



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA
ADMINISTRACIÓN ORAL DE PÉPTIDOS
DE COLÁGENO DE ANCHOVETA SOBRE
EL METABOLISMO ÓSEO EN RATAS
OVARIECTOMIZADAS”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO
DE MAESTRO EN FISIOLÓGÍA

ANA LUCIA CHIRINOS SEVERINO

LIMA - PERÚ

2018

Asesor de Tesis

Dra. Carla Gonzales Arimborgo

A mis padres

Ana Lía Severino Ossio

Cesar Raul Chirinos Hurtado

Agradecimientos

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo otorgado por mis jefes el Dr. Jose Rainuzzo y Yuri Sasaki, gracias por todo el tiempo y la confianza otorgados no solo durante el desarrollo de este proyecto si no durante todo el tiempo que trabajamos juntos.

Quisiera agradecer también a la Dra. Carla Gonzales no solo como asesora si no como profesora, sensei y amiga desde mucho antes de comenzar este proyecto, lo cual también aplica a la Dra. Cynthia Gonzales, gracias por la paciencia y toda la ayuda.

Al Dr. Gustavo Gonzales y a todo el equipo del Laboratorio de Endocrinología y Reproducción por su constante colaboración y apoyo.

A Paola Olavegoya por toda la ayuda durante el desarrollo del proyecto.

Finalmente agradecer el apoyo incondicional brindado por mis padres, hermanos, familiares y amigos durante el desarrollo de toda mi carrera profesional, sin su aliento, confianza, paciencia y cariño nada de esto hubiera sido posible.

Financiado por CIENCIACTIVA - CONCYTEC

Tabla de contenido

Resumen	ix
Abstract	x
1 INTRODUCCION	1
2 PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	3
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
2.2 MARCO TEÓRICO	4
2.2.1 COMPOSICIÓN ÓSEA	4
2.2.2 ESTRÓGENOS	8
2.2.3 COLÁGENO	11
2.3 JUSTIFICACIÓN	19
2.4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	20
2.5 HIPÓTESIS	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GENERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	23
4.1.1 Grupos de tratamiento	24
4.2 POBLACIÓN Y MUESTRA	25
4.3 CIRUGÍA	27
4.4 LOS TRATAMIENTOS	28
4.4.1 Péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta	28
4.4.2 Estradiol	30
4.5 EUTANASIA	30
4.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS PEPTIDOS HIDROLIZADOS DE COLÁGENO DE ANCHOVETA	31
4.6.1 Análisis Proximal	31

4.6.2	Análisis Microbiológico.....	33
4.6.3	Análisis de distribución de peso molecular.....	34
4.6.4	Composición de aminoácidos	34
4.7	PARÁMETROS FÍSICOS DE FÉMUR	35
4.8	FUERZA DE FRACTURA.....	35
4.9	EVALUACIÓN HISTOMORFOMÉTRICA.....	39
4.10	MARCADORES BIOQUÍMICOS EN SUERO	41
4.11	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	42
4.12	CONSIDERACIONES ETICAS.....	43
5	RESULTADOS	44
5.1	CARACTERIZACION DE LOS PEPTIDOS HIDROLIZADOS DE ANCHOVETA	44
5.2	PESO DE LOS ANIMALES.....	45
5.3	EFEECTO SOBRE LA ESTRUCTURA OSEA	47
5.3.1	Fémur	47
5.3.2	Vertebra.....	53
5.4	ANÁLISIS BIOMECANICO DEL FÉMUR.....	56
5.5	MARCADORES BIOQUÍMICOS EN SUERO	60
6	DISCUSIÓN	62
7	CONCLUSIONES.....	75
8	RECOMENDACIONES.....	76
9	BIBLIOGRAFÍA	77

Resumen

El suplemento oral diario de la dieta durante 12 semanas con péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta demostró para todas las dosis evaluadas poseer efectos benéficos sobre el metabolismo óseo a través de resultados positivos en la evaluación de la estructura, la histomorfología y la biomecánica ósea en ratas hembras sometidas a una ovariectomía bilateral; presentando resultados mejores que los encontrados en el grupo control tratado de manera convencional con una terapia de reemplazo (enantato de estradiol)

De acuerdo a los resultados mostrados y discutidos en el presente documento a corto plazo la mejor dosis resultó ser la correspondiente a 2 g.kg⁻¹ debido a que no solo produjo un incremento significativo del área trabecular a nivel del fémur ($p < 0.01$) y de la de segunda vértebra lumbar ($p < 0.05$), sino que también mejoró significativamente las características biomecánicas del hueso mejorando su resistencia a las fracturas a través de un incremento de la carga máxima tolerada y elasticidad ($P = 0.021$ and $P < 0.01$ respectivamente).

La anchoveta es un recurso marino cuyo aprovechamiento principal se ha orientado para la elaboración de harina de pescado para consumo animal. Con el desarrollo de este proyecto, se espera dar un mayor valor agregado a la anchoveta, permitiendo esta vez que las personas sean las que directamente aprovechen sus beneficios.

Abstract

Introduction: In the present study, we evaluated physical parameters of the bone after ovariectomy and the effect of treatments with estradiol as a positive control and hydrolyzed anchovy collagen peptides (HACP) in three different doses.

Results: Supplementing the diet with 1g.kg⁻¹, 2g.kg⁻¹, and 4g.kg⁻¹ of HACP reversed significantly the effect of the estrogen deficiency over the femoral ash content and the trabecular bone area of the femur ($p<0.01$) and the second lumbar vertebra ($p<0.05$). The maximum stress and elastic modulus, in the 2g.kg⁻¹ of HACP group were significantly higher than in the control OVX+VH group ($P=0.021$ and $P<0.01$ respectively).

Conclusion: The daily supplementation of the diet with hydrolyzed anchovy collagen peptides reverts the bone loss found on ovariectomized rats.

1 INTRODUCCION

El metabolismo óseo comprende mecanismos de remodelación ósea basados en el mantenimiento de un balance entre la tasa de degradación y la de formación el hueso.

Su regulación se basa en la actividad de una unidad básica multicelular compuesta por osteocitos, osteoblastos y osteoclastos cuyo desempeño es regulado por fuerzas mecánicas, hormonas como el estrógeno, citoquinas y otros factores específicos (Datta HK, 2008). Alteraciones a cualquiera de estos niveles llevan a un desequilibrio entre los procesos de resorción y de formación ósea lo que a su vez genera trastornos como la osteoporosis.

De acuerdo al instituto nacional de salud de los Estados Unidos la osteoporosis se define como un “trastorno esquelético sistémico caracterizado por masa ósea baja y deterioro de la micro arquitectura del tejido óseo, con el consecuente incremento de la fragilidad ósea y una mayor susceptibilidad a las fracturas” (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, 2001).

La osteoporosis post menopáusica, generada por la deficiencia de estrógenos, afecta aproximadamente al 40% de las mujeres en este periodo de su vida (Unnanuntana et al., 2010) siendo responsable de más de 9.8 millones de fracturas al año a nivel mundial (Johonell & Kanis, 2006). En el mundo se calcula que más de 200 millones de mujeres tienen osteoporosis y que a partir de los 50 años 1 de cada 3 mujeres desarrolla una

fractura relacionada con este mal (Janiszewska et al., 2014), lo cual genera un aumento del gasto público destinado a la salud tanto preventiva como curativa y paliativa.

La terapia hormonal de reemplazo con estrógenos es empleada habitualmente como un método eficaz de prevenir su aparición (Farzaneh & Zarghi, 2016), sin embargo, su uso prolongado ha sido relacionado con múltiples problemas sistémicos incluyendo tromboembolismo venoso, cáncer de mamas, alteraciones cardiovasculares y demencia (Kwun et al., 2012; Marjoribanks et al., 2017) por lo que profesionales de la salud buscan la implementación de tratamientos alternativos y el concepto de nutrición preventiva cobra importancia (Coxam, 2005)

Frente a esta situación el colágeno hidrolizado de diferentes fuentes ha demostrado que representa una alternativa viable para el tratamiento de estas afecciones sin las desventajas generadas por los medicamentos (Han X., et al., 2009; de Almeida J., et al., 2010) ya que los aminoácidos que lo componen estimulan la formación de nuevo colágeno en los fibroblastos.

El presente estudio busca verificar que el colágeno hidrolizado de las escamas de anchoveta posee los mismos efectos positivos atribuidos al colágeno de otras fuentes.

2 PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La osteoporosis es una enfermedad esquelética multifactorial, que se caracteriza por la reducción de la masa ósea y la alteración de la micro arquitectura estructural del tejido óseo, dando lugar a una pérdida de resistencia mecánica y a un incremento significativo del riesgo de fracturas (Anonymous, 2002).

