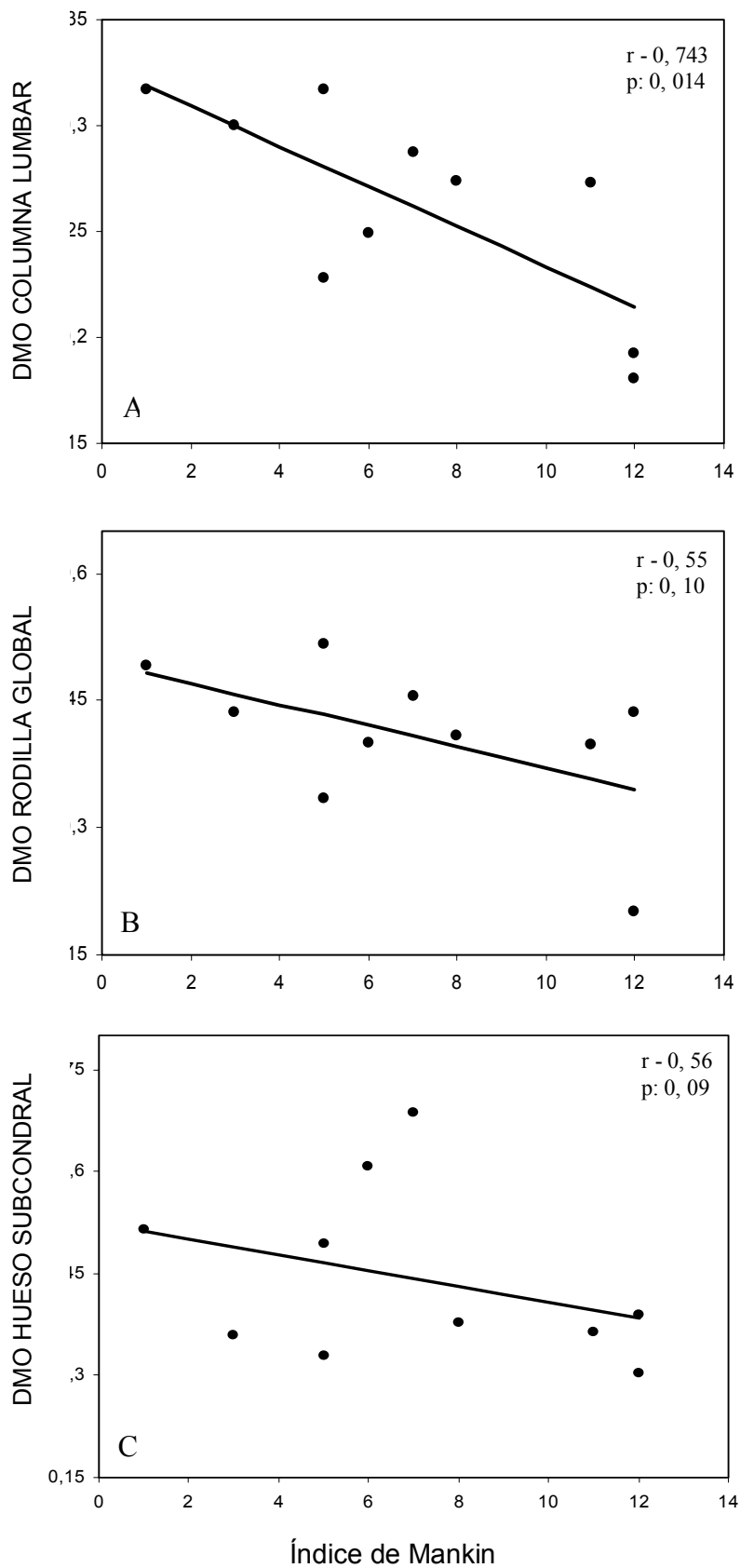


Figura 26. Correlación lineal entre los valores de DMO (g/cm^2) y los hallazgos histopatológicos encontrados en el cartílago y evaluados mediante la escala de Mankin.

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los modelos animales de OP pueden clasificarse en dos categorías principales, de acuerdo al mecanismo utilizado: 1) Modelos con incremento de la resorción: son aquéllos en los que el mecanismo principal involucrado es un incremento en la resorción ósea, v. gr. modelos por deprivación hormonal (ovariectomía, orquiectomía) o por inmovilización; 2) Modelos con disminución de la formación: aquéllos en los que el mecanismo dominante es un defecto en la formación ósea, v. gr. modelo de rata senil, ratones SAM, administración de glucocorticoides (Rodgers JB, 1993; Geddes AD, 1996; Bellino FL, 2000; Turner AS, 2001; Turner RT, 2001; Kimmel DB, 2001). En algunos modelos, pueden existir varios mecanismos patogénicos implicados.

Los clínicos tendemos a asumir con frecuencia que la cercanía filogenética de una especie es un marcador de relevancia a la hora de elegir un determinado modelo, y este axioma no siempre es verdadero. En otras ocasiones, la selección de un modelo depende de si el animal elegido reproduce adecuadamente los aspectos fisiopatológicos que nos interesa elucidar.

La rata OVX es el modelo más utilizado para el estudio de la pérdida ósea por deprivación hormonal, por lo que se considera el “patrón oro” para el estudio de la pérdida ósea principalmente trabecular inducida por la deficiencia de estrógenos (Wronski TJ, 1985; Wronski TJ, 1986; Kalu DN, 1991; Frost HM, 1992; Barlet JP, 1994; Guías FDA, 1994; Dempster DW, 1995; Turner AS, 2001). Algunos autores proponen estrategias mixtas, combinando la OVX con inmovilización o con una dieta pobre en calcio, en un intento de mejorar dicho modelo. Sin embargo, la rata apenas tiene remodelado cortical, por lo que esta especie no es la adecuada para el estudio de las pérdidas originadas en el hueso compacto (Wronski TJ, 1991; Sietsma WK, 1995). Un modelo adecuado debería tener una buena representación de remodelado cortical, debido a que el hueso compacto es extremadamente importante en el mantenimiento de la fortaleza y resistencia óseas. Esto es especialmente importante para el estudio y desarrollo de los nuevos fármacos anabólicos u osteoformadores.

En realidad, no existe el modelo ideal para estudiar la OP postmenopáusica (Bellino FL, 2000). El más idóneo lo constituirían algunas especies de primates, pero la investigación con estos modelos es costosa, laboriosa y no exenta de riesgos. Newman y

cols. proponen la oveja como alternativa a la rata y a otros modelos animales. Sin embargo, también señalan el interés y enfatizan las ventajas del conejo como modelo experimental de OP (Newman E, 1995). Estos mismos autores admiten que existen, sorprendentemente, pocos trabajos utilizando esta especie para estudiar la OP. Los dos principales mecanismos empleados para producir una reducción de masa ósea en el conejo han sido la OVX y la administración de corticoides, pero los resultados con ambos métodos por separado son controvertidos y discordantes (Grardel B, 1994; Southard TE, 2000; Eberhardt AW, 2001).

Por otro lado, el conejo es un modelo excelente para el estudio de algunas enfermedades vasculares (Kushwaha RS, 1981; Hough JL, 1986; Armstrong ML, 1990; Sulistiyani H, 1995; Haarbo J, 1996; Kaplan JR, 1996). Recientemente, la posible interconexión entre las enfermedades vasculares y la OP está despertando un creciente interés en relación con el hecho de que ambas enfermedades coexisten con frecuencia en el mismo paciente. Aunque la prevalencia de las dos entidades es elevada, actualmente se postula la existencia de mecanismos patogénicos comunes que podrían influir negativamente tanto en el metabolismo óseo como en la integridad de la pared vascular. Existen trabajos recientes que sugieren que el sistema RANKL / RANK / OPG podría constituir un nexo paracrino común en estas dos enfermedades, tanto en los modelos animales como en humanos (Bucay N, 1998; Min H, 2000; Sattler AM, 2004; Hofbauer LC, 2004; Yeung RSM, 2004). No obstante, muchos de los mecanismos compartidos por los mediadores del daño vascular y las células óseas están todavía lejos de ser dilucidados. En este sentido, y dada la idoneidad del conejo para el estudio de las enfermedades vasculares, podría representar una especie ideal para estudiar los mecanismos compartidos entre la aterosclerosis y la osteoporosis.

1. DETERMINACIÓN DE LA MASA ÓSEA EN UNA POBLACIÓN DE CONEJOS SANOS Y OSTEOPÉNICOS

El primer propósito de nuestra investigación fue determinar la distribución y características de la masa ósea mediante DXA en una población adulta y sana de conejos albinos de raza Nueva Zelanda. Los resultados de nuestro estudio mostraron que los valores densitométricos del CMO y de la DMO seguían un gradiente de menor a mayor según que la región anatómica analizada fuera la columna lumbar, la rodilla globalmente considerada, el hueso subcondral o la región cortical de la metáfisis proximal de la tibia, respectivamente.

Además, pudimos comprobar que el comportamiento del CMO y de la DMO seguía un modelo de distribución Normal en las diferentes regiones analizadas, a pesar del pequeño tamaño muestral considerado. Pudimos también confirmar la buena correlación existente en la DMO de las diferentes regiones anatómicas entre sí (Castañeda S, 2006).

Asimismo, la reproducibilidad de las medidas mediante DXA, valorada a través de su CV (error de precisión), mostró unos valores entre 2,6 y 3,8%, similares a los encontrados en otras especies animales (Jayo MJ, 1991; Griffin MG, 1993; Casez JP, 1994; Rozenberg S, 1995; Turner AS, 1995; Gala-Paniagua J, 1998). Esta variabilidad fue menor a nivel de la rodilla global, por lo que será en esta región donde encontraremos las medidas más fiables.

La DXA con software de ultra alta resolución es una herramienta de alta precisión, superior a otros procedimientos no invasivos basados en la atenuación de los rayos γ o de los ultrasonidos (Shipp CC, 1988; Sartoris DJ, 1990; Lang P, 1991; Guglielmi G, 1995; Grier SJ, 1996; Gala-Paniagua J, 1998). Sin embargo, todavía son necesarios estudios de validación densitométrica en los modelos animales, al menos hasta que los nuevos métodos capaces de reconstruir datos en tres dimensiones - como la TC cuantitativa o la μ -TC - estén más disponibles; especialmente cuando lo que tratamos de estudiar son estructuras anatómicas relativamente complejas o desconocidas, como es el caso del hueso cortical o del hueso subcondral (Hartke JR, 1998; Turner RT, 2001; Schmidt C, 2003; Veitch SW, 2004).

Los bajos valores de LSC que hemos encontrado en nuestro estudio, unido a la variabilidad (CV) intra-individuo comentada, nos demuestran la alta precisión de las mediciones densitométricas realizadas con esta técnica en nuestro modelo.

En el siguiente tiempo, realizamos una aproximación para determinar las pérdidas de masa ósea que se podrían alcanzar mediante una doble manipulación osteopenizante, combinando una maniobra que incrementase la resorción ósea, como la OVX, con otra cuyo mecanismo fundamental fuera inhibir la osteoformación.

Los resultados de nuestro estudio demuestran que la combinación de OVX y la administración de GC provocaban una pérdida acelerada tanto del hueso trabecular como del cortical. La eficiencia de este modelo experimental combinado se confirmó por el pequeño número de animales necesario para detectar variaciones significativas. Aunque no hay un acuerdo en la literatura acerca de la dosis ideal de corticoides para inducir una pérdida ósea significativa, en un primer experimento nos hemos decantado por dosis medianas de MPH, debido a que a estas dosis parece demostrado un efecto inhibitorio en el remodelado óseo, sin desencadenarse ciertos efectos negativos, como inflamación, necrosis o cambios vasculares en el HS, uno de los tejidos diana en nuestros siguientes experimentos (Eberhardt AW, 2001).

La columna lumbar constituye la localización anatómica más frecuentemente utilizada para monitorizar las variaciones de la masa ósea tanto en humanos como en los modelos experimentales de OP (Wahner HW, 1988; Jayo MJ, 1990; Hansen MA, 1990). En nuestro modelo, hemos demostrado sin embargo que la rodilla global representaba una región excelente, posiblemente la mejor para demostrar tales variaciones, en consonancia con los valores de LSC encontrados y el bajo número de animales necesario para detectar cambios significativos. En esta investigación, hemos utilizado un densitómetro Hologic® QDR-1000/W basado en “tecnología de rayo puntiforme”, en lugar de los nuevos instrumentos basados en “tecnología de abanico”. Esto no supone problema alguno, si tenemos en cuenta los estudios comparativos que han demostrado una excelente correlación entre medidas *in vitro* e *in vivo* con estos dos sistemas de DXA (Faulkner KG, 1993; Barthe N, 1997; Norris SA, 2000; Dal Mas I, 2002).

Recientemente, algunos estudios han sugerido que el HS podría jugar un papel esencial en la etiología y desarrollo de algunas enfermedades articulares, como la OA y

la artritis reumatoide (Pogrud H, 1986; Burr DB, 2004). Dado que estas dos enfermedades coexisten con frecuencia con la OP, y que la interrelación entre la OP y las enfermedades articulares no es bien conocida en la actualidad, parece pertinente definir mejor las características densitométricas de esta región específica. Hasta donde hemos revisado, no existen muchos estudios que evalúen la densidad y contenido mineral óseos del hueso subcondral, y la DXA podría ser una herramienta útil para este propósito.

La presente investigación prueba que la DXA es también una técnica efectiva y precisa para medir la densidad mineral y detectar las variaciones de la masa ósea a nivel del HS. Los valores de DMO encontrados a nivel de la rodilla global y del hueso subcondral de la rodilla fueron intermedios a los detectados en otras zonas más específicas del hueso trabecular o cortical. Más aún, estos valores fueron cuantitativamente más elevados a nivel del HS que en la RG, sugiriendo que el HS podría constituir una estructura de transición entre el hueso exclusivamente trabecular o el cortical puro, con más contenido éste de tejido haversiano. De hecho, los valores de DMO obtenidos mediante DXA en el hueso subcondral, fueron bastante similares a los encontrados en la metafisis proximal de la tibia, por lo que podríamos especular que ambos pudieran tener un comportamiento paralelo en la evolución de la OP.

Finalmente, y en relación con los valores densitométricos encontrados a nivel del hueso cortical, comprobamos que la variabilidad inter-individual de la DMO en dicha zona, mostraba valores extremadamente elevados, hallazgo que también se ha descrito en tibias de cadáveres humanos (Veitch SW, 2004). Esta variabilidad podría explicarse por dificultades tanto en el reposicionamiento del animal de una manera reproducible, como por el hecho de que el hueso a este nivel podría ser más metafisario que diafisario; y contener, por tanto, mayor composición de hueso trabecular que el córtex de la diáfisis media de los huesos largos, que es la región habitualmente evaluada para estudiar el hueso cortical en humanos (Sievanen H, 1992; Casez JP, 1994).

Sin embargo, existen estudios histomorfométricos que demuestran que el hueso aquí estudiado es de predominio cortical (Kaartinen E, 1993), y, en este sentido, los altos valores de CMO y de DMO encontrados en esta investigación, sugieren se trata de un hueso de características densitométricas similares al HC, cuando se compararon con los encontrados por ejemplo en la columna lumbar. No obstante, queda abierta la vía a

nuevas investigaciones espaciales y volumétricas que utilicen otras técnicas más sofisticadas, como la TC microscópica, para clarificar algunos aspectos todavía confusos de la microarquitectura del hueso de la rodilla.

En un intento de hacer una extrapolación a lo que ocurre en el humano, cuantificamos también la variación experimentada en nuestro modelo combinado mediante la transformación matemática del T-score, o número de DE que cada región anatómica se alejaba de la media del “teórico pico” de masa ósea de la misma población antes de cualquier intervención experimental. Comprobamos que las pérdidas de DMO eran similares y tenían un comportamiento paralelo tanto en columna, como en RG y HS, siendo los resultados significativos cuando se compararon con el grupo control no sometido a ninguna intervención. A nivel del hueso cortical metafisario de la tibia, la pérdida fue considerablemente mayor, pero también la dispersión de la medida, reflejo de la elevada variabilidad interindividual, como ya hemos comentado.

Como resumen de este primer estudio, podíamos concluir que era factible provocar pérdidas significativas de la masa ósea en el conejo, mediante la combinación de una OVX bilateral y administración posterior de corticoides. Que el modelo era reproducible, y se podía conseguir una marcada disminución de la masa ósea en hueso trabecular y cortical, y en un corto periodo de tiempo. Además, la DXA era una técnica precisa y fiable para evaluar el CMO y la DMO tanto en hueso trabecular como subcondral.

2. CARACTERIZACIÓN DE NUESTRO MODELO DE OP COMBINADO MEDIANTE OVX E INYECCIONES DIARIAS DE CORTICOIDES

La pérdida ósea inducida por GC se caracteriza por una disminución rápida de la masa ósea del hueso trabecular y cortical (Grardel B, 1994; Chavassieux P, 1997). Asimismo, los corticoides producen un incremento en la resorción osteoclástica y una disminución de la formación ósea a nivel del hueso subarticular (Canalis E, 1996; Weinstein RS, 1998; Eberhardt AW, 2001). Los corticoides pueden ocasionar una parada en la maduración del linaje osteoblástico, así como inducir su muerte celular por apoptosis en fases tempranas (Pereira RC, 2001 y 2002; Canalis E, 2004). En nuestra

investigación, hemos postulado que la combinación de estos dos mecanismos, OVX y corticoides, producirían una pérdida ósea más rápida y de manera más consistente. Sin embargo, las dosis óptimas para inducir pérdidas significativas de la masa ósea en esta especie no están bien estandarizadas. Por otro lado, las dosis elevadas producen con frecuencia necrosis del hueso subcondral e incluso una alta mortalidad en el conejo (Paolaggi JB, 1980; Warman M, 1983; Yamamoto T, 1997; Miyanishi K, 2005).

En nuestro segundo experimento, nos planteamos caracterizar mejor las pérdidas óseas del modelo anterior, comparando la administración de MPH de forma aislada, con la OVX sola, o la combinación de ambas manipulaciones con dosis variables de MPH. Eberhard y cols. demostraron que dosis entre 0,5 y 1 mg/kg/día tenían un efecto exclusivo en el recambio óseo, sin mostrar consecuencias negativas como inflamación, necrosis o cambios vasculares en el hueso subarticular, mientras que con dosis más bajas no encontraron cambios significativos en el hueso trabecular ni en el cortical (Eberhardt AW, 2001). En nuestro caso, hemos utilizado dosis variables de MPH entre 0,5 y 2 mg /kg /día, para averiguar la menor dosis efectiva para inducir osteopenia sin causar efectos deletéreos en el hueso subcondral.

De acuerdo con nuestros datos, la dosis de 1,5 mg/kg/día de MPH utilizada de forma aislada durante 4 semanas indujo una disminución de la DMO tanto en columna lumbar, como en las otras regiones evaluadas. La dosis baja, de 0,5 mg/kg/día, combinada con OVX, fue claramente insuficiente para reducir la masa ósea a nivel de la columna lumbar. Por el contrario, la dosis de 2 mg/kg/día fue letal en todos los animales en los que se ensayó. Por este motivo, y para minimizar otros posibles efectos deletéreos en el hueso subcondral, es por lo que combinamos las inyecciones de corticoides con la OVX, pudiendo asegurar que fue con la dosis de 1 mg/kg/día más OVX, con la que se consiguieron mejores resultados en columna y rodilla global.

El hecho de que se obtuvieran resultados positivos en la rodilla global a esta dosis es muy interesante, puesto que confirma que se puede obtener una reducción significativa de la masa ósea en huesos con diferente composición o cociente hueso esponjoso: hueso compacto. Dicho de otro modo, la disminución de la DMO en el hueso subcondral de la rodilla podría tener implicaciones terapéuticas y experimentales en el estudio de enfermedades donde el hueso subcondral puede desempeñar un papel patogénico relevante. Hay que resaltar además que la estrategia que hemos utilizado ha

sido eficiente para inducir osteopenia en un corto periodo de tiempo, de tan sólo 6 semanas.

Aunque la OVX ha demostrado ser de gran utilidad a la hora de ahorrar corticoides en nuestra investigación, fue insuficiente por separado para reducir la DMO de manera significativa en las regiones evaluadas, tras seis semanas de intervalo. Este hallazgo está en consonancia con la opinión de algunos autores, que sugieren la debilidad del modelo exclusivo por privación de la función ovárica para el estudio de la OP en el conejo (Geddes AD, 1996; Turner RT, 2001; Kimmel DB, 2001). No obstante, y en contra de esta corriente de opinión, tenemos que mencionar que en nuestro estudio se observó una tendencia clara a perder contenido mineral, al menos en columna y rodilla global, aunque los valores no alcanzaran significación estadística. No podemos descartar, por tanto, que otras técnicas más sofisticadas hubieran podido detectar esta pequeña variación, dado que la valoración de la masa ósea mediante DXA, puede no ser suficientemente sensible a cambios tan sutiles (Erben RG, 2000).

Con respecto a la variación de la masa ósea observada a las veintidós semanas de la OVX en los diferentes grupos, pudimos comprobar que la DMO se mantuvo constante en el grupo control durante todo el periodo del estudio. Estos datos animan a pensar en el conejo como especie que alcanza plena madurez esquelética, manteniendo estables los valores de masa ósea, en contraste con otras especies como ratas y ratones, e idoneizan este modelo para el estudio de los fármacos que actúan sobre el remodelado óseo (Gilsanz V, 1988). Asimismo, la variación observada en el grupo OVX fue mínima en las diferentes regiones estudiadas, a excepción de un pequeño descenso de la DMO en columna lumbar, que no llegó a alcanzar significación estadística. La pérdida ósea se mantuvo estable en los dos grupos combinados de OVX y MPH seguidos durante este periodo. Sin embargo, y mientras que la disminución de la DMO sólo fue significativa en la rodilla global en el grupo con la dosis baja de MPH, la pérdida mantuvo la significación estadística en columna y rodilla global en el grupo de dosis intermedia, confirmando una vez más la consistencia del modelo propuesto. Las pérdidas en el HS, aunque marcadas, no alcanzaron significación posiblemente por la dispersión encontrada y al bajo número de animales utilizados para el seguimiento.

El hecho de no encontrar variaciones significativas en el grupo de sólo OVX, plantearía la posibilidad de una producción hormonal endógena ectópica tras la OVX,

que podría sustituir el déficit estrogénico tras la castración del animal. Sin embargo, y en contra de esta hipótesis, pudimos demostrar que los niveles hormonales de estradiol se mantenían significativamente bajos veintidós semanas después de la OVX. Es posible que exista la producción de otras hormonas sexuales a nivel de la grasa corporal, que el conejo tiene en abundancia, como estrona, estriol o los andrógenos adrenales (dehidroepiandrosterona y androstenodiona), que podría explicar el hecho de que la pérdida ósea que ocurre tras la OVX del conejo sea tan variable y no presente la intensidad de otras especies animales, incluida la especie humana. El incremento de los niveles séricos de triglicéridos durante el seguimiento, creemos se debe más a las inyecciones de MPH que a la OVX, aunque no podemos descartar el posible papel que las otras hormonas mencionadas pudieran desempeñar en este incremento.

De todos los hechos comentados, podría argumentarse que el modelo que presentamos provoca una osteopenia en condiciones poco fisiológicas. Sin embargo, y como ya hemos comentado, es un método consistente, fácil de conseguir y altamente reproducible. En este sentido, otros autores ya han utilizado maniobras combinadas para inducir OP en varios modelos animales (Mosekilde L, 1993; Chavassieux P, 1997; Lill CA, 2002a; Lill CA, 2002b). Especialmente, la dieta restringida en calcio y la inmovilización han sido los más utilizados en combinación con la depleción hormonal o la administración de corticoides en varias especies animales. Actualmente, se está probando un método consistente en OVX en combinación con una dieta exenta en calcio en ovejas, para conseguir un grado de osteopenia similar a la que se detecta en la OP humana (Turner AS, 2001). La administración de GC a la rata, por ejemplo, no logra reducir la masa ósea de una manera significativa a menos que se asocie con otras medidas osteorreductoras, como una dieta ausente de calcio.

Finalmente, Lill y cols. han utilizado el mismo método que nosotros - OVX y corticoides - en ovejas, con unos resultados todavía más espectaculares, puesto que han obtenido una disminución de la masa ósea en columna de hasta un 40% y, lo que todavía es más interesante, una alteración en los estudios biomecánicos de compresión (Lill CA, 2002b).

En resumen, en este segundo experimento hemos podido confirmar la pérdida ósea ya apuntada en el estudio anterior, en un modelo combinado de OVX más MPH a dosis medias. Además, mediante esta doble manipulación, se pueden obtener resultados

positivos en pocas semanas, con lo que se acortan los tiempos de estudio y minimizamos posibles efectos nocivos de los corticoides a dosis elevadas o durante periodos más prolongados. Asimismo, las variaciones encontradas se mantenían constantes veintidós semanas después de la OVX en los diferentes grupos analizados.

3. INFLUENCIA DE LA OP EN LA EVOLUCIÓN DE LA OA EN NUESTRO MODELO COMBINADO

3.1. Estudios epidemiológicos:

La relación entre la OP y la OA ha despertado un creciente interés en los últimos años. Sin embargo, los estudios relacionados con este tema son confusos y contradictorios. Esta controversia se debe en parte a la falta de estudios secuenciales, pues la mayoría de datos obtenidos proceden de estudios cruzados o transversales.

Existe una importante corriente de opinión, que podríamos definir como clásica, que defiende la existencia de una relación inversa entre estas dos entidades basada en la hipótesis biomecánica postulada en los años 70 y 80 por Radin y Rose (Radin EL, 1972; Radin EL y Rose RM, 1986), y defendida posteriormente por algunos grupos de autores (Carlson A, 1979; Pogrand H, 1982; Dequeker J, 1983, 1993a, 1993b, 1995, 2003; Hanan MT, 1993; Hart DJ, 1994; Nevitt MC, 1995; Burger H, 1996; Sambrook P, 1997; Sowers M, 1999; Stewart A, 2000). No obstante, los diseños de gran parte de los estudios que defienden este argumento no fueron siempre adecuados, ni tampoco se tuvieron siempre en cuenta algunas variables de confusión como la edad, el peso, la actividad física, la edad y tiempo de menopausia, el tratamiento estrogénico previo o factores genéticos, etc. que podrían influir en la evolución de estas dos enfermedades.

Sowers y cols. publicaron en 1991 un estudio prospectivo intentando despejar alguna duda sobre la relación entre masa ósea y OA de mano, y encontraron que las mujeres con más lesiones artrósicas en la mano, tenían más masa ósea a nivel de los metacarpianos, antes incluso del diagnóstico de la artrosis (Sowers M, 1991). Como parte del estudio Rotterdam, se demostró también que la población con artrosis en varias localizaciones, presentaba una DMO significativamente más elevada. Así, con la

excepción de la OA de rodilla en hombres, la artrosis de cadera en ambos sexos y la de rodilla en mujeres, se asoció con valores más elevados de DMO hasta de un 3-8% a nivel del cuello femoral (Burger H, 1996).

En un trabajo de corte transversal, el “Estudio de las Fracturas Osteoporóticas”, se estudió la asociación entre los hallazgos radiográficos de la OA de cadera y la masa ósea en cadera, columna y esqueleto apendicular en 4.855 mujeres americanas de raza caucásica. Se encontró que las mujeres con OA de cadera grados 3-4 de Kellgren, tenían la DMO más alta a nivel del cuello femoral, triángulo de Ward, trocánter, columna lumbar (8%), radio distal y calcáneo (5%), que las que tenían OA grado 1-2, incluso tras ajustar los resultados por edades (Nevitt MC, 1995).

Otros autores encuentran también una asociación entre artrosis de rodilla y masa ósea incrementada en la columna lumbar y cuello femoral (Cooper C, 1991; Hanan MT, 1993; Hart DJ, 1994). En un estudio más reciente de cohorte longitudinal, cuyo objetivo primario era evaluar la repercusión y variaciones de la DMO en la incidencia y progresión de la OA de rodilla, se demostró una relación directa entre masa ósea y artrosis prevalente de rodilla, mientras que la progresión de la artrosis, valorada radiológicamente mediante la cuantificación del espacio articular, era menor cuanto mayor la masa ósea (Zhang Y, 2000). En la misma línea se encuentran los resultados del estudio Chingford, donde se demuestra un riesgo incrementado de artrosis de rodilla en la población con mayor contenido mineral en cadera y columna, pero también se apreció una menor progresión de la artrosis en la misma población. Aquí, los resultados sí fueron ajustados a variables como edad e índice de masa corporal y, en el caso de la DMO en columna, para la presencia de OA previa en columna lumbar (Hart DJ, 2002). Otras variables de confusión, como: tabaquismo, tratamiento estrogénico, alcohol, edad de menopausia, clase social y actividad física, no mostraron diferencias en los resultados.

En otro estudio, los pacientes con OA de cadera, rodilla y mano tenían también valores de DMO más altos, con una menor tasa de fracturas para la OA de rodilla y mano tras un seguimiento de más de siete años. Sin embargo, los autores no encontraron disminución del riesgo de fracturas en el caso de la OA de cadera, que atribuyeron a un mayor riesgo de caídas en estos pacientes (Arden NK, 1999).

Desde el punto de vista fisiopatológico, existen trabajos que demuestran que, no sólo la DMO, sino también la rigidez, la fortaleza ósea y el contenido en osteocalcina en biopsias de cresta ilíaca, eran mayores en pacientes con OA de mano que en controles (Gevers G, 1989a; 1989b).

De todo lo expuesto, se podría deducir que, efectivamente, hay sospechas más que razonables de una asociación inversa entre las dos enfermedades, sobre todo en mujeres y en grandes articulaciones de carga, especialmente de los miembros inferiores. Sin embargo, lo que no parece tan claro es que exista diferencia en cuanto al número o tasa de fracturas entre la población con o sin artrosis.

Por el contrario, existen estudios donde no se encuentra una relación tan clara entre ambas, y donde los valores mayores de DMO que presentan los pacientes con OA axial o generalizada, podrían deberse a artefactos (osteofitos en columna, escoliosis pronunciada, etc.) o a una técnica defectuosa en el posicionamiento de los pacientes (Reid DM, 1984; Orwoll S, 1990; Dawson-Hughes B, 1990; Haddaway MJ, 1990; Laitinen K, 1991). Este hecho parece menos evidente entre masa ósea y OA de manos. Así, en el estudio longitudinal Baltimore, no encontraron relación entre la masa ósea en el esqueleto apendicular y la artrosis de la mano en mujeres de raza caucásica de más de 40 años, después de ajustar para la edad y el índice de masa corporal (Hochberg MC, 1995). En un estudio histopatológico, aunque con escasas muestras, con biopsias de cresta ilíaca en pacientes con OA de rodilla, cadera y tobillo, se encontró una relación directa entre OA y OP, expresada ésta como disminución del volumen óseo trabecular (Ng MC, 1984). Otros estudios en esta línea, muestran también una relación directa entre alteraciones de la masa ósea, la mineralización o las propiedades biomecánicas en pacientes con OA de manos (Gevers G, 1989a; 1989b).

Otra posible explicación es que la disminución en la actividad física secundaria a una artrosis más avanzada, a la edad o a otros factores, conduciría a una pérdida de masa ósea, que podría enmascarar la interrelación entre OP y OA (Lane NE, 1994). Esta teoría viene avalada por la evidencia de que la OA de cadera y rodilla no sólo se asocia a una menor masa ósea en algunos trabajos, sino también a un incremento del “turnover óseo” (Burger H, 1996).

Si existe confusión en cuanto a la interconexión entre estas enfermedades, todavía es mayor cuando intentamos aclarar los posibles mecanismos involucrados. Es

probable que existan factores genéticos mal conocidos que podrían estar jugando un importante papel en la patogenia de estas dos entidades. Es bien conocida la influencia de la genética en la adquisición del pico de masa ósea, y que explicaría hasta un 70-80% de la masa ósea del individuo adulto (Pocock NA, 1987). Existen también estudios en gemelos que sugieren la importancia de los factores genéticos en la artrosis de mano y rodilla (Spector TD, 1996). Es muy posible la existencia de varios factores de riesgo compartidos. Dequeker y cols. defiende la existencia de dos fenotipos bien diferenciados que representarían dos polos opuestos: la “mujer osteoporótica” con fenotipo más liviano, talla más baja, menos grasa y masa muscular; en contraposición a la “mujer artrósica” de edad similar, con mayor tamaño esquelético, más peso, más grasa, masa muscular y fortaleza física (Dequeker J, 1983a).

Llegados a este punto, es necesario mencionar la importancia que el hueso subcondral podría desempeñar en la patogenia inversa entre OA y OP (Radín EL, 1986; Dequeker J, 1995; Nevitt MC, 1995). Según estos autores, la rigidez y densidad del HS, como parte de una mayor densidad ósea generalizada, contribuiría a una progresión acelerada de la OA debida a una mayor disfunción condrocitaria. Asimismo, determinadas citocinas y factores de crecimiento podrían justificar esta asociación. Así, el factor de crecimiento 1 similar a insulina (IGF-1) parece tener receptores en hueso y cartílago, que tendrían un papel anabólico tanto en el hueso (osteoformación) como en el condrocito (osteofitosis), y que podría explicar esta asociación inversa en algunos pacientes (Lloyd ME, 1996). De igual modo ocurriría con el factor de crecimiento transformante β (Dequeker J, 1993b).

De todo lo comentado hasta ahora, deberíamos concluir que podría existir una relación inversa entre OA y OP, especialmente en las formas periféricas de artrosis y en sus etapas iniciales, aunque esta asociación quedaría enturbiada por algunas variables de confusión difíciles de eliminar en los estudios humanos. Por el contrario, esta relación podría invertirse según avanza la artrosis, existiendo un efecto directo entre osteoporosis y artrosis periférica a lo largo de su evolución. Sin embargo, la asociación entre OA y fracturas, sean éstas vertebrales o periféricas, es mucho más débil y confusa. Por otro lado, la relación entre OA generalizada, espondiloartrosis y osteoporosis está menos estudiada.

Dado que no existen métodos disponibles para el estudio de las fases iniciales de la OA en humanos, es prácticamente imposible establecer el papel que la OP puede desempeñar en la etiopatogenia de la OA en las primeras fases de su evolución. Con este objetivo, se hace necesario acudir a los modelos experimentales, donde ambas patologías pueden inducirse de manera independiente, sin la interferencia de algunas variables de confusión que podrían influir en su desarrollo.

En esta investigación hemos desarrollado un modelo experimental de OP y OA en el conejo, donde la incidencia e interacción de ambas se ha estudiado de una manera longitudinal; y al contrario de la opinión más convencional y generalizada, hemos podido comprobar en nuestro estudio, una relación directa desde el inicio entre estas dos enfermedades. Es importante resaltar que, en nuestro modelo, se pueden descartar algunas de las variables de confusión del humano, al tratarse de una raza genéticamente homogénea, todas hembras, con un peso y masa corporal homogéneos, y con el mismo tiempo de evolución desde la OVX.

3. 2. Estudios mediante RM:

La RM ofrece unas cualidades excelentes para el estudio secuencial de la lesión artrósica desde su inicio, por la elevada resolución espacial que aporta sin dañar el cartílago. Se han propuesto múltiples secuencias para mejorar el contraste del cartílago hialino con el líquido sinovial y el hueso subcondral y hasta la fecha no existe un consenso acerca de cual es la ideal para estudiar el cartílago (Loeuille D, 1998; Dedrick DK, 2000). Las secuencias eco de gradiente ofrecen una amplia gama de contrastes y permiten obtener información volumétrica (Klandy B, 1999; Graichen H, 2000; Hardy PA, 2001). Entre éstas, las secuencias con tiempos de eco cortos y ángulos de inclinación relativamente grandes, proporcionan imágenes potenciadas en T1 en las que el líquido articular es menos intenso que el cartílago, y la grasa se suprime eficazmente contrastando el cartílago al máximo (Recht MP, 1993). Por ello, las secuencias con supresión grasa han demostrado ser las mejores para cuantificar el cartílago articular (Peterfy CG, 1995; Eckstein F, 1998; Graichen H, 2000; Glaser C, 2001). La secuencia eco de gradiente con supresión grasa utilizada en este estudio proporciona un buen contraste entre el cartílago y las estructuras adyacentes.

Además de los problemas de contraste, también existen problemas de valoración debido a que la resolución espacial de los sistemas convencionales de RM es limitada, al tratarse de un tejido que representa una capa muy fina en relación con el tamaño del “pixel” utilizado. El error puede aumentar si consideramos que el cartílago tiene superficies curvas. Éste es el motivo de la escasa correlación comunicada en algunos trabajos entre las medidas realizadas con los sistemas de RM empleados en clínica y las medidas en las piezas anatómicas (Yeh LR, 1998). A diferencia de los sistemas de RM convencionales, aquéllos que utilizan gradientes de alto campo pueden solucionar este inconveniente. Sin embargo, esta tecnología todavía no se ha aplicado en estudios cuantitativos. El tamaño del pixel conseguido en este trabajo expresa una resolución espacial excelente, capaz de detectar mínimas variaciones de grosor en un cartílago tan fino como el de la rodilla del conejo.

Entre las alteraciones morfológicas más precoces evidenciables por RM en la artrosis, se encuentran las variaciones en la intensidad de señal del cartílago, que pueden manifestarse como simples cambios focales (Gahunia HK, 1995; Borthacur A, 2000) o como una alteración en el aspecto plurilaminar del tejido (Carpenter TA, 1995; Loeuille D, 1997). Sin embargo, el estudio de estos parámetros puede estar sujeto a determinados artefactos (Erickson SJ, 1996; Xia Y, 2000), por lo que para investigar los cambios iniciales de la artrosis por RM, se aconsejan estudios cuantitativos.

Los estudios cuantitativos del cartílago utilizados habitualmente se basan en el análisis de las modificaciones en los tiempos de relajación en T1 y T2 y en la determinación de las variaciones en el espesor o el volumen del tejido.

Los estudios del grosor del cartílago tienen la ventaja de que permiten evaluar de forma separada las diferentes zonas de la superficie articular. Los estudios que cuantifican el espesor del cartílago con RM han quedado perfectamente validados y han demostrado una excelente correlación anatómica (Klandy B, 1999; Cova M, 2000; Hardy PA, 2001; Calvo E, 2004). La técnica computarizada utilizada por nosotros permite detectar cambios mínimos en la intensidad de señal, por lo que la superficie del cartílago puede distinguirse fácilmente de las estructuras adyacentes. De este modo, se pudieron estudiar las variaciones en el espesor del cartílago en diferentes zonas de la articulación. La utilización de un método automatizado de medición del grosor del cartílago basado en la aplicación del análisis digitalizado de la imagen proporciona un

método alternativo que se ha mostrado más eficaz que aquellos que realizan la medición “a ojo desnudo” (Tan TC, 1996; Yeh LR, 1998; Cohen ZA, 1999; Stammberger T, 1999). El método descrito en este trabajo es especialmente útil para analizar articulaciones pequeñas que tienen una cantidad mínima de líquido entre las superficies opuestas del cartílago.

En nuestro estudio, hemos demostrado que no existían diferencias ni en el grosor ni en la morfología del cartílago entre los dos grupos de animales seis semanas tras la OVX, y justo antes de operarles la rodilla, como tampoco se detectaron cambios a nivel del hueso subcondral. Esto descartaría cualquier efecto deletéreo local de los corticoides a las dosis utilizadas en nuestro modelo. El hecho de que el grosor medido fuera similar en ambos grupos, descarta también un posible efecto nocivo de la OVX y de la depleción estrogénica en este momento de la evolución.

Desde que varios autores demostraron la existencia de receptores estrogénicos en el condrocito, a través de los cuales los estrógenos modularían ciertas funciones del metabolismo condrocitario (Dayani N, 1988; Richmond RS, 2000; Claassen H, 2001; Nilsson LO, 2001; Richette P, 2003; Gokhale JA, 2004), existen bastantes trabajos que demuestran un probable efecto condroprotector de los estrógenos en la articulación, y que luego comentaremos más detenidamente. Sin embargo, no podemos descartar cambios sutiles en la histología del cartílago en estas fases tempranas, al no disponer de muestras histológicas, dado que este objetivo no constituía un objetivo primario de nuestro proyecto inicial.

En el seguimiento evolutivo de nuestro modelo, sí pudimos demostrar una disminución significativa en el grosor del cartílago del grupo OPOA, con respecto al grupo artrósico sin OVX previa, a las 16 de la meniscectomía, a pesar del pequeño tamaño de la muestra evaluada. Este dato apoyaría el efecto perjudicial de la osteoporosis en la evolución del daño cartilaginoso. Además, y aunque fue evidente en los tres sectores considerados en los que habíamos dividido tanto el cartílago femoral como el tibial, la disminución del espesor fue mucho más llamativa en el tercio posterior del cóndilo femoral interno, en la zona de contacto con la meseta tibial. Estas regiones se corresponden con las zonas anatómicas que soportan una mayor carga mecánica, ya que en condiciones normales el conejo camina con la rodilla flexionada, y es esta zona donde inciden los mayores impactos mecánicos (Calvo E, 2001b). Se sabe

también que el grosor del cartílago en el compartimiento medial de la rodilla del conejo permanece constante durante el periodo de maduración esquelética (Wei X, 1998), por lo que no habría errores derivados de una variación en su espesor por crecimiento del animal. Estos hallazgos han sido ya demostrados por otro miembro del grupo y otros autores, que es precisamente en la zona posterior del cóndilo femoral medial donde se encuentran las lesiones cartilagosas más tempranas en esta especie, y en este modelo concreto de OA experimental (Calvo E, 2001b y 2004).

3. 3. Resultados histopatológicos:

La OP experimental inducida mediante la OVX e inyecciones de corticoides en nuestro modelo combinado, ocasionó alteraciones evidentes en el cartílago articular de la rodilla. Además, las lesiones cartilagosas inducidas por la menisectomía y la sección del LCA, fueron significativamente más severas en el grupo de conejos OP.

Desde el punto de vista histopatológico, observamos una disminución significativa de la tinción de la matriz en los conejos OP sin OA con respecto a las rodillas control. Asimismo, pudimos comprobar alteraciones significativas en la celularidad y en la tinción de la matriz en el grupo de conejos OPOA, cuando se compararon con las rodillas sanas y con los conejos OP, que mostraron una clara tendencia a la significación con respecto a las rodillas OA. Calvo y cols. demostraron en un estudio reciente de corte longitudinal, que el primer hallazgo detectado en un modelo de OA experimental en conejos, es precisamente una disminución de la tinción de la matriz seguida de una alteración en la celularidad; mientras que los cambios en la estructura del cartílago o las alteraciones de la línea limitante basófila, aparecían en fases más avanzadas (Calvo E, 2004). Nuestros hallazgos sugieren que la OP acelera el daño a nivel del cartílago sin alterar la secuencia de acontecimientos histopatológicos que acontecen en la OA. La valoración global mediante la escala de Mankin mostró que los hallazgos encontrados en las rodillas OPOA eran significativamente más acusados que en el resto de grupos estudiados, lo que se correspondía con los datos parciales encontrados en la valoración de las alteraciones histológicas por separado.

Dado que existen algunos trabajos que indican que los corticoides por vía sistémica pueden provocar daño a nivel del cartílago, es posible argumentar que la

degeneración cartilaginosa detectada en nuestro modelo experimental pudiera estar influenciada por la administración transitoria de MPH (Ribbens C, 2002). Fue una de las razones por las que realizamos el estudio mediante RM de alta resolución previo a inducirles la OA. Calvo y cols. demostraron en el mismo modelo experimental que, esta técnica, tal como la hemos hecho, es suficientemente sensible como para detectar cambios en el espesor del cartílago en etapas muy incipientes de la artrosis (Calvo E, 2001), y que este hallazgo se correlacionaba histopatológicamente con cambios en la tinción de la matriz, que indicaban una depleción de proteoglicanos (Calvo E, 2004). Puesto que no pudimos detectar lesiones articulares en la RM realizada antes de la intervención de rodilla, pensamos que las alteraciones encontradas a nivel del cartílago en nuestro modelo fueron debidas propiamente a la OP y a la OA.

El hecho de que las alteraciones del cartílago se vieran más acentuadas en los conejos OP con OVX es consistente con datos de estudios previos que indican que la incidencia y prevalencia de OA en humanos está incrementada en la mujer postmenopáusica (Spector TD, 1991; Inoue K, 1995; Felson DT, 1995; Felson DT, 1999; Erb A, 2000; Wluka AE, 2000). Algunos trabajos recientes demuestran la existencia de receptores estrogénicos a nivel del cartílago y apuntan la idea de un teórico “papel condroprotector” de los mismos en la evolución de la artrosis (Felson DT, 1998; Sandell LJ, 2001; Richette P, 2003; Gokhale JA, 2004).

Ushiyama y cols. publicaron ya en 1998 una posible relación entre la OA generalizada y determinados polimorfismos genéticos del receptor estrogénico (Ushiyama T, 1998). Más recientemente, Claassen y cols. demuestran, con técnicas inmunohistoquímicas, la presencia del receptor estrogénico alfa en condrocitos articulares de vacas, cerdos y humanos, mediante la utilización del anticuerpo 13H2 (Claassen H, 2001). Otros autores han comunicado también la presencia de receptores estrogénicos en cartílago articular de perro, conejo y babuino (Young PC, 1982; Rosner IA, 1982; Sheridan PK, 1985). Richette revisa el papel de los estrógenos en el metabolismo del cartílago y en la artrosis, señalando que se han identificado los dos receptores estrogénicos, alfa y beta, tanto en cartílago sano como artrósico (Richette P, 2003).

Todos estos datos vienen avalados por estudios *in vitro* y en modelos animales. En este sentido, Bellino ya demostró actividad enzimática 17-beta-hidroxi

dehidrogenasa con capacidad de convertir estrona en estradiol, a nivel de cartílago y condrocitos en cultivo de conejos hembra inmaduros (Bellino FL, 1992). En estudios más recientes, Claassen y cols. comprobaron que la MEC del cartílago articular de cerdos enanos, sometidos a condiciones de privación estrogénica, experimentaba cambios similares a los encontrados en cartílago envejecido, con incremento en la proporción de glicosaminoglicanos sulfatados pesados (Claassen H, 2002). En otro estudio en monos *Cynomolgus*, Ham y cols. encuentran que el tratamiento prolongado con estrógenos induce una elevación de niveles IGFBP-3 en el cartílago articular, como muestra de un metabolismo condrocitario incrementado (Ham KD, 2002). En un trabajo mucho más antiguo, utilizando ratones macho con predisposición genética a la artrosis, Silberberg encontró que el tratamiento hormonal disminuía la incidencia y severidad de las lesiones artrósicas (Silberberg M, 1963).

Sin embargo, no todos los estudios en modelos animales confirman los mismos resultados. Algunos autores encuentran, justo al contrario, que los estrógenos tendrían un efecto depresor sobre el metabolismo condrocitario en cartílago hialino costal normal de rata y en cartílago epifisario de conejo (Priest R, 1960; Bernstein E, 1968). En esta línea del posible “efecto condrodestructor” del cartílago ocasionado por los estrógenos, Rosner y cols. demostraron que la administración de estrógenos a conejas ooforectomizadas vírgenes producía un incremento aparente de las lesiones artrósicas (Rosner IA, 1979 y 1980). Song y cols. estudiaron los efectos de los estrógenos y progestágenos en la expresión de MMP, inhibidores titulares de MMP e IL-1beta en la sinovial del conejo artrósico, concluyendo que los efectos de los diferentes compuestos a nivel del cartílago dependerían de la dosis utilizada, y que tanto los estados de deficiencia estrogénica como los niveles demasiado elevados, serían perjudiciales por un igual para la homeostasis del cartílago articular (Song YJ, 2003).

Más recientemente, Hoegh-Andersen y cols. han validado un modelo de OA lenta en ratas OVX, que podría remedar la OA postmenopáusica humana, en el que se demuestra que los estrógenos tienen un claro “efecto nutritivo y condroprotector” sobre el cartílago. Además, en este artículo se demuestra que la OVX induce un modelo de OA lenta en rodillas en el que demuestran una elevación de los biomarcadores de destrucción del cartílago, principalmente en las primeras semanas tras la OVX; y posteriormente, la aparición de fisuras y lesiones a nivel del cartílago, menos llamativas

que las observadas en las OA inducidas por métodos quirúrgicos, que simularían lo que ocurre en la evolución lenta de la artrosis humana (Hoegh-Andersen P, 2004).

Todos estos resultados contradictorios encontrados en los estudios animales enfatizan la naturaleza heterogénea de la artrosis, y reflejan una vez más la ausencia de un modelo animal que simule y reproduzca con exactitud y fiabilidad lo que acontece en la OA generalizada del humano. Probablemente no es igual comparar un modelo de artrosis genética que otro inducido quirúrgicamente, como tampoco lo sea comparar un modelo en ratón macho que otro en hembras OVX (Sandell LJ, 2001; Richette P, 2003; Gokhale JA, 2004).

Tampoco hay una opinión uniforme con lo que ocurre en los humanos. Así, existen algunos estudios epidemiológicos observacionales e incluso algunos ensayos recientes de intervención que soportan el papel beneficioso de los estrógenos en la evolución de algunas formas de artrosis (Samanta A, 1993; Nevitt MC, 1994; Nevitt MC, 1996; Zhang Y, 1998). En el estudio Chingford, Spector y cols. encuentran una relación inversa entre la utilización del tratamiento hormonal sustitutivo y los hallazgos radiológicos de la artrosis de rodilla, después de ajustar a variables como la histerectomía, actividad física, clase social y tabaquismo. La relación beneficiosa de los estrógenos fue más débil a nivel de la OA de mano (Spector TD, 1997). En un estudio reciente, Ravn y cols. demuestran que el tratamiento con estradiol en pauta oral y transdérmica disminuyen los productos de degradación del colágeno tanto del hueso como del cartílago tras un año de tratamiento, sugiriendo que esta pauta protegería frente a la OP y la OA (Ravn P, 2004). En una editorial reciente, Reginster defiende el papel de los estrógenos como modificadores de progresión estructural en la artrosis, particularmente de los miembros inferiores (Reginster JY, 2003). No obstante, otros autores no han encontrado este posible efecto beneficioso. Así, Nevitt y cols. no encontraron ningún beneficio sobre el dolor y la discapacidad de la OA de rodilla, tras 4 años de tratamiento con estrógenos y progestágenos frente a placebo (Nevitt MC, 2001; Rosner IA, 1986; Turner AS, 1987). También hay autores que defienden que el “efecto condroprotector” de los estrógenos sobre el cartílago, podría verse contrarrestado por la utilización conjunta de progestágenos (Fernihough JK, 1999; Nevitt MC, 2001; Ham KD, 2002).

Además de este efecto directo de los estrógenos sobre el cartílago articular, existiría otro escalón de actuación a nivel del hueso subcondral que, como hemos comentado, desempeña un papel predominante en el desarrollo y progresión de la artrosis establecida (Radin EL, 1986; Burr DB, 1987; Manicourt DH, 1999). La idea actualmente en boga es que los fármacos antirresortivos óseos en general (bisfosfonatos, estrógenos, calcitoninas) podrían influir en la evolución de la artrosis como moduladores del remodelado y metabolismo del hueso subcondral (Manicourt DH, 1999; Muehleman C, 2002; Spector TD, 2003; Hayami T, 2004; Cohen SB, 2004). En uno de los estudios mencionados anteriormente, utilizando monos *Cynomolgus*, Ham y cols. encontraron que el tratamiento prolongado con estrógenos disminuía la lesión histológica artrósica tanto en cartílago como en el hueso subcondral en la necropsia de los animales, cuando se comparaban con los tratados exclusivamente con soja o los no tratados (Ham KD, 2002). En un trabajo más reciente, Hayami y cols. demostraron un claro efecto condroprotector del alendronato mediante biomarcadores de degradación del cartílago y criterios histopatológicos en un modelo de OA por sección del LCA en ratas (Hayami T, 2004). Los autores encuentran además que alendronato disminuye el reclutamiento de osteoclastos a nivel del hueso subcondral, inhibe la invasión vascular en el cartílago calcificado y reduce la formación de osteofitos de una manera dosis dependiente (Hayami T, 2004).

Existen también algunos trabajos en humanos que demuestran el posible efecto beneficioso de risedronato, alendronato y calcitonina en la disminución de lesiones en el hueso subcondral y mejoría de los síntomas y evolución de la artrosis de mano y rodilla (Cohen SB, 2004; Doschak MR, 2004; Doschak MR, 2005; Spector TD, 2005; Bingham CO, 2006; Karsdal MA, 2006; Buckland-Wright JC, 2007). Carbone y cols. publicaron un estudio de corte transversal, en el que analizaron el posible efecto de diversos antirresortivos óseos (estrógenos, raloxifeno y alendronato) en la evolución de la artrosis de rodilla en una población de mujeres ancianas (Carbone LD, 2004). La evaluación del estado articular se realizó tanto desde el punto de vista clínico (dolor por escala WOMAC), como por radiografías y RM. Estos autores encontraron que, tanto el uso de alendronato como el de estrógenos, se asoció con una menor incidencia de edema y quistes óseos en el hueso subcondral, cuando los resultados se compararon con

las enfermas que no habían tomado medicación (Carbone LD, 2004). El alendronato reducía también la intensidad del dolor cuantificado mediante la escala de WOMAC.

De todo lo dicho, parece que actualmente existen más datos del posible papel condroprotector y nutritivo de los estrógenos endógenos sobre el cartílago articular, con un posible efecto beneficioso adicional de los mismos, así como de otros antirresortivos óseos, en el hueso subcondral de las articulaciones, lo que podría modificar de forma favorable la evolución de la artrosis, tanto en modelos animales como en humanos.

Finalmente, es interesante reseñar que, no sólo la OVX y/o la OP incrementaron la lesión cartilaginosa en nuestro modelo de OA, sino que además la gravedad de las lesiones histológicas correlacionaron bien con la cantidad de DMO perdida en columna y rodilla global, corroborando una relación directa entre las dos enfermedades.

Respecto al hueso subcondral, la DMO fue significativamente más baja en las rodillas OPOA que las rodillas OA en nuestra investigación. En este sentido, también se han detectado valores de DMO más bajos de lo normal en cabeza femoral y rodillas de pacientes con artrosis severa de cadera y rodilla, respectivamente (Li B, 1997; Karvonen RL, 1998). Aunque es innegable el papel del hueso subcondral en la patogenia y evolución de la artrosis, se desconocen muchos de los mecanismos últimos. A la luz de los hallazgos comentados, y en consonancia con la opinión de algunos autores, es posible que la menor densidad detectada en el HS, y por extensión una menor resistencia, volverían al cartílago suprayacente más susceptible a los impactos mecánicos diarios, originando un empeoramiento en la evolución de la artrosis.

En resumen, la OP incrementa la gravedad de la lesión artrósica en un modelo de OA experimental. Dado que los condrocitos presentan receptores estrogénicos, este efecto de la OP en la evolución de la OA, podría deberse en parte a la disminución del efecto condroprotector de los estrógenos en el cartílago tras la OVX. Por otro lado, la debilidad del hueso subcondral osteopénico podría contribuir también al empeoramiento de las lesiones histológicas encontradas. Nuestros resultados no permiten concluir de manera fehaciente si la aceleración de la OA en nuestros animales OP, es consecuencia de una insuficiencia hormonal, de una insuficiencia biomecánica del hueso subcondral, o de ambas. Sin embargo, creemos haber contribuido con esta investigación a despejar algunas incógnitas en la compleja patogenia de dos enfermedades frecuentes en la clínica diaria, así como de su intrincada interrelación.

Resumen final

En la presente investigación hemos caracterizado un nuevo modelo experimental de OP. El conejo es una especie utilizada con excelentes resultados en el estudio de enfermedades como la artrosis y algunas enfermedades cardiovasculares. No obstante, su aplicación al estudio de la OP no se ha generalizado debido a que la deprivación estrogénica no ha conseguido inducir OP en esta especie.

Por otro lado, el hueso subcondral está cobrando una importancia creciente en los últimos años en la patogenia de las enfermedades articulares. Aunque sus características morfométricas, densitométricas y biomecánicas no son bien conocidas, muchos autores creen que el hueso subcondral desarrolla un papel esencial en la progresión de enfermedades como la artrosis o la artritis reumatoide.

En la presente investigación hemos empleado conejos, especie con remodelado trabecular y cortical demostrados y hemos estudiado regiones anatómicas con una distinta proporción de hueso trabecular y cortical como la columna lumbar, la rodilla globalmente considerada y cuatro subregiones localizadas en los cóndilos femorales y ambas mesetas tibiales. Para ello, hemos puesto a punto un nuevo modelo de OP en conejos albinos de raza Nueva Zelanda maduros mediante una doble manipulación consistente en OVX e inyecciones de metilprednisolona durante 4 semanas. Mediante este método hemos obtenido importantes variaciones en el contenido mineral en todas las regiones evaluadas y en cortos periodos de tiempo. Además, hemos podido comprobar que el hueso subcondral tiene unas características densitométricas intermedias entre el hueso cortical y el trabecular, lo que le puede otorgar una importancia capital en la encrucijada del hueso con el cartílago y la sinovial articular.

Asimismo, se calculó el menor número de animales necesario para demostrar variaciones de la DMO en nuestro modelo y encontramos que entre 6 y 8 animales serían suficientes para detectar cambios significativos en las diferentes regiones evaluadas mediante la doble manipulación mencionada. Pudimos también comprobar que la OVX aislada no fue suficiente para producir variaciones significativas, mientras que la adición de corticoides a la dosis de 1 mg/kg/día provocaba una reducción significativa del contenido mineral óseo en las regiones analizadas en sólo 6 semanas.

Además, el modelo era reproducible y las pérdidas se mantenían constantes a los 4 meses de la OVX.

Posteriormente, seleccionamos 12 animales del estudio previo para inducirles una OA de rodilla mediante meniscectomía medial parcial y sección del ligamento cruzado anterior (LCA). En estas condiciones, se indujo una OA de rodilla muy similar a la que ocurre en el humano, y en un corto periodo de tiempo. A continuación, se analizó el efecto que la OP subcondral podría desempeñar en nuestro modelo de OA.

Para comprobar que no existían otras alteraciones en el hueso subcondral diferentes a la OP, se estudió la rodilla mediante RM experimental de alto campo (4,7 T) antes y después de la ovariectomía y administración de los corticoides, previamente a la meniscectomía y sección del LCA; y posteriormente a las 6, 12 y 16 semanas. No se vieron diferencias ni en el espesor ni en las características morfológicas del cartílago a tiempo 0; aunque sí se apreciaron diferencias morfológicas y en el grosor del cartílago a las 16 semanas, tanto en el sector central como posterior, que es la zona que soporta mayor carga biomecánica en la rodilla del conejo.

En esta situación comprobamos que la OP incrementaba la gravedad de la lesión artrósica. Así, la histología macroscópica mostró un mayor índice de lesión tanto en las rodillas artrósicas como en las artrósicas y osteoporóticas respecto a las OP y controles a las 16 semanas. Los resultados histológicos microscópicos mostraron una gradación creciente de lesión en las rodillas OP, OA y OPOA, con valores máximos en estas últimas, tanto en su estructura, como en la celularidad y en la tinción de la matriz, mediante la escala de Mankin. Asimismo, demostramos que existía una correlación inversa entre la DMO y la lesión histopatológica en las tres regiones evaluadas.

Por lo tanto, y de acuerdo con nuestros resultados, la debilidad de un hueso subcondral osteopénico agravaría de forma clara la progresión de la lesión artrósica. Sin embargo, las pequeñas lesiones encontradas en las rodillas sólo OP, no permiten descartar cierto efecto nocivo secundario a la deprivación estrogénica tras la OVX, dado el probable efecto condroprotector de los estrógenos sobre el cartílago articular.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La distribución poblacional de la masa ósea en el conejo albino raza Nueva Zelanda mostró un comportamiento con morfología de normalidad. Esto es aplicable tanto a la distribución del CMO como de la DMO en columna lumbar, rodilla global y hueso subcondral de la rodilla. La distribución del hueso cortical metafisario mostró un comportamiento mucho más irregular.

La DXA se mostró precisa y fiable para evaluar el CMO y la DMO tanto en el hueso trabecular como en el subcondral en esta especie.

2. La OVX aislada en el conejo fue insuficiente para producir osteoporosis. Sin embargo, se pudo conseguir una marcada reducción del contenido mineral óseo en el conejo mediante la OVX y la administración posterior de corticoides. La OVX sí permitió reducir la dosis total de corticoides administrados y disminuir el riesgo de sus efectos secundarios.

Nuestro modelo de OP es reproducible y consigue reducir la masa ósea tanto en hueso trabecular como cortical en un corto periodo de tiempo.

3. Los cambios conseguidos en nuestro modelo combinado se mantuvieron constantes a los cuatro meses de la OVX, lo que confirma de manera indirecta la madurez esquelética y la consecución de un “teórico” pico de masa ósea en esta especie.

El conejo es una especie idónea para estudios de OP sobre esqueleto maduro con remodelado óseo definido.

4. La OP incrementó la gravedad del daño cartilaginoso en nuestro modelo de OA experimental. El deterioro del cartílago se correlacionó inversamente con la DMO de columna lumbar y rodilla global. La OVX más MPH *per se* indujo también pequeñas alteraciones en la tinción de la matriz cartilaginosa y en el índice global de valoración histopatológica de las rodillas no sometidas a cirugía con respecto a los controles.

La OP ejerció un claro efecto desfavorable sobre la evolución de la artrosis en nuestro modelo.

En resumen, en esta investigación hemos mejorado nuestro conocimiento en la fisiología ósea animal en una población madura de conejos N-Z. Hemos definido las características densitométricas del hueso subcondral de la rodilla del conejo. Hemos probado diferentes maniobras osteopenizantes y hemos caracterizado un nuevo modelo de osteoporosis, mediante una doble intervención que combina OVX e inyecciones de metilprednisolona. A través de estas dos maniobras hemos conseguido una marcada reducción del contenido mineral óseo tanto en hueso trabecular como cortical, en un corto espacio de tiempo. Posteriormente, hemos inducido una artrosis de rodilla mediante meniscectomía medial parcial y sección del LCA y hemos demostrado que la OP incrementa la intensidad de la lesión artrósica en nuestro modelo de OA. Hemos corroborado una relación inversa entre contenido mineral óseo y degradación del cartílago articular.

El modelo propuesto plantea nuevas hipótesis y abre vías de investigación para la utilización de fármacos antirresortivos y osteomoduladores en el tratamiento futuro de la artrosis.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams ME, Li DK, McConkey JP, Davidson RG, Day B, Duncan CP, et al. Evaluation of cartilage lesions by magnetic resonance imaging at 0.15 T: Comparison with anatomy and concordance with arthroscopy. *J Rheumatol* 1991; 18: 1573-80.
2. Agnello KA, Trumble TN, Chambers JN, Seewald W, Budsberg SC. Effects of zoledronate on markers of bone metabolism and subchondral bone mineral density in dogs with experimentally induced cruciate-deficient osteoarthritis. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1487-95.
3. Altman RD, Dean DD. Osteoarthritis research: animal models. *Semin Arthritis Rheum* 1990; 19: 21-5.
4. Arboleya L. Inhibidores de los leucotrienos: los nuevos antiinflamatorios en el tratamiento de la artrosis. *Rev Esp Reumatol* 2004; 31: 451-2.
5. Arden NK, Nevitt MC, Lane NE, Gore LR, Hochberg MC, Scott JC, et al. Osteoarthritis and risk of falls, rates of bone loss, and osteoporotic fractures. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1378-85.
6. Armstrong ML, Heistad DD. Animal models of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1990; 85: 15-23.
7. Badger AM, Blake SM, Dodds RA, Griswold DE, Swift BA, Rieman DJ, et al. Idoxifene, a novel selective estrogen receptor modulator, is effective in a rat model of adjuvant-induced arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291: 1380-6.
8. Baim S, Wilson CR, Lewiecki EM, Luckey MM, Downs RW, Lentle BC. Precision assessment and radiation safety for dual-energy X-ray absorptiometry. *J Clin Densitom* 2005; 8: 371-8.
9. Barkmann R, Kantorovich E, Singal C, Hans D, Genant HK, Heller M, et al. A new method for quantitative ultrasound measurements at multiple skeletal sites: first results of precision and fracture discrimination. *J Clin Densitom* 2000; 3: 1-7.
10. Barkmann R, Lüsse S, Stampa B, Sakata S, Heller M, Gluer CC, et al. Assessment of the geometry of human finger phalanges using quantitative ultrasound in vivo. *Osteoporos Int* 2000; 11: 745-55.
11. Barlet JP, Coxam V, Davicco MJ, Gaumet N. Animal models of post-menopausal osteoporosis. *Reprod Nutr Dev* 1994; 34: 221-36.

12. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld L, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1805-15.
13. Barthe N, Braillon P, Ducassou D, Basse-Cathalinat B. Comparison of two Hologic DXA systems (QDR 1000 and QDR 4500/A). *Br J Radiol* 1997; 70: 728-39.
14. Bauer DC. Clinical applications of quantitative ultrasound. En: Njeh CF, Hans D, Fuerst T, Glüer CC, Genant HK, eds. *Quantitative Ultrasound, assessment of osteoporosis and bone status*. Editado por: London: Martin Dunitz Ltd, 1999: 283-97.
15. Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, Baylink DJ. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone* 1996; 18: 397-403.
16. Bellino FL. Estrogen metabolism, not biosynthesis, in rabbit articular cartilage and isolated chondrocytes: a preliminary study. *Steroids* 1992; 57: 507-10.
17. Bellino FL. Non-primate animal models of menopause: workshop report. *Menopause* 2000; 7: 14-24.
18. Bendele AM. Animal models of osteoarthritis in an era of molecular biology. *J Musculoskel Neuron Interact* 2002; 2: 501-3.
19. Benito MJ, Sánchez-Pernaute O, López Armada MJ, Hernández P, Palacios I, Egido J, et al. Cyclosporin A prevents the histologic damage of antigen arthritis without inducing fibrosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 311-9.
20. Benito-Ruiz P, Monfort-Fauré J. Etiopatogenia, clasificación y epidemiología de la artrosis. En: Alonso-Ruiz A, Álvaro-Gracia JM, Andreu-Sánchez JL, Blanch-Rubió J, Collantes-Estévez E, Cruz-Martínez J, eds. *Manual SER de las enfermedades reumáticas*. Editado por: Madrid: Panamericana, 2000: 463-75.
21. Bernstein E. Epiphyseal growth zones in oestradiol-treated rabbits. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1968; 57: 69-80.
22. Bergink AP, Uitterlinden AG, van Leeuwen JPTM, Hofman A, Verhaar JAN, Pols HAP. Bone mineral density and vertebral fracture history are associated with incident and progressive radiographic knee osteoarthritis in elderly men and women: The Rotterdam Study. *Bone* 2005; 37: 446-56.
23. Bezakova E, Collins PJ, Beddoe AH. Absorbed dose measurements in dual energy X-ray absorptiometry (DXA). *Br J Radiol* 1997; 70: 172-9.

24. Bingham CO, Buckland-Wright JC, Garnero P, Cohen SB, Dougados M, Adami S, et al. Risedronate decreases biochemical markers of cartilage degradation but does not decrease symptoms or slow radiographic progression in patients with medial compartment osteoarthritis of the knee: results of the two-year multinational knee osteoarthritis structural arthritis study. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3494-507.
25. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995; 146: 75-85.
26. Blanco-García FJ, Fernández López JC, Galdo Fernández F. Artrosis. *Medicine (ed. española)* 2004: 1-12.
27. Blake GM, Fogelman I. Technical principles of dual energy x-ray absorptiometry. *Semin Nucl Med* 1997; 27: 210-28.
28. Blank RD, Malone DG, Christian RC, Vallarta-Ast NL, Krueger DC, Drezner MK, et al. Patient variables impact lumbar spine dual energy X-ray absorptiometry precision. *Osteoporos Int* 2006; 17: 768-74.
29. Blom AB, van Lent PL, Libregts S, Holthuysen AE, van der Kraan PM, van Rooijen N, et al. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 147-57.
30. Blumsohn A. Marcadores del remodelado óseo: Valoración del riesgo de fractura y reducción. *Curr Osteoporos Rep (ed. española)* 2003; 1: 83-9.
31. Bonnick SL, Johnston CC, Jr., Kleerekoper M, Lindsay R, Miller P, Sherwood L, et al. Importance of precision in bone density measurements. *J Clin Densitom* 2001; 4: 105-10.
32. Borah B, Dufresne TE, Cockman MD, Gross GJ, Sod EW, Myers WR, et al. Evaluation of changes in trabecular bone architecture and mechanical properties of minipig vertebrae by three-dimensional magnetic resonance microimaging and finite element modelling. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 1786-97.
33. Borthacur A, Shapiro EM, Beers J, Kudchodkar S, Kneeland JB, Reddy R. Sensitivity of MRI to proteoglycan depletion in cartilage: comparison of sodium and proton MRI. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 288-93.
34. Bouchard GF, Durham HE, McOsker JE, Krause GF, Eilersieck MR, Reddy CS. Determination of the peak bone mass and whole bone composition in Sinclair miniature swine. *J Bone Miner Res* 1995; 10 (Suppl): S476.

35. Boyce RW, Paddock CL, Franks AF, Jankowsky ML, Eriksen EE. Effects of intermittent hPTH (1-34) alone and in combination with 1, 25 (OH)₂ D₃ or risedronate on endosteal bone remodeling in canine cancellous and cortical bone. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 600-13.
36. Brandt K, Lohmander LS, Doherty M. Pathogenesis of osteoarthritis: the concept of osteoarthritis as failure of the diarthrodial joint. En: Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS, eds. *Osteoarthritis*. Editado por: Oxford (UK): Oxford University Press, 1998: 70-4.
37. Brandt KD. Animal models of osteoarthritis. *Biorheology* 2002; 39: 221-35.
38. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12: 1260-8.
39. Buckland-Wright JC, Messent EA, Bingham CO, Ward RJ, Tonkin C. A 2 year longitudinal radiographic study examining the effect of a bisphosphonate (risedronate) upon subchondral bone loss in osteoarthritic knee patients. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 257-64.
40. Bullough, PG y Jagannath, A. The morphology of the calcification front in articular cartilage (its significance in joint function). *J Bone Joint Surg* 1983; 65B: 72-8.
41. Bulstra SK, Buurman WA, Walenkamp GH, van der Linden AJ. Metabolic characteristics of in vitro cultured human chondrocytes in relation to the histopathologic grade of osteoarthritis. *Clin Orthop* 1989; 242: 294-302.
42. Burger H, van Daele PL, Odding E, Valkenburg HA, Hofman A, Grobee DE, et al. Association of radiographically evident osteoarthritis with higher bone mineral density and increased bone loss with age. The Rotterdam Study. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 81-6.
43. Burr DB, Schaffler MB. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthrosis: Quantitative microscopic evidence. *Microsc Res Tech* 1997; 37: 343-57.
44. Burr DB. Subchondral bone. En: Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS, eds. *Osteoarthritis*. Editado por: Oxford (UK): Oxford University Press, 1998a: 144-56.
45. Burr DB. The importance of subchondral bone in osteoarthrosis. *Curr Opin Rheumatol* 1998b; 10: 256-62.
46. Burr DB. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: S20-S30.

47. Byers PD, Contepouri CA, Farkas TA. A post-mortem study of the hip joint. *Ann Rheum Dis* 1970; 29: 15-31.
48. Calvo E, Herrero-Beaumont G. Modelos experimentales de artrosis. En: Batlle E, Benito P, Blanco FJ, Martín Mola E, eds. *Manual SER de la Artrosis*. Editado por: Madrid: IM&C, 2001a: 63-75.
49. Calvo E, Palacios I, Delgado E, Ruiz-Cabello J, Hernández P, Sánchez-Pernaute O, et al. High resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2001b; 9: 463-72.
50. Calvo E. Estudio de la artrosis precoz mediante resonancia magnética de alto campo, microrradiografía e histología. Tesis Doctoral. Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, U. A. M. Madrid, 2002.
51. Calvo E, Palacios I, Delgado E, Sánchez-Pernaute O, R Largo, G Herrero-Beaumont. Cartilage swelling detected by MRI in early experimental OA represents proteoglycan depletion. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 878-86.
52. Canalis E, Bilezikian JP, Angeli A, Giustina A. Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 2004; 34: 593-8.
53. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3441-7.
54. Cao T, Shirota T, Yamazaki M, Ohno K, Michi KI. Bone mineral density in mandibles of ovariectomized rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12: 604-8.
55. Cao T, Shirota T, Ohno K, Michi KI. Mineralized bone loss in partially edentulous trabeculae of ovariectomized rabbit mandibles. *J Periodontal Res* 2004; 39: 37-41.
56. Carbone LD, Nevitt MC, Wildy K, Barrow KD, Harris F, Felson D, et al. The relationship of antiresortive drug use to structural findings and symptoms of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3516-25.
57. Carlson A, Nilsson BE, Westlin NE. Bone mass in primary coxarthrosis. *Acta Orthop Scand* 1979; 50: 187-9.
58. Carlson CS, Loeser RF, Johnstone B, Tulli HM, Dodson DB, Caterson B. Osteoarthritis in *Cynomolgus macaques*. III. Effects of age, gender and subchondral bone thickness on the severity of the disease. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1209-17.

59. Carmona L. Artrosis. En: Prevalencia e impacto de las enfermedades reumáticas en la población adulta española. Estudio EPISER. Editado por: Madrid: MSD y SER, 2001: 61-75.
60. Carpenter TA, Everett JR, Hall LD, Harper GP, Hodgson RJ, James MF. Visualisation of subchondral erosion in rat monoarticular arthritis by magnetic resonance imaging. *Skeletal Radiol* 1995; 24: 341-9.
61. Casez JP, Muehlbauer RC, Lippuner K, Kelly T, Fleisch H, Jaeger P. Dual-energy X-ray absorptiometry for measuring total bone mineral content in the rat: Study of accuracy and precision. *Bone Min* 1994; 26: 61-8.
62. Castañeda S, Largo R, Calvo E, Rodríguez F, Marcos ME, Díaz Curiel, et al. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol* 2006; 35: 34-41.
63. Cavolina JM, Evans GL, Harris SA, Zhang M, Westerlind KC, Turner RT. Effects of orbital spaceflight on bone histomorphometry and messenger ribonucleic acid levels for bone matrix proteins and skeletal signalling peptides in ovariectomized growing rats. *Endocrinology* 1997; 138: 1567-76.
64. Claassen H, Hornberger F, Scholz-Ahrens K, Schunke M, Schrezenmeir J, Kurz B. The effect of estrogens and dietary calcium deficiency on the extracellular matrix of articular cartilage in Gottingen miniature pigs. *Ann Anat* 2002; 184: 141-8.
65. Clark JM, Huber JD. The structure of the human subchondral plate. *J Bone Joint Surg* 1990a; 72B: 866-73.
66. Clark JM. The structure of vascular channels in the subchondral plate. *J Anat* 1990b; 171: 105-15.
67. Clark S, Rowe DW. Transgenic animals. En: Bilezikians JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principals of Bone Biology*. Editado por: San Diego: Academic Press, 1996: 1161-72.
68. Cocco R, Tofi C, Fioravanti A, Nerucci F, Nannipieri F, Zampieri A, et al. Effects of clodronate on synovial fluid levels of some inflammatory mediators, after intra-articular administration to patients with synovitis secondary to knee osteoarthritis. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1999; 75: 71-6.
69. Cohen ZA, McCarthy DM, Kwak SD, Legrand P, Fogarasi F, Ciaccio EJ, et al. Knee cartilage topography, thickness, and contact areas from MRI: in-vitro calibration and in-vivo measurements. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7: 95-109.

70. Cohen SB. An update on bisphosphonates. *Curr Rheumatol Rep* 2004; 6: 59-65.
71. Cooper C, Cook PL, Osmond C, Fisher L, Cawley MI. Osteoarthritis of the hip and osteoporosis of the proximal femur. *Ann Rheum Dis* 1991; 50: 540-2.
72. Cortet B, Dubois P, Boutry N, Bourel P, Cotten A, Marchandise X. Image analysis of the distal radius trabecular network using computed tomography. *Osteoporos Int* 1999; 9: 410-9.
73. Cova M, Toffanin R, Szomolanyi P, Vittur F, Pozzi-Mucelli RS, Jellus V, et al. Short-TE projection reconstruction MR microscopy in the evaluation of articular cartilage thickness. *Eur Radiol* 2000; 10: 1222-6.
74. Chavassieux P, Buffet A, Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ. Short-term effects of corticosteroids on trabecular bone remodelling in old ewes. *Bone* 1997; 20: 451-5.
75. Chen H, Shoumura S, Emura S. Ultrastructural changes in bones of the senescence-accelerated mouse (SAMP6): a murine model for senile osteoporosis. *Histol Histopathol* 2004; 19: 677-85.
76. Chesnut CH. Theoretical overview: Bone development, peak bone mass, bone loss and fracture risk. *Am J Med* 1991; 91 (Suppl 5B): 2S -4S.
77. Dal Mas I, Biscardi A, Ripamonti U. Comparison of two Hologic DXA systems (QDR 1000 and QDR 4500/A for in vivo bone mass measurement in the baboon (*Papio ursinus*). *J Clin Densitom* 2002; 5: 313-8.
78. Dawson-Hughes B, Dallal GE. Effect of radiographic abnormalities on rate of bone loss from the spine. *Calcif Tissue Int* 1990; 46: 280-1.
79. Dawson J, Gustard S, Beckmann N. High-resolution three-dimensional magnetic resonance imaging for the investigation of knee joint damage during the time course of antigen-induced arthritis in rabbits. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 119-28.
80. Dayani N, Corvol MT, Robel P, Eychenne B, Moncharmont B, Tsagris L. Estrogen receptors in culture rabbit articular chondrocytes: influence of age. *J Steroid Biochem* 1988; 31: 351-6.
81. Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989; 84: 678-85.

82. De Rousseau CJ. Aging in the musculoskeletal system of rhesus monkeys. II. Degenerative joint disease. *Am J Phys Anthropol* 1985; 67: 177-84.
83. Del Río L. Densitometría ósea. En: Riancho JA, González-Macías J, eds. *Osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*. Editado por: Madrid: Jarpyo Ed, 2004: 83-7.
84. Dedrick DK, Goldstein SA, Brandt KD, O'Connor BL, Goulet LW, Albrecht MA. Longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1460-7.
85. Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Shen V. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone* 1995; 16: 157-61.
86. Dequeker J, Goris P, Uytterhoeven R. Osteoporosis and osteoarthritis (osteoarthrosis). Anthropometric distinctions. *JAMA* 1983; 249: 1448-51.
87. Dequeker J. The relationship between osteoporosis and osteoarthritis. *Clin Rheum Dis* 1985; 11: 271-96.
88. Dequeker J, Johnell O. Osteoarthritis protects against femoral neck fracture: the MEDOS study experience. *Bone* 1993a; 14 (suppl 1): S51-S56.
89. Dequeker J, Mohan S, Finkelman RD, Aerssens J, Baylink DJ. Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor types I and II and transforming growth factor beta in cortical bone from the iliac crest. Possible mechanism of increased bone density and protection against osteoporosis. *Arthritis Rheum* 1993b; 36: 1702-8.
90. Dequeker J, Mokassa L, Aerssens J. Bone density and osteoarthritis. *J Rheumatol* 1995; 43: 98-100.
91. Dequeker J, Aerssens J, Luyten FP. Osteoarthritis and osteoporosis: clinical and research evidence of inverse relationship. *Aging Clin Exp Res* 2003; 15: 426-39.
92. Di Cesare PE, Abramson SB. Pathogenesis of osteoarthritis. En: Harris ED, Budd RC, Firestein GS, Genovese MC, Sargent JS, Ruddy S, Sledge CB, eds. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Editado por: Philadelphia: Elsevier, 2005: 1493-513.
93. Disler DG, Recht MP, McCauley TR. MR imaging of articular cartilage. *Skeletal Radiol* 2000; 29: 367-77.
94. Doschak MR, Wohl GR, Hanley DA, Bray RC, Zernicke RF. Antiresorptive therapy conserves some periarticular bone and ligament mechanical properties after anterior cruciate ligament disruption in the rabbit knee. *J Orthop Res* 2004; 22: 942-8.

95. Doschak MR, LaMothe JM, Cooper DM, Hallgrimsson B, Hanley DA, Bray RC, et al. Bisphosphonates reduces bone mineral loss at ligament entheses after joint injury. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 790-7.
96. Dougados M. Clinical features of osteoarthritis. En: Harris ED, Budd RC, Firestein GS, Genovese MC, Sargent JS, Ruddy S, Sledge CB, eds. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Editado por: Philadelphia: Elsevier, 2005: 1514-27.
97. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2000; 100: 197-207.
98. Dupont WD, Plummer WD. Power and sample size calculations: A review and computer program. *Control Clin Trials* 1990; 11: 116-28.
99. Dupont WD, Plummer WD. Power and sample size calculations for studies involving linear regression. *Control Clin Trials* 1998; 19: 589-601.
100. Eberhardt AW, Yeager-Jones A, Blair HC. Regional trabecular bone matrix degeneration and osteocyte death in femora of glucocorticoid-treated rabbits. *Endocrinology* 2001; 142: 1333-40.
101. Eckstein F, Schnier M, Haubner M, Priebisch J, Glaser C, Englmeier KH, et al. Accuracy of cartilage volume and thickness measurements with magnetic resonance imaging. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 352: 137-48.
102. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2005; 16: S129-S138.
103. Elders MJ. The increasing impact of arthritis on public health. *J Rheumatol* 2000; 60 (Suppl): 6-8.
104. Elmer RM, Moskowitz RW, Frankel VH. Meniscal regeneration and postmeniscectomy degenerative joint disease. *Clin Orthop Relat Res* 1977; 124: 304-10.
105. Erb A, Brenner H, Gunther KP, Sturmer T. Hormone replacement therapy and patterns of osteoarthritis: baseline data from the Ulm Osteoarthritis Study. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 105-9.
106. Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M. Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1085-98.

107. Erickson SJ, Waldschmidt JG, Czervionke LF, Prost RW. Hyaline cartilage: Truncation artifacts as a cause of trilaminar appearance with fat-suppressed three-dimensional spoiled gradient-recalled sequences. *Radiology* 1996; 201: 260-4.
108. Fahmy NR, Williams E, Noble J. Meniscal pathology and osteoarthritis of the knee. *J Bone Joint Surg* 1983; 65B: 24-8.
109. Faulkner KG, Glüeer CC, Estilo M, Genant HK. Cross-calibration of DXA equipment: upgrading from Hologic QDR 1000/W to QDR 2000. *Calcif Tissue Int* 1993; 52: 79-89.
110. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF. The prevalence of knee osteoarthritis (OA) in the elderly: the Framingham study. *Arthritis Rheum* 1987; 10: 283-7.
111. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weisman BN, Aliabadi P, et al. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly: The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1500-5.
112. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1343-55.
113. Felson DT, Nevitt MC. The effects of estrogen on osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1998; 10: 269-72.
114. Felson DT, Nevitt MC. Estrogen and osteoarthritis: how do we explain conflicting study results? *Prev Med* 1999; 28: 445-8.
115. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG. Osteoarthritis: The disease and its prevalence and impact. En: Felson DT, conference chair. *Osteoarthritis: New insights. Part 1: The disease and its risk factors. Ann Intern Med* 2000; 133: 637-9.
116. Fernihough JK, Richmond RS, Carlson CS, Cherpes T, Holly JMP, Loeser RF. Estrogen replacement therapy modulation of the insulin-like growth factor system in monkey knee joints. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2103-11.
117. Fortune CL, Farrugia W, Trensham J, Scoggins BA, Wark JD. Hormonal regulation of osteocalcin plasma production and clearance in sheep. *Endocrinology* 1989; 124: 2785-90.
118. Forwood MR, Burr DB, Takano Y, Eastman DF, Smith PN, Schwardt JL. Risedronate treatment does not increase microdamage in the canine femoral neck. *Bone* 1995; 16: 643-50.

119. Foss MV, Byers PD. Bone density, osteoarthritis of the hip and fracture of the upper end of the femur. *Ann Rheum Dis* 1972; 31: 259-64.
120. Fox RR, Laird CW. Sexual cycles. En: Hafez ESE, ed. *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Editado por: Filadelfia: Lea & Febiger, 1970: 107-22.
121. Frankl V, Pogrund H, Yosipovitch Z. The effect of intraarticular colchicine on the knee joint of the rat. *Clin Orthop* 1983; 178: 270-5.
122. Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenia and osteoporoses. *Bone Miner* 1992; 18: 227-36.
123. Fujita T, Fujii Y, Okada SF, Miyauchi A, Takagi Y. Analgesic effect of etidronate on degenerative joint disease. *J Bone Miner Metab* 2001; 19: 251-6.
124. Gahunia HK, Lemaire C, Babyn PS, Cross AR, Kessler MJ, Pritzker KP. Osteoarthritis in *rhesus macaque* knee joint: Quantitative magnetic resonance imaging tissue characterization of articular cartilage. *J Rheumatol* 1995; 22: 1747-56.
125. Gala-Paniagua J, Díaz Curiel M, De la Piedra Gordo C, Castilla Reparaz C, Torralbo García M. Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol* 1998; 71: 754-8
126. Garofalo S, Metsaranta M, Ellard J, Smith C, Horton W, Vuorio E, et al. Assembly of cartilage collagen fibrils is disrupted by overexpression of normal type II collagen in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3825-9
127. Geddes AD. Animal models of bone disease. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principals of Bone Biology*. Editado por: San Diego: Academic Press, 1996: 1343-54.
128. Genant HK, Majumdar S. High-resolution magnetic resonance imaging of trabecular bone structure. *Osteoporos Int* 1997; 7 (Suppl 3): S135-9.
129. Geusens P, Boonen S, Nijs J, Jiang Y, Lowet G, van Auderkercke R, et al. Effect of salmon calcitonin on femoral bone quality in adult ovariectomized ewes. *Calcif Tissue Int* 1996; 59: 315-20.
130. Gevers G, Dequeker J, Geusens P, Nyssen-Behets C, Dhem A. Physical and histomorphological characteristics of iliac crest bone differ according to the grade of osteoarthritis of the hand. *Bone* 1989a; 10: 173-7.

131. Gevers G, Dequeker J, Martens M, van Audekercke R, Nyssen-Behets C, Dhem A. Biochemical characteristics of iliac crest bone in elderly women according to osteoarthritis grade at the hand joints. *J Rheumatol* 1989b; 16: 660-3.
132. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, et al. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol* 1988; 255: E416-E421.
133. Glaser C, Faber S, Eckstein F, Fischer H, Springer V, Heudorfer L, et al. Optimization and validation of a rapid high-resolution T1-w 3D FLASH water excitation MRI sequence for the quantitative assessment of articular cartilage volume and thickness. *Magn Reson Imaging* 2001; 19: 177-85.
134. Glüer CC, Blake G, Lu Y, Blunt BA, Jergas M, Genant HK. Accurate assessment of precision errors: how to measure the reproducibility of bone densitometry techniques. *Osteoporos Int* 1995; 5: 262-70.
135. Glüer CC. Quantitative ultrasound techniques for the assessment of osteoporosis: expert agreement on current status. The International Quantitative Ultrasound Consensus Group. *J Bone Min Res* 1997; 12: 1280-8.
136. Glüer CC. Monitoring skeletal changes by radiological techniques. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1952-62.
137. Glüer CC, Barkmann R. Ultrasonografía cuantitativa: Empleo en la detección de fracturas y en la determinación de la composición ósea. *Curr Osteoporos Rep (ed. español)* 2003; 1: 90-7.
138. Gonnelli S, Cepollano C. The use of ultrasound in the assessment of bone status. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 389-97.
139. González Macías J. Osteoporosis. En: Rozman C, ed. *Medicina Interna Farreras-Rozman*. Editado por: Madrid: Harcourt, 2004:
140. Graichen H, Springer V, Flaman T, Stammberger T, Glasser C, Englemeier KH. Validation of high resolution water-excitation magnetic resonance imaging for quantitative assessment of thin cartilage layers. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 106-14.
141. Grardel B, Sutter B, Flautre B, Viguier E, Lavaste F, Hardouin P. Effects of glucocorticoids on skeletal growth in rabbits evaluated by dual-photon absorptiometry, microscopic connectivity and vertebral compressive strength. *Osteoporos Int* 1994; 4: 204-10.

142. Gregg EW, Kriska AM, Salamone LM, Roberts MM, Anderson SJ, Ferrell RE, et al. The epidemiology of quantitative ultrasound: a review of the relationship with bone mass, osteoporosis and fracture risk. *Osteoporos Int* 1997; 7: 89-99.
143. Grier SJ, Turner AS, Alvis MR. The use of dual-energy x-ray absorptiometry in animals. *Invest Radiol* 1996; 31: 50-62.
144. Griffin MG, Kimble R, Hopfer W, Pacifici R. Dual-energy X-ray absorptiometry of the rat: accuracy, precision and measurement of bone loss. *J Bone Min Res* 1993; 8: 795-800.
145. Grynepas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KP. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 20-6.
146. Grynepas MD, Kasra M, Dumitriu M, Nespeca R, Very JM, Mertz B. Recovery from pamidronate (APD): A two-year study in the dog. *Calcif Tissue Int* 1994; 55: 288-94.
147. Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Division of Metabolism and Endocrine Drug Products, Food and Drug Administration (FDA) Draft. Washington DC, April, 1994.
148. Guglielmi G, Glueer CC, Majumdar S, Blunt BA, Genant HK. Current methods and advances in bone densitometry. *Eur Radiol* 1995; 5: 129-39.
149. Guglielmi G, Schneider P, Lang TF, Giannatempo GM, Cammisa M, Genant HK. Quantitative computed tomography at the axial and peripheral skeleton. *Eur Radiol* 1997; 7 (Suppl 2): S32-42.
150. Haddaway MJ, Davie MW, McCall IW. Bone mineral density in healthy normal women and reproducibility of measurements in spine and hip using dual-energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol* 1992; 213-7.
151. Hall MC. Cartilage changes after experimental immobilization of the knee joint of the young rat. *J Bone Joint Surg* 1963; 45A: 36-44.
152. Ham KD, Loeser RF, Lindgren BR, Carlson CS. Effects of long-term estrogen replacement therapy on osteoarthritis severity in cynomolgus monkeys. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1956-64.
153. Hans D, Njeh CF, Genant HK, Meunier PJ. Quantitative ultrasound in bone status assessment. *Rev Rhum Engl Ed* 1998; 65: 489-98.

154. Hansen MA, Hassager C, Overgaard K, Marslew U, Riis BJ, Christiansen C. Dual-energy x-ray absorptiometry: a precise method of measuring bone mineral density in the lumbar spine. *J Nucl Med* 1990; 31: 1156-62.
155. Hardy PA, Nammalwar P, Kuo S. Measuring thickness of articular cartilage from MR images. *J Magn Reson Imaging* 2001; 13: 120-5.
156. Hart DJ, Mootoosamy I, Doyle DV, Spector TD. The relationship between osteoarthritis and osteoporosis in the general population: the Chingford Study. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 158-62.
157. Hart DJ, Cronin C, Daniels M, Worthy T, Doyle DV, Spector TD. The relationship of bone mineral density and fracture to incident and progressive osteoarthritis of the knee: the Chingford Study. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 92-9.
158. Hartke JR. Non-primate models of osteoporosis. *Lab Anim Sci* 1998; 48: 623-9.
159. Havdrup T, Telhag H. Papain induced changes in the knee joints of adult rabbits. *Acta Orthop Scand* 1977; 48: 143-9.
160. Havdrup T. Trypsin-induced mitosis in the articular cartilage of adult rabbits. *Acta Orthop Scand* 1979; 50: 15-9.
161. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, et al. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1193-206.
162. Helminen HJ, Säämänen AM, Salminen H, Hyttinen MM. Transgenic mouse models for studying the role of cartilage macromolecules in osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41:848-56.
163. Hernández-Presa MA, Martín-Ventura JL, Ortego M, Gómez-Hernández A, Tunón J, Hernández-Vargas P, et al. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002; 160: 49-58.
164. Herberhold C, Stammberger T, Faber S, Putz R, Englmeier KH, Reiser M, et al. A MR-based technique for quantifying the deformation of articular cartilage during mechanical loading in an intact cadaver joint. *Magn Reson Med* 1998; 39: 843-50.
165. Hishiya A, Watanabe K. Progeroid syndrome as a model for impaired bone formation in senile osteoporosis. *J Bone Min Metab* 2004; 22: 399-403.

166. Hochberg MC, Lethbridge-Cejku M, Scott WW, Reichle L, Plato CC, Tobin JD. Upper extremity bone mass and osteoarthritis of the knees: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Bone Mineral Res* 1995; 10: 432-8.
167. Høegh-Andersen P, Tankó LB, Andersen TL, Lundberg CV, Mo JA, Heegaard AM, et al. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: R169-R180.
168. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999; 140: 4382-9.
169. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the Osteoprotegerin / RANKL / RANK / System for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004; 292: 490-5.
170. Hoffmeister BK, Whitten SA, Kaste SC, Rho JY. Effect of collagen and mineral content of the high-frequency ultrasonic properties of human cancellous bone. *Osteoporos Int* 2002; 13: 26-32.
171. Hodler J, Loredó RA, Longo C, Trudell D, Yu JS, Resnick D. Assessment of articular cartilage thickness of the humeral head: MR-anatomic correlation in cadavers. *AJR* 1995; 165: 615-20.
172. Hornby SB, Ford SL, Timpson NJ, Ancill AK, Evans GP. Skeletal changes in the ewe after ovariectomy. *J Bone Miner Res* 1994; 9 (Suppl. 1): S258.
173. Hough JL, Zilversmit DB. Effect of 17 beta estradiol on aortic cholesterol content and metabolism in cholesterol-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 57-63.
174. Howell DS. Pathogenesis of osteoarthritis. *Am J Med* 1986; 80: 24-8.
175. Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report. *Acta Orthop Scand*. 1970; 41: 522-30.
176. Imhof H, Breitenseher M, Kainberger F, Trattning S. Degenerative joint disease: cartilage or vascular disease? *Skeletal Radiol* 1997; 26: 398-403.
177. Inoue K, Ushiyama T, Kim Y, Shichikawa K, Nishioka J, Hakuda S. Increased rate of hysterectomy in women undergoing surgery for osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1995; 3: 205-9.

178. Jayo MJ, Weaver DS, Rankin SE, Kaplan JR. Accuracy and reproducibility of lumbar bone mineral status determined by DPA in live male *cynomolgous macaques*. *Lab Anim Sci* 1990; 40: 266-9.
179. Jayo MJ, Rankin SE, Weaver DS, Carlson CS, Clarkson TB. Accuracy and precision of lumbar bone mineral content by dual-energy X-ray absorptiometry in live female monkeys. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 438-40.
180. Jerome CP, Turner CH, Lees CJ. Decreased bone mass and strength in ovariectomized cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Calcif Tissue Int* 1997; 60: 265-70.
181. Jiang Y, Zhao J, Augat P, Ouyang X, Lu Y, Majumdar S, et al. Trabecular bone mineral calculated structure of human bone specimens scanned by peripheral quantitative computed tomography: relation to biochemical properties. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 1783-90.
182. Jilka RL, Weinstein RS, Takahashi K, Parfitt AM, Manolagas SC. Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. *J Clin Invest* 1996; 97: 1732-40.
183. Jiménez SA. Genetic aspects of familial osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1995; 53: 789-97.
184. Johnson RG, Poole AR. Degenerative changes in dog articular cartilage induced by unilateral tibial valgus osteotomy. *Exp Pathol* 1988; 33: 145-64.
185. Kalbhen DA. Chemical model of osteoarthritis - a pharmacological evaluation. *J Rheumatol* 1987; 14: 130-1.
186. Kalender WA. Effective dose values in bone mineral measurements by photon absorptiometry and computed tomography. *Osteoporos Int* 1992; 2: 82-7.
187. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15: 175-91.
188. Kanis JA, Melton LJ III, Christiansen C, Jonhston CC, Khaltaev N. Perspective: The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Min Res* 1994; 9: 1137-41.
189. Kanis JA, Glüer CC. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 2000; 11: 192-202.
190. Kaplan HM, Timmons EH. *The Rabbit. A model for the principles of mammalian physiology and surgery*. New York: Academic Press Inc, 1979: 127-9.