La bibliografía a través de estudios *in vivo* (de Almeida Jackix et al., 2010; Guillerminet et al., 2012; Nomura et al., 2005), *in vitro* (Guillerminet et al., 2010; Kim et al., 2013; Tsuruoka et al., 2007) y ensayos clínicos (Kumar et al., 2015; Zdzieblik et al., 2015) han demostrado el efecto positivo del colágeno hidrolizado de diferentes orígenes como porcino (Wu et al., 2004), aviar (Watanabe-Kamiyama et al., 2010) , o marino producido de piel de salmón (Xu et al., 2010) o bacalao (Han et al., 2009) sobre el metabolismo óseo. Productos derivados de colágeno como la gelatina o los péptidos hidrolizados de colágeno poseen propiedades bioactivas entre las que se encuentran la estimulación de la diferenciación de osteoblastos (Kim et al., 2013), mejoras en el proceso de absorción de calcio intestinal, y capacidades antioxidantes y anti-inflamatorias. Sin embargo, quedaba por dilucidar si los péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta compartían estos efectos ya que el grado de hidrolisis (Finot, 2000) y el perfil de aminoácidos de la materia prima influyen estas propiedades (Chi et al., 2015).

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 COMPOSICIÓN ÓSEA

La fuerza del hueso está determinada por su composición material y estructural (Turner, 2006). El hueso debe ser rígido y capaz de resistir la deformación, y soportar la carga; debe ser también flexible, capaz de absorber energía por deformación, acortarse y ensancharse cuando es comprimido y alargarse y estrecharse en tensión sin romperse. Si el hueso es frágil, la energía impuesta durante la carga podría ser liberada por fallas estructurales, iniciada por micro rupturas hasta su completa fractura (Belill et al., 2014). El esqueleto está formado por dos tipos de tejido óseo, los cuales se diferencian en función a su estructura y distribución.

Los huesos largos están compuestos por un cilindro hueco, o diáfisis; una zona intermedia o metáfisis por debajo de las placas de crecimiento y epífisis redondeadas por encima de las placas de crecimiento. La diáfisis se compone principalmente de hueso cortical, mientras que la metáfisis y las epífisis están compuestas por hueso esponjoso rodeado por una capa relativamente delgada de hueso cortical (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) (Clarke, 2008).

El hueso cortical o compacto representa aproximadamente el 80% del peso esquelético. Se caracteriza por su alta densidad y una porosidad menor al 10% lo que permite poseer una gran resistencia frente a fuerzas de compresión contribuyendo significativamente al rol estructural del hueso. Su diseño cilíndrico permite un incremento de la resistencia

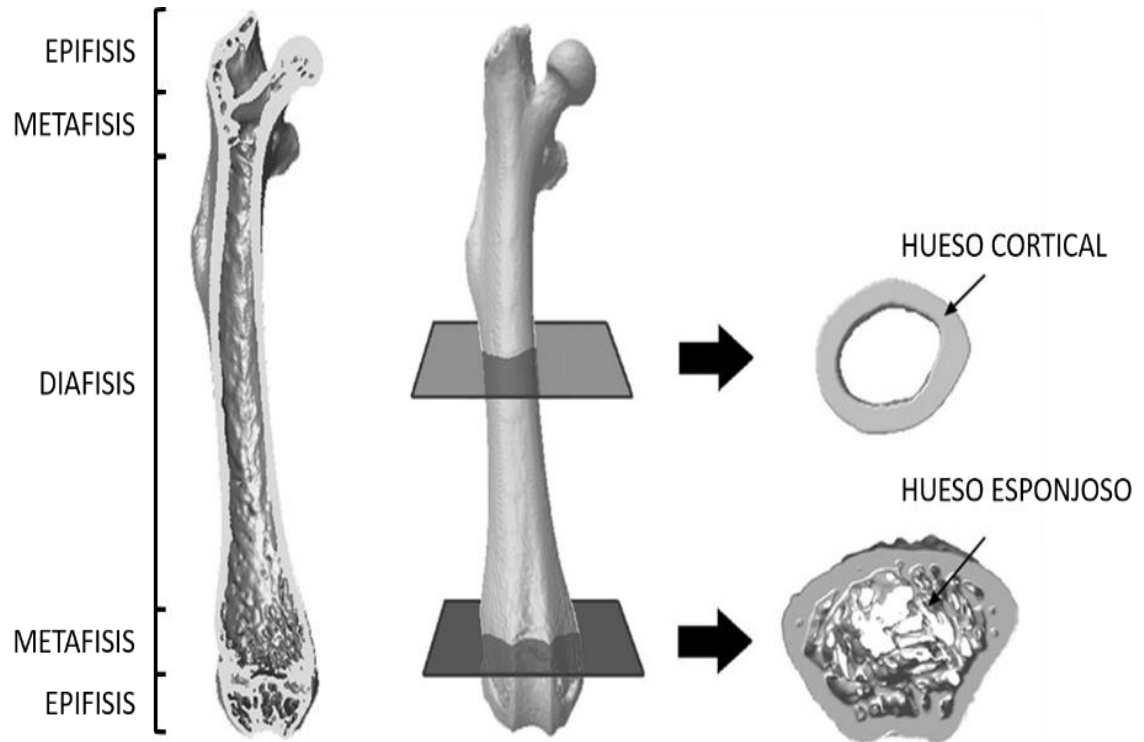
y flexibilidad sin incrementar la masa ósea lo que resulta en huesos largos con la fuerza y rigidez necesaria para brindar soporte a los músculos y lo suficientemente ligeros para permitir el desplazamiento de manera energéticamente eficiente (Weatherholt et al., 2012).

El hueso trabecular o esponjoso pese a su gran porosidad (>50%) proporciona al hueso la capacidad de distribuir la energía y soportar la carga en regiones cercanas a las articulaciones (Weatherholt et al., 2012)

En general el hueso está formado por tejido conectivo mineralizado, que consiste principalmente de una matriz extracelular compuesta por colágeno tipo I, proteínas no colagénicas, y agua (Boskey A. , 2013) en la cual se encuentran adheridas células especializadas: osteoblastos, osteoclastos y donde residen los osteocitos (Jähn & Bonewald, 2012).

La fase inorgánica, la cual constituye aproximadamente el 60% del hueso contiene principalmente cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), los cuales encierran a las fibras de colágeno, lo que proporciona al hueso sus propiedades de rigidez, flexibilidad y fuerza (Feng, 2009). El componente estructural de la fase orgánica ($\approx 30\%$ del hueso) es el colágeno tipo 1 en un 90%, el 10% restante está conformado por proteínas no estructurales, incluyendo osteonectina, osteocalcina, fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas de la sangre (Young, 2003).

Figura 1 Estructura macroscópica de un hueso largo.



La estructura cilíndrica o diáfisis se compone principalmente de hueso cortical mientras que las epífisis + metáfisis están formadas en gran medida por hueso esponjoso o trabecular. Adaptación de una imagen de una micro tomografía computarizada (Weatherholt et al., 2012)

Estas proteínas no estructurales juegan un papel importante regulando el diámetro de las fibras de colágeno, desempeñando un papel como señalizadores celulares, actuando como factores de crecimiento o enzimas entre otras funciones especializadas.

Su concentración depende de factores como la edad, ubicación, género, etnicidad y estado de salud. En conjunto con el colágeno y la fibronectina son las responsables de las características del hueso (Boskey, 2013).

Los osteoblastos son células de origen mesodérmico cuya función primaria es la formación de hueso. Los osteoblastos derivan de células precursoras mesénquimales pluripotenciales que se diferencian en unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) y trabajan en grupos para secretar la matriz orgánica y luego mineralizarla por medio de una fase vesicular y una fibrilar (Sandoval, 2005).

La fase vesicular ocurre cuando los osteoblastos liberan vesículas matriciales cargadas de iones de calcio que se unen a los proteoglicanos de la matriz orgánica quienes luego serán degradados por acción enzimática liberando el calcio (H. Anderson, 2003).

Por otro lado, los osteoblastos activos expresan altos niveles de fosfatasa alcalina la cual libera iones fosfato. Cuando el fosfato y el calcio se juntan dentro de las vesículas forman los cristales de hidroxapatita los cuales son liberados mineralizando la matriz durante la fase fibrilar (Flores-Silva et al., 2015).