191. Karsdal MA, Tanko LB, Riis BJ, Sondergard BC, Henriksen K, Altman RD, et al. Calcitonin is involved in cartilage homeostasis: Is calcitonin a treatment for OA? *Osteoarthritis Cartilage* 2006 ; 14 : 617-24.
192. Karvonen RL, Miller PR, Nelson DA, Granda JL, Fernández-Madrid F. Periarticular osteoporosis in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 1998; 25: 2187-94.
193. Kasra M, Grynblas MD. Effect of long-term ovariectomy on bone mechanical properties in young female cynomolgus monkeys. *Bone* 1994; 15: 557-61.
194. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16: 494-502.
195. Kessler MJ, Turnquist JE, Pritzker KPH, London WT. Reduction of passive extension and radiographic evidence of degenerative joint disease in caged-raised and free-ranging aged rhesus monkeys (*Maccaca mulatta*). *J Med Primatol* 1986; 15: 1-9.
196. Kimmel DB. Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research. En: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. *Osteoporosis*. Editado por: San Diego: Academic Press, 2001: 29-47.
197. Klandy B, Martus P, Schiwy-Bochat KH, Weseloh G, Swoboda B. Measurement of cartilage thickness in the human knee-joint by magnetic resonance imaging using a three-dimensional gradient-echo sequence. *Int Orthop* 1999; 2: 264-7.
198. Kuettner KE, Goldberg VM. Osteoarthritic disorders. En: Keuttner K y Goldberg VM, eds. *Osteoarthritic disorders*. Editado por: Rosemont: American Academy of Orthopedic Surgeons, 1995: 21-5.
199. KushwahaRS, Hazzard WR. Exogenous estrogens attenuate dietary hypercholesterolemia and atherosclerosis in the rabbit. *Metabolism* 1981; 30: 359- 66.
200. Kwan KM, Pang MK, Zhou S, Cowan SK, Kong RY, Pfordte T, et al. Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. *J Cell Biol* 1997; 136: 459-71.
201. Lagier R. Hip osteoarthrosis in dogs with an acetabular dysplasia. A pathological study. *J Orthop Rheum* 1988; 1: 219-26.
202. Laib A, Newitt DC, Lu Y, Majumdar S. New-model independent measures of trabecular bone structure applied to in vivo high-resolution MR images. *Osteoporos Int* 2002; 13: 6-130-6.

203. Laitinen K, Valimaki M, Keto P. Bone mineral density measured by dual-energy X-ray absorptiometry in healthy Finnish women. *Calcif Tissue Int* 1991; 48: 224-31.
204. Lajeunesse D. The role of bone in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: S34-S38.
205. Lane LB, Villacin A, Bullough PG. The vascularity and remodelling of subchondral bone and calcified cartilage in adult human femoral and humeral heads. *J Bone Joint Surg* 1977; 58B: 272-8.
206. Lane NE, Nevitt MC. Osteoarthritis and bone mass. *J Rheumatol* 1994; 21: 1393-6.
207. Lane NE, Haupt D, Kimmel DB, Modin G, Kinney JH. Early estrogen replacement therapy reverses the rapid loss of trabecular bone volume and prevents further deterioration of connectivity in the rat. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 206-14.
208. Lane NE, Leboff MS. Metabolic Bone Disease. En: Harris ED, Budd RC, Firestein GS, Genovese MC, Sergent JS, Ruddy S, Sledge CB, eds. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Editado por: Philadelphia: Elsevier, 2005: 1473-92.
209. Lang P, Steiger P, Faulkner K, Glueer CC, Genant HK. Osteoporosis. Current techniques and recent developments in quantitative bone densitometry. *Radiol Clin North Am* 1991; 29: 49-76.
210. Largo R, Castañeda S. Modelos animales de artrosis y osteoporosis. En: Blanco FJ, Cañete JD, Pablos JL, eds. *Técnicas de investigación básica en reumatología*. Monografías SER. Editado por: Madrid: Panamericana, 2005: 229-45.
211. Lagier R, MacGee W, Boussina I. Synovial deposit of osmic acid after intra-articular injection. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1976; 372: 237-44.
212. Layton MUV, Goldstein SA, Goulet RW, Feldkamp LA, Kubinski DJ, Bole GG. Examination of subchondral bone architecture in experimental osteoarthritis by microscopic computer axial tomography. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1400-5.
213. Lenchik L, Kiebzak GM, Blunt BA. What is the role of serial bone mineral density measurements in patient management? *J Clin Densitom* 2002; 5 (suppl.): S29-S38.
214. Leslie WD, Moayyeri A. Minimum sample size requirements for bone density precision assessment produce inconsistency in clinical monitoring. *Osteoporos Int* 2006; 17: 1673-80.

215. Lethbridge-Cejku M, Tobin JD, Scott WW, Hochberg MC, Reichle L, Plato CC. Axial and hip bone mineral density and radiographic changes of osteoarthritis of the knees: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Rheumatol* 1996; 23: 1943-7.
216. Lewis MK, Blake GM, Fogelman I. Patient dose in dual X-ray absorptiometry. *Osteoporos Int* 1994; 4: 11-5.
217. Li B, Apsden RM. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 641-51.
218. Li B, Apsden RM. Material properties of bone from the femoral neck and calcar femorale of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *Osteoporosis Int* 1997; 7: 450-6.
219. Li SW, Takanosu M, Arita M, Bao Y, Ren ZX, Maier A, et al. Targeted disruption of *Col11a2* produces a mild cartilage phenotype in transgenic mice: comparison with the human disorder otospondylomegaepiphyseal dysplasia (OSMED). *Dev Dyn* 2001; 222: 141-52.
220. Lindgren JU, DeLuca HF, Mazess RB. Effects of 1, 25(OH)₂ D₃ on bone tissue in the rabbit: studies on fracture healing, disuse osteoporosis, and prednisone osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1984; 35: 591-5.
221. Link TM, Majumdar S, Lin JC, Newitt D, Augat P, Ouyang X, et al. A comparative study of trabecular bone properties in the spine and femur using high resolution MRI and CT. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 122-32.
222. Lill CA, Gerlach UV, Eckhardt C, Goldhahn J, Scheider E. Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2002; 13: 407-14.
223. Lill CA, Fluegel AK, Schneider E. Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep: a pilot study. *Osteoporos Int* 2002; 13: 480-6.
224. Loeuille D, Gonord P, Guingamp C, Gillet P, Blum A, Sauzade M, Netter P. In vitro magnetic resonance microimaging of experimental osteoarthritis in the rat knee joint. *J Rheumatol* 1997; 24: 133-9.
225. Loeuille D, Olivier P, Mainard D, Gillet P, Netter P, Blum A. Magnetic resonance imaging of normal and osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 963-75.
226. López Armada, Carames B, Cillero-Pastor B, Blanco García FJ. Fisiopatología de la artrosis: ¿cuál es la actualidad? *Rev Esp Reumatol* 2004; 31: 379-93.

227. Lust G, Geary JC, Sheffy BE. Development of hip dysplasia in dogs. *Am J Vet Res* 1973; 34: 87-91.
228. Lloyd ME, Hart DJ, Nandra D, McAlindon TE, Wheeler M, Doyte DV, et al. Relation between insulin-like growth factor-1 concentration, osteoarthritis, bone density, and fractures in the general population: The Chingford Study. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 870-4.
229. Manicourt DH, Altman RD, Williams JM, Devogelaer JP, Druetz-Van Egeren A, Lenz ME, et al. Treatment with calcitonin suppresses the responses of bone, cartilage, and synovium in the early stages of canine experimental osteoarthritis and significantly reduces the severity of the cartilage lesions. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1159-67.
230. Mann DR, Gould KG, Collins DC. Potential primate model for bone loss resulting from medical oophorectomy or menopause. *J Clin Endocr Metabol* 1990; 71: 105-10.
231. Majumdar S, Link TM, Augat P, Lin JC, Newitt D, Lane NE, et al. Trabecular bone architecture in the distal radius using magnetic resonance imaging in subjects with fractures of the proximal femur. *Osteoporos Int* 1999; 10: 231-9.
232. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971; 53 A: 523-37.
233. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Cloutier JM, Howell DS, Ghandur-Mnaymneh L, Woessner JF Jr. Neutral proteases capable of proteoglycan digesting activity in osteoarthritic and normal human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 305-12.
234. Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP. Etiopathogenesis of osteoarthritis. En: Koopman WJ, Moreland LW, eds. *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. Editado por: Filadelfia: Lippincott, 2005: 2199-226.
235. Mason RM Chambers MG, Flannelly J, Gaffen JD, Dudhia J, Bayliss MT. The STR /ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9: 85-91.
236. Masud T, Langley S, Wiltshire P, Doyle DV, Spector TD. Effect of spinal osteophytosis on bone mineral density measurements in vertebral osteoporosis. *Br Med J* 1993; 307: 172-3.
237. Matsushita M, Tsyboyama T, Kasai R, Okumura H, Yamamuro T, Higuchi K, et al. Age-related changes in bone mass in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Am J Pathol* 1986; 125: 276- 83.

238. McCauley TR, Disler DG. Magnetic resonance imaging of articular cartilage of the knee. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9: 2-8.
239. Meachim G. Articular cartilage lesions in osteoarthritis of the femoral head. *J Pathol* 1972; 107: 199-210.
240. Melton LJ III. How many women have osteoporosis now? *J Bone Min Res* 1995; 10: 175-7.
241. Melton LJ III. Epidemiology worldwide. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2003; 32: 1-13.
242. Mendes DG, Gotfried Y, Hamburger S. Induction of the three grades of osteoarthritis in rabbit knee. *Orthop Rev* 1981; 10: 113-6.
243. Messner K, Fahlgren A, Ross I, Andersson B. Simultaneous changes in bone mineral density and articular cartilage in a rabbit meniscectomy model of knee osteoarthrosis. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 197-206.
244. Messner K, Fahlgren A, Persliden J, Andersson B. Radiographic joint space narrowing and histologic changes in a rabbit meniscectomy model of early knee osteoarthritis. *Am J Sports Med* 2001; 29: 151-60.
245. Milz S, Putz R. Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. *J Anat* 1994; 185: 103-10.
246. Miller LC, Weaver DS, McAlister JA, Koritnik DR. Effects of ovariectomy on vertebral bone in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Calcif Tissue Int* 1986; 38: 62-5.
247. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2000; 192: 463- 74.
248. Miyanishi K, Yamamoto T, Iriya T, Motomura G, Jingushi S, Sueishi K, et al. Effects of different corticosteroids on the development of osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 332-6.
249. Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo M. Osteointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 351-61.
250. Mori S, Harruf R, Burr DB. Microcracks in articular calcified cartilage of human femoral heads. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 196-8.

251. Mosekilde L, Danielsen CC, Knudsen UB. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. *Bone* 1993; 14: 1-6.
252. Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, Stills HF, Jankowsky ML, Ebert DC, et al. Evaluation of the skeletal effects of combined mild dietary calcium restriction and ovariectomy in Sinclair S-1 minipigs: A pilot study. *J Bone Min Res* 1993; 8: 1311-21.
253. Mosekilde L. Assessing bone quality-animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone* 1995; 17 (Suppl 4): 343S-352S.
254. Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Martens RW, Baker J, Mayor M, et al. Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthritis Rheum* 1973; 22: 155-63.
255. Moskowitz RW. Experimental models of osteoarthritis. En: Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ, eds. *Osteoarthritis. Diagnosis and medical /surgical management*. Editado por: Philadelphia: WB Saunders Company, 1988: 213-32.
256. Moskowitz RW. The relevance of animal model in osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 1990; 81 (Suppl.): 21-3.
257. Muehleman C, Green J, Williams JM, Kuettner KE, Thonar EJ, Sumner DR. The effect of bone remodelling inhibition by zoledronic acid in an animal model of cartilage matrix damage. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 226-33.
258. Nakata K, Ono K, Miyazaki J, Olsen BR, Muragaki Y, Adachi E et al. Osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing alpha 1 (IX) collagen chains with a central deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2870-4.
259. Nevitt MC, Cummings SR, Lane LE, Genant HK, Presuman AR. Current use of oral estrogen is associated with a decreased prevalence of radiographic hip OA in elderly white women [abstract]. *Arthritis Rheum* 1994; 37 (Suppl. 9): S212.
260. Nevitt MC, Lane NE, Scott JC, Hochberg MC, Pressman AR, Genant HK, et al. Radiographic osteoarthritis of the hip and bone mineral density. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 907-16.
261. Nevitt MC, Cummings SR, Lane NE, Hochberg MC, Scott JC, Pressman AR. Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med* 1996; 156: 2073-80.

262. Nevitt MC, Felson DT. Sex hormones and the risk of osteoarthritis in women: epidemiological evidence. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 673-6.
263. Nevitt MC, Felson DT, Williams EN, Grady D, for the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study Research Group. The effect of estrogen plus progestin on knee symptoms and related disability in postmenopausal women: the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 811-8.
264. Newitt DC, Van Rietbergen B, Majumdar S. Processing and analysis of in vivo high resolution MR images of trabecular bone for longitudinal studies: reproducibility of structural measures and micro-finite element analysis derived mechanical properties. *Osteoporos Int* 2002a; 13: 278-87.
265. Newitt DC, Majumdar S, van Rietbergen B, von Ingersleben G, Harris ST, Genant HK, et al. In vivo assessment of architecture and micro-finite element analysis derived indices of mechanical properties of trabecular bone in the radius. *Osteoporos Int* 2002b; 13: 6-13.
266. Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: Current status and comparison with other animal models. *Bone*: 1995; 16: 277S-284S.
267. Ng MC, Revell PA, Beer M, Boucher BJ, Cohen RD, Currey HLF. Incidence of metabolic bone disease in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1984; 43: 370-7.
268. Nicholson PH, Müller R, Cheng XG, Ruegsegger P, van der Perre G, Dequeker J, et al. Quantitative ultrasound and trabecular architecture in the human calcaneus. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1886-92.
269. NIH consensus panel: Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993; 94: 646-50.
270. NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *JAMA* 2001; 285: 785-95.
271. Njeh CF, Fuerst T, Hans D, Blake GM, Genant HK. Radiation exposure in bone mineral density assessment. *Appl Radiat Isot* 1999; 50: 215-36.
272. Noble J, Alexander K. Studies of tibial subchondral bone density and its significance. *J Bone Joint Surg* 1985; 67A: 295-302.

273. Nolla Solé JM. Densitometría ósea. En: Alonso A, ed. Técnicas de diagnóstico y tratamiento en Reumatología. Monografías SER. Editado por: Madrid: Editorial Panamericana, 2004: 159-69.
274. Nolte-Ernstring CCA, Adam G, Böhne M, Prescher A, Günther RW. MRI of degenerative bone marrow lesions in experimental osteoarthritis of canine knee joints. *Skeletal Radiol* 1996; 25: 413-20.
275. Norris SA, Pettifor JM, Gray DA, Biscardi A, Buffenstein R. Validation and application of dual-energy X-ray absorptiometry to measure bone mineral density in rabbit vertebrae. *J Clin Densitom* 2000; 3: 49-55.
276. O'Connell SL, Trensham J, Fortune CL, Farrugia W, McDougall JG, Scoggins BA, et al. Effects of prednisolone and deflazacort on osteocalcin metabolism in sheep. *Calcif Tissue Int* 1993; 53: 117-21.
277. O'Connor BL, Visco DM, Brandt KD. The development of experimental osteoarthritis (OA) in dogs with extensively deafferented knee joints. *Arthritis Rheum* 1989; 32 (suppl 4): S106.
278. Olsewski JM, Lust G, Rendano VT, Summers BA. Degenerative joint disease: multiple joint involvement in young and mature dogs. *Am J Vet Res* 1983; 44: 1300-8.
279. Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, et al. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab Invest* 1992; 66: 680-90.
280. Ogata K, Whiteside LA, Lesker PA. Subchondral route for nutrition to articular cartilage in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 1978; 60A: 905-10.
281. Okamoto Y, Takahashi K, Toriyama K, Takeda N, Kitagawa K, Hosokawa M, et al. Femoral peak bone mass and osteoclast number in an animal model of age-related spontaneous osteopenia. *Anat Rec* 1995; 242: 21-8.
282. Orwoll ES, Oviatt SK, Mann T. The impact of osteophytic and vascular calcifications on vertebral mineral density measurements in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 1202-7.
283. Orwoll ES, Bauer DC, Vogt TM, Fox KN. Axial bone mass in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 1996; 124: 187-96.

284. Ostergaard K, Petersen J, Andersen CB, Bendtzen K, Salter DM. Histologic / histochemical grading system for osteoarthritic articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1766-71.
285. Paolaggi JB, Le Parc JM, Durigon M, Barres D, Paolaggi F, Arfi S, et al. Osteonecroses cortisoniques: acquisitions tirées de l'observation chez l'homme et confrontation avec les resultats de l'experimentation animale. *Revue Rhum Mal Osteoartic* 1980 ; 47 : 719-29.
286. Pastoureau P, Arlot ME, Caulin F, Barrier JP, Meunier PJ, Delmas PD. Effects of oophorectomy on biochemical and histological indices of bone turnover in ewes. *J Bone Miner Res* 1989; 4 (Suppl. 1): S477.
287. Patel R, Blake GM, Batchelor S, Fogelman I. Occupational dose to the radiographer in dual X-ray absorptiometry: a comparison of pencil-beam and fan-beam systems. *Br J Radiol* 1996; 69: 539-43.
288. Paul PK, O'Byrne E, Blancuzzi V, Wilson D, Gunson D, Douglas FL, et al. Magnetic resonance imaging reflects cartilage proteoglycan degradation in the rabbit knee. *Skeletal Radiol* 1991; 20: 31-6.
289. Parks NJ, Jee WSS, Dell RB, Miller GE. Assessment of cortical and trabecular bone distribution in the beagle skeleton by neutron activation analysis. *Anat Rec* 1986; 215: 230-50.
290. Peel NF, Barrington NA, Blumsohn A, Colwell A, Hannon R, Eastell R. Bone mineral density and bone turnover in spinal osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 867-71.
291. Pelletier JP, Lajeunesse D, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Jolicoeur FC, Hilal G, et al. Carprofen simultaneously reduces progression of morphological changes in cartilage and subchondral bone in experimental dog osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000; 27: 2893- 902.
292. Pelletier JP, Boileau C, Brunet J, Boily M, Lajeunesse D, Reboul P et al. The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K. *Bone* 2004; 34: 27-38.
293. Pereira RC, Delany AM, Canalis E. Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone* 2001; 28: 484-90.
294. Pereira RC, Delany AM, Canalis E. Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression. *Bone* 2002; 30: 685-91.

295. Peterfy CG, van Dijke CF, Lu Y, Nguyen A, Connick TJ, Kneeland JB, et al. Quantification of the volume of articular cartilage in the metacarpophalangeal joints of the hand: Accuracy and precision of three-dimensional MR imaging. *AJR* 1995; 165: 371-5.
296. Peterfy CG, Genant HK. Emerging applications of magnetic resonance imaging in the evaluation of articular cartilage. *Radiol Clin North Am* 1996; 34: 195-213.
297. Petersen MM, Nielsen PK, Lewin E, Olgaard K. Dual energy X-ray absorptiometry in small rats with low bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 2000; 67: 455-9.
298. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Eberl S. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J Clin Invest* 1987; 80: 706-10.
299. Pogrand H, Rutenberg M, Makin M, Robin GC, Steinberg R, Bloom R. Osteoarthritis of the hand and osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res* 1986; 203: 239-43.
300. Poole CA, Matsouka A, Schofield Jr. Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 22-35.
301. Poole AR. An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosc* 1999; 4: 662-70.
302. Poole AR. Biomarcadores bioquímicos/inmunoquímicos de artrosis: utilidad para predecir la aparición o progresión de la artrosis. *Rheum Dis Clin North Am* (ed. español) 2003: 693-705.
303. Pope NS, Gould KG, Anderson DC, Mann DR. Effects of age and sex on bone density in the rhesus monkey. *Bone* 1989; 10: 109-12.
304. Priest RE, Koplitz RM, Benditt EP. Estradiol reduces incorporation of radioactive sulphate into cartilage and aortas of rats. *J Exp Med* 1960; 112: 225-36.
305. Radin EL, Paul IL, Rose RM. Mechanical factors in osteoarthritis. *Lancet* 1972; 519-22.
306. Radin EL, Martin RB, Burr DB, Caterson B, Boyd RD, Goodwin C. Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee. *J Orthop Res* 1984; 2: 221-34.
307. Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Rel Res* 1986; 213: 34-40.
308. Räsänen T, Messner K. Regional variations and indentation stiffness and thickness of normal rabbit knee articular cartilage. *J Biomed Mat Res* 1996; 31: 519-24.

309. Ravn P, Warming L, Christgau S, Christiansen C. The effect on cartilage of different forms of application of postmenopausal estrogen therapy: comparison of oral and transdermal therapy. *Bone* 2004; 35: 1216-21.
310. Recht MP, Kramer J, Marcelis S, Pathria MN, Trudell D, Haghghi P. Abnormalities of articular cartilage in the knee: analysis of available MR techniques. *Radiology* 1993; 187: 473-8.
311. Reginster JY, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Henrotin Y, eds. *Osteoarthritis: Clinical and Experimental Aspects*. Heidelberg (Germany): Springer-Verlag, 1999: 156-87.
312. Reginster JY, Kvasz A, Bruyere O, Henrotin Y. Is there any rationale for prescribing hormone replacement therapy (HRT) to prevent or to treat osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11: 87-91.
313. Reid DM, Kennedy NS, Smith MA, Nuki G. Bone mass in nodal primary generalised osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis* 1984; 43: 240-2.
314. Reimann I. Experimental osteoarthritis of the knee in rabbits induced by alteration of the load-bearing. *Acta Orthop Scand* 1973; 44: 496-504.
315. Richette P, Corvol M, Bardin T. Estrogens, cartilage and osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2003; 70: 257-62.
316. Richmond RS, Carlson CS, Register TC, Shanker G, Loeser RF. Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insuline-like growth factor binding protein 2. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2081-90.
317. Ribbens C, Martin y Porras M, Franchimont N, Kaiser MJ, Jaspar JM, Damas P, et al. Increased matrix metalloproteinase-3 serum levels in rheumatic diseases: relationship with synovitis and steroid treatment. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 161-6.
318. Richmond RS, Carlson CS, Register TC, Shanker G, Loeser RF. Functional estrogen receptors in adult articular cartilage. Estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2081-90.
319. Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen receptor modulators. Mechanism of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 2003; 348: 618-29.

320. Ritman EL, Bolander ME, Fitzpatrick LA, Turner RT. Micro-CT imaging of structure to function relationship of bone microstructure and associated vascular involvement. *Technol Health Care* 1998; 6: 403-12.
321. Roach HI, Shearer JR, Archer C. The choice of an experimental model. A guide for research workers. *J Bone Joint Surg (Br)* 1989; 71B: 549-53.
322. Rodgers JB, Mounier-Faugere MC, Malluche H. Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian functions. *Bone* 1993; 14: 369-77.
323. Rodríguez RR, Seegmiller RE, Stark MR, Bridgewater LC. A type XI collagen mutation leads to increased degradation of type II collagen in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 314-20.
324. Rosen HN, Tollin S, Balena R, Middlebrooks VL, Beamer WG, Danohue LR, et al. Differentiating between ovariectomized rats and controls using measurements of trabecular bone density: A comparison among DEXA, histomorphometry, and peripheral quantitative computerized tomography. *Calcif Tissue Int* 1995; 57: 35-9.
325. Rosner IA, Goldberg VM, Getzy L, Moskowitz RW. Effects of estrogen on cartilage and experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 52-8.
326. Rosner IA, Goldberg VM, Getzy L, Moskowitz RW. A Trial of intrarticular orpotein, a superoxide dismutase, in experimentally induced osteoarthritis. *J Rheumatol* 1980; 7: 24-9.
327. Rosner IA, Manni A, Malemud CJ, Boja B, Moskowitz RW. Estradiol receptors in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106: 1378-82.
328. Rosner IA, Goldberg VM, Moskowitz RW. Estrogens and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1986; 10: 77-83.
329. Rozenberg S, Vandromme J, Neve J, Aguilera A, Muregancuro A, Peretz A, et al. Precision and accuracy of in-vivo bone mineral measurement in rats using dual-energy X-ray absorptiometry. *Osteoporos Int* 1995; 5: 47-53.
330. Saamanen AM, Tammi M, Jurvelin J, Kiviranta I, Helminen HJ. Proteoglycan alterations following immobilization and remobilization in the articular cartilage of young canine knee (stifle) joint. *J Orthop Res* 1990; 8: 863-73.
331. Saito I, Koshino T, Nakashima K, Uesugi M, Saito T. Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 156-62.

332. Samanta A, Jones S, Regan M, Wilson S, Doherty M. Is osteoarthritis in women affected by hormonal changes or smoking? *Br J Rheumatol* 1993; 32: 366-70.
333. Sambrook P, Naganathan V. What is the relationship between osteoarthritis and osteoporosis? *Baillières Clin Rheum* 1997; 11: 695-710.
334. Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001; 3: 107-13.
335. Sartoris DJ, Resnick D. Current and innovative methods for noninvasive bone densitometry. *Radiol Clin North Am* 1990; 28: 257-78.
336. Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC. Novel aspects on RANKL ligand and Osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int* 2004; 74: 103-6.
337. Schumacher HR Jr. Synovial inflammation, crystals and osteoarthritis. *J Rheumatol* 1995; 43 (suppl.): 101-3.
338. Schmidt C, Priemel M, Kohler T, Weusten A, Müller R, Amling M, et al. Precision and accuracy of peripheral quantitative computed tomography (p-QCT) in the mouse skeleton compared with histology and microcomputed tomography (μ CT). *J Bone Miner Res* 2003; 18: 1486-96.
339. Sheridan PK, Aufdemorte TB, Holt GR, Gates GA. Cartilage of the baboon contains estrogen receptors. *Rheumatol Int* 1985; 5: 279-81.
340. Shibakawa A, Yudoh K, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 679-87.
341. Shipp CC, Berger PS, Deehr MS, Dawson-Hughes B. Precision of dual photon absorptiometry. *Calcif Tissue Int* 1988; 42: 287-92.
342. Showers M, Lachance L, Jamadar D Hochberg MC, Hollis B, Crutchfield M, et al. The associations of bone mineral density and bone turnover markers with osteoarthritis of the hand and knee in pre- and perimenopausal women. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 483-9.
343. Sietsma WK. Animal models of cortical porosity. *Bone* 1995; 17: S297-S305.
344. Sievanen H, Oja P, Vuori I. Precision of dual-energy x-ray absorptiometry in determining bone mineral density and content of various skeletal sites. *J Nucl Med* 1992; 33: 1137-42.

345. Silberberg M, Silberberg R. Modyfing action of estrogen on the evolution of osteoarthritis in mice of different ages. *J Endocrinol* 1963; 72: 449-51.
346. Simmons A, Simpson DE, O'Doherty MJ, Barrington S, Coakley AJ. The effects of standardization and reference values on patient classification for spine and femur dual-energy X-ray absorptiometry. *Osteoporos Int* 1997; 7: 200-6.
347. Simon MR: The rat as an animal for the study of senile idiopathic osteoporosis *Acta Anat* 1984; 119: 248-50.
348. Sokoloff L. Microcraks in the calcified layer of articular cartilage. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 191-5.
349. Solomon L, Schnitzler CM, Browett JP. Osteoarthritis of the hip: the patient behind the disease. *Ann Rheum Dis* 1982; 41: 118-25.
350. Southard TE, Southard KA, Krizan KE, Hillis SL, Haller JW, Keller J, et al. Mandibular bone density and fractal dimension in rabbits with induced osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89: 244-9.
351. Sogaard CH, Wronski TJ, McOsker JE, Mosekilde L. The positive effect of parathyroid hormone on femoral neck bone strength in ovariectomized rats is more pronounced than of estrogen or bisphosphonates. *Endocrinology* 1999; 134: 650-7.
352. Song YJ, Wu ZH, Lin SQ, Weng XS, Qiu GX. The effect of estrogen and progestin on the expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of metalloproteinase and interleukin-1 beta mRNA in synovia of OA rabbit model. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003; 83: 498-503.
353. Sowers M, Zobel D, Weissfeld L, Hawthorne VM, Carman W. Progression of the osteoarthritis of the hand and metacarpal bone loss. A twenty-year followup of incident cases. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 36-42.
354. Spencer GR. Pregnancy and lactational osteoporosis. Animal model: porcine lactational osteoporosis. *Am J Pathol* 1979; 95: 277-80.
355. Spector TD, Hart DJ, Brown P, Almeyda J, Dacre JE, Doyle DV, et al. Frequency of osteoarthritis in hysterectomized women. *J Rheumatol* 1991; 18: 1877-83.
356. Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis: a twin study. *BMJ* 1996; 312: 940-4.

357. Spector TD, Nandra D, Hart DJ, Doyle DV. Is hormone replacement therapy protective for hand and knee osteoarthritis in women? The Chingford study. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 432-4.
358. Spector TD. Bisphosphonates: potencial therapeutic agents for disease modification in osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res* 2003; 15: 413-8.
359. Spector TD, Conaghan PG, Buckland-Wright JC, Garnero P, Cline GA, Beary JF, et al. Effect of risedronate on joint structure and symptoms of knee osteoarthritis: results of the BRISK randomized, controlled trial. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R625-33.
360. Stammberger T, Eckstein F, Englmeier KH, Reiser M. Determination of 3D cartilage thickness data from MR imaging: computational method and reproducibility in the living. *Magn Reson Med* 1999; 41: 529-36.
361. Stewart A, Black A. Bone mineral density in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 464-7.
362. Stewart A, Black A, Robbins SP, Reid DM. Bone density and bone turnover in patients with osteoarthritis and osteoporosis. *J Rheumatol* 1999; 26: 622-6.
363. Tan TC, Wilcox DM, Frank L, Shih C, Trudell DJ, Sartoris DJ, et al. MR imaging of articular cartilage in the ankle: comparison of available imaging sequences and methods of measurement in cadavers. *Skeletal Radiol* 1996; 25: 749-55.
364. Takeda T. Senescence-accelerated mouse (SAM): A biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 105-10.
365. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 1995; 17 (Suppl 4): 125S-133S.
366. Tornero Molina J, Rodríguez Benito U, Massip M, Vidal Fuentes J, Fernández Echevarría. La enfermedad reumática como causa de incapacidad laboral permanente en España. *Rev Esp Reumatol* 1992; 19: 294-7.
367. Turner AS, Athanasiou KA, Zhu CF, Alvis MR, Bryant HU. Biochemical effects of estrogen on articular cartilage in ovariectomized sheep. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 5: 63-9.
368. Turner RT. Mice, estrogen and postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 187-91.

369. Turner AS. Animal models of osteoporosis-necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 2001; 1: 66-81.
370. Turner AS, Mallinckrodt CH, Alvis MR, Bryant HU. Dual-energy X-ray absorptiometry in sheep: experiences with in vivo and ex vivo studies. *Bone* 1995; 17 (Suppl 4): 381S-387S.
371. Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, et al. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2001; 2: 117-27.
372. Thorndike E, Turner AS. In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Frontiers in Biosc* 1998; 3: 17-26.
373. Uthoff HK, Jaworski ZF. Bone loss in response to long-term immobilisation. *J Bone Joint Surg Br* 1978; 60: 420-9.
374. Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Nishioka J, Onkubo I, Hakuda S. Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis. *J Rheumatol* 1998; 25: 134-7.
375. Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S. Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7: 560-6.
376. Van den Berg WB, van der Kraan PM, van Beuningen HM. Synovial mediators of cartilage damage and repair in OA. En: Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS, eds. *Osteoarthritis*. Editado por: Oxford (UK): Oxford University Press, 1998: 157-67.
377. Van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Putte LBA, van der Berg WB. Degenerative knee joint lesions in mice after a single intraarticular collagenase injection: a new model of osteoarthritis. *J Exp Pathol* 1990; 71: 19-31.
378. Van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van der Berg WB. Proteoglycan synthesis and osteophyte formation in 'metabolically' and 'mechanically' induced murine degenerative joint disease: an in-vivo autoradiographic study. *Int J Exp Pathol* 1992; 73: 335-50.
379. Van der Sluijs JA, Geesink RG, van der Linden AJ, Bulstra SK, Kuyer R, Grukker J. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. *J Orthop Res* 1992; 10: 58-61.
380. Van Leersum MD, Schweitzer ME, Gannon F, Vinitski S, Finkel G, Mitchell DG. Thickness of patellofemoral articular cartilage as measured on MR imaging: sequence comparison of accuracy, reproducibility, and interobserver variation. *Skeletal Radiol* 1995; 24: 431-5.

381. Van Kuijk C, Genant HK. Radiological aspects. En: Osteoporosis: Etiology, diagnosis and management. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1995: 249-75.
382. Van Rietbergen B, Majumdar S, Newitt DC, MacDonald B. High-resolution MRI and micro-FE for the evaluation of changes in bone mechanical properties during longitudinal clinical trials: application to calcaneal bone in postmenopausal women after one year of idoxifene treatment. *Clin Biochem (Bristol, Avon)* 2002; 17: 81-8.
383. Vanderschueren D, Van Herck E, Schot P, Rush E, Einhorn T, Geusens P, et al. The aged male rat as a model for human osteoporosis: evaluation by non-destructive measurements and biomechanical testing. *Cacif Tissue Int* 1993; 53: 342-7.
384. Veitch SW, Findlay SC, Ingle BM, Ibbotson CJ, Barrington A, Hamer AJ, et al. Accuracy and precision of peripheral quantitative computed tomography measurements at the tibial metaphysis. *J Clin Densitom* 2004; 7: 209-17.
385. Verstraeten A, van Ermen H, Haghebaert G, Nijs J, Geusens P, Dequeker J. Osteoarthritis retards the development of osteoporosis. Observation of the coexistence of osteoarthritis and osteoporosis. *Clin Orthop* 1991; 264: 169-77.
386. Vogel JM, Wasnich RD, Ross PD. The clinical relevance of calcaneus bone mineral measurements: a review. *Bone Miner* 1988; 5: 35-58.
387. Vokes TJ, Favus MJ. Noninvasive assessment of bone structure. *Curr Osteoporos Rep* 2003; 1: 20-4.
388. Warman M, Boskey AL. Effect of high levels of corticosteroids on the lipids of the long bones of the mature rabbit. *Metab Bone Dis Rel Res* 1983; 4: 319-24.
389. Watanabe K, Hishiya A. Mouse models of senile osteoporosis. *Mol Asp Med* 2005; 26: 221-31.
390. Watson PJ, Carpenter TA, Hall LD, Tyler JA. Cartilage swelling and loss on a spontaneous model of osteoarthritis visualized by magnetic resonance imaging. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; 4: 197-207.
391. Webster SSJ. Animal models in the prevention and treatment of osteopenia: Forward. *Bone* 1995; 17: 113S-114S.
392. Wei X, Räsänen T, Messner, K. Maturation-related compressive properties of rabbit knee articular cartilage and volume fraction of subchondral tissue. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6: 400-9.

393. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 1998; 102: 274-82.
394. Weintraub S, Papo J, Ashkenazi M, Tardiman R, Weissman SL, Salama R. Osteoarthritis of the hip and fractures of the proximal end of the femur. *Acta Orthop Scand* 1982; 53: 261-4.
395. Weiss RA. Retroviral zoonoses. *Nature Med* 1998; 4: 391-2.
396. Weissman G, Pras M, Rosenberg L. Arthritis induced by filipin in rabbits. *Arthritis Rheum* 1967; 10: 325-36.
397. Wahner HW, Dunn WL, Brown ML, Morin RL, Riggs BL. Comparison of dual-energy x-ray absorptiometry and dual photon absorptiometry for bone mineral measurements of the lumbar spine. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 1075-84.
398. WHO Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO. Technical report series. Ginebra, Suiza, 1994.
399. Williams JM, Brandt KD. Immobilization ameliorates chemically-induced articular cartilage damage. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 208-16.
400. Wluka AE, Cicuttini FM, Spector TD. Menopause, estrogens and arthritis. *Maturitas* 2000; 35: 183-99.
401. Woods CG, Greenwald AS, Haynes DW. Subchondral vascularity in the human femoral head. *Ann Rheum Dis* 1970; 29: 138-42.
402. Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 324-8.
403. Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 1986; 7: 119-23.
404. Wronski TJ, Yen CF. The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cell and Mater* 1991; 1 (Suppl. 1): 69-74.
405. Wu DD, Boyd RD, Fix TJ, Burr DB. Regional patterns of bone loss and altered bone remodelling in response to calcium deprivation in laboratory rabbits. *Calcif Tissue Int* 1990; 47: 18-23.
406. Xia Y. Heterogeneity of cartilage laminae in MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 2000; 11: 686-93.

407. Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues. Corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 2055-64.
408. Yamauchi H, Kushida K, Yamazaki K, Inoue T. Assessment of spine bone mineral density in ovariectomized rats using DXA. *J Bone Min Res* 1995; 10: 1033-9.
409. Yamaura M, Nakamura T, Nagai Y, Yoshihara A, Suzuki K. Reduced mechanical competence of bone by ovariectomy and its preservation with 24R, 25-dihydroxyvitamin D3 administration in beagles. *Calcif Tissue Int* 1993; 52: 49-56.
410. Yeh LR, Kwak S, Kim YS, Chou DS, Muhle C, Skaf A, et al. Evaluation of articular cartilage thickness of the humeral head and the glenoid fossa by MR arthrography: anatomic correlation in cadavers. *Skeletal Radiol* 1998; 27: 500-4.
411. Yeung RSM. The Osteoprotegerin /Osteoprotegerin ligand family: role in inflammation and bone loss. *J Rheumatol* 2004; 31: 844-6.
412. Young PC, Stack MT. Estrogen and glucocorticoid receptors in adult canine articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 568-73.
413. Young DR, Niklowitz WJ, Brown RJ, Jee WS. Immobilization-associated osteoporosis in primates. *Bone* 1986; 7: 109-17.
414. Zhang Y, McAlindon TE, Hannan MT, Chaisson CE, Klein R, Wilson PWF, et al. Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: The Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1867-73.
415. Zhang Y, Hannan MT, Chaisson CE, McAlindon TE, Evans SR, Aliabadi P, et al. Bone mineral density and risk of incident and progressive radiographic knee osteoarthritis in women: the Framingham Study. *J Rheumatol* 2000; 27: 1032-7.

VIII. APORTACIONES CIENTÍFICAS

Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados parcialmente en:

- **S Castañeda**, R Largo, E Calvo, F. Rodríguez-Salvanés, M E Marcos, M Díaz-Curiel, G Herrero-Beaumont. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol* 2006; 35: 34-41.
- E Calvo, **S Castañeda**, R Largo, M E Fernández-Valle, F Rodríguez-Salvanés, G Herrero-Beaumont. Osteoporosis increases the severity of cartilage damage in an experimental model of osteoarthritis in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15: 69-77.
- R Largo, **S Castañeda**. Modelos experimentales de artrosis y osteoporosis. En: Blanco FJ, Cañete JD, Pablos JL, eds. *Técnicas de investigación básica en Reumatología*. Monografías S.E.R. Editado por: Ed Panamericana y SER: Madrid, 2007; 2: 229-41.
- **S Castañeda**, E Calvo, R Largo, R González-González, C de la Piedra, G Herrero-Beaumont. Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. *J Bone Miner Metab* 2007; (en prensa).

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis son:

- **S Castañeda**, G Herrero-Beaumont. El hueso subcondral y el tejido sinovial como diana terapéutica en la artrosis. *Rev Esp Reumatol* 2005; 32: 42-7.
- G Herrero-Beaumont, L C Rovati, **S Castañeda**, M A Álvarez-Soria, R Largo. The reverse glucosamine sulphate pathway: from empirical clinical practice to the scientific basis of its application in knee osteoarthritis. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8: 215-25.
- **S Castañeda**, J Bruges-Armas, G Herrero-Beaumont. Importancia do osso subcondral e da membrana sinovial na patogenia e no tratamento de osteoartrose. *Acta Reum Port* 2006; 31: 205-13.

Los resultados han sido también presentados en las siguientes reuniones científicas:

▪ **Congresos nacionales:**

- IX CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIONES ÓSEAS Y METABOLISMO MINERAL (SEIOMM). Las Palmas de Gran Canaria, Noviembre 2003. **S Castañeda**, F Rodríguez, M Díaz Curiel, R Largo, M Torralbo, E Ferrando, G Herrero-Beaumont. Validación de la densitometría ósea en conejos (póster). Publicado en la Rev Esp Enf Metab Óseas (REEMO); 2003 (Supl. 1): P79.

- IX CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIONES ÓSEAS Y METABOLISMO MINERAL (SEIOMM). Las Palmas de Gran Canaria, Noviembre 2003. **S Castañeda**, F Rodríguez, M Díaz Curiel, E Calvo, O Sánchez, E Ferrando, E Marcos, G Herrero-Beaumont. Modelo experimental de osteoporosis en conejas inducido por ooforectomía bilateral y tratamiento con glucocorticoides (póster). Publicado en Rev Esp Enf Metab Óseas (REEMO); 2003 (Supl. 1): P80.

- 41º CONGRESO NACIONAL DE LA SECOT. Madrid, Octubre 2004. **S Castañeda**, E Calvo, R Largo, F Rodríguez, E Marcos, M A Álvarez, M Díaz Curiel, G Herrero-Beaumont. Caracterización de la osteoporosis en conejos en un modelo combinado de ooforectomía (OVX) y glucocorticoides (GC) (Comunicación oral).

- VII REUNIÓN MONOGRÁFICA DE OSTEOPOROSIS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIONES ÓSEAS Y METABOLISMO MINERAL (SEIOMM). Cáceres, 2004. **S Castañeda**, R Largo, F Rodríguez, E Calvo, E Marcos, M A Álvarez, M Díaz Curiel, G Herrero-Beaumont. Caracterización de la osteoporosis en conejos en un modelo combinado (Comunicación oral). REEMO; 2004; 13 (5): 103.

- X CONGRESO NACIONAL DE LA SEIOMM. Madrid, Nov 2005. **S Castañeda**, R Largo, E Calvo, M J Fernández-Luque, F Rodríguez, M Díaz Curiel, G Herrero-Beaumont. Modelo experimental de osteoporosis en conejos: efecto de la ooforectomía en el ahorro de corticoides (póster). Publicado en la Rev Esp Enf Metab Óseas (REEMO); 2005 (Supl. 1) 14 (6): P6.

- X CONGRESO NACIONAL DE LA SEIOMM. Madrid, Nov 2005. **S Castañeda**, E Calvo, R Largo, F Rodríguez-Salvanés, M J Fernández-Luque, G Herrero-Beaumont. La osteoporosis acelera el deterioro del cartílago en un modelo experimental de artrosis (póster). Publicado en la Rev Esp Enf Metab Óseas (REEMO); 2005 (Supl. 1) 14 (6): P19.

▪ **Congresos internacionales:**

- IX WORLD CONGRESS OF THE OSTEOARTHRITIS RESEARCH SOCIETY INTERNACIONAL (OARSI). Chicago IL, U.S.A., December 2004. R Largo, **S Castañeda**, E Calvo, F Rodríguez-Salvanés, M E Marcos, G Herrero-Beaumont. Measurement of subchondral bone mineral density in an experimental model of osteoporosis in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12 (Suppl. B): P223.

- X WORLD CONGRESS OF THE OSTEOARTHRITIS RESEARCH SOCIETY INTERNACIONAL (OARSI). Boston, Mass, U.S.A., December 2005. **S Castañeda**, R Largo, E Calvo, F Rodríguez-Salvanés, G Herrero-Beaumont. Osteoporosis accelerates cartilage damage in a rabbit experimental model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13 (Suppl. A): P205.

- ANNUAL EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY (EULAR). Amsterdam, June 2006. **S Castañeda**, R Largo, E Calvo, F Rodríguez-Salvanés, G Herrero-Beaumont. Osteoporosis accelerates cartilage damage in a rabbit experimental model of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65 (Suppl. II): 414.

- 28th ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY BONE MINERAL RESEARCH (ASBMR). Philadelphia, U.S.A., Sept 2006. **S Castañeda**, E Calvo, R Largo, C de la Piedra, M Díaz-Curiel, M Bellido, G Herrero-Beaumont. Characterization of an experimental model of osteoporosis in rabbits induced by combined ovariectomy and corticosteroids (póster P1200). *J Bone Miner Res* 2006; 21 (Suppl. 1): S178.

- 28th ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY BONE MINERAL RESEARCH (ASBMR). Philadelphia, U.S.A., Sept 2006. G Herrero-Beaumont, E Calvo, R Largo, R González, M Bellido, **S Castañeda**. Does osteoporosis increase the osteoarthritis progression? (póster P1094). *J Bone Miner Res* 2006; 21 (Suppl. 1): S179.

- 71th ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (ACR). Washington, DC. November 2006. R Largo, **S Castañeda**, E Calvo, F Rodríguez-Salvanés, G Herrero-Beaumont. Does osteoporosis increase the osteoarthritis progression? (Comunicación oral). *Arthritis Rheum* 2006; 54 (Suppl.): S532.

- VII EUROPEAN CONGRESS ON CLINICAL AND ECONOMIC ASPECTS OF OSTEOPOROSIS AND OSTEOARTHRITIS (ECCEO). Porto, Marzo 2007. **S Castañeda**, E Calvo, R Largo, C de la Piedra, M Torralbo-García, G Herrero-Beaumont. Is the rabbit an appropriate animal to study osteoporosis? *Osteoporos Int* 2007; 18 (Suppl. 1): P153.

- VII EUROPEAN CONGRESS ON CLINICAL AND ECONOMIC ASPECTS OF OSTEOPOROSIS AND OSTEOARTHRITIS (ECCEO). Porto, Marzo 2007. **S Castañeda**, E Calvo, R Largo, M A Álvarez-Soria, M Bellido, G Herrero-Beaumont. The influence of osteoporosis on the osteoarthritic process in a rabbit experimental model. *Osteoporos Int* 2007; 18 (Suppl. 1): P154.

Ponencias en Cursos y Congresos relacionadas con la tesis:

- X SIMPOSIO INTERNACIONAL DE INFLAMACIÓN Y ENFERMEDADES REUMÁTICAS. Murcia, Abril 2004. Debatidor en la mesa: “Las terapias biológicas en la artrosis”.
- I SIMPOSIO DE ARTROSIS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE REUMATOLOGÍA. A Coruña, Nov 2004. Ponente del tema: “El hueso subcondral y la membrana sinovial como diana terapéutica en la artrosis”.
- I REUNIÓN INTERNACIONAL SOBRE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y MEDICINA INDIVIDUALIZADA. Madrid, Marzo 2006. Ponente del tema: “Influencia de la Osteoporosis en la evolución de la Artrosis. A propósito de un modelo experimental”.
- III SIMPOSIO DE OSTEOPOROSIS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE REUMATOLOGÍA. Salamanca, 7 de octubre de 2006. Coordinador de la ponencia: “Epidemiología y fisiopatología de la osteoporosis”.
- III SIMPOSIO DE OSTEOPOROSIS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE REUMATOLOGÍA. Salamanca, 7 de octubre de 2006. Ponente del tema: “Osteoporosis y artrosis: hallazgos al otro lado del espejo”.
- XXXIII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE REUMATOLOGÍA. Granada, Mayo 2007. Ponente del tema: “Influencia del hueso subcondral en el desarrollo de la artrosis”.

IX. ADDENDA

S Castañeda
R. Largo
E. Calvo
F. Rodríguez-Salvanés
M. E. Marcos
M. Díaz-Curiel
G. Herrero-Beaumont

Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits

Received: 2 November 2004
Revised: 6 June 2005
Accepted: 1 August 2005
Published online: 25 October 2005
© ISS 2005

S. Castañeda
Rheumatology Department,
Hospital de la Princesa,
Universidad Autónoma,
Madrid, Spain

R. Largo · E. Calvo · M. E. Marcos ·
G. Herrero-Beaumont (✉)
Inflammation Research Unit,
Rheumatology Department,
Fundación Jiménez Díaz,
Universidad Autónoma,
Madrid, Spain
e-mail: gherrero@fjd.es
Tel.: +34-91-5504918
Fax: +34-91-5494764

E. Calvo
Department of Orthopaedic Surgery,
Fundación Jiménez Díaz,
Universidad Autónoma,
Madrid, Spain

F. Rodríguez-Salvanés
Clinical Epidemiology Unit,
Hospital de la Princesa,
Universidad Autónoma,
Madrid, Spain

M. Díaz-Curiel
Department of Internal Medicine,
Fundación Jiménez Díaz,
Universidad Autónoma,
Madrid, Spain

Abstract *Introduction:* Experimental models of osteoporosis in rabbits are useful to investigate anabolic agents because this animal has a fast bone turnover with predominant remodelling over the modelling processes. For that purpose, it is necessary to characterize the densitometric values of each type of bony tissue. *Objective:* To determine areal bone mass measurement in the spine and in trabecular, cortical and subchondral bone of the knee in healthy and osteoporotic rabbits. *Design:* Bone mineral content and bone mineral density were measured in lumbar spine, global knee, and subchondral and cortical bone of the knee with dual energy X-ray absorptiometry using a Hologic QDR-1000/W densitometer in 29 skeletally mature female healthy New Zealand rabbits. Ten rabbits underwent triplicate scans for evaluation of the effect of repositioning. Osteoporosis was experimentally induced in 15 rabbits by bilateral ovariectomy and postoperative corticosteroid treatment for 4 weeks. Identical dual energy X-ray absorptiometry (DXA) studies were performed thereafter. *Results:* Mean values of bone mineral content at the lumbar spine, global knee, subchondral bone and cortical tibial metaphysis were: 1934 ± 217 mg, 878 ± 83 mg,

149 ± 14 mg and 29 ± 7.0 mg, respectively. The mean values of bone mineral density at the same regions were: 298 ± 24 mg/cm², 455 ± 32 mg/cm², 617 ± 60 mg/cm² and 678 ± 163 mg/cm², respectively. Bone mineral content and bone density of healthy rabbits followed a normal distribution at the four skeletal regions studied. Precision after triplicate repositioning yielded a coefficient of variation ranging from 2.6% to 3.8%. The least significant change ranged between 7.3% and 10.7%. Bone mineral density measured at the four different skeletal regions correlated significantly. Bone mineral density in osteoporotic rabbits was significantly lower in the four regions studied than that in controls, rendering a T-score of, respectively, -2.0 ± 1.1 in the lumbar spine, -2.2 ± 2.1 in the global knee, -1.9 ± 0.6 in the subchondral bone, and -5.7 ± 3.1 in the cortical tibia ($P < 0.05$). *Conclusions:* DXA is a reliable and precise method to evaluate the bone mass in rabbits. Our results also suggest that subchondral bone is a bone of mixed densitometric characteristics with marked cortical bone predominance.

Keywords Osteoporosis · Subchondral bone · Trabecular bone · Bone mineral density · Rabbit

Introduction

Osteoporosis is a skeletal disease characterized by loss of bone strength, leading to an increased susceptibility to fractures. Since bone mass plays a major role in bone strength, it is essential to measure it precisely to diagnose and follow the treatment of osteoporosis both in humans and laboratory animals. Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) is a non-invasive method of measuring bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) *in vivo*. The measurements of BMC and BMD in animal models have been carried out with instruments designed for human clinical use.

The development of animal models has been essential to studies of bone mass as well as for the development of new drugs for osteoporosis [1–4]. Although the ovariectomized rat represents the “gold standard” in experimental animal models for postmenopausal osteoporosis studies [5–10], it has several disadvantages that may not provide the ideal model for the human condition, such as the failure to achieve true skeletal maturity and the low rate of intracortical remodelling [11, 12]. Rabbits achieve skeletal maturity at approximately 6 months of age, show significant intracortical remodelling [4, 13–15], have faster bone turnover than other rodents, even than primates, and a significant bone loss can be induced within a short period of time [13, 14, 16]. These aspects turn this animal into a promising model to study osteoporosis and to investigate anabolic drugs.

DXA is the currently utilized technique to assess sequential studies of BMC and BMD in both humans and laboratory animals. This technique has the necessary precision when used in small laboratory animals [17–20]. Rabbits have been employed to study bone ingrowth around implants in osteoporotic models and for glucocorticoid-induced osteopenia [4, 21–24]. However, rabbit osteoporosis has not been fully characterized and, to our knowledge, systematic DXA measurements at different skeletal regions have not been published [25, 26].

The interest in the relationship between osteoporosis and osteoarthritis has recently increased [27–29]. Evidence of the role played by subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis, as well as in the progression of cartilage damage, has been demonstrated [30, 31], and it is therefore necessary to characterize DXA measurements fully in this specific anatomical area.

The aim of our study was to determine bone mass values of normality in a healthy and osteoporotic population of mature female rabbits and to characterize the densitometric measurements in this population in trabecular, cortical and subchondral bone.

Materials and methods

Animals

Twenty-nine, 8-month-old (3.8–4.8 kg body weight), skeletally mature, female New Zealand rabbits were included in

the study (Granja Universal, Pamplona, Spain). The animals became acclimatized after 2 weeks and were housed individually in stainless-steel cages and maintained on a 12-h light/12-h dark cycle at room temperature. The animals had free access to water and standard rabbit chow (Panlab, Barcelona, Spain). Bone mineral determination at different anatomical sites was performed in all 29 rabbits at baseline to characterize densitometric values, and 20 rabbits were reserved for the study of experimentally induced osteoporosis in this species.

Bone mineral measurements and definition of regions of interest

DXA analyses were carried out with a Hologic QDR-1000/W densitometer based on pencil-beam technology (Hologic, Waltham, Mass., USA) with a 1 mm diameter collimator on the X-ray output. The densitometer was calibrated daily. Specific software for small sample analysis, which increases the spatial resolution, was used (space per scanning line of 0.0254 cm and resolution for each point of 0.0127 cm; version 6.2). Bone area (BA), BMC and BMD were measured in the lumbar spine (L3 and L4 vertebrae) and in the left

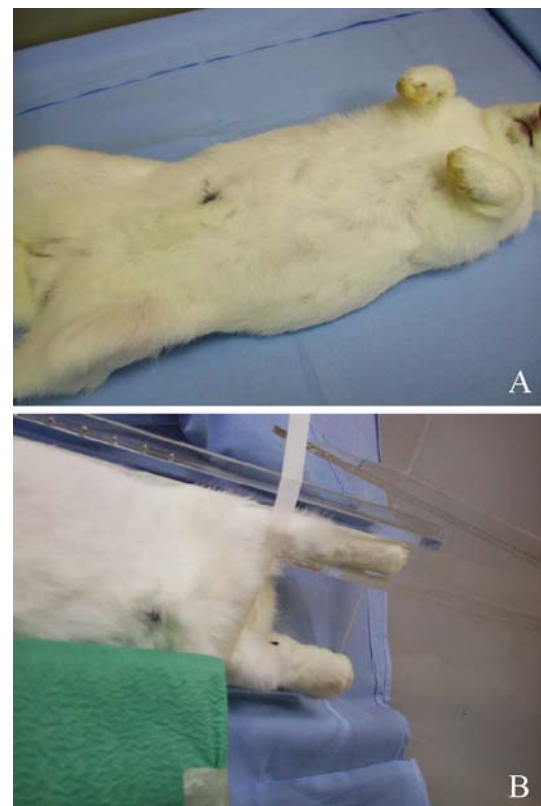


Fig. 1 Measurements were carried out *in vivo* with animals placed in the supine decubitus position under general anaesthesia. A point 3 cm below the navel was used as an external guide to focus the DXA beam (A). DXA of the knees was obtained by the placement of the rabbits on a methacrylate bed, specifically designed for the study, with 30° of lateral tilt to obtain a true posterior–anterior joint view (B)

knee. Measurements were carried out *in vivo* with the animals placed in the supine decubitus position under general anaesthesia [32]. The rabbits were placed on a methacrylate bed, specifically designed for the study, with 30° of lateral inclination so that a true posterior–anterior joint view could be obtained (Fig. 1). After digital radiological screening, a point 3 cm below the navel was considered to be the external guide to focus the DXA beam about L3–L4. DXA of the left knee was carried out with the leg in full extension and internal rotation and with the beam focused immediately distal to the joint line [33]. Images with condylar overlapping were excluded (Fig. 2).

DXA analysis of various skeletal regions with different degrees of trabecular and cortical remodelling were performed. The means of the absorptiometric values of the third and fourth vertebrae were calculated for the lumbar spine. Regarding the knee, three different anatomical areas were selected: (a) the global knee, considering a ROI of 266 lines of width and 22 lines above and under the joint space. This zone was considered as an index of combined trabecular and cortical bone (Fig. 2). (b) Four differentiated subregions corresponding to medial and lateral femoral condyles and tibial plateaux (17×11 pixels, 0.06 cm² each), located, respectively, 1 mm above and 1 mm below the joint line at the areas of maximum contact between the femoral condyles and the tibial plateaux. The mean values of BMC and BMD at these four zones were considered to be representative of subchondral bone. (c) Finally, we analysed an area of 15×9 pixels (0.04 cm²) at the lateral cortex of the proximal metaphysis of the tibia

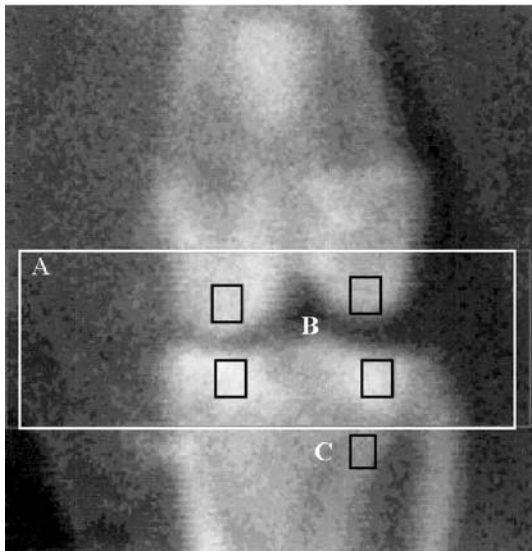


Fig. 2 DXA analysis of a rabbit knee showing the anatomical areas evaluated. The global knee was selected to evaluate trabecular and cortical bone (*large rectangle; A*). Four squared areas adjacent to the joint line were used to assess subchondral bone in each femoral condyle and tibial plateaux (*B*). To study cortical bone, we outlined a metaphyseal area immediately distal to the tibio-fibular joint (*C*)

immediately distal to the tibio-fibular joint, as the main reference of cortical bone.

Assessment of precision

In order to evaluate the effect of repositioning, we performed scans of the knee and lumbar spine three times in the same week in ten healthy rabbits. We estimated the lower statistically significant change for these three repeated measurements, the so-called least significant change (LSC), which was estimated in accordance with Glueer et al. [34], calculating the BMD and BMC changes (as percentages) exceeding $2\sqrt{2}$ times the precision error of the technique (with 95% confidence interval). The reproducibility of the measurements was controlled by scanning the s/n Q-239 Hologic spine phantom of known composition in each session, according to the manufacturer's recommendations. The *in vitro* coefficient of variation (CV) during the designed period of study was 0.49% for BMD and 0.60% for BMC.

Rabbit model of osteoporosis

After baseline BMC and BMD had been determined, 15 animals underwent bilateral ovariectomy and, 2 weeks later, they were given daily intramuscular (*i.m.*) injections of methylprednisolone hemisuccinate to induce osteoporosis. The injection of 1 mg/kg per day (2.5 μmol/kg per day) lasted for 4 consecutive weeks [35]. Bilateral ovariectomy was carried out under general anaesthesia by a standard technique [36]. Antibiotic prophylaxis with cefonicid (100 mg/kg) (Monocid; Smith and Beecham, Madrid, Spain) was administered prior to surgery and for the following 5 days. Five additional rabbits were employed as healthy controls. All the rabbits underwent a second DXA analysis 6 weeks after ovariectomy, or after the first DXA in the control group, and were killed thereafter. These experiments were approved by the local ethics committee, and guidelines for the care and use of small animals were followed.

Statistical analysis

The descriptive analysis of densitometric values included the baseline BA, BMC and BMD, as well as the mean and standard deviation (SD), which were used to calculate the T-score in our population of rabbits. In addition, the coefficient of variation (CV), defined as $SD/mean \times 100$, was determined to estimate interindividual variability. Normality hypothesis of data distribution was defined through the Kolmogorov–Smirnov test. Correlation analysis between different skeletal regions was assessed by Pearson's correlation coefficient (*r*) with their respective hypothesis test. The *in vivo* reproducibility of the mea-

Table 1 Descriptive analysis of densitometric values at baseline in the rabbit population studied

Parameter	Lumbar spine	Global knee	Subchondral knee	Cortical metaphyseal tibia
BA (cm ²)	6.49±0.46	1.93±0.15	0.24±0.01	0.04±0.002
BMC (mg)	1,934±218	879±83	149±14	30±7
BMD (mg/cm ²)	298±24	455±32	617±60	678±163
BMD-CV (%)	7.8	7.0	9.6	24.0
<i>P</i> (K-S)	0.947	0.949	0.888	0.954

Data are shown as mean±SD

P (K-S) *P* value according to the Kolmogorov–Smirnov test

measurements was evaluated through the CV of three repeated measurements performed over the same week at the lumbar spine, global knee, tibial metaphysis at cortical level and subchondral bone in each rabbit, as explained before. Variations in BMD and in T-score were calculated as the difference between baseline and final bone mineral density and as the reduction in the number of SDs over the reference mean values obtained in our population of rabbits prior to any experimental intervention. Student's *t*-test was used to compare the bone mass variations after the study period. A statistically significant value was chosen at $P < 0.05$. In order to reduce the number of animals as much as possible in future studies using this experimental model of osteoporosis, we calculated the least number of rabbits needed to detect statistical significances, following the proceedings described by Dupont and Plummer [37]. Statistical analysis was performed through the SPSS program, version 10.0 (SPSS, Chicago, Ill., USA).

Results

Descriptive analysis of densitometric values

BA, BMC and BMD measurements for the different anatomical locations studied in the population of healthy rabbits are shown in Table 1. When the statistical distribution of data was evaluated, the Kolmogorov–Smirnov test revealed that BMC and BMD resembled a normal distribution, and changes in these parameters followed a parallel distribution in the four anatomical locations assessed (Table 1). It is interesting to notice that BMD increased progressively from lumbar spine to global knee, subchondral bone, and to proximal tibial metaphysis, which showed the highest density. These variations reflected the different ratios of trabecular and cortical bone existing in the areas studied.

With regard to the correlation shown by BMD measurements at the different anatomical sites, values of BMD at the spine, global knee and subchondral bone correlated significantly (Fig. 3), whereas BMD of the metaphyseal cortex of the tibia did not correlate with any of the other locations.