Cuando los osteoblastos quedan encasillados dentro de la matriz que han sintetizado se vuelven osteocitos. Estas células se encuentran dispersas a lo largo de toda la matriz y poseen una menor capacidad formadora de hueso que los osteoblastos, sin embargo, constituyen un 90% del total de células óseas adultas (Datta HK, 2008). Los osteocitos juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura del hueso interactuando entre ellos y con otras células por medio de una red que viaja por medio

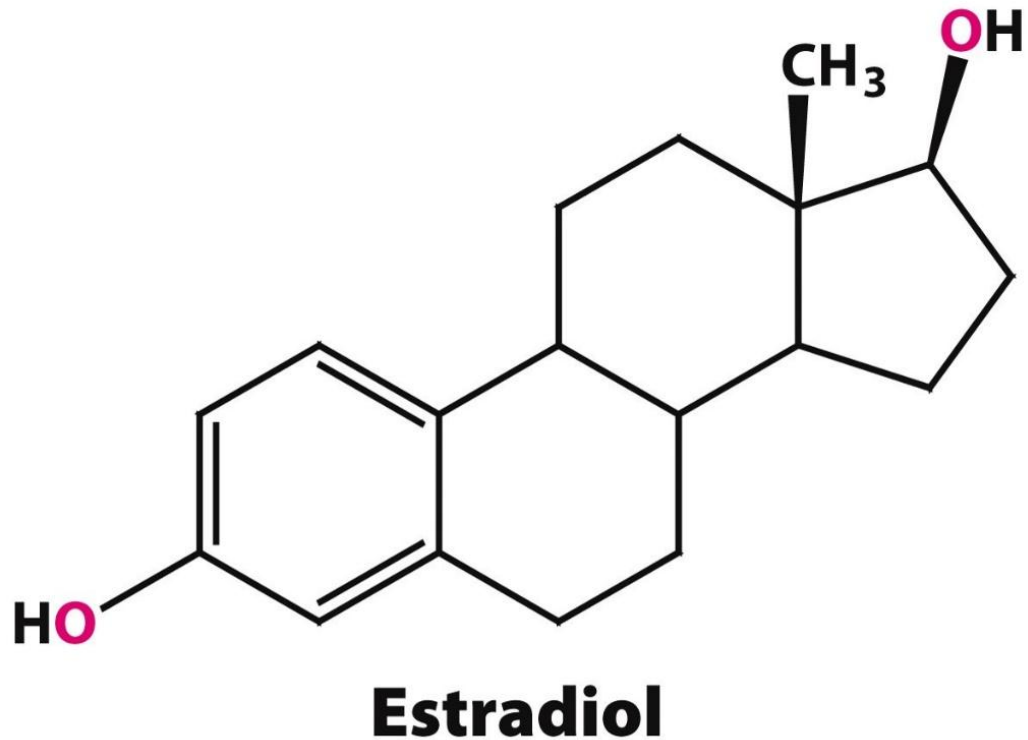
de prolongamientos celulares al interior de canalículos fraguados en el espesor de la matriz (Sandoval, 2005) . Se teoriza que los osteocitos actúan como sensores de estrés mecánico y que su red de conexiones le permite transmitir las señales a las células responsables de la formación y el remodelamiento óseo.

2.2.2 **ESTRÓGENOS**

Los estrógenos son hormonas esteroideas derivadas del colesterol. En las mujeres, el estradiol (E2) () es sintetizado principalmente en las células de la granulosa y la teca interna de los folículos en desarrollo.

Los estrógenos poseen diversos efectos biológicos en animales y en humanos viéndose implicados en procesos de crecimiento, diferenciación celular y el metabolismo de diferentes tejidos blanco (Compston, 2001), gran parte de estos efectos son aparentemente mediados a través de dos sub tipos de receptores identificados como receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) y receptor de estrógenos beta ($ER\beta$) (Katzenellenbogen et al., 2000).

Figura 2 Estructura química del estradiol.



(Berg et al., 2012)

En humanos ambos subtipos pertenecientes a la familia de receptores de hormonas esteroideas que incluye receptores para glucocorticoides, andrógenos, progesteronas y mineralocorticoides (Compston, 2001) se encuentran en diferentes células y tejidos controlando funciones fundamentales de varios órganos. ER α por ejemplo se encuentra expresado en las glándulas mamarias, el útero, los ovarios (células de la Teca), el hueso y el tejido adiposo entre otros; por su lado ER β se observa más en células de la granulosa, el colon, el tejido adiposo y el sistema inmune (Farzaneh & Zarghi, 2016).

La osteoporosis es un problema serio asociado a la deficiencia de estrógenos en mujeres durante la etapa post-menopáusicas. Una serie de estudios revelan el rol de esta hormona en el mantenimiento de la homeostasis ósea, siendo la terapia hormonal de reemplazo con estrógenos la que habitualmente es utilizada como un método eficaz de prevenir su desarrollo (Farzaneh & Zarghi, 2016), sin embargo, su uso prolongado ha sido relacionado con múltiples problemas sistémicos incluyendo trombo embolismo venoso, cáncer de mamas, alteraciones cardiovasculares y demencia (Kwun et al., 2012; Marjoribanks et al., 2017).

a. Efecto de los estrógenos sobre el metabolismo óseo

La regulación del metabolismo óseo se basa en la actividad de una unidad básica multicelular compuesta por osteocitos, osteoblastos y osteoclastos cuyo desempeño es regulado por fuerzas mecánicas, hormonas como la parathormona (PTH) o la hormona de crecimiento (GH), citoquinas y otros factores específicos (Datta HK, 2008).

Los osteoclastos difieren dramáticamente de los osteoblastos y se caracterizan por su gran tamaño y por sus múltiples núcleos resultantes de la fusión de las células precursoras (Boyle, 2003). Se originan a partir de precursores hematopoyéticos de la línea monocito/macrófago.

La deficiencia de estrógenos causa osteoporosis en mujeres durante la etapa post menopáusicas y contribuye al desarrollo de osteoporosis en hombres mayores.

La osteoporosis por deficiencia de estrógenos ha sido asociada a un incremento de la resorción ósea provocada por un aumento de la cantidad y actividad de osteoclastos en la medula ósea.

Los estrógenos juegan un papel importante sobre el metabolismo óseo; por un lado, regulan negativamente la expresión de factores que estimulan el proceso de resorción ósea como la IL-1, la IL-6, TNF- α o el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y por otro lado estimulan en los osteoblastos la producción de factor del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) quien inhibe la resorción disminuyendo la actividad de los osteoclastos y aumentando su apoptosis (Cheung et al., 2003; Oursler et al., 1991), así mismo induce a su vez la diferenciación del precursor de los osteoblastos y promueve la producción de fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina, osteocalcina (OC) y osteoprotegerina (OPG) (Y. Wang et al., 2016)

La OPG es miembro de la súper familia de receptores de factores de necrosis tumoral (TNF-R) y actúa uniéndose y neutralizando a su ligando el factor nuclear κ B (RANK-L) quien junto con M-CSF es un factor necesario para la osteoclastogénesis (Bord et al., 2003; LC et al., 1999).

2.2.3 COLÁGENO

El término genérico colágeno engloba a varias subfamilias clasificadas en base a sus estructuras primarias o formas de organización supramolecular (Exposito et al.,

2002). A la fecha, se han identificado 28 tipos diferentes de colágenos reconocidos (8 de los cual han sido descubiertos recientemente y su función aún es desconocida) que son denotados asignándoles números romanos.

En conjunto, las diferentes sub familias llegan a representar un 30% del contenido proteico total del cuerpo cuya principal característica es la presencia de una triple hélice que representa desde un 96% de su estructura para el colágeno tipo I hasta un 10% en el colágeno tipo XII (Ricard-Blum, 2011).

Se le considera la proteína más abundante en los mamíferos y una de las más importantes gracias a su papel en tejidos como la piel cuyas proteínas son 74% colágeno, los tendones y ligamentos donde representan el 90%, la córnea (64%), el cartílago (50%), el hueso cortical (23%), la aorta (12-14%), el pulmón (10%) y el hígado (4%).

Al ensamblarse, sus fibras forman una matriz estructural básica que se reconoce como el principal componente de la matriz extracelular, proporcionando la forma y dotando de fuerza y flexibilidad a los tejidos. Su presencia está relacionada con procesos como: transmisión de fuerzas en tendones, lubricación en el cartílago, transmisión de luz en el cristalino y generación de barreras para la filtración de moléculas o separación de tipos celulares (Viguet-Carrin et al, 2006).

Los tipos de colágeno más abundantes y esenciales en el cuerpo humano están agrupados de acuerdo a su estructura física. Los principales tipos de colágeno del tejido conectivo son I, II, III, IV, V, VIII y IX. El tipo I es el colágeno principal de

piel y huesos, siendo el más abundante de todos, representando alrededor del 90% del colágeno total de cuerpo. El tipo II se encuentra en los cartílagos, mientras que el III se encuentra en la piel vasos sanguíneos y órganos internos. El tipo V se encuentra en huesos, piel, tendones, ligamentos y córnea. El tipo IX se encuentra a veces asociado con el tipo II y ofrece integridad estructural a los tejidos (Van der Rest & Garrone, 1991).

a. Estructura y características

La súper familia del colágeno incluye proteínas de diferentes tamaños y formas caracterizadas por una molécula compuesta por tres cadenas de aminoácidos entrelazadas cuya estructura es estabilizada principalmente gracias a puentes de hidrógeno formados por los grupos hidroxilos de la hidroxiprolina (Shoulders & Raines, 2009). La hidroxiprolina es un aminoácido marcador específico para cualquier tipo de colágeno y es formado por una modificación post-traduccional en la que se hidroxila la prolina (Jenkins et al, 2003).