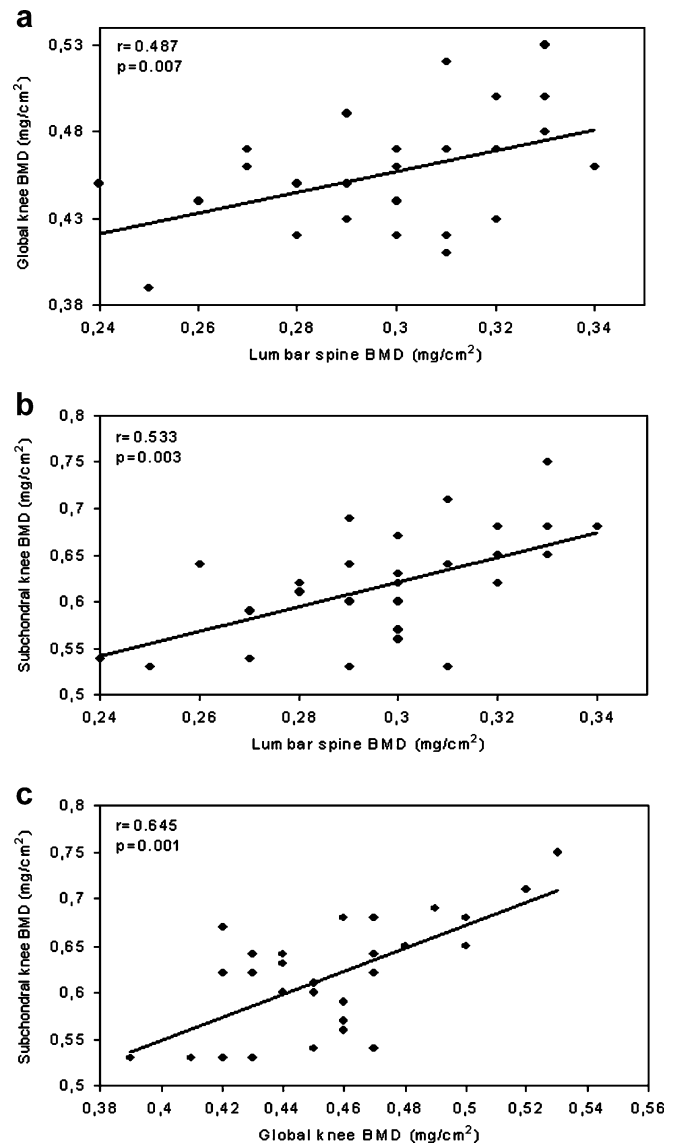


Fig. 3 Linear correlations between BMD (in milligrammes per square centimetre) measured by DXA at the lumbar spine, global knee and subchondral knee bone. The respective values of the coefficient of correlation *r* and the *P* significance are also shown

Table 2 Coefficient of variation (CV) and least significant change (LSC) of BMD for repeated measurements

Parameter	Lumbar Spine	Global knee	Subchondral knee	Cortical metaphyseal tibia
CV (%)	3.8±2.6	2.6±1.6	3.6±3.6	3.1±2.2
LSC (%)	10.7	7.3	10.2	8.7

CV and LSC are expressed as percentages of variation after triple repeated measurements in ten healthy rabbits at the different anatomical regions studied. CV is shown as mean±SD

Table 3 BMD variations in osteoporotic and control groups

Region	Osteoporotic (<i>n</i> =15)			Controls (<i>n</i> =5)		
	BMD (mg/cm ²)	Δ BMD (mg/cm ²)	T-score	BMD (mg/cm ²)	Δ BMD (mg/cm ²)	T-score
Lumbar spine	250±34	-48±25*	-2.0±1.1*	303±15	-14±7	-0.6±0.3
Global knee	369±80	-70±67**	-2.2±2.1**	465±50	28±43	0.9±1.4
Subchondral bone	515±33	-111±33*	-1.9±0.6*	633±42	-22±13	-0.4±0.2
Cortical metaphyseal tibia	366±186	-302±165*	-5.7±3.1*	690±229	39±40	0.7±0.8

Data are shown as mean±SD

BMD is expressed in milligrammes per square centimetre. Δ BMD variations in BMD 6 weeks after ovariectomy and 4 weeks after corticosteroid treatment. BMD variations are expressed in milligrammes per square centimetre (Δ BMD) and as number of SDs related to the reference normal values shown in Table 1 (T-score)

* and ** represent significant values of variations of BMD and T-score in comparison with control group (**P*<0.05 and ***P*<0.01 respectively)

Precision of vertebrae and knee DXA measurements.
Effect of repositioning

After triple repositioning of the animals, the CV ranged from 2.6% to 3.8% in the anatomical regions considered. These data were supported by the value of the least significant change of BMD, that oscillated from 7.3% to 10.7% at the same areas (Table 2).

DXA analysis in osteoporotic rabbits

Table 3 shows the variations in BMD and T-score in osteoporotic and control animals at the lumbar spine, global knee, subchondral bone of the knee and tibial metaphysis. When these variations were compared, there were no significant differences in BMD between controls and osteoporotic animals at baseline at any skeletal site. However, 6 weeks after ovariectomy, a statistically significant reduction of BMD in ovariectomized rabbits was observed in comparison to controls, clearly exceeding the LSC mentioned before and being maximal in the cortical region of the tibial metaphysis. According to these data, the smallest number of rabbits that were required to demonstrate statistically significant differences in BMD before and after the experimental intervention was eight for the lumbar spine and six or fewer for the three remaining sites.

Discussion

Animal models of osteoporosis can be classified into two main categories: those where increased bone resorption is

the dominant mechanism (i.e. ovariectomy) and models where the formation deficit is prevailing (i.e. senile rats or corticosteroid administration) [3, 15, 35, 38]. Corticosteroid administration and ovariectomy are the main models of experimental osteoporosis described in rabbits [21, 35, 39], but the induction of the disease by any of these methods alone has been controversial. For this reason we hypothesized that the combination of both models would reproduce the disease in a more consistent manner. The results of this study demonstrate that the combination of ovariectomy and corticosteroid treatment induces rapid trabecular and cortical osteoporosis, reducing the time to achieve osteoporosis and sparing the final dose of corticosteroids. The efficiency of this combined experimental model is confirmed by the low number of animals necessary to detect significant variations in BMD. Although there is not consensus in the literature about the ideal doses of corticosteroids to induce osteoporosis, mean doses of methylprednisolone were used because they have an effect limited to bone turnover without the development of inflammation, necrosis or vascular changes in subchondral bone, one of the target tissues to be analysed in this experiment [35].

DXA with ultra-high resolution software is a tool of high precision superior to other non-invasive procedures based on the attenuation of a beam of γ-rays, X-rays or quantitative ultrasound [40–45]. However, and until newer methods capable of reconstructing a three-dimensional data set of bone—such as quantitative computed tomography or microscopic computed tomography—are widely available, more studies on densitometric validation in animal models are needed, especially when complex anatomical structures or new anatomical areas such as subchondral or cortical bone are to be evaluated [2, 46–48]. The low values of LSC

found in our study, and the fact that the intra-individual CVs were similar to those reported in investigations carried out in other animal species, demonstrate that high-precision densitometric measurements can be performed with this technique [17, 18, 40, 49–51].

The lumbar spine is the usual anatomical location where BMD variations are monitored in experimental models of osteoporosis. This model shows that the global knee might constitute an excellent site for that purpose, according to values of LSC and the low number of animals needed to detect significant changes. A Hologic QDR-1000/W densitometer based on pencil-beam technology was used in this study instead of newer devices based on fan-beam technology, but it does not seem to constitute a major drawback, since comparative studies have demonstrated an excellent correlation in the measurements of *in vitro* and *in vivo* bone mass between two generations of DXA systems [52–54].

It has been suggested that subchondral bone mineral density may play a key role in the aetiology and development of joint diseases, such as osteoarthritis and rheumatoid arthritis [27, 55]. Since these entities frequently coexist with osteoporosis, and the relationship between osteoporosis and joint diseases has yet to be established, it is relevant to characterize the densitometric values in this specific area. To our knowledge, there are no experimental studies evaluating the bone mineral density and bone mineral content of subchondral bone, and DXA could be used for this purpose. This investigation proves that DXA is also an effective and precise technique to measure mineral density and to detect bone mass variations in subchondral bone. Global and subchondral knee bone obtained intermediate densitometric values between cortical and trabecular bone that were quantitatively superior at the subchondral bone, suggesting that this area might have a transitional structure between trabecular and cortical bone, with a higher content in cortical tissue. In fact, BMD values in subchondral bone obtained through DXA were quite similar to those in the proximal tibial metaphysis, and it could be speculated that both may have a parallel behaviour in osteoporosis.

Finally, cortical bone showed a high inter-individual variation coefficient in BMC and BMD, a finding which has also been described in human cadaveric tibiae [48].

Those variations could be explained by difficulties in repositioning the animal in a reproducible manner or by the fact that bone at this level could be more metaphyseal than diaphyseal and, therefore, have a higher composition of trabecular bone than in the mid-shaft, which is the area usually evaluated for cortical bone in humans [56, 57]. However, histomorphometric studies have shown that bone at the level assessed here is predominantly cortical [58], and the greater BMC and BMD values in this area when compared with lumbar vertebrae, suggest that it represents a tissue with densitometric characteristics of compact bone. Further investigations using volumetric techniques based on microscopic computed tomography will probably help to clarify the bony structure of the knee.

In summary, experimental models of osteoporosis in rabbits can be very helpful, especially to investigate agents with bone anabolic properties, because this animal has a fast bone turnover with predominant remodelling over the modelling processes in comparison with others species. Osteoporosis can be induced in the rabbit by a combination of ovariectomy and corticosteroid treatment in a reproducible manner, and significant trabecular and cortical bone loss is obtained within a short period of time. DXA is a precise technique to evaluate BMC and BMD in trabecular and subchondral bone in this animal. Densitometric values of subchondral bone are closer to those of cortical tissue than trabecular tissue, suggesting that subchondral and cortical bone might follow similar changes in osteoporosis. This constitutes a key finding when the relationship between osteoporosis and other joint diseases, where subchondral bone may play an important role, is under study.

Acknowledgements The authors wish to thank Dr. C. de la Piedra Gordo, from the Bone Metabolism Research Unit, Dr. O. Sánchez-Pernaute, from the Inflammation Research Unit, and M. Torralbo García, from the Bone Densitometry Unit (Fundación Jiménez Díaz) for their valuable advice and technical assistance in this study. This work was partly funded by grants from the Comunidad Autónoma de Madrid (CAM, 08.7/0007.1/2003), the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2003/08379) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS CP03/0011). M.E.M. is a fellow of the Fundación Conchita Rábago.

References

1. Turner AS. Animal models of osteoporosis—necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 2001;1:66–81
2. Turner RT, Maran A, Lotinun S, et al. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2001;2:117–27
3. Bellino FL. Non-primate animal models of menopause: workshop report. *Menopause* 2000;7:14–24
4. Kimmel DB. Animal models for *in vivo* experimentation in osteoporosis research. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis*, vol 2. San Diego, California: Academic Press; 2001. pp. 29–47
5. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 1995;17 Suppl 4:125S–33S
6. Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1985;37:324–8
7. Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 1986;7:119–23

8. Wronski TJ, Yen CF. The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cell Mater* 1992;1 Suppl 1:69–74
9. Kalu DN. The ovariectomized rat as a model of postmenopausal osteopenia. *Bone Miner* 1991;15:175–91
10. Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenia and osteoporoses. *Bone Miner* 1992;18:227–36
11. Rodgers JB, Mounier-Faugere MC, Malluche H. Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian functions. *Bone* 1993;14:369–77
12. Mosekilde Li. Assessing bone quality—animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone* 1995;17 Suppl 4:343S–52S
13. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, et al. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol* 1988;255:E416–E21
14. Wu DD, Boyd RD, Fix TJ, Burr DB. Regional patterns of bone loss and altered bone remodelling in response to calcium deprivation in laboratory rabbits. *Calcif Tissue Int* 1990;47:18–23
15. Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995;16:277S–84S
16. Lindgren JU, DeLuca HF, Mazess RB. Effects of 1,25(OH)₂D₃ on bone tissue in the rabbit: studies on fracture healing, disuse osteoporosis, and prednisone osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1984;35:591–5
17. Griffin MG, Kimble R, Hopfer W, Pacifici R. Dual-energy X-ray absorptiometry of the rat: accuracy, precision and measurement of bone loss. *J Bone Min Res* 1993;8:795–800
18. Casez JP, Muehlbauer RC, Lippuner K, Kelly T, Fleisch H, Jaeger P. Dual-energy X-ray absorptiometry for measuring total bone mineral content in the rat: study of accuracy and precision. *Bone Miner* 1994;26:61–8
19. Yamauchi H, Kushida K, Yamazaki K, Inoue T. Assessment of spine bone mineral density in ovariectomized rats using DXA. *J Bone Miner Res* 1995;10:1033–9
20. Petersen MM, Nielsen PK, Lewin E, Olgaard K. Dual energy X-ray absorptiometry in small rats with low bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 2000;67:455–9
21. Southard TE, Southard KA, Krizan KE, et al. Mandibular bone density and fractal dimension in rabbits with induced osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89:244–9
22. Cao T, Shiota T, Yamazaki M, Ohno K, Michi KI. Bone mineral density in mandibles of ovariectomized rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:604–8
23. Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo M. Osteointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:351–61
24. Cao T, Shiota T, Ohno K, Michi KI. Mineralized bone loss in partially edentulous trabeculae of ovariectomized rabbit mandibles. *J Periodontal Res* 2004;39:37–41
25. Dequeker J. The relationship between osteoporosis and osteoarthritis. *Clin Rheum Dis* 1985;11:271–96
26. Norris SA, Pettifor JM, Gray DA, Biscardi A, Buffenstein R. Validation and application of dual-energy X-ray absorptiometry to measure bone mineral density in rabbit vertebrae. *J Clin Densitom* 2000;3:49–55
27. Pogrand H, Rutenberg M, Makin M, Robin GC, Steinberg R, Bloom R. Osteoarthritis of the hand and osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res* 1986;203:239–43
28. Hart DJ, Mootoosamy I, Doyle DV, Spector TD. The relationship between osteoarthritis and osteoporosis in the general population: the Chingford Study. *Ann Rheum Dis* 1994;53:158–62
29. Sambrook P, Naganathan V. What is the relationship between osteoarthritis and osteoporosis? *Bailliere's Clin Rheumatol* 1997;11:695–710
30. Verstraeten A, van Ermen H, Haghebaert G, Nijs J, Geusens P, Dequeker J. Osteoarthritis retards the development of osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res* 1991;264:169–77
31. Grynblas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KP. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* 1991;49:20–6
32. Benito MJ, Sánchez-Pernaute O, López Armada MJ, et al. Cyclosporin A prevents the histologic damage of antigen arthritis without inducing fibrosis. *Arthritis Rheum* 2000;43:311–9
33. Messner K, Fahlgren A, Ross I, Andersson B. Simultaneous changes in bone mineral density and articular cartilage in a rabbit meniscectomy model of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:197–206
34. Glueer CC, Blake G, Lu Y, Blunt BA, Jergas M, Genant HK. Accurate assessment of precision errors: how to measure the reproducibility of bone densitometry techniques. *Osteoporos Int* 1995;5:262–70
35. Eberhardt AW, Yeager-Jones A, Blair HC. Regional trabecular bone matrix degeneration and osteocyte death in femora of glucocorticoid-treated rabbits. *Endocrinology* 2001;142:1333–40
36. Kaplan HM, Timmons EH. The rabbit. A model for the principles of mammalian physiology and surgery. New York: Academic Press; 1979
37. Dupont WD, Plummer WD. Power and sample size calculations: a review and computer program. *Control Clin Trials* 1990;11:116–28
38. Simon MR. The rat as an animal for the study of senile idiopathic osteoporosis. *Acta Anat* 1984;119:248–50
39. Grardel B, Sutter B, Flautre B, Viguier E, Lavaste F, Hardouin P. Effects of corticosteroids on skeletal growth in rabbits evaluated by dual-photon absorptiometry, microscopic connectivity and vertebral compressive strength. *Osteoporos Int* 1994;4:204–10
40. Gala-Paniagua J, Diaz Curiel M, De la Piedra Gordo C, Castilla Reparaz C, Torralbo Garcia M. Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol* 1998;71:754–8
41. Shipp CC, Berger PS, Deehr MS, Dawson-Hughes B. Precision of dual photon absorptiometry. *Calcif Tissue Int* 1988;42:287–92
42. Grier SJ, Turner AS, Alvis MR. The use of dual-energy x-ray absorptiometry in animals. *Invest Radiol* 1996;31:50–62
43. Sartoris DJ, Resnick D. Current and innovative methods for noninvasive bone densitometry. *Radiol Clin North Am* 1990;28:257–78
44. Lang P, Steiger P, Faulkner K, Glueer CC, Genant HK. Osteoporosis. Current techniques and recent developments in quantitative bone densitometry. *Radiol Clin North Am* 1991;29:49–76
45. Guglielmi G, Glueer CC, Majumdar S, Blunt BA, Genant HK. Current methods and advances in bone densitometry. *Eur Radiol* 1995;5:129–39
46. Hartke JR. Non-primate models of osteoporosis. *Lab Anim Sci* 1998;48:623–9

-
47. Schmidt C, Priemel M, Kohler T, et al. Precision and accuracy of peripheral quantitative computed tomography (pQCT) in the mouse skeleton compared with histology and microcomputed tomography (μ CT). *J Bone Miner Res* 2003;18:1486–96
 48. Veitch SW, Findlay SC, Ingle BM, et al. Accuracy and precision of peripheral quantitative computed tomography measurements at the tibial metaphysis. *J Clin Densitom* 2004;7:209–17
 49. Rozenberg S, Vandromme J, Neve J, et al. Precision and accuracy of in-vivo bone mineral measurement in rats using dual-energy X-ray absorptiometry. *Osteoporos Int* 1995;5:47–53
 50. Jayo MJ, Rankin SE, Weaver DS, Carlson CS, Clarkson TB. Accuracy and precision of lumbar bone mineral content by dual-energy X-ray absorptiometry in live female monkeys. *Calcif Tissue Int* 1991;49:438–40
 51. Turner AS, Mallinckrodt CH, Alvis MR, Bryant HU. Dual-energy X-ray absorptiometry in sheep: experiences with in vivo and ex vivo studies. *Bone* 1995;17 Suppl 4:381S–7S
 52. Faulkner KG, Glueer CC, Estilo M, Genant HK. Cross-calibration of DXA equipment: upgrading from Hologic QDR 1000/W to QDR 2000. *Calcif Tissue Int* 1993;52:79–89
 53. Barthe N, Braillon P, Ducassou D, Basse-Cathalinat B. Comparison of two Hologic DXA systems (QDR 1000 and QDR 4500/A). *Br J Radiol* 1997;70:728–39
 54. Dal Mas I, Biscardi A, Ripamonti U. Comparison of two Hologic DXA systems (QDR 1000 and QDR 4500/A) for in vivo bone mass measurement in the baboon (*Papio ursinus*). *J Clin Densitom* 2002;5:313–8
 55. Burr DB. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:S20–S30
 56. Sievanen H, Oja P, Vuori I. Precision of dual-energy X-ray absorptiometry in determining bone mineral density and content of various skeletal sites. *J Nucl Med* 1992;33:1137–42
 57. Casez JP, Troendle A, Lippuner K, Jaeger P. Bone mineral density at the tibia using dual-energy X-ray absorptiometry in normal women and in patients with vertebral osteoporosis or primary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res* 1994;9:1851–7
 58. Kaartinen E. A histomorphometric study of rabbit tibiofibular bones after rigid intramedullary nailing. *Ann Chir Gynaecol* 1993;82:189–93

RESUMO

A osteoartrose (OA) é uma das doenças músculo-esqueléticas mais prevalentes e é causada por um desequilíbrio na homeostasia do condrocito. Apesar do condrocito ser considerado o elemento chave na manutenção da homeostasia da cartilagem, outras estruturas como o osso subcondral e a membrana sinovial estão também envolvidos no desenvolvimento e progressão da OA. De facto, a OA é considerada um exemplo da falência global das estruturas articulares. Neste artigo, faremos a revisão do papel do osso subcondral e da membrana sinovial na patogénese da OA e de quais as possíveis implicações terapêuticas decorrentes desta relação.

Palavras-Chave: Osteoartrose; Osso subcondral; Membrana sinovial; Condroprotecção.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is one of the most prevalent diseases of the musculoskeletal system, and it is caused by an unbalance in the chondrocytic homeostasis. Although the chondrocyte is considered the key element in the maintenance of cartilage homeostasis, other structures like subchondral bone and synovial membrane are also involved in the development and progression of OA. In fact, OA is considered an example of a global failure of joint structures. In this paper, we will review the role of subchondral bone and synovium in the pathogenesis of OA, as well as their possible therapeutic implications.

Keywords: Osteoarthritis; Subchondral bone; Synovial membrane; Chondroprotection.

IMPORTÂNCIA DO OSSO SUBCONDAL E DA MEMBRANA SINOVIAL NA PATOGENIA E NO TRATAMENTO DA OSTEOARTROSE

S. Castañeda Sanz*, Jácome Bruges-Armas**, G. Herrero-Beaumont***

A osteoartrose (OA) é um processo de evolução irreversível que resulta de um desequilíbrio na homeostasia condrocitária. Como consequência, existe desigualdade entre degradação e síntese dos distintos componentes da matriz extracelular (MEC), com claro predomínio dos processos catabólicos. Se bem que o condrócito seja o elemento central na manutenção da referida homeostasia, outras estruturas participam também no início e progressão da OA. De facto, fala-se hoje da OA como uma falência ou insuficiência articular global – por comparação com outros órgãos – em que participam todas as estruturas articulares, desde a cartilagem até aos tendões, cápsula e ligamentos, tendo especial importância a interacção entre três elementos: cartilagem hialina, osso subcondral e membrana sinovial, esta última especialmente nas fases mais avançadas. Nesta revisão vamos-nos centrar no papel que tanto a membrana sinovial como o osso subcondral desempenham na patogenia da OA, assim como as suas possíveis implicações terapêuticas.

Ossos subcondral

O osso subcondral (OS) é o tecido subarticular mineralizado que se estende desde o *tidemark* (frente de mineralização ou união entre a cartilagem calcificada e a não calcificada) até ao início da medula óssea. As suas funções principais consistem em dar suporte à cartilagem articular suprajacente, distribuir a carga mecânica na diáfise cortical subjacente, absorver a tensão contínua dos impactos mecânicos e alimentar as camadas profundas da cartilagem hialina, especialmente no período do crescimento.¹

O OS inclui pelo menos três estruturas bem di-

ferenciadas: a cartilagem calcificada, o osso lamelar cortical e o osso subcondral trabecular. As duas primeiras são conhecidas na literatura como placa subcondral. Alguns autores consideram também a existência de um osso trabecular subarticular, por debaixo do OS trabecular, cujos limites não estão bem definidos.^{1,2} A espessura do OS varia em função da espécie animal, idade, massa corporal, localização e tipo de articulação. Assim, a espessura do OS ao nível do prato tibial humano pode chegar aos 2-3 mm na zona de maior carga. O OS é muito vascularizado, ainda que a maioria dos vasos não alcancem a cartilagem calcificada e, exceptuando situações de doença, nenhum penetra na cartilagem hialina.¹ A cartilagem calcificada pode aumentar de espessura por ossificação endocondral, contribuindo para a esclerose observada nas radiografias de doentes com OA. Desta forma, o OS pode aumentar a sua espessura por aposição directa de osso (modelação óssea) e/ou aumentar a sua densidade através da remodelação óssea, contribuindo ambos os factores para o aumento da «densidade aparente» desta zona do osso. Em condições fisiológicas, o crescimento, modelação e remodelação óssea ocorrem constantemente ao longo da vida, embora a sua actividade seja diferente nos três tecidos mineralizados mencionados, com diferente resultado sobre a massa, geometria e mecânica articular² (Quadro I). O conteúdo mineral e as características densitométricas do OS não estão bem estudados. Recentemente, o nosso grupo identificou o conteúdo e densidade mineral óssea (DMO) nesta região anatómica, num modelo animal, encontrando valores de DMO intermédios entre o osso trabecular e o cortical.³

O processo de ossificação endocondral ocorre normalmente ao longo de toda a vida, dando lugar na OA ao avanço e perda de ondulação do *tidemark*, à duplicidade da frente de mineralização e ao aumento de espessura da cartilagem calcificada, que pode atingir até 25% da espessura total da cartilagem (em condições normais a relação entre ambos costuma ser de 10 para 1).⁴ Estas alterações

*Staff de Reumatologia. Serviço de Reumatologia. Hospital de la Princesa. Madrid

**Director do Serviço Especializado de Epidemiologia e Biologia Molecular (SEEBMO), Hospital de Santo Espírito de Angra do Heroísmo. Açores

***Serviço de Reumatologia. Chefe da Unidade de Investigação Osteoarticular. Fundación Jiménez Díaz. Madrid

Quadro I. Adaptação biomecânica dos diferentes componentes mineralizados do osso subcondral (modificado da referência 5).

Compartmento ósseo	Tipo de adaptação	Mecanismo predominante	Consequência biomecânica
Cartilagem calcificada	Crescimento	Formação de osso	Aumento da massa óssea
Placa subcondral corticalizada	Modelação óssea	Activação – Formação/ Activação – Reabsorção	Aumento da massa óssea + alteração da forma / geometria
Osso subcondral trabecular	Remodelação óssea	Activação – Reabsorção – Formação	Manutenção da forma e massa ósseas

Enquanto no osso subcondral trabecular, os mecanismos de activação, reabsorção e formação se sucedem de forma coordenada e sequencial, esta sucessão não ocorre a nível da placa subcondral corticalizada, onde a formação e reabsorção ósseas estão habitualmente descoordenadas.

conferem maior rigidez à cartilagem calcificada e maior sobrecarga à cartilagem suprajacente, o que favorece o desenvolvimento da OA.

Contudo, e se bem que a densidade aparente do OS seja significativamente maior nos doentes artrósicos do que nos indivíduos normais ou osteoporóticos, a densidade mineral óssea real é significativamente menor devido a uma deficiente mineralização do referido tecido.⁵ É esta densidade aparente a que normalmente vemos nas radiografias dos doentes com artrose e esclerose subcondral.

Existe uma controvérsia não resolvida sobre a relação entre duas entidades de elevada prevalência: OA e osteoporose (OP), e que tem importantes e evidentes implicações terapêuticas.

Hoje em dia, a maior parte dos estudos clínicos sugere uma relação inversa entre OA e OP⁶⁻⁸ No estudo Framingham, a DMO da anca foi 5-9% mais elevada em mulheres com OA grau 1-2 do que em controlos sem OA.⁹ Esta relação inversa entre OA e OP poderia reflectir uma diferença de qualidade óssea entre ambas as entidades. Existem, porém, algumas variáveis confundentes que podem explicar *per se* esta relação de mútua exclusão.¹⁰ Existem ainda, em alguns destes estudos clínicos, viés de selecção que invalidam ou criam incertezas relativamente aos resultados esperados. Assim, a maioria destes estudos não foram aleatorizados de forma adequada, em alguns faltam inclusivamente os controlos emparelhados adequados, os tamanhos das amostras são por vezes extremamente pequenos e o diagnóstico de OA estabelece-se de forma incorrecta, baseado exclusivamente na clínica e sem confirmação radiológica em alguns deles.¹

Radin e Rose propuseram uma teoria biomecânica, segundo a qual um aumento na densidade óssea do OS aumentaria paralelamente a rigidez do referido tecido.¹¹ Isto provocaria uma diminuição das suas propriedades viscoelásticas e reduziria a sua capacidade de amortizar as cargas com a consequente sobrecarga e deterioração da cartilagem suprajacente.¹² Posteriormente, e à medida que a OA progride, produz-se OP sub-articular multifactorial, que ocasiona o aparecimento de microfracturas no OS e microfissuras na cartilagem calcificada, cuja intenção reparadora potencia a angiogénese, com formação e invasão de novos vasos que penetram ao nível da cartilagem calcificada, contribuindo para o aumento da sua espessura, esclerose subcondral e progressão da OA.^{1,2} Este crescimento vascular ocasiona um aumento na produção de factores angiogénicos, que activam metaloproteinases (MMPs), as quais irão causar maior reabsorção da cartilagem e calcificação da placa subcondral. Todos estes fenómenos originam um osso e cartilagem ainda mais rígidos, com perpetuação do processo degenerativo.

Resumidamente, poderíamos concluir dos estudos existentes, que a presença de OP poderia prevenir ou retardar o início da OA, porém, posteriormente, teria o efeito contrário, aumentando de forma evidente a progressão da doença.

Recentemente, o grupo de Pelletier sugeriu uma hipótese interessante que postula o aumento na remodelação óssea do OS como base patogénica da OA.¹³ Segundo estes autores, um aumento na remodelação óssea subcondral conduziria à deterioração ou perda da MEC da cartilagem e iniciaria uma tentativa de reparação estrutural, quer por

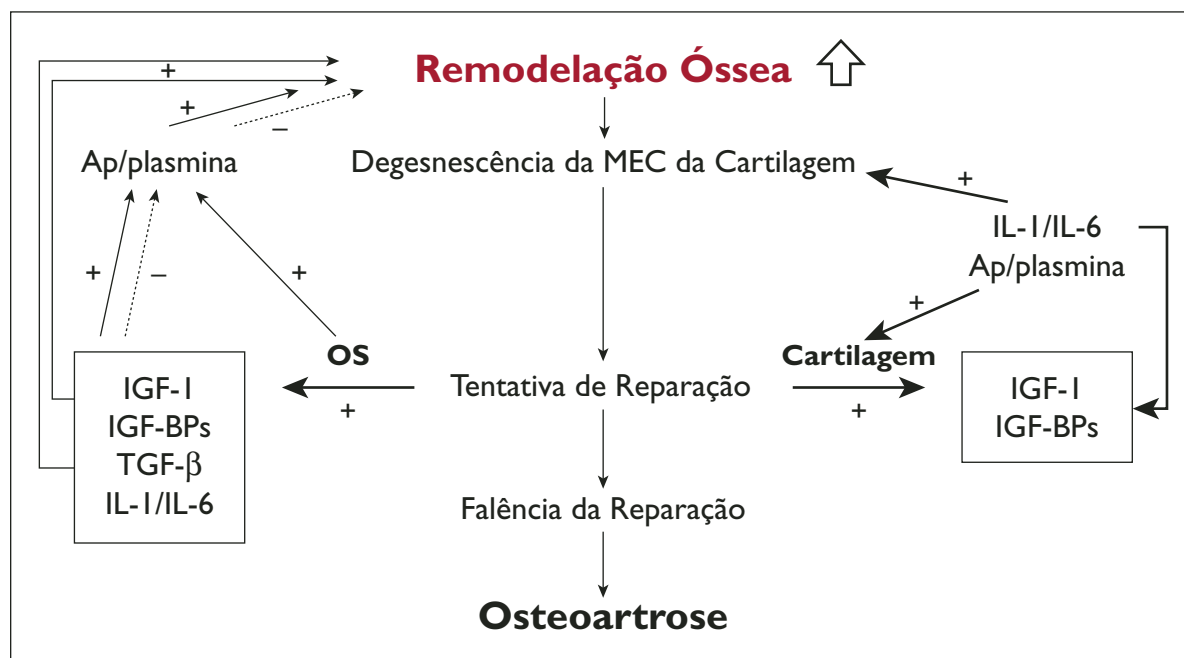


Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na remodelação do osso subcondral artrósico e possível interação com a cartilagem (reproduzido da referência 16).

MEC: matriz extracelular da cartilagem; Ap/plasmina: ativador do plasminogénio-plasmina; IGF-1: factor de crescimento insulínico 1; IGF-BPs: proteínas de união ao IGF-1; TGF-β: factor transformador do crescimento β; IL-1 e 6: interleucinas 1 e 6; OS: osso subcondral.

parte da própria cartilagem (condrócitos), quer do OS subjacente. Neste ponto crítico pode ocorrer uma de duas situações: os processos anabólicos e reparadores corrigem o dano estabelecido ou, se o ponto crítico for ultrapassado, aumentam a destruição articular e a progressão da OA (Figura 1).

A confirmação desta sequência de factos tem importantes implicações terapêuticas, já que se coloca a possibilidade da utilização de fármacos anti-reabsortivos com a intenção de frear a remodelação óssea. De facto, existem estudos observacionais e em experimentação animal que demonstram a utilidade dos estrogénios como redutores da velocidade de progressão da OA após a menopausa,¹⁴⁻¹⁷ ainda que tivesse mais interesse a utilização de bifosfonatos e alguns anti-inflamatórios não esteroides com capacidade de inibir a reabsorção óssea, como explicaremos de seguida.

Papel da membrana sinovial na osteoartrose

Até há relativamente pouco tempo considerava-se que a participação da membrana sinovial na OA era mínima, secundária e apenas nas fases tardias.¹⁸ Porém, existe sinovite nos estádios precoces da OA.¹⁹ De facto, a participação da membrana si-

Quadro II. Mediadores de inflamação na artrose

- **Proteases:**
MMPs: collagenases; gelatinases; estromelisinases
Outras: agrecanases; activador do plasminogénio/plasmina e catepsinas.
- **Citocinas catabólicas e pró-inflamatórias:**
IL-1α; IL-1β; TNF-α; IL-6; IL-8; IL-17; IL-18; MCP-1; quimocinas.
- **Citocinas reguladoras:**
IL-4 ; IL-10 ; IL-13.
- **Factores condrogénicos e de crescimento:**
IGF-1; TGF-β; FGF; PDGF; EGF; BMPs.
- **Radicais livres:** ON e derivados.
- **Eucosanóides:** PGE2 e leucotrienos: LTB4; LTC4.