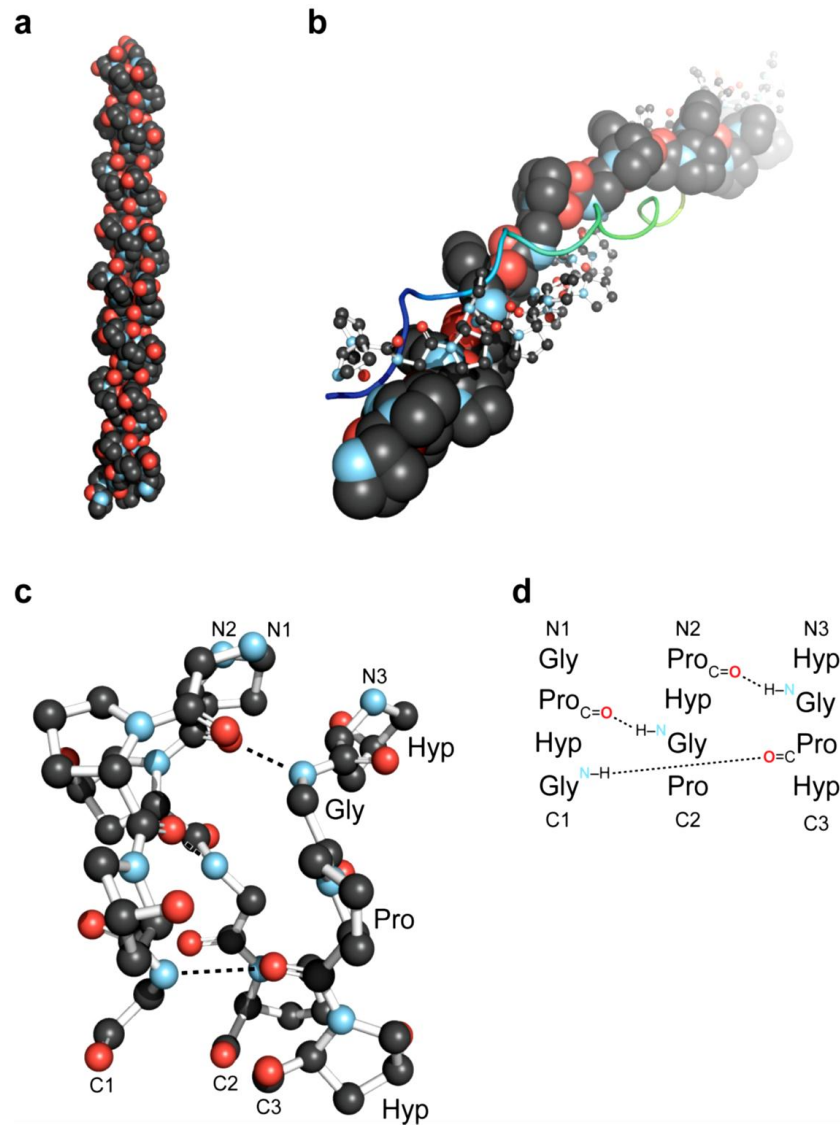
La secuencia de aminoácidos de las cadenas individuales es singular y característica pues presentan una repetición casi continua del trímero de aminoácidos Gly-X-Y donde X es generalmente prolina e Y es hidroxiprolina (Asghar & Henrickson, 1982) y es este orden, con los residuos de glicina, el aminoácido más pequeño apareciendo en cada tercera posición de la secuencia y encasillado en el centro, lo que permite la cercana conexión de las cadenas poli peptídicas y la formación de lo

que se conoce como la triple hélice del colágeno como se aprecia en la figura 3 (Schrieber & Gareis, 2007).

Dependiendo del tipo genético del colágeno esta conformación fibrilar puede representar una parte mayor o menor dentro de la molécula (10% – 96%) sin embargo su presencia es necesaria para que una proteína sea denominada como colágeno (Fratzl, 2008). Estas regiones son resistentes a la degradación por proteasas comunes y sólo son sensibles a colagenasas específicas.

Las fuentes más abundantes de colágeno comercial son la de piel de cerdo (46%), de bovinos (29.4%) y huesos de ganado y cerdos (23.1%). El colágeno marino representó menos del 1.5% del total de colágeno (como gelatina principalmente) producido en el año 2007 (Gómez-Guillén et al., 2009). Esto debido a aspectos socio - culturales, el desarrollo de enfermedades como Encefalopatías espongiiformes transmisibles (TSE) como la encefalopatía espongiiforme bovina (BSE), la enfermedad de pies y boca (FMD) en cerdos y ganado (Jongjareonrak et al., 2005) y el interés creciente de buscar nuevas alternativas en el aprovechamiento de los recursos marinos.

Figura 3 Representación de la triple hélice de colágeno.



(A) Estructura cristalina de la triple hélice del colágeno, formada a partir de la asociación de los trímeros (ProHypGly) - (ProHypAla) - (ProHypGly) (B) Vista axial de la triple hélice representada de tres maneras diferentes (C) Imagen de bola y palo de un segmento de la triple hélice del colágeno resaltando la escalera formada por los enlaces de hidrógeno. (D) Composición de los aminoácidos que forman las hebras observadas en la imagen C. (Shoulders & Raines, 2009)

La literatura científica hace referencia a diferentes fuentes alternativas y nuevas funcionalidades para el colágeno lo que representa un boom en los últimos 10 - 15 años, esto en parte debido al creciente interés para la valoración económica de sub- productos industriales y el manejo eco amigable de los desechos.

Por otro lado, las diferentes propiedades biológicas de los péptidos hidrolizados de colágeno han generado su inclusión en productos de consumo masivo (agua embotellada, café, jugos de frutas, yogurt entre otros) aportando bienestar a sus consumidores.

b. Colágeno y el metabolismo oseo

El colágeno constituye el principal componente estructural de la matriz extracelular de todos los tejidos conectivos incluyendo la matriz ósea donde representa el 90% del contenido proteico total habiéndose identificado que el 95 % del mismo es colágeno de tipo I, el cual influencia a través de la concentración, orientación, diámetro y distribución de sus fibras las propiedades mecánicas del hueso(Paschalis EP, 2003) .

El hueso es un tipo de tejido conectivo especializado, ya que con el fin de cumplir con el rol de brindar soporte mecánico al cuerpo de manera resistente pero lo suficientemente ligera como para permitir la movilidad (Datta HK, 2008) , mineraliza su matriz por acción de los osteoblastos quienes regulan el proceso destruyendo

enzimáticamente pirofosfatos y proteoglicanos, inhibidores del proceso de mineralización (Addison WN, 2007), y liberando vesículas matriciales cargadas de enzimas fosfohidrolasas como la fosfatasa alcalina, moléculas fijadoras de calcio (H. C. Anderson, 2003) y iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} quienes se unen a la matriz colágena dotándola de rigidez y fuerza (Tzaphlidou, 2008), pero permitiendo gracias al pequeño tamaño de los cristales minerales que las fibras conserven cierta elasticidad (Drezner, 2006)

En hueso tanto cortical como trabecular la matriz es muy densa y si bien las fibras de colágeno se organizan en capas concéntricas proveyendo máxima resistencia frente a un estrés por compresión o torsión su alineación no es tan uniforme como la que se encuentra en otros tejidos. (Paschalis EP, 2003).

De manera particular, el diámetro de las fibras ha demostrado poseer principal importancia sobre la fuerza biomecánica y la salud ósea (Tzaphlidou & Berillis, 2005).

c. Propiedades mecánicas del hueso

El hueso es un tejido complejo anisótropo y viscoelástico cuya principal función es resistir fuerzas mecánicas y fracturas brindando estructura y protección al cuerpo. Con este fin posee la habilidad de adaptarse continuamente frente a los cambios fisiológicos y mecánicos a los que es sometido (Viguet-Carrin et al., 2006).

La resistencia de los huesos no depende únicamente de la cantidad de masa ósea presente en ellos sino también de su geometría, su forma, la micro arquitectura de los huesos esponjosos, su metabolismo y tasa de regeneración, la concentración mineral y el colágeno (AL Boskey et al., 1999).

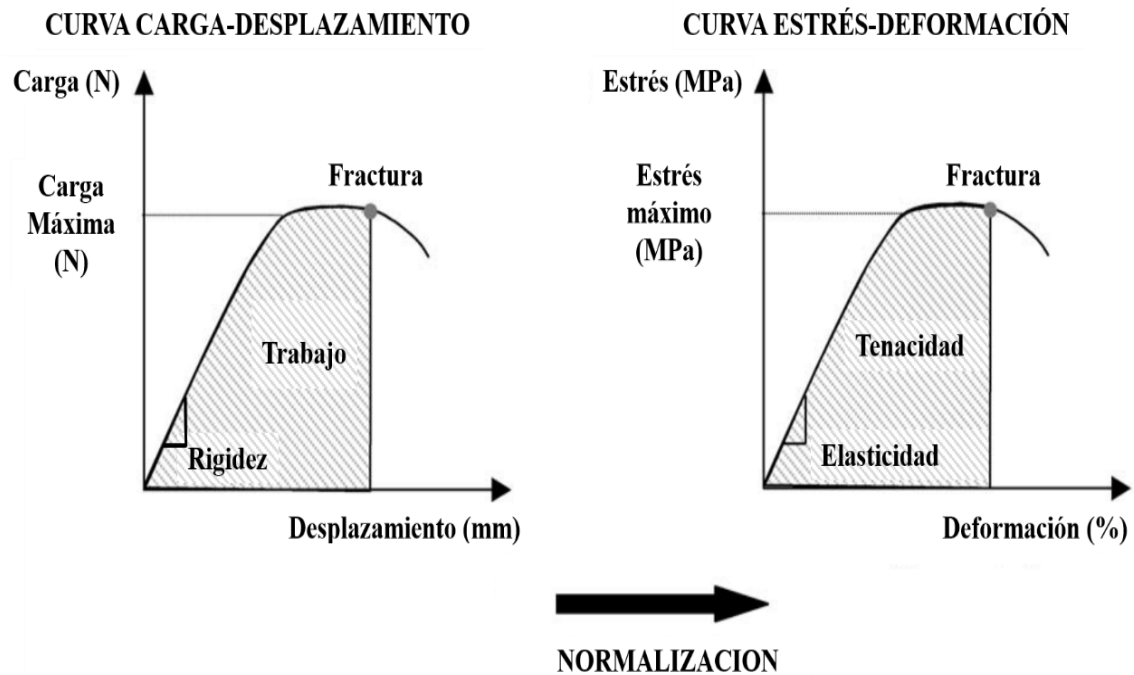
El colágeno en particular posee un rol importante sobre la resistencia, habiéndose identificado por ejemplo que la integridad de sus fibras disminuye con la edad y que este cambio está asociado a la necesidad de menos fuerza para generar fracturas (X. Wang et al., 2002).

Los principios de la mecánica clásica se aplican al estudio de la resistencia de los materiales a la fractura cuando son sometidos a una carga determinada (Guede et al., 2013). Las propiedades mecánicas del hueso reflejan las características de este como un material en función a la manera como sus componentes se ordenan e interactúan y pueden ser evaluadas de diferentes maneras como por ejemplo a través de la compresión de las vértebras o el desarrollo de pruebas de flexión en tres o cuatro puntos sobre los huesos largos como el fémur o el humero (Viguet-Carrin et al., 2006).

El resultado de estas pruebas es una curva que grafica la relación carga-desplazamiento, lo que permite determinar luego parámetros como la carga máxima tolerada y la rigidez de las muestras. Debido a que estos valores son sensibles a variables como las dimensiones de las muestras pueden ser normalizados de manera que la carga se traduce en esfuerzo y el desplazamiento se vuelve deformación ().

Los resultados dados por la curva estrés-deformación consideran la forma y el área de la región transversal del hueso evaluado sin embargo existen cambios no solo de un fémur al otro, sino que dentro de los mismos huesos el área y la forma varia a lo largo de la diáfisis por lo que los cálculos solo pueden ser aproximados (Engesaeter et al., 1978).

Figura 4 Evaluación mecánica del hueso.



Adaptado de (Viguet-Carrin et al., 2006)

2.3 JUSTIFICACIÓN

Alteraciones sobre el metabolismo óseo como la osteoporosis por deficiencia de estrógeno pueden ser consideradas como un problema de salud pública por el porcentaje de mujeres afectadas y su repercusión en las cargas económicas que generan su tratamiento. Es sabido que la mejor política es la de la prevención, y si bien la terapia hormonal de reemplazo es una de las principales estrategias de prevención, esta está asociada a una serie de efectos secundarios cuyo costo puede ser mayor que el beneficio generado, por lo tanto, es necesario encontrar un tratamiento inocuo y eficaz para combatir la osteoporosis generada por la pérdida de estrógenos en el periodo de la postmenopausia.

Así mismo es importante encontrar alternativas a la explotación de la anchoveta para la producción de harina de pescado que resulten rentables y permitan a la población beneficiarse directamente de la explotación de este recurso natural.

2.4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El suplemento dietético con péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta es capaz de revertir el efecto de la deficiencia de estrógenos inducida por la ovariectomía bilateral (OVX) sobre la estructura, la histomorfología y la biomecánica ósea en ratas?

2.5 HIPÓTESIS

El suplemento dietético con péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta es capaz de revertir el efecto de la deficiencia de estrógenos inducida por la ovariectomía bilateral (OVX) sobre la estructura, la histomorfología y la biomecánica ósea en ratas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del suplemento dietético de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta a 3 diferentes dosis, comparado con estradiol sobre la estructura, la histomorfología y la biomecánica ósea en ratas ovariectomizadas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Evaluar los efectos del suplemento dietético de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta a 3 diferentes dosis sobre la estructura ósea del fémur en ratas ovariectomizadas, y compararlos con el tratamiento con el tratamiento estándar (estradiol).
- ✓ Evaluar los efectos del suplemento dietético de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta a 3 diferentes dosis sobre el peso fresco del fémur en

ratas ovariectomizadas, y compararlos con el tratamiento con el tratamiento estándar (estradiol).

- ✓ Evaluar los efectos del suplemento dietético de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta a 3 diferentes dosis sobre el peso seco del fémur en ratas ovariectomizadas, y compararlos con el tratamiento con el tratamiento estándar (estradiol).
- ✓ Evaluar los efectos del suplemento dietético de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta a 3 diferentes dosis sobre diferentes propiedades biomecánicas del fémur en ratas, y compararlos con el tratamiento con el tratamiento estándar (estradiol).
- ✓ Evaluar los efectos del suplemento dietético de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta a 3 diferentes dosis sobre el porcentaje del área trabecular de la segunda vértebra lumbar en ratas ovariectomizadas, y compararlos con el tratamiento con el tratamiento estándar (estradiol).
- ✓ Evaluar los efectos del suplemento dietético de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta a 3 diferentes dosis sobre la concentración de diferentes marcadores del metabolismo óseo en suero de ratas, y compararlos con el tratamiento con el tratamiento estándar (estradiol).

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

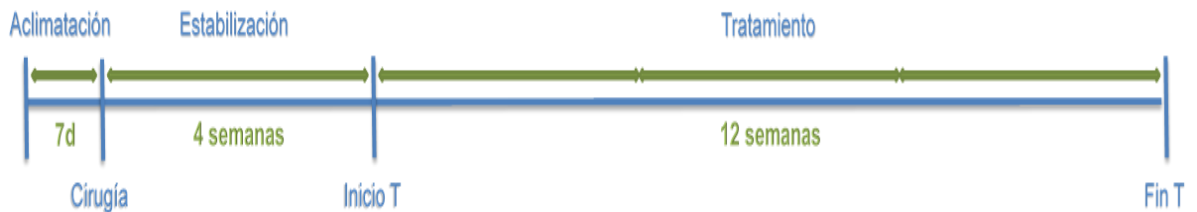
El diseño utilizado es de tipo experimental y cuantitativo (según la clasificación en el Manual de Normas y Procedimientos para la elaboración del trabajo de investigación).

En el presente estudio se comparó el efecto del consumo de péptidos de colágeno de anchoveta en ratas adultas ovariectomizadas (OVX) con:

- Animales sanos (SHAM + VH)
- Animales ovariectomizados y tratados con una terapia hormonal de reemplazo (OVX+E2)
- Animales ovariectomizados y no tratados (OVX+VH)

El protocolo empleado se esquematiza en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

Figura 5 Línea de tiempo del proyecto



4.1.1 Grupos de tratamiento

Durante el proyecto se distribuyó a los animales agrupándolos aleatoriamente de acuerdo a su condición (SHAM u OVARIECTOMIZADO) y a los diferentes tratamientos que les fueron asignados. La distribución se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1- Distribución de los grupos de acuerdo a cirugía y tratamiento administrado.