MMPs: metaloproteinases; IL: interleucinas; TNF: factor de necrose tumoral; MCP-1: proteína quimiotática para os monócitos; IGF-1: factor de crescimento insulínico 1; TGF-β: factor transformador do crescimento β; FGF: factor de crescimento fibroblástico; PDGF: factor de crescimento plaquetar; EGF: factor de crescimento epidérmico; BMPs: proteínas ósseas morfogénicas; ON: óxido nítrico; PGE2: prostaglandina E2; LTB4 e LTC4: leucotrienos B4 e C4

novial na OA pode ser de extrema importância no processo de cronicidade e na perpetuação da lesão articular, já que a membrana sinovial activada sintetiza e liberta múltiplos mediadores de inflamação, como proteases, citocinas pró-inflamatórias, mediadores lipídicos e radicais livres que modulam o metabolismo condrocitário com claro predomínio dos fenómenos catabólicos^{3,21} (Quadro II). Entre os mediadores da inflamação que intervêm no catabolismo articular, cabe destacar o papel de algumas MMPs (colagenases 1 e 3, estromielisinas, etc.), agreganases, citocinas catabólicas da família da interleucina (IL) -1 (IL-1 α , IL-1 β) e do factor de necrose tumoral (TNF), radicais livres como o monóxido de azoto (NO) e eicosanoides como a prostaglandina (PG) E2 e leucotrieno (LT) B4. Origina-se, assim, um ciclo vicioso com maior degradação da cartilagem, libertação de mais mediadores pró-inflamatórios e destruição progressiva da MEC.

As mudanças morfológicas observadas na membrana sinovial artrósica nas fases avançadas da doença mostram proliferação de células mononucleares, incluindo linfócitos activados (T, e em menor grau, B), hiperplasia sinovial, aumento da angiogénese e da osteoclastogénese nas zonas de erosão óssea, muito semelhantes aos encontrados nas artropatias inflamatórias, e em particular na artrite reumatóide. Nestas fases avançadas, libertam-se pequenos fragmentos de colagénio na cavidade articular, assim como microcristais provenientes da degradação da cartilagem, sendo identificados mais frequentemente os de pirofosfato de cálcio e os de hidroxiapatite de cálcio.²³ Todos estes fenómenos induzem maior síntese de citocinas inflamatórias pelos fibroblastos e macrófagos, que perpetuam e conduzem a um processo irreversível de degenerescência da cartilagem. O tecido sinovial é também capaz de sintetizar IL-6, um factor relevante na inflamação e consequente destruição óssea. Por outro lado, a membrana sinovial da OA aumenta também a síntese de citocinas reguladoras e anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13. Estas citocinas diminuem a produção de IL-1 β , TNF- α e MMPs, inibem a PGE2, e aumentam os níveis de TIMP-1 e de IL-1Ra.²⁴⁻²⁵ Nas fases finais da OA, a membrana sinovial desenvolve uma resposta inflamatória que contribui de forma decisiva para a patogenia e expressão clínica da doença.

Ossó subcondral e membrana sinovial como alvos terapêuticos na OA

Se tivermos em conta a hipótese anteriormente

exposta em relação ao possível papel patogénico que a remodelação óssea poderia desempenhar nas fases precoces da OA, parece razoável pensar que os fármacos anti-reabsortivos poderiam ser de grande utilidade. Contudo, se a rigidez óssea subcondral fosse o factor patogénico predominante, estes fármacos seriam provavelmente prejudiciais. Como efeito adicional, e porque quer a modelação como a remodelação óssea são responsáveis pela adaptação geométrica da articulação às novas condições mecânicas, os agentes anti-reabsortivos poderiam ter um efeito deletério adicional. Não obstante, e apesar destas consequências teóricas adversas, existem estudos em diversos modelos animais e em humanos que confirmam a utilidade dos fármacos anti-reabsortivos como alternativa eficaz no tratamento da OA.

Assim, demonstrou-se que o ácido zoledrónico previne a lesão na cartilagem num modelo de OA do joelho induzida por quimipapaína em coelhos.²⁶ O risedronato parece desempenhar um efeito protector sobre as propriedades biomecânicas num modelo de OA do joelho induzido pela ressecção do ligamento cruzado anterior (LCA) em coelhos;²⁷ porém o estudo mais consistente é o que demonstra a utilidade do alendronato de sódio para prevenir a osteofitose e progressão da lesão cartilaginosa em ratos (Hayami et al.).²⁸ Nos humanos, o etidronato mostrou também um efeito analgésico na espondilartrose e na gonartrose.²⁹ Finalmente, o clodronato, administrado por via intra-articular, demonstrou eficácia na redução da sinovite secundária à OA avançada, ao diminuir os níveis de PGE2 intra-articular.³⁰

Outros fármacos que demonstraram eficácia como anti-reabsortivos e «condroprotectores» são alguns anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) como o carprofeno e os inibidores do sistema ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase (COX/LOX). Concretamente, o carprofeno reduz a deterioração da cartilagem ao longo do tempo, bem como diminui a reabsorção óssea e o número de unidades de remodelação de forma significativa. A nível bioquímico, observa-se uma redução nos níveis de IGF-1, do factor activador do plasminogénio e uma diminuição na produção de TGF- β pelos osteoblastos.³¹

Hoje em dia estão a ser desenvolvidos novos AINEs, entre os quais se destacam os inibidores dos leucotrienos e os inibidores do sistema COX/LOX, de que é exemplo a licofelona.³² Num modelo experimental de artrose provocada pela secção do

LCA em cães, a licofelona demonstrou um evidente efeito anti-reabsortivo no OS, reduzindo também os níveis da MMP 13 e da catépsina κ , o que poderia interpretar-se como «efeito condroprotector», se bem que façam falta mais estudos que confirmem estes dados preliminares.³³

Na membrana sinovial, os resultados de um grande número de estudos indicam que o objectivo mais interessante e imediato seria bloquear o efeito das citocinas catabólicas mais relevantes na patogenia da OA e aumentar ou potenciar os antagonistas dos receptores das ditas citocinas (Quadro III). De seguida detalharemos algumas das estratégias mais prometedoras no tratamento da OA a nível da membrana sinovial:

1. Inflamação e citocinas: Porque a IL-1 β tem um

Quadro III. Mediadores de inflamação como alvo terapêutico na artrose

- **Antagonistas / inibidores das citocinas pró-inflamatórias:**
IL-1Ra intra-articular.
Inibidores da ECI ou caspase 1.
Receptores solúveis da IL-1 e do TNF.
Anticorpos anti-TNF e anti-IL-1.
- **Citocinas reguladoras e anti-inflamatórias:**
IL-4; IL-10; IL-13.
- **Factores condrogénicos e de crescimento:**
IGF-1 e TGF- β .
- **Inibidores de sinalização intracelular:**
Inibidores das quinases e dos factores de transcrição nuclear.
- **Inibidores das metaloproteinases:**
Quelantes de metais pesados; minociclina e doxiciclina; TIMPs.
- **Inibidores da apoptose:**
Inibidores das caspases.
- **Radicais livres e COX-2:**
Inibidores da ON sintetase.
- **Eucosanóides:**
Inibidores da PGE2 e dos leucotrienos.

IL: interleucina; TNF: factor de necrose tumoral; IL-1Ra: antagonista do receptor da IL-1; ECI: enzima conversora da IL-1; IGF-1: factor de crescimento insulínico 1; TGF- β : factor transformador do crescimento β ; TIMPs: inibidores tecidulares das metaloproteinases; ON: óxido nítrico; PGE2: prostaglandina E2.

papel patogénico relevante na progressão da OA, parece razoável utilizar agentes que inativem a sua actividade biológica.³⁴⁻³⁶ Assim, pode-se reduzir a sua actividade a nível celular mediante a utilização de antagonistas do receptor da IL-1 ou através da utilização dos seus receptores solúveis.³⁷ As acções da IL-1 podem também bloquear-se interferindo com os seus mecanismos de sinalização intracelular.³⁸⁻³⁹ Vários estudos *in vitro* demonstraram que o IL-1Ra reduz vários processos catabólicos dependentes da IL-1. A administração intra-articular de IL-1Ra parece diminuir a progressão da OA em modelos animais.⁴⁰ Recentemente, comprovou-se que a transfecção do gene do IL-1Ra em joelhos artrósicos de cães e coelhos, reduz a progressão das lesões artrósicas.⁴¹⁻⁴² Outra forma de inactivar o sistema IL-1 é através da inibição da enzima de conversão da IL-1 β ou caspase-1 (ECI). Como é sabido, a ECI transforma a pró-forma inactiva de IL-1 na sua forma activa madura, admitindo-se, por isso, a possibilidade da utilização dos inibidores da ECI no tratamento da OA.⁴³ Por esse motivo, foram utilizados inibidores da ECI por via oral com resultados preliminares promissores em doentes com artrite reumatóide (resultados não publicados). Existem também trabalhos que mostram a utilidade dos receptores solúveis da IL-1 e do TNF- α . Outra alternativa terapêutica seria a utilização de citocinas reguladoras anti-inflamatórias como as IL-4, IL-10 e IL-13.

2. Mecanismos de sinalização intracelular: Outra forma de contrariar os efeitos catabólicos das citocinas pró-inflamatórias inclui a inibição dos seus mecanismos de sinalização intracelular ao nível das cinases proteicas ou dos factores de transcrição celular. Assim, o inibidor selectivo do P38 reduz a progressão estrutural num modelo de artrite em ratos.⁴⁴ A inibição selectiva do ERK 1/2 por via oral poderia reduzir a progressão da OA num modelo experimental de coelhos, ao diminuir a síntese de MMPs.⁴⁵ Existem também trabalhos nos quais o bloqueio foi efectuado ao nível da união nuclear dos factores de transcrição como nos casos do NF- κ B e do AP-1.⁴⁶

3. Metaloproteinases: Constituem uma via final comum implicada directamente na deterioração e destruição da cartilagem, pelo que a sua inibição se poderia considerar essencial no tratamento da OA. Alguns autores consideram os

fármacos que actuam a este nível como fármacos realmente modificadores da doença. Neste grupo incluem-se determinados inibidores químicos, como os quelantes de metais pesados, por exemplo o zinco e o cálcio, ou as tetraciclinas (minociclina e doxiciclina). Contudo, estes fármacos causam frequentemente efeitos colaterais, motivo pelo qual se investigam neste momento inibidores selectivos de algumas MMPs.

4. Radicais livres e COX-2: O NO e os seus subprodutos são capazes de provocar lesão e destruição tecidual através de múltiplos mecanismos.⁴⁷ Em primeiro lugar, o NO induz a morte dos condrócitos por apoptose.⁴⁸ Também estimula a síntese e a actividade de várias MMPs e inibe a síntese do colagénio e dos proteoglicanos.³⁶⁻³⁷ O NO aumenta a actividade da COX-2 e secundariamente a resposta inflamatória (49). A inibição da síntese do NO converteu-se portanto num dos principais objectivos do tratamento sintomático e modificador da OA. Um estudo recente mostra a utilidade de um inibidor específico da sintetase do NO administrado oralmente num modelo de artrose em cães.⁴⁷ A inibição selectiva da COX-2 bloqueia a apoptose induzida pelo NO.⁵⁰ Já comentámos também a utilidade dos inibidores dos leucotrienos para frenar a progressão da OA.

Em resumo, poderíamos dizer que a OA constitui um campo apaixonante em expansão para a investigação e desenvolvimento de novos fármacos. O osso subcondral e a membrana sinovial representam duas estruturas fundamentais na patogenia da doença, pelo que também constituem alvos interessantes a explorar com novos fármacos capazes de modificar a evolução desta doença.

Referências

- Brandt K, Lohmander LS, Doherty M. Pathogenesis of osteoarthritis: the concept of osteoarthritis as failure of the diarthrodial joint. In: Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS, editors. *Osteoarthritis*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1998: 70-74.
- Blanco-García FJ, Fernández López JC, Galdo Fernández F. *Artritis*. *Medicine (ed. española)* 2005; 9: 2098-2107.
- López Armada, Carames B, Cillero-Pastor B, Blanco García FJ. *Fisiopatología de la artritis: ¿cuál es la actualidad?*. *Rev Esp Reumatol* 2004; 31: 379-393.
- Burr DB. Subchondral bone. In: Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS, editors. *Osteoarthritis*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1998: 144-156.
- Burr DB. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: S20-S30.
- Castañeda S, Largo R, Calvo E et al. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol* 2006; 35: 34-41.
- Burr DB, Schaffler MB. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthritis: Quantitative microscopic evidence. *Microsc Res Tech* 1997; 37: 343-357.
- Li B, Aspden RM. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 614-651.
- Dequeker J. The relationship between osteoporosis and osteoarthritis. *Clin Rheum Dis* 1985; 11: 271-296.
- Pogrand H, Rutenberg M, Makin M, Robin G, Mencil J, Steinberg R. Osteoarthritis of the hip joint and osteoporosis: a radiological study in a random population sample in Jerusalem. *Clin Orthop Rel Res* 1982; 164: 130-135.
- Verstraeten A, van Ermen H, Haghebaert G, Nijs J, Geusens P, Dequeker J. Osteoarthritis retards the development of osteoporosis. *Clin Orthop Rel Res* 1991; 264: 169-177.
- Hannan MT, Anderson JJ, Zhang Y, Levy D, Felson DT. Bone mineral density and knee osteoarthritis in elderly men and women. The Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1671-1680.
- Felson DT. Epidemiology of osteoarthritis. In: Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS, editors. *Osteoarthritis*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1998: 13-22.
- Radin EL, Paul IL, Rose RM. Mechanical factors in osteoarthritis. *Lancet* 1972; 519-522.
- Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Rel Res* 1986; 213: 34-40.
- Reginster JY, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Henrotin Y, editors. *Osteoarthritis: Clinical and Experimental Aspects*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 1999: 156-187.
- Spector TD, Nandra D, Hart DJ, Doyle DV. Is hormone replacement therapy protective for hand and knee osteoarthritis in women?: The Chingford study. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 432-434.
- Reginster JY, Kvasz A, Bruyere O, Henrotin Y. Is there any rationale for prescribing hormone replacement therapy (HRT) to prevent or to treat osteoarthritis? *Osteoarthritis Cart* 2003; 11: 87-91.
- Richette P, Corvol M, Bardin T. Estrogens, cartilage, and osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2003; 70: 257-262.
- Ham KD, Loeser RF, Lindgren BR, Carlson CS. Effects of long-term estrogen replacement therapy on osteoarthritis severity in Cynomolgus monkeys. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1956-1964.
- van den Berg WB, van der Kraan PM, van Beuningen HM. Synovial mediators of cartilage damage and repair in OA. In: Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS, editors. *Osteoarthritis*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1998: 157-167.
- Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Youssef PP, Coleman P. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1997; 24: 365-371.
- Schumacher HR Jr. Synovial inflammation, crystals and osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43: 101-103.
- Alaaeddine N, Di Battista JA, Pelletier JP, Kiansa K, Clou-

- tier JM, Martel-Pelletier J. Differential effects of IL-8, LIF (pro-inflammatory) and IL-11 (anti-inflammatory) on tnf-alpha-induced PGE(2) release and on signalling pathways in human OA synovial fibroblasts. *Cytokine* 1999; 11: 1020-1030.
25. Jovanovic D, Pelletier JP, Alaeddine N et al. Effect of IL-13 on cytokines, cytokine receptors and inhibitors on human osteoarthritic synovium and synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6: 40-49.
 26. Muehleman C, Green J, Williams JM, Kuettner KE, Thonar EJ, Sumner DR. The effect of bone remodeling inhibition by zoledronic acid in an animal model of cartilage matrix damage. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 226-233.
 27. Doschak MR, Wohl GR, Hanley DA, Bray RC, Zernicke RF. Antiresorptive therapy conserves some periarticular bone and ligament mechanical properties after anterior cruciate ligament disruption in the rabbit knee. *J Orthop Res* 2004; 22: 942-948.
 28. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA et al. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1193-1206.
 29. Fujita T, Fujii Y, Okada SF, Miyauchi A, Takagi Y. Analgesic effect of etidronate on degenerative joint disease. *J Bone Miner Metab* 2001; 19: 251-256.
 30. Cocco R, Tofi C, Fioravanti A et al. Effects of clodronate on synovial fluid levels of some inflammatory mediators, after intra-articular administration to patients with synovitis secondary to knee osteoarthritis. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1999; 75: 71-76.
 31. Pelletier JP, Lajeunesse D, Jovanovic DV et al. Carprofen simultaneously reduces progression of morphological changes in cartilage and subchondral bone in experimental dog osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000; 27: 2893-2902.
 32. Arboleya L. Inhibidores de los leucotrienos: los nuevos antiinflamatorios en el tratamiento de la artrosis. *Rev Esp Reumatol* 2004; 31: 451-452.
 33. Pelletier JP, Boileau C, Brunet J et al. The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K. *Bone* 2004; 34: 27-38.
 34. Van de Loo FAJ, Joosten LA, van Lent PL, Arntz OJ, van den Berg WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen and zymosan induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 164-172.
 35. Plows D, Probert L, Georgopoulos S, Alexopoulou L, Kollias G. The role of tumor necrosis factor (TNF) in arthritis: studies in transgenic mice. *Rheumatol Eur* 1995; Suppl 2: 51-54.
 36. Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1998; 10:263-268.
 37. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1237-1247.
 38. Firestein GS, Manning AM. Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 609-621.
 39. Dhillon AS, Kolch W. Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys* 2002; 404: 3-9.
 40. Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis: suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1535-1544.
 41. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Gene therapy for osteoarthritis: new perspectives for the twenty-first century. *Clin Orthop* 2000; 379 (Suppl): S262-272.
 42. Pelletier JP, Caron JP, Evans CH et al. In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by IL-1Ra using gene therapy. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1012-1019.
 43. Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Interleukin-1 -converting enzyme/ /Caspase-1 in human osteoarthritis tissues: Localization and role in the maturation of IL-1 and IL-18. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1577-1587.
 44. Badger AM, Griswold DE, Kapadia R et al. Disease-modifying activity of SB-242235, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 175-183.
 45. Pelletier JP, Moldovan F, Fernandes JC, Schrier D, Flory C, Martel-Pelletier J. In vivo selective inhibition of ERK 1/2 in rabbit experimental osteoarthritis is associated with a reduction in the progression of articular tissue structural changes and metalloprotease inhibition. *Arthritis Rheum* 2001; 44: S305.
 46. Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Martel-Pelletier J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 595-607.
 47. Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1275-1286.
 48. Blanco FJ, Ochs RL, SchwarzH, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995; 146: 75-85
 49. Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheumatol* 1999; 26: 2002-2014.
 50. Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F, Pelletier JP. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 2000; 165: 3402-3410.

Endereço para correspondência

G. Herrero-Beaumont. Serviço de Reumatologia.
Fundación Jimenez Díaz.
Avda. Reyes Católicos, 2. Madrid – 28040.
E-mail: gherrero@fjd.es

Osteoporosis increases the severity of cartilage damage in an experimental model of osteoarthritis in rabbits

E. Calvo M.D., Orthopaedic Surgeon^{††a*}, S. Castañeda M.D.,
Rheumatologist, Service of Rheumatology^{§a}, R. Largo Ph.D., Research Assistant[‡],
M. E. Fernández-Valle Ph.D., Research Assistant^{||}, F. Rodríguez-Salvanés M.D.[¶] and
G. Herrero-Beaumont M.D., Service of Rheumatology, Head, Professor of Rheumatology[‡]
[†] Department of Orthopaedic Surgery, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid, Spain
[‡] Bone and Joint Research Unit, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid, Spain
[§] Department of Rheumatology, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma, Madrid, Spain
^{||} MRI Research Center, Universidad Complutense, Madrid, Spain
[¶] Unit of Clinical Epidemiology, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma, Madrid, Spain

Summary

Objective: To evaluate the effect of osteoporosis (OP) in cartilage damage developed in an experimental model of osteoarthritis (OA) in mature female rabbits in order to investigate the relationship between OP and OA.

Methods: OA was experimentally induced by anterior cruciate section and partial medial meniscectomy in the left knee of 12 rabbits. OP was experimentally induced prior to OA in six rabbits by bilateral ovariectomy (OVX) and systemic corticosteroid administration during 4 weeks. Knees were evaluated with high resolution magnetic resonance imaging (MRI) before knee surgery to rule out any detrimental effect of corticosteroids on cartilage. Gross and microscopic cartilage changes were assessed 16 weeks after surgery in bilateral knees. Left knees were considered osteoarthritic or osteoarthritic plus osteoporotic. Right knees were used as osteoporotic and healthy controls, respectively. Bone mineral density (BMD) was measured with dual energy X-ray absorptiometry (DXA) at the lumbar spine, global knee and subchondral knee bone, and its variations correlated with cartilage abnormalities.

Results: MRI before knee surgery disclosed no cartilage or bone abnormalities in any of the studied groups. OP increased the severity of cartilage abnormalities in experimental knee OA significantly ($P < 0.05$). Cartilage damage was inversely correlated with BMD variations measured at the lumbar spine ($r = -0.74$; $P = 0.015$). BMD changes in global and subchondral knee bone also showed a trend to correlate inversely with cartilage damage.

Conclusions: Prior induction of OP increases the severity of cartilage damage in experimental OA. Increase in cartilage damage correlates with bone loss. These findings suggest a direct relationship between OP and OA.

© 2006 Osteoarthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: Osteoporosis, Osteoarthritis, Bone mineral density, Cartilage.

Introduction

Osteoarthritis (OA) and osteoporosis (OP) are the most prevalent skeletal diseases related to age and are associated with considerable morbidity. Clinical experience suggests that the conditions occur together uncommonly in the same patient, but the relationship between the two diseases remains unclear^{1–4}. Many studies indicate that bone mass expressed as bone mineral density (BMD) of the lumbar spine and/or hip is higher in patients with OA than in healthy subjects^{4–12}, but long term follow-up studies have failed to demonstrate that patients with OA have

a lower rate of fractures despite higher BMD¹³. Furthermore, other investigations have stated that subchondral bone density in OA is lower than normal^{14,15}. To increase the confusion, recent experimental reports have pointed out that estrogen deficiency could result in cartilage degeneration^{16,17}.

This controversy is due to the fact that data on the relationship between OA and OP are commonly obtained from clinical cross-sectional studies. Few longitudinal studies have been undertaken looking at the association between these two entities^{18,19}. Although longitudinal studies would ideally be better, they are also more difficult to perform because of the length of time needed. In addition, key tools for studying OP, such as BMD analysis by dual energy X-ray absorptiometry (DXA), can easily be biased by the presence of osteophytes or other abnormalities commonly associated to age, making their results difficult to interpret. These limitations may be overcome with experimental studies. However, experimental investigations addressing the relationship between OP and OA are limited¹⁷.

^aBoth authors have equally contributed to this work.

*Address correspondence and reprint requests to: Dr Emilio Calvo, M.D., Orthopaedic Surgeon, Department of Orthopaedic Surgery, Fundación Jiménez Díaz, Avenida Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid, Spain. Tel: 34-91-549-5544; Fax: 34-91-549-9122; E-mail: ecalvo@fjd.es

Received 16 November 2005; revision accepted 13 June 2006.

The purpose of this study is to analyze the effect of OP on joint degeneration developed in an experimental model of OA in mature female rabbits.

Material and methods

EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL

A total of 12 sexually and skeletally mature white New Zealand female rabbits (8 months old, 3.5–5 kg body weight) were obtained from B&K Universal, Pamplona, Spain. The animals had free access to water and standard rabbit chow (Panlab, Barcelona, Spain). After 2 weeks of acclimatization, rabbits were randomly allocated to two study groups (OP plus OA or OA alone) to assess the effect of OP on cartilage lesions.

OP was experimentally induced in six rabbits by a combination of bilateral ovariectomy (OVX) and systemic corticosteroid administration as previously described²⁰. Bilateral OVX was performed through a sagittal medial laparotomy under general anesthesia with intramuscular injection of 0.5 ml/kg xylazine (Rompun[®], Bayer, Leverkusen, Germany) and 1.5 ml/kg of ketamine HCl (Ketolar[®], Parke-Davis, Barcelona, Spain) 1:3. Antibiotic prophylaxis with cefonicid (100 mg/kg) (Monocid[®]; Smith & Beecham, Madrid, Spain) was administered before and during the 5 days following surgery. Figure 1 illustrates the protocol for the experimental induction of OP and OA in the same rabbits. Two weeks postoperatively they began to receive daily i.m. injections of methylprednisolone hemisuccinate (MPH) at a dose of 1 mg/kg/day for 4 weeks. Six weeks after OVX, OA was experimentally induced in the left knee by anterior cruciate ligament section and partial medial meniscectomy^{21,22}. Rabbits were anesthetized and antibiotic prophylaxis was used according to the protocols previously described. The knee was approached through a median parapatellar incision under sterile conditions. The anterior cruciate ligament was sectioned at its femoral insertion with a nr. 11 blade. Using iris scissors, the meniscotibial ligament was incised, the peripheral attachment of the anterior half of the meniscus was released and finally excised. The knee was closed by layers and a bulky Robert-Jones bandage applied for 4 days. All animals were permitted free cage activity after surgery.

Experimental OA was induced simultaneously in the six remaining rabbits following the same protocol without prior induction of experimental OP. Rabbits were euthanized by intracardiac administration of sodium pentobarbital (50 mg/kg) (Pentotal, Abbott, Madrid, Spain) 16 weeks after the knee operation. Both knee joints were carefully dissected to characterize the progression of their stifle joint disease

and to observe the influence of OP on the cartilage lesions. Left knees from ovariectomized rabbits were osteoporotic and osteoarthritic (OPOA knees), while left knees obtained from rabbits which had not been ovariectomized were OA alone (OA knees). Right knees from ovariectomized rabbits were used as non-osteoarthritic but osteoporotic controls (OP knees), and right knees from non-ovariectomized animals served as healthy (normal knees) controls. The research complied with national legislation and with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and had local ethical committee approval.

BMD MEASUREMENTS

DXA analyses of BMD were performed in all rabbits at baseline, 6 weeks after OVX and 16 weeks after experimental OA, immediately before sacrifice according to a previously reported protocol²⁰ (see Fig. 1). DXA analyses were carried out using a Hologic QDR-1000/W[™] pencil beam densitometer (Hologic Inc., Waltham, MA, USA) with a 1 mm diameter collimator on the X-ray output. The densitometer was daily calibrated and a specific software for small sample analysis which increases the spatial resolution was used (space per scanning line of 0.0254 cm and resolution for each point of 0.0127 cm; version 6.2 (Hologic Inc., Waltham, MA, USA)). BMD was measured in the lumbar spine and in the left stifle joint. Measurements were performed *in vivo* with animals placed in supine decubitus position under general anesthesia with xylazine and ketamine HCl as previously described. After digital radiological screening, a point located 3 cm below the navel was used as the external guide to focus the DXA pencil beam at about L3–L4. For the knee DXA analysis, rabbits were placed lying on a methacrylate bed specifically designed for the study with 30 degrees of lateral tilt to obtain a true posterior-anterior joint view, and DXA was carried out with the leg in full extension and internal rotation, with the beam focused immediately distal to the joint line²⁰.

Mean absorptiometric values for the third and the fourth vertebrae were calculated for the lumbar spine, and global joint and subchondral bone values were evaluated in the left knee²⁰. A region of interest of 266 lines of width and 22 lines above and under the joint space was defined for global knee BMD values, and the mean values of four differentiated regions corresponding to medial and lateral femoral condyles and tibial plateaux (17 × 11 pixels, 0.06 cm² each), located, respectively, 1 mm above and below the joint line at the areas of maximum contact between the femoral condyles and the tibial plateaux were computed for subchondral bone BMD values (Fig. 2).

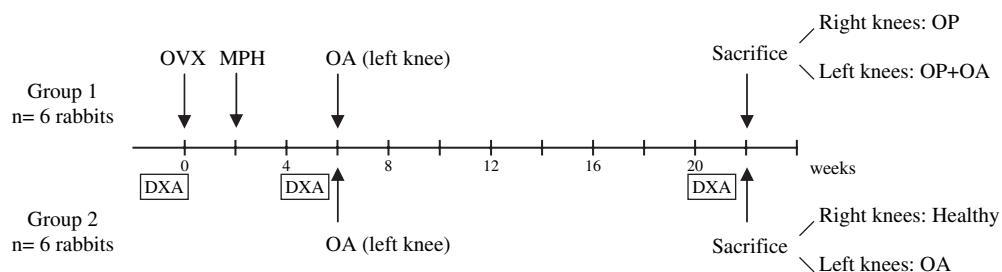


Fig. 1. Diagram showing the schedule of experimental interventions.

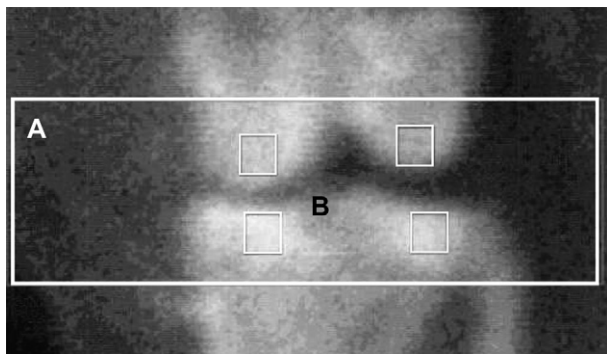


Fig. 2. DXA analysis of a rabbit knee showing the regions of interest evaluated. Global knee evaluated trabecular and cortical bones in the big rectangle (A). Four squared areas adjacent to the joint line were used to assess subchondral bone in each femoral condyle and tibial plateau (B).

CARTILAGE EVALUATION WITH MAGNETIC RESONANCE IMAGING

Since the aim of this study was to evaluate the effect of OP in the development of osteoarthritic articular lesions, the left knees in all rabbits were examined with high resolution magnetic resonance imaging (MRI) immediately prior to knee operation. MRI appearance of both groups of animals was compared in order to exclude any detrimental effect upon joint cartilage due to OVX or corticosteroid treatment.

MRI was performed on a Bruker Biospec 47/40 spectrometer (Bruker Medizintechnik GmbH, Ettlingen, Germany) equipped with a 4.7 T superconducting magnet (Oxford Instruments Ltd., Oxford, UK) and high-performance actively shielded gradients with a maximum gradient strength of 50 mT/m, following a modified, previously described protocol²³. The radiofrequency probe used was a 4 cm home-made surface coil. Articular abnormalities were evaluated in coronal images obtained using a T1 weighted spin-echo sequence [repetition time (TR) = 700 ms, echo time (TE) = 15 ms, 5 cm Field Of View (FOV), 256 × 256 image matrix giving 195 μm² in plane spatial resolution from a 1 mm slice thickness]. In addition, cartilage thickness of the weight bearing area of the medial femoral condyle

was automatically measured in sagittal images following a method based on digitized image analysis of variations in signal intensity. The cartilage thickness was evaluated using a specifically developed IDL program²³ (Fig. 3). The sequence acquired for image analysis of cartilage thickness was a 3D-spoiled gradient-echo with TR/TE 100/8 ms, a flip angle of 30°, 1 number of average experiments (NEX). The FOV was 5 × 5 × 1.6 cm³ and the image acquisition size was 256 × 256 × 16. The weight bearing area was selected because it has been demonstrated that it is the zone where the earliest abnormalities can be detected with MRI²³. The MR images were interpreted by two blinded observers (EC and SC).

GROSS PATHOLOGY

At sacrifice, the infrapatellar synovial pad and the femoral and tibial cartilages were inspected for gross pathologic changes by a blinded observer experienced in cartilage pathology (EC) following a semiquantitative scale²⁴. The synovial pad was graded as 0 (normal) or 1 (fibrous and proliferative appearance). For the femoral condyle and tibial plateau cartilage the severity of macroscopic changes was categorized as 0 (normal), 1 (discoloration, mild surface irregularities or pitting), 2 (partial-thickness erosion or fibrillation), and 3 (full-thickness erosion or/and osteophytes). A score was allocated to each joint surface (medial and lateral femoral condyles and tibial plateaux) and an overall score was obtained by adding the severity scores for synovial pad and each surface evaluated in order to quantify the joint alterations with regard to both the severity and the extent of tissue damage.

HISTOLOGY

The purpose of the histological evaluation was to define and quantify the overall degree of joint changes, to score abnormalities of cells, matrix, structure and calcified cartilage, and to correlate each histological alteration with the variations of BMD detected by DXA in the ovariectomized rabbits.