CÓDIGO	CONDICIÓN	TRATAMIENTO	N MUESTRAL
SHAM + VH	SHAM	Agua	12
OVX + VH	Ovariectomizado	Agua	12
OVX + E2	Ovariectomizado	Estradiol	12
OVX + PHCA1	Ovariectomizado	Péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta (1g.kg ⁻¹)	12
OVX + PHCA2	Ovariectomizado	Péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta (2g.kg ⁻¹)	12
OVX + PHCA4	Ovariectomizado	Péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta (4g.kg ⁻¹)	12

4.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Con el fin de determinar el número mínimo de animales que son requeridos para evaluar de manera significativa cada variable objetivo se empleó la fórmula para comparación de dos medias, con las desviaciones y errores estándar obtenidos de un estudio similar (Gonzales et al., 2010):

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 * S^2}{d^2}$$

Donde:

n = Sujetos necesarios en cada una de las muestras

$Z\alpha = 1.96$

$Z\beta = 1.282$

S = Varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo de referencia = 0.085

d = Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar = $(0.636 - 0.445) = 0.286$

Nivel de riesgo = 0.05

Poder estadístico = 90%

El tamaño de la muestra fue determinado para un nivel alfa de 0.05 y una potencia estadística de 90% buscando minimizar las posibilidades de error tipo I y error tipo II.

Los valores de S y d se obtuvieron en función a un estudio anterior en el cual se evaluaron las mismas variables(Gonzales et al., 2010).

$$n = \frac{2(1.96 + 1.282)^2 * 0.085^2}{(0.636 - 0.1145)^2}$$

Según la fórmula obtenemos como resultado una n = 5.14 animales por grupo. Sin embargo, se consideró una n=6 en caso de deceso de algún animal dentro del grupo.

El tamaño de muestra determina el número mínimo de animales que son requeridos para el nivel de significancia y la potencia estadística de tal manera de minimizar las posibilidades de error tipo I y error tipo II. Debido al número de variables por analizar en este estudio se requirió 2 grupos para cada tratamiento por lo que la n final por tratamiento fue de 12.

En total se emplearon 72 ratas hembras Holtzman de 3 meses de edad con un peso aproximado de 300 gr las cuales fueron adquiridas en el Bioterio Central de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 6 grupos de estudio y mantenidos en un ambiente a temperatura constante con ciclos alternados de 12 hrs. luz/oscuridad agrupados a manera de seis animales por jaula dependiendo el tratamiento y contando con alimento balanceado (purina) y agua *ad libitum*.

4.3 CIRUGÍA

Una semana luego de la llegada de los animales al bioterio para su aclimatación se procedió a realizar una ovariectomía bilateral en los animales correspondientes a los grupos “OVX”, “OVX+E2”, “OVX+PHCA1”, “OVX+PHCA2” y “OVX+PHCA4” con el fin de inducir la osteoporosis por pérdida de estrógenos. Y se consideró un grupo SHAM como control.

Para la cirugía se anestesió a los animales con 0.5 mL. de Pentobarbital sódico (35 mg/Kg.) y se procedió a la depilación del área dorsal. Luego de la desinfección de la zona, se realizó una incisión dorsal que permitió la exposición de los ovarios, los cuales fueron devueltos a la cavidad abdominal en ratas del grupo “SHAM”; y extraídos en el resto de animales, grupos “OVX”. Para mantener la hemostasis se ligó la parte superior del oviducto con sutura de seda y seguidamente las capas de músculo y piel fueron suturadas.

Las suturas fueron tratadas con el antibiótico Multimycin® en crema (Farminindustria S.A.) que contiene neomicina, polimixina B y bacitracina, hasta que terminaron de cicatrizar y fueron controladas para evitar infecciones.

Durante el transcurso del estudio se observó que todas las heridas cicatrizaron correctamente, no habiéndose presentado ningún caso de infección. Cuatro semanas luego de la cirugía se dio inicio a los tratamientos respectivos.

4.4 LOS TRATAMIENTOS

Los diferentes tratamientos fueron administrados diariamente por vía oral empleando una sonda oro gástrica N° 18 durante 12 semanas iniciando cuatro semanas post-cirugía.

Los animales de los grupos “SHAM y “OVX” recibieron 1 ml de agua destilada como vehículo. Los animales del grupo “OVX+E2” recibieron 0.04 mg/kg de estradiol (Gonzales et al., 2010) reconstituido en 1 ml de agua destilada. Los animales de los grupos “OVX+PHCA1”, “OVX+PHCA2” y “OVX+PHCA4” recibieron péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta a razón de 1, 2 y 4 g.kg⁻¹ de peso respectivamente, reconstituido en 1 ml de agua destilada.

4.4.1 Péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta

Los péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta fueron proporcionados por una empresa pesquera peruana para el desarrollo del estudio.

La materia prima empleada para su elaboración fue escamas de anchoveta peruana (*engraulis ringens*), producto del proceso de pesca industrial.

Las dosis administradas fueron calculadas tomando en consideración el factor de corrección (k_m) para cada especie, basado en el área superficial del cuerpo y su peso promedio. La fórmula empleada para calcular la dosis animal equivalente (AED) fue:

$$AED (mg.kg^{-1}) = DRH (mg.kg^{-1}) * \frac{k_m \text{ humanos}}{k_m \text{ ratas}}$$

Donde:

DRH = Dosis recomendada para humanos = 166.66 mg.kg⁻¹

k_m humanos = 37 tomando como referencia un peso de 60 (Nair & Jacob, 2016)

k_m ratas = 6 tomando como referencia un peso de 0.08 – 0.27 kg (Nair & Jacob, 2016)

Aplicando la fórmula obtenemos como resultado una dosis animal equivalente diaria de 1027 mg. kg⁻¹. En función a este resultado y a estudios previos realizados con péptidos de colágeno se determinaron las 3 dosis evaluadas en el estudio que corresponden a 1000 mg. kg⁻¹, 2000 mg. kg⁻¹ y 4000 mg. kg⁻¹.

4.4.2 Estradiol

La dosis se tomó en función a estudios previos con resultados óptimos en los mismos parámetros con Progynova® 1mg (valerato de estradiol) (Bayer Schering Pharma S.A.). La dosis diaria de Estradiol es de 0.04 mg/kg, la cual se administró en un 1 ml de vehículo vía oral (Mödder et al., 2004).

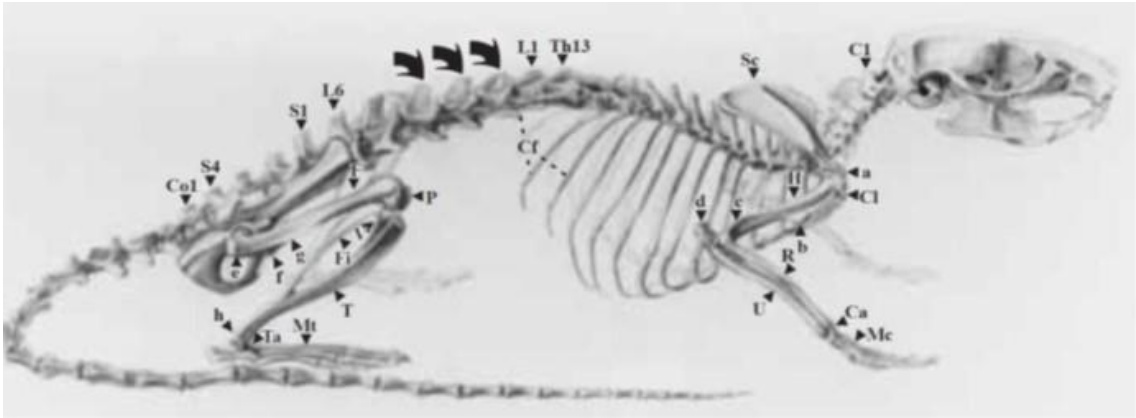
4.5 EUTANASIA

Finalizado el tratamiento, 12 semanas después de la cirugía, se procedió a sacrificar a las ratas por inhalación de CO₂.

Empleando el método de punción cardiaca se procedió a recuperar la sangre de los animales con la ayuda de tubos BD Vacutainer® para suero recubiertos con activador de coagulación. Treinta minutos luego de la extracción la sangre coagulada fue centrifugada a 10 000rpm durante diez minutos. El suero obtenido fue alicuotado y conservado a -20°C para su posterior análisis.

Inmediatamente después del sacrificio los animales fueron pesados y se les extrajeron el hígado, los riñones, el útero, ambos fémures y la segunda vértebra lumbar (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Figura 6 Esqueleto de rata.



Se indican con flechas oscuras las vértebras lumbares L2-L4 analizadas. (Stromberg, 1976)

4.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS PEPTIDOS HIDROLIZADOS DE COLÁGENO DE ANCHOVETA

4.6.1 Análisis Proximal

Como parte de la caracterización de los péptidos de colágeno se realizó un análisis proximal donde se evaluó:

-**Contenido de proteína total** con el método ISO 5983-2-2009 (ISO 5983-2, 2009) donde la muestra es digerida con ácido sulfúrico. Usando como catalizador sulfato de potasio y cobre el nitrógeno orgánico es transformado en sulfato de amonio y por la adición de álcali es liberado como amoniaco (NH₃).