After macroscopic examination, isolated femurs and tibiae were fixed in buffered formalin for 24 h and then decalcified for 6 weeks in an EDTA solution (2 mM

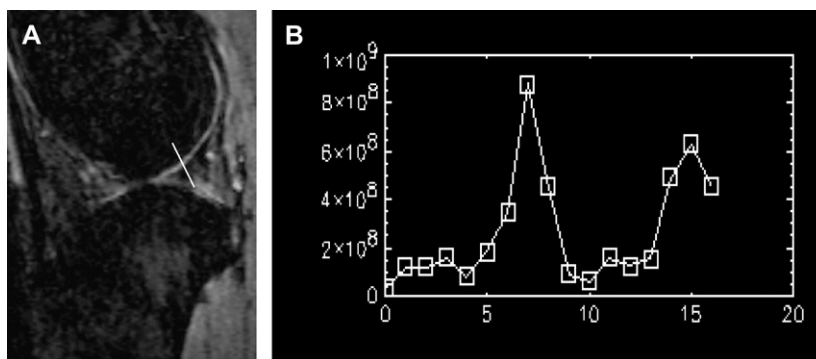


Fig. 3. Cartilage thickness measurement by MRI. (A) The cartilage thickness was measured in the sagittal gradient-echo image through the medial compartment of the left knee (TR/TE 100/8 ms). Five lines crossing the articular cartilage perpendicularly were automatically displayed along the weight bearing area of the medial femoral condyle. (B) A graph of digitized image analysis plotted with signal intensity across the articular surface corresponding to each line was obtained. A characteristic high peak represents the cartilage signal intensity. Cartilage thickness was measured by computing the distance between the points of signal drop on the baseline which correspond to subchondral bone and joint fluid. The mean values of the cartilage thickness measurements were used for statistical analysis.

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.5 mM tartrate sodium–potassium, pH 1) for further histological evaluation. The decalcified knee joints were cleaved in a sagittal plane along the central portion of the articular surface of each medial femoral condyle corresponding to the weight bearing area before embedding in paraffin wax. Sections (5 μ m) were stained with hematoxylin and eosin (to assess cellularity and structural abnormalities) and Alcian blue to evaluate matrix abnormalities. The weight bearing area of the femoral condyle was delimited and histopathologically assessed using the Mankin's grading system by an experienced cartilage pathologist (EC)²⁵. The observer was blinded with respect to group, laterality, and macroscopic description, and the samples were presented in random order. A partial score for each category of the Mankin scale (structure abnormalities, cellularity, matrix staining and tidemark integrity) was allocated, and the scores in each of these categories were combined for each section. The evaluation was performed at the weight bearing surface of the medial femoral condyle because it shows the earliest and most severe histological abnormalities²⁴.

STATISTICAL ANALYSIS

All statistical analyses were performed using commercially available software (SPSS v 11.0, Windows®, Chicago, IL, USA). Results are expressed as mean \pm standard error measurement (S.E.M.) unless otherwise stated. Data from multiple groups were compared using Kruskal–Wallis and Mann–Whitney non-parametric analyses as appropriate. A Spearman correlation test was calculated to determine the extent to which the cartilage abnormalities evaluated according to the Mankin grading system correlated with the variations in BMD measured with DXA (r = partial correlation). Differences were considered significant when the P value was less than 0.05.

Results

One rabbit undergoing experimental OA without previous OVX died following meniscectomy. Consequently, data from 11 rabbits were available: five animals with experimental OA, and six undergoing experimental OP and OA (22 knees, six OPOA, six OP, five OA and 5 healthy controls).

CARTILAGE EVALUATION WITH MRI AND GROSS PATHOLOGY

No morphologic cartilage or bone changes could be identified in any knee at MRI examination prior to experimental induction of OA. Figure 3 shows a characteristic high peak representing the cartilage signal intensity. Mean values of cartilage thickness measured with high resolution MRI at

the weight bearing area of the left medial femoral condyle were 0.56 ± 0.04 mm and 0.54 ± 0.04 mm in the groups of rabbits with and without previous OVX, respectively. Differences were not statistically significant at comparison.

The scores corresponding to the macroscopic joint assessment after evaluating the 22 knees are shown in Table I. While no abnormalities could be found on gross inspection in the OP and normal control right knees, those knees corresponding to the groups where OA had been previously experimentally induced showed evident alterations consisting of synovial thickening, cartilage pitting and discoloration, ulcers and osteophytes. These abnormalities were more severe in the medial compartment of the knee. Although they were distributed along the whole articular surface, cartilage lesions were more intense in the weight bearing area of both femoral condyle and tibial plateau (Fig. 4). Interestingly, total scores individually given to both medial femoral and tibial compartments in the OPOA knees were significantly higher than those obtained by OP and control knees ($P < 0.05$). While macroscopic cartilage surface changes showed a trend to be more severe in OA than in OP and control knees, the differences were not statistically significant ($P = 0.06$).

HISTOLOGY

As illustrated in Fig. 5, those knees where OA had been experimentally induced (OA and OPOA left knees) showed significantly higher overall Mankin scores than normal healthy knees ($P < 0.05$). Moreover, there were also significant differences when the scores obtained from osteoarthritic knees in ovariectomized rabbits (OPOA knees) were compared with OA knees. Overall Mankin scores in OA knees were higher than that in OP knees, but the differences were not significant. However, OP knees showed significantly higher scores than normal healthy knees ($P < 0.05$), suggesting that OP could have an aggravating detrimental effect on the development of OA lesions.

The majority of OA and OPOA knees had abnormalities in structure, cellular density and matrix staining but there were no significant differences between the two groups of knees and the tidemark appeared normal, without any breach by blood vessels, in the majority of samples evaluated. Structural irregularities consisted of fibrillation and clefts or ulcers that reached the radial zone. However, the detrimental effect of OP in cartilage was more pronounced in the matrix staining with Alcian blue (Fig. 6). While OA showed mild to moderate reduction in the matrix staining, this reduction was moderate to severe in OPOA knees, and the combined histological scores used for assessment of matrix staining were significantly higher in

Table I
Macroscopic evaluation of the cartilage

Group#	Synovial pad	Medial femur	Lateral femur	Medial tibia	Lateral tibia	Total score
Normal	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
OP	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
OA	0.8 \pm 0.2	2.4 \pm 0.6	0.6 \pm 0.4	1.6 \pm 0.7	0.6 \pm 0.6	6 \pm 1.7
OPOA	0.5 \pm 0.2	2.7 \pm 0.3*§	1 \pm 0.6	3 \pm 0*§	0.8 \pm 0.5	8 \pm 1.4*§

#Normal: healthy control right knees of rabbits in which experimental OA was induced in the left knee. OP: osteoporotic control right knees of rabbits in which experimental OA was induced in the left knee 6 weeks after OVX and corticosteroid treatment. OA: left osteoarthritic knees of previously healthy rabbits. OPOA: left osteoarthritic knees of rabbits in which OP was induced. Data are expressed as mean \pm S.E.M. $N = 5$ (normal and OA)–6 (OPOA and OP). * $P < 0.05$ vs normal; § $P < 0.05$ vs OP.

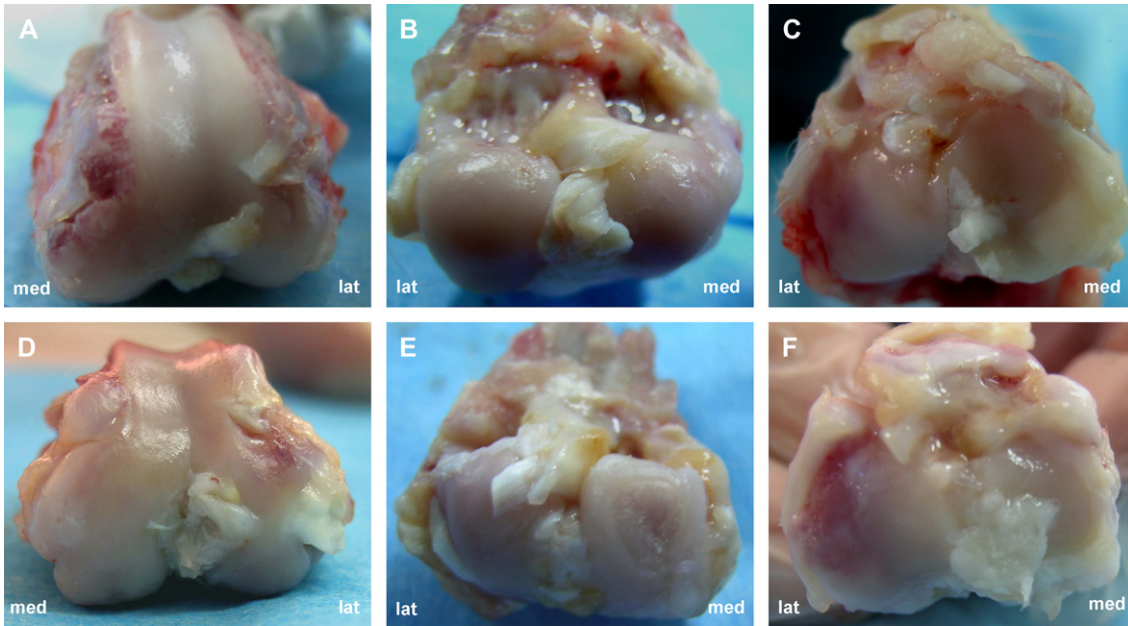


Fig. 4. Gross pathological macrographs from OA (A, B, C) and OPOA (D, E, F) knees. (A) OA knee where the distal joint surface of the femoral condyles appears normal, but the rim of the medial condyle shows a whitish osteophyte. Although no ulcers or fissuring can be detected, the weight bearing area of femoral condyles appears eburnated. (B) OA knee: the load bearing area shows partial-thickness ulcer in the medial femoral condyle and irregularities and pitting in the lateral condyle. (C) Tibia from an OA rabbit where changes of OA, including erosion of the medial plateau and an osteophyte at the edge of the lateral plateau can be seen. (D) OPOA knee: normal whitish bright appearance of the femoral cartilage in the femoral condyles has disappeared and an extensive osteophyte can be observed along the medial rim of the femoral condyle. Note partial-thickness ulcers located at the anterior part of the lateral femoral condyle and weight bearing area of the medial femoral condyle. (E) Full-thickness ulcer in the load bearing area of the medial femoral condyle. (F) Extensive inflamed ulceration can be observed in the medial joint surface and osteophytes border the medial and lateral margins of the tibial plateaux. med = medial side. lat = lateral side.

OPOA and OP knees than in controls. With regard to cellular changes, OA knees showed mild to moderate alterations in chondrocytes and hypercellularity, but the cartilage was usually hypocellular, and clones could be appreciated more frequently in OPOA knees. The clones

were localized in the superficial and deep zones of the tissue (Fig. 6). Although differences did not reached statistical significance, partial scores from matrix staining and cellular density showed a trend to be more severe in OPOA than in OA knees ($P = 0.067$).

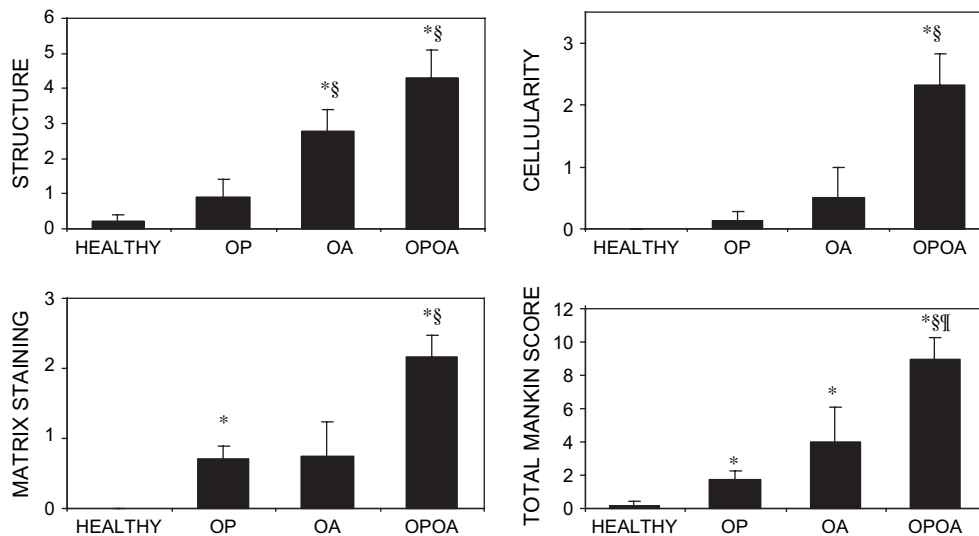


Fig. 5. Bar graphs show the histological microscopic evaluation at the weight bearing area of the medial femoral condyle, with the total Mankin score and the partial scores obtained for each category of the scale. HEALTHY = healthy knees, OP = osteoporotic knees, OA = osteoarthritic knees, OPOA = osteoporotic and osteoarthritic knees. * $P < 0.05$ vs healthy; § $P < 0.05$ vs OP; ¶ $P < 0.05$ vs OA.

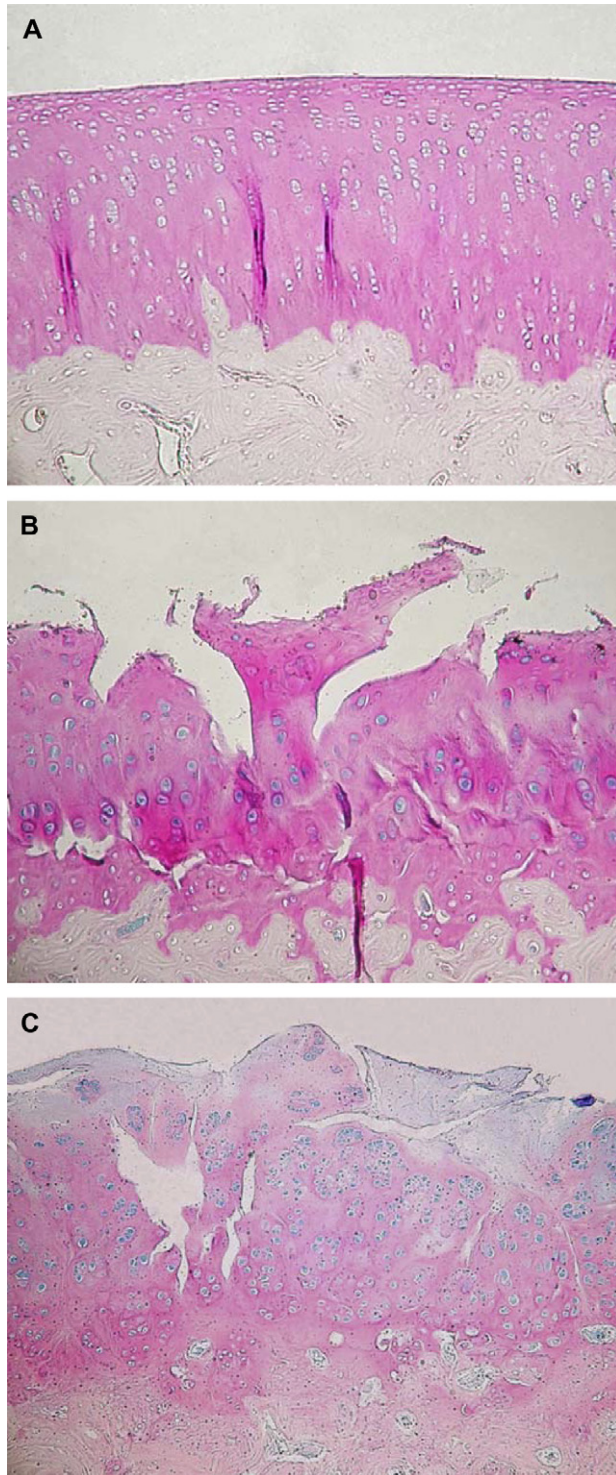


Fig. 6. Photomicrographs of femoral rabbit articular cartilage (Alcian blue). (A) In OP knees the cartilage shows a normal appearance. The surface is smooth, chondrocytes are present throughout, and the matrix staining is homogeneous ($\times 10$). (B) The superficial and intermediate layers of cartilage are lost and fissures reach the deep radial zone in this sample corresponding to an ulcer at the weight bearing area from an OA knee. Cellularity is diminished and the normal pattern of distribution in columns is lost ($\times 20$). (C) Marked structural abnormalities and hypocellularity are also evident in this sample from an OPOA knee. Chondrocytes are grouped in clones and matrix staining intensity is severely reduced ($\times 20$).

Table II
BMD measurements by DXA

	Baseline	Pre-OA¶		Post-OA¶	
		OPOA	OA	OPOA	OA
Lumbar spine	300 ± 15	248 ± 27*	302 ± 21	233 ± 39*	305 ± 12
Global knee	453 ± 20	342 ± 31*	458 ± 43	363 ± 76*	473 ± 31
Subchondral bone	625 ± 30	483 ± 73*	637 ± 32	489 ± 97*	642 ± 47

BMD values are expressed in mg/cm^2 . Only left knees were used for DXA studies. ¶BMD values before and after experimental OA induction. OPOA: rabbits with experimentally induced OP followed by OA induction. OA: rabbits with experimental OA induction without previous OP. Data are expressed as mean \pm s.e.m. $N = 5$ (OA)—6 (OPOA). * $P < 0.05$ vs baseline.

BMD MEASUREMENTS AND CORRELATION WITH HISTOPATHOLOGY

BMD measurements for the different anatomical locations analyzed with DXA in the groups of knees studied are shown in Table II. Six weeks after OVX, OP rabbits showed a significant decrease in BMD when compared to baseline at the three anatomical locations analyzed ($P < 0.05$). BMD values in this group, measured immediately before knee surgery, were also significantly lower than those from animals that did not undergo experimental OP. The BMD values, in this group, were also within the normal range, consistent with previously published data²⁰. These data demonstrate that OA was surgically induced in both OP and healthy rabbits. Sixteen weeks after experimental induction of OA, BMD values showed no significant change, and the differences between the two groups of animals (i.e., rabbits with and without previous OP) were maintained in the three anatomical sites evaluated ($P < 0.05$).

With regard to the relation between BMD variations and cartilage injury, it is notable that microscopic cartilage abnormalities evaluated by the Mankin grading system correlated with the decrease of lumbar BMD [Fig. 7(A), $r = -0.743$; $P = 0.014$]. This tendency was also observed in the global and subchondral bone of the knee [Fig. 7(B and C), $r = -0.55$ and -0.56 ; $P = 0.10$ and 0.09 , respectively].

Discussion

The connection between OA and OP has attracted considerable attention. However, reports concerning the relationship between OA and OP are contradictory. This controversy may be the result of difficulties in undertaking adequate sequential studies. Most, data pertaining to this relationship have been obtained from human cross-sectional studies. As accurate methods to assess the initial stages of cartilage degeneration in humans are not available, it is almost impossible to establish the potential role of OP in the etiopathogenesis of OA. OP and OA have a heterogeneous pathogenesis where bone integrity plays a key role. There is, therefore, a need for experimental studies where both pathologies can be induced independently without interference from other confounding factors which could influence their development. In this investigation we developed an experimental model of OP and OA in the rabbit where the interplay between both conditions can be studied in a longitudinal manner.

Contrary to conventional wisdom, which suggests that OP and OA are inversely related, we have demonstrated a direct association between these two entities in this study.

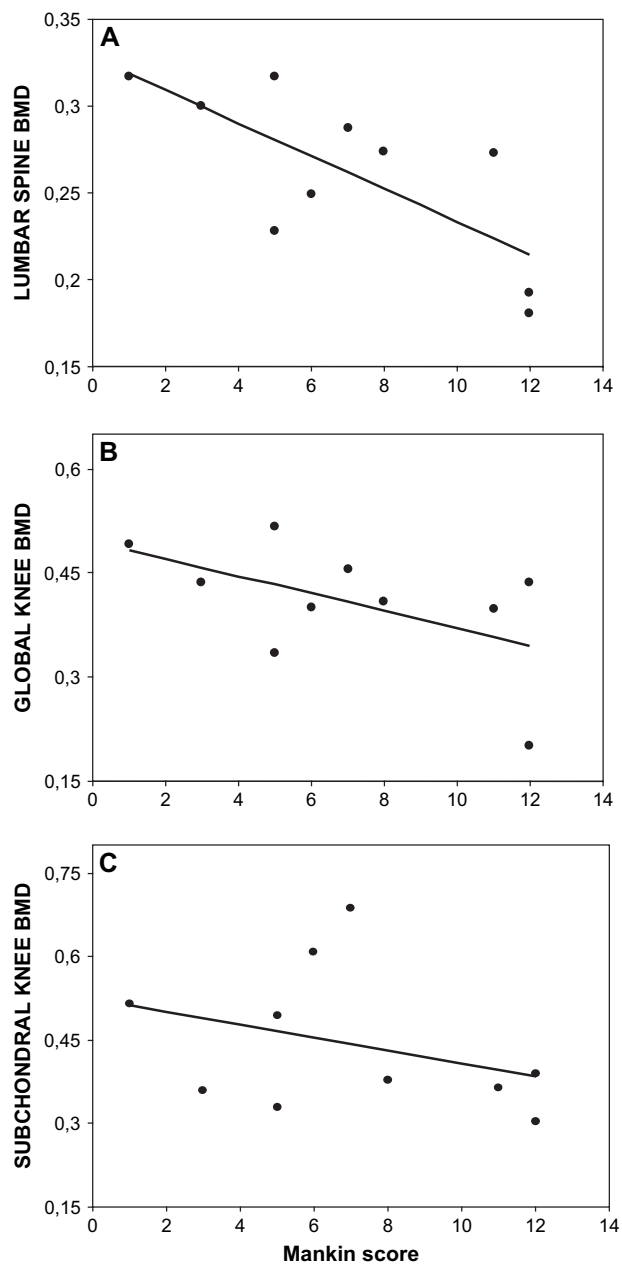


Fig. 7. Linear correlations between BMD values (g/cm^2) measured using DXA at (A) lumbar spine, (B) global knee and (C) subchondral knee bone and histopathological microscopic scores according to the Mankin's grading system.

Experimentally induced OP using a combined model of OVX and systemic corticosteroid administration results in the development of cartilage abnormalities in the knee. In addition, cartilage lesions, experimentally induced by anterior cruciate ligament sectioning and partial meniscectomy, are more severe in OP rabbits. From a histopathological point of view, a significant decrease in matrix staining was observed when the cartilage from OP animals without OA was evaluated. Decreases in matrix staining and in cellular density were the two features in the Mankin scale in which OA and OP rabbits showed differences which tended to statistical significance when compared to OA rabbits. We have previously demonstrated in longitudinal studies of

experimental OA that the decrease in matrix staining, followed by changes in cellularity are the earliest histological abnormalities detected in OA, while breaches of the tidemark and injury to cartilage structure are only prominent at advanced stages²⁴. Our findings suggest that OP accelerates cartilage damage without altering the sequence of changes or the histopathological characteristics of OA.

Since a few reports have indicated that systemic corticosteroids may result in cartilage damage, it could be argued that cartilage degeneration in this experimental model could be secondary to transient methylprednisolone administration²⁶. For this reason we performed a study with high resolution MRI before the experimental induction of OA. We have previously demonstrated in an experimental study that at the very early stages of OA high resolution MRI is sensitive enough to detect cartilage swelling, and that this finding correlates histologically to changes in matrix staining, which represents proteoglycan depletion^{23,24}. As no joint lesions could be detected on MRI in the current study, we considered it likely that the cartilage lesions are due to OP and OA.

The observation that cartilage damage is increased by OP is consistent with data from previous studies indicating that the incidence and prevalence of OA are increased in postmenopausal women^{27,28}. Recent publications in monkeys and rats have provided strong evidence that OVX induces OA-like changes in articular cartilage^{16,17}. These studies suggested an apparent chondroprotective effect of endogenous estrogens on cartilage turnover. The suggestion that cartilage metabolism may be influenced by estrogens is made credible by several reports which clearly demonstrated that chondrocytes in articular cartilage possess functional estrogen receptors^{29,30}. Furthermore, this putative chondroprotective effect of estrogens could have critical therapeutic implications for OA. Experimental and epidemiological and case-control studies have demonstrated that the administration of exogenous estrogens and estrogen-like drugs, such as selective estrogen receptor modulators, might prevent cartilage destruction and decrease the incidence of OA³¹⁻³³. However, whether established cartilage lesions can be effectively reversed using such medications remains to be investigated.

It is interesting that not only did OP increase cartilage lesions in experimental OA, but also the severity of the cartilage lesions correlated with the amount of BMD lost at the lumbar spine and knee, verifying a direct relationship between both these pathologies. With regard to subchondral bone, BMD was significantly lower in OPOA knees than in OA knees in this investigation. Lower than normal BMD values in subchondral regions of both femoral head and knee joints of patients with hip and knee OA have been reported^{15,34}. Subchondral bone rendering articular cartilage more susceptible to mechanical stresses has been incriminated in the pathogenesis of OA^{35,36}. However, this finding suggests that changes in articular cartilage precede structural alterations in subchondral bone in OA, as we have previously demonstrated^{23,24}.

In summary, OP increases the severity of cartilage damage in experimental OA. Cartilage damage is inversely correlated with BMD measured at the lumbar spine and knee. Since chondrocytes possess estrogenic receptors, the effect of OP in OA lesions might be explained by the potential protective effect of estrogens on cartilage. Abnormalities in the mechanical properties of osteopenic subchondral bone in OP could also be incriminated in the etiopathogenesis of OA. The current experiments do not allow us to ascertain if the acceleration of OA in OP is the result of estrogen insufficiency, abnormal subchondral

bone biomechanics, or both. Further studies on the relationship between OP and OA are needed as better understanding of the pathogenesis of these two disorders could have important therapeutic implications for both of these common diseases.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr O. Sánchez-Pernaute, from the Bone and Joint Research Unit (Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid), and Dr A. Herrera and Dr E. Sáez Barajas, from the CAI of RMN (Universidad Complutense, Madrid) for their valuable advice and technical assistance in this study. This work was partially supported by research grants from the Spanish Ministry of Education (SAF 2003/08379) Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/0798/2004), and the Fondo de Investigaciones Sanitarias (CP03/00011; G03/152; PI04/0259).

References

- Hart DJ, Mootosamy I, Doyle DV, Spector TD. The relationship between osteoarthritis and osteoporosis in the general population: the Chingford Study. *Ann Rheum Dis* 1994;53:158–80.
- Sambrook P, Naganathan V. What is the relationship between osteoarthritis and osteoporosis? *Baillieres Clin Rheum* 1997;11:695–710.
- Dequeker J, Aerssens J, Luyten FP. Osteoarthritis and osteoporosis: clinical and research evidence of inverse relationship. *Aging Clin Exp Res* 2003;15:426–39.
- Stewart A, Black A. Bone mineral density in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:464–7.
- Stewart A, Black A, Robbins SP, Reid DM. Bone density and bone turnover in patients with osteoarthritis and osteoporosis. *J Rheumatol* 1999;26:622–6.
- Showers M, Lachance L, Jamadar D, Hochberg MC, Hollis B, Crutchfield M, *et al.* The associations of bone mineral density and bone turnover markers with osteoarthritis of the hand and knee in pre- and perimenopausal women. *Arthritis Rheum* 1999;42:483–9.
- Nevitt MC, Lane NE, Scott JC, Hochberg MC, Pressman AR, Genant HK, *et al.* Radiographic osteoarthritis of the hip and bone mineral density. *Arthritis Rheum* 1995;38:907–16.
- Hannan MT, Anderson JJ, Zhang Y, Levy D, Felson DT. Bone mineral density and knee osteoarthritis in elderly men and women: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1993;36:1671–80.
- Burger H, van Daele PLA, Odding E, Valkenburg HA, Hofman A, Grobbee DE, *et al.* Association of radiographically evident osteoarthritis with higher bone mineral density and increased bone loss with age: the Rotterdam Study. *Arthritis Rheum* 1996;36:81–6.
- Orwoll ES, Bauer DC, Vogt TM, Fox KN. Axial bone mass in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 1996;124:187–96.
- Hochberg MC, Lethbridge-Cejku M, Scott WW, Reichle L, Plato CC, Tobin JD. Upper extremity bone mass and osteoarthritis of the knees: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Bone Miner Res* 1995;10:432–8.
- Lethbridge-Cejku M, Tobin JD, Scott WW, Hochberg MC, Reichle L, Plato CC. Axial and hip bone mineral density and radiographic changes of osteoarthritis of the knees: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Rheumatol* 1996;23:1943–7.
- Arden NK, Nevitt MC, Lane NE, Gore LR, Hochberg MC, Scott JC, *et al.* Osteoarthritis and risk of falls, rates of bone loss, and osteoporotic fractures. *Arthritis Rheum* 1999;42:1378–85.
- Verstraeten A, van Ermen H, Haghebaert G, Nijs J, Geusens P, Dequeker J. Osteoarthritis retards the development of osteoporosis. Observation of the coexistence of osteoarthritis and osteoporosis. *Clin Orthop* 1991;264:169–77.
- Karvonen RL, Miller PR, Nelson DA, Granda JL, Fernández-Madrid F. Periarticular osteoporosis in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 1998;25:2187–94.
- Ham KD, Loeser RF, Lindgren BR, Carlson CS. Effects of long-term estrogen replacement therapy on osteoarthritis severity in cynomolgus monkeys. *Arthritis Rheum* 2002;46:1956–64.
- Høegh-Andersen P, Tankó LB, Andersen TL, Lundberg CV, Mo JA, Heegaard AM, *et al.* Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R169–80.
- Zhang Y, Hannan MT, Chaisson CE, McAlindon TE, Evans SR, Aliabadi P, *et al.* Bone mineral density and risk of incident and progressive knee osteoarthritis in women: the Framingham Study. *J Rheumatol* 2000;27:1032–7.
- Hart DJ, Cronin C, Daniels M, Worthy T, Doyle DV, Spector TD. The relationship of bone mineral density and fracture to incident and progressive osteoarthritis of the knee: the Chingford Study. *Arthritis Rheum* 2002;46:92–9.
- Castañeda S, Largo R, Calvo E, Rodríguez-Salvanés F, Marcos ME, Díaz-Curiel M, *et al.* Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol* 2006;35:34–41.
- Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report. *Acta Orthop Scand* 1970;41(5):522–30.
- Mendes DG, Gotfried Y, Hamburger S. Induction of the three grades of osteoarthritis in rabbit's knee. *Orthop Rev* 1981;10:113–6.
- Calvo E, Palacios I, Delgado E, Ruiz-Cabello J, Hernández P, Sánchez-Pernaute O, *et al.* High resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:463–72.
- Calvo E, Palacios I, Delgado E, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Egido J, *et al.* Histopathological correlation of cartilage swelling detected by magnetic resonance imaging in early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:878–86.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971;53A:523–37.
- Ribbens C, Martin y Porras M, Franchimont N, Kaiser R, Jaspar JM, Damas P, *et al.* Increased matrix metalloproteinase-3 serum level in rheumatic diseases: relationship with synovitis and steroid treatment. *Ann Rheum Dis* 2002;61:161–6.

27. Felson DT, Nevitt MC. Estrogen and osteoarthritis: how do we explain conflicting study results? *Prev Med* 1999;28:445–8.
28. Erb A, Brenner H, Gunther KP, Sturmer T. Hormone replacement therapy and patterns of osteoarthritis: baseline data from the Ulm Osteoarthritis Study. *Ann Rheum Dis* 2000;59:105–9.
29. Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S. Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:560–6.
30. Richmond RS, Carlson CS, Register TC, Shanker G, Loeser RF. Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2. *Arthritis Rheum* 2000;43:2081–90.
31. Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen receptor modulators. Mechanism of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 2003;348:618–29.
32. Badger AM, Blake SM, Dodds RA, Griswold DE, Swift BA, Rieman DJ, *et al.* Idoxifene, a novel selective estrogen receptor modulator, is effective in a rat model of adjuvant-induced arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:1380–6.
33. Nevitt MC, Cummings SR, Lane NE, Hochberg MC, Scott JC, Pressman AR. Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med* 1996;156:2073–80.
34. Li B, Aspden RM. Material properties of bone from the femoral neck and calcar femorale of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *Osteoporos Int* 1997;7:450–6.
35. Radin EL, Rose EL. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop* 1986;213:34–40.
36. Layton MUV, Goldstein SA, Goulet RW, Feldkamp LA, Kubinski DJ, Bole GG. Examination of subchondral bone architecture in experimental osteoarthritis by microscopic computer axial tomography. *Arthritis Rheum* 1988;31:1400–5.