El porcentaje de proteína total es calculado de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{(GM - BK) \times 1.4007 \times 0.2 \times Fs.}{Wm}$$

Donde:

GM =Gasto en la muestra

BK =Blanco de muestra

Fs =Factor de Solución del HCl 0.2N

Wm =Peso de Muestra

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{Nitrógeno} \times 5.55$$

-Contenido de ceniza con el método ISO 5984-2002 basado en la calcinación de la muestra a 600°C, obteniéndose el contenido de materia inorgánica presente. El porcentaje de ceniza total es calculado de acuerdo a la siguiente formula:

$$\%C = \frac{P_2 - P_1}{Pm} \times 100$$

Donde:

%C =Contenido de ceniza en porcentaje

Pm =Peso de la muestra en gramos

P₁ =Peso del crisol vacío en gramos

P₂ =Peso del crisol más residuo en gramos.

-Contenido de humedad con el método NTP 209.085 1981 (Rev. 2012) estimado en base a la pérdida de masa bajo determinadas condiciones de secado. El porcentaje de humedad es calculado de acuerdo a la siguiente formula:

$$\%H = \frac{m_1 - m_2}{Wm} \times 100$$

Donde:

H = Humedad en porcentaje

Wm = Peso muestra inicial

m₁ = Peso placa + peso muestra inicial

m₂ = Peso placa + peso de muestra final

-Contenido de grasa con el método NTP 204.033 1985 (Rev. 2010) donde los lípidos son extraídos con la ayuda de un solvente el cual es luego evaporado empleando un rota vapor.

4.6.2 **Análisis Microbiológico**

Con el fin de evaluar las características microbiológicas de la muestra se realizó el recuento de aerobios mesofilos totales según ICMSF 2da Edición. 1983 el recuento de

unidades formadoras de colonias de Mohos y Levaduras ICMSF 2da Edición. 1983, el procedimiento para la Detección de Salmonella spp. según ISO 6579:2002/ Cor 1: 2004 y el recuento de coliformes totales (NMP) ISO/TS 16649-3. 2005.

Estos análisis fueron realizados por un laboratorio externo.

4.6.3 Análisis de distribución de peso molecular

Con el fin de determinar la distribución del peso molecular de las muestras y la efectividad del proceso de hidrólisis las muestras fueron evaluadas con la técnica de SDS-PAGE de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970; He, 2011), para lo cual 10 mg de colágeno fueron disueltos en 1.0 ml de buffer de carga (Tris-HCl. pH 6.8) y expuestos a 100°C durante 5 minutos para luego tomar 20 µl y cargarlo en los geles junto con un marcador de peso molecular de amplio espectro (Bio-Rad). Finalizada la corrida se procedió a la tinción de las bandas con azul de Coomassie R250 y a su análisis empleando el software Totallab Quant comparando la muestra con el estándar.

4.6.4 Composición de aminoácidos

La muestra de hidrolizado de colágeno de anchoveta fue enviada a un laboratorio externo con el fin de obtener un perfil de aminoácidos completo empleando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

4.7 PARÁMETROS FÍSICOS DE FÉMUR

Los fémures derechos de 6 animales de cada grupo de interés fueron aislados y pesados empleando una balanza analítica. Posteriormente, fueron colocados en crisoles y llevados a la mufla (Barnstead Thermolyne modelo FA8020-33) para ser deshidratados a 600°C por 24 h; el peso de la ceniza fue evaluado empleando una balanza analítica.

4.8 FUERZA DE FRACTURA

Para evaluar las características mecánicas de los huesos se realizó una prueba de flexión en tres puntos con la ayuda de un analizador de textura CT3 marca Brookfield con una capacidad de 15000 gramos (compresión/tensión) y el software “TexturePRO CT V1.8”.

Luego de la muerte de los animales se procedió a evaluar la fuerza de fractura tolerada por el fémur izquierdo en un ensayo de 3 puntos donde este fue colocado de manera horizontal sobre un soporte de dos puntos separados por 20 mm (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). La carga fue colocada en el centro del hueso a una tasa de 0.5 mm/s hasta que el hueso se fracturó; la máxima carga tolerada fue expresada en Newtons y el desplazamiento/rigidez se expresó en mm.

Figura 7 Imagen del equipo analizador de textura CT3 marca Brookfield al momento de realizar la prueba de flexión en tres puntos sobre el fémur derecho de una rata.



Para poder comparar la carga y rigidez de los diferentes grupos los valores se normalizaron como esfuerzo y deformación respectivamente, estandarizando de esta manera los resultados al considerar las diferencias en la distribución de la masa del hueso generadas por los diferentes tratamientos.

Para determinar la distribución de la masa se consideró al fémur como un cilindro elíptico hueco y se calculó su momento de inercia (I) (Guede et al., 2013):

$$I = \frac{\pi}{64} [(X_1 Y_1^3) - (X_2 Y_2^3)]$$

Donde:

I = Momento de inercia para una elipse hueca

X1 = Diámetro externo mayor de la sección transversal en el punto de aplicación de la fuerza

Y1 = Diámetro externo menor de la sección transversal en el punto de aplicación de la fuerza

X2 = Diámetro interno mayor de la sección transversal en el punto de aplicación de la fuerza

Y2 = Diámetro interno menor de la sección transversal en el punto de aplicación de la fuerza

El esfuerzo (σ) fue calculado empleando la teoría de flexión de vigas y asumiendo que el fémur posee un comportamiento elástico lineal para un ensayo de tres puntos aplicando la siguiente formula (Guede et al., 2013):

$$\sigma = \frac{PLc}{4I}$$

Donde:

P = Carga aplicada (N)

L =Distancia entre los soportes (mm)

c =1/2 del diámetro externo menor (mm)

I =Momento de Inercia de la sección transversal elíptica

La deformación (ε) fue calculada de acuerdo a la siguiente formula (Guede et al., 2013):

$$\varepsilon = \delta \left(\frac{12c}{L^2} \right)$$

Donde:

ε = Deformación

δ =Desplazamiento que sufre el cuerpo sobre el que se ejerce la fuerza (mm)

c =1/2 del diámetro externo menor (mm)

L =Desplazamiento (mm)

La elasticidad de los huesos fue calculada de acuerdo a la fórmula (Guede et al., 2013):

$$E = \frac{PL^3}{48I\delta}$$

Donde:

P = Carga aplicada (N)

L = Distancia entre los soportes (mm)

I = Momento de Inercia de la sección transversal elíptica

δ = Desplazamiento que sufre el cuerpo sobre el que se ejerce la fuerza (mm)

4.9 EVALUACIÓN HISTOMORFOMÉTRICA

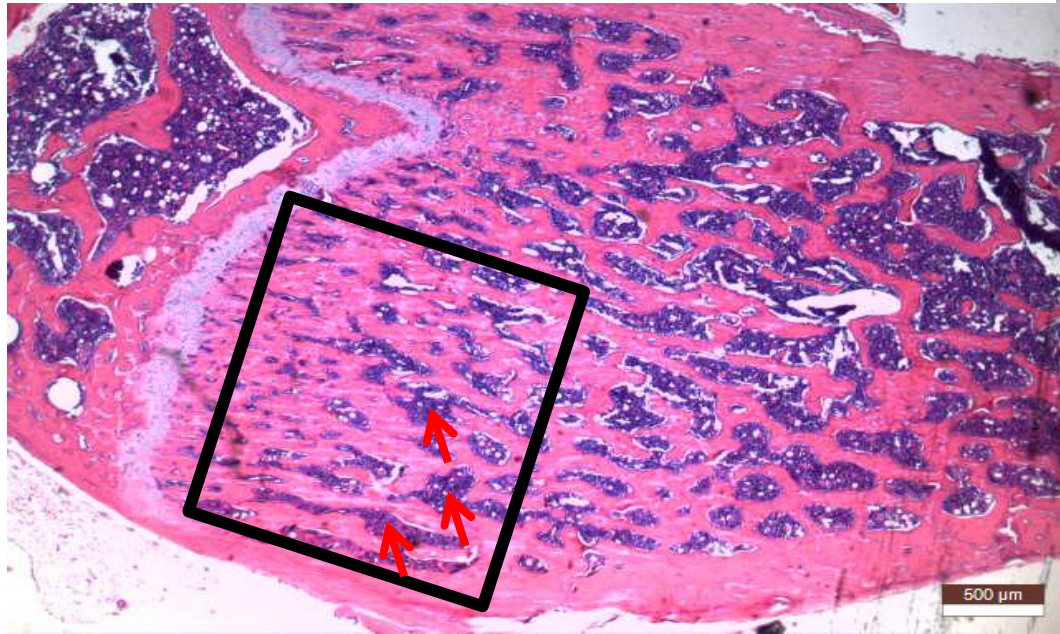
Durante la recolección de las muestras pata posterior derecha fue desarticulada a nivel de la cadera, la rodilla y el tobillo; para el análisis histológico el fémur fue removido, despojado de todo tejido blando y fijado en buffer formol fosfato 0.1M durante 24 h para luego ser descalcificados, deshidratados y embebidos en parafina con el fin de obtener 2 secciones: un corte longitudinal y uno transversal del hueso, las cuales fueron examinadas al microscopio habiendo sido teñidas con hematoxilina y eosina y tinción tricromica de Masson para evaluar la distribución del colágeno dentro de las mismas.

La cabeza del fémur y la segunda vértebra lumbar fueron evaluadas para determinar la calidad del hueso, sus medidas y la densidad trabecular del mismo ().

La sección transversal del fémur fue analizada para determinar a partir de ella el momento de inercia de las muestras. Con este fin se midió la longitud de los diámetros externos (x_1 e y_1) e internos (x_2 e y_2) del hueso y su grosor el cual se consideró como un promedio de diez lecturas tomadas alrededor de la muestra (). Los cortes fueron

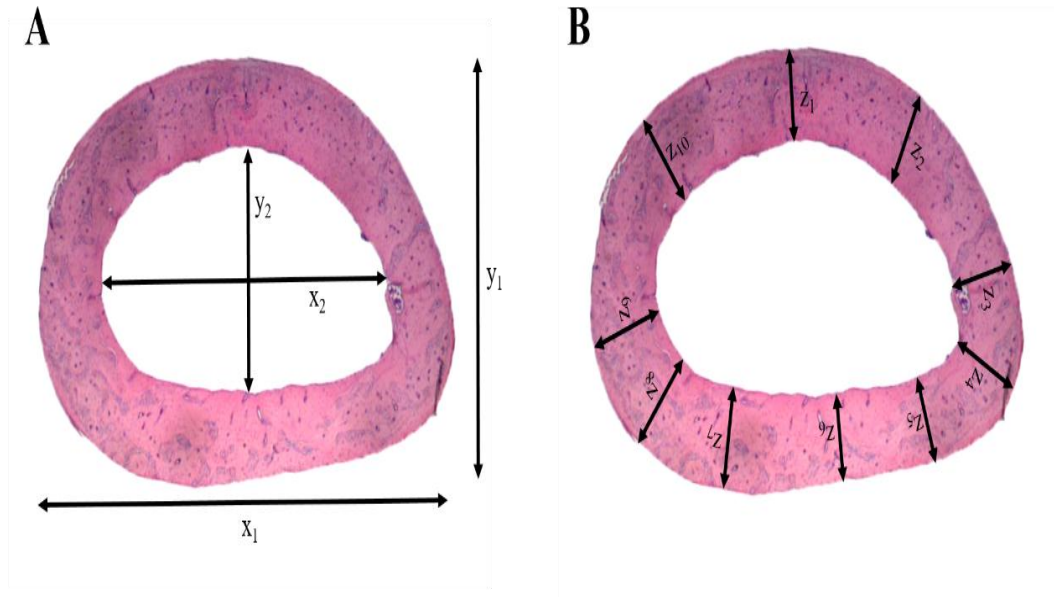
analizados al microscopio (10X) con el programa Leica Application Suite para Windows.

Figura 8 Corte longitudinal de fémur de rata.



Tinción eosina & hematoxilina. Aumento 2.5X. Representación del método para la cuantificación del área trabecular. Se calculó el área dentro del recuadro negro, las flechas indican las cavidades intratrabeculares cuyas áreas fueron cuantificadas con un aumento de 10X

Figura 9 Corte transversal de fémur de rata.



Tinción eosina & hematoxilina. Aumento 2.5X. Representación del método para: A- Evaluación de los diámetros externos (x_1 e y_1) e internos (x_2 e y_2) del hueso. B- Grosor del área cortical del fémur. Se cuantificó la longitud de las líneas en micras a un aumento de 2.5X.

4.10 MARCADORES BIOQUÍMICOS EN SUERO

Con el fin de evaluar marcadores del metabolismo óseo en las muestras de suero recolectadas de los diferentes grupos estudiados se emplearon kits comerciales específicos para rata de acuerdo a las recomendaciones indicadas por los fabricantes.

IL-6 (Rat IL-6 Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), IL-1 β (Rat IL-1-beta Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), TNF- α (Rat TNF-alpha Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), Osteocalcina (OC Rat-Mid ELISA; Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev, Denmark), Telopectido C-terminal del colágeno tipo I (RatLapsTM CTX-I EIA; Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev, Denmark).

4.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos fueron analizados con el programa “IBM SPSS statistics 24” para determinar las diferencias y correlaciones entre las variables y los diferentes grupos. Para el análisis de homogeneidad de varianzas se usó la prueba de Levene.

Para variables homogéneas, las diferencias entre medias las cuales son expresadas como media +/- desviación estándar para las diferentes variables y tratamientos se determinaron por el análisis de varianza (ANOVA) y la diferencia entre par de medias, por las pruebas de Tukey y DSM. Se considera como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

4.12 CONSIDERACIONES ETICAS

Los procedimientos se realizaron de acuerdo a las condiciones científicas, técnicas y administrativas para la investigación; y los principios éticos de la experimentación animal del International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS).

Este estudio ha sido aprobado por el comité de ética animal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código SIDISI: 64996).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACION DE LOS PEPTIDOS HIDROLIZADOS DE ANCHOVETA

De manera previa al inicio del tratamiento los péptidos hidrolizados de escamas de anchoveta fueron analizados para verificar su composición, origen e inocuidad.

Gracias a los resultados del análisis proximal y el perfil de aminoácidos fue posible concluir que el tratamiento administrado consistió en colágeno hidrolizado en polvo (tablas 2, 3) y que su consumo no supone ningún riesgo por contaminación (tablas 4 y 5)

Tabla 2. Análisis proximal de los péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta

Parámetro	Resultado
Contenido de proteína	0.929
Contenido de lípidos	0.0022
Contenido de Ceniza	0.0158
Contenido de Humedad	0.043

Tabla 3 Perfil de aminoácidos de los péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta

Parámetro	Resultado (%)
Hidroxiprolina + Prolina	20
Aminoácidos esenciales	17
Arginina	8
Alanina	10
Glicina	26
Acido glutámico	9
Otros	8

Tabla 4 Análisis microbiológico a los péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta

Parámetro	Resultado
Conteo aerobios totales	580 fcu/g
Salmonella	Neg.
E. coli	Neg.
Hongos y Levaduras	< 10 fcu/g

Tabla 5 Análisis de metales pesados a los péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta

Parámetro	Resultado
Hg	< 0.03 ppm
Pb	< 0.5 ppm
As	< 0.5 ppm
Cd	< 0.5 ppm
Cr	< 1 ppm
Cu	0.44 ppm
Zn	3.27 ppm

5.2 PESO DE LOS ANIMALES

Durante el desarrollo del estudio no se observó diarrea en ninguno de los animales. En los meses de tratamiento todos los grupos aumentaron de peso, sin embargo, el incremento fue significativamente mayor al presentado por el grupo control SHAM en todos los grupos ovariectomizados ($p < 0.05$) a excepción del grupo tratado diariamente con una dosis de $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de péptido colágeno hidrolizado de anchoveta (OVX+PHCA1) (Tabla 6).

Tabla 6 – Efecto de los tratamientos sobre el peso corporal de los animales tratados.

		Peso inicial (g)	Peso final (g)	Delta peso (g)
		Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM
Tratamiento	SHAM	165.0 ± 3.1	236.4 ± 3.1	70 ± 3.6
	OVX + VH	182.3 ± 3.9	266 ± 7 *	83.8 ± 7.5
	OVX+E2	173.3 ± 4.9	263.5 ± 6.3*	90.2 ± 4.5*
	OVX+PHCA1	181 ± 3.8	259.1 ± 10.5	77 ± 10.5
	OVX+PHCA2	171.3 ± 4	275 ± 4.9 *	102.3 ± 6.9 *
	OVX+PHCA 4	181.1 ± 3.8	283 ± 5.9 *	101.9 ± 7.8 *

* $P < 0.05$ vs. grupo SHAM

Con respecto al peso de los órganos se observó que todos los grupos ovariectomizados presentaron un menor peso uterino en comparación al grupo control SHAM ($p < 0.05$).

Por otro lado, se encontró que todos los grupos ovariectomizados presentaron hiperplasia a nivel hepático y renal a comparación del grupo control SHAM ($p < 0.05$) excepto el tratado con estradiol (tabla7).

Tabla 7 Efecto de los tratamientos sobre el peso de los órganos de los animales tratados.

		Riñones (g)	Hígado(g)	Útero(g)
		Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM
Tratamiento	SHAM	1.46±0.03	7.92±0.21	0.43±0.03
	OVX + VH	1.59±0.04	7.8±0.39	0.06±0.00 ^a
	OVX+E2	1.54±0.04	7.76±0.61	0.15±0.01 ^{a,b}
	OVX+PHCA1	1.72±0.07 ^{a,c}	8.37±0.52	0.14±0.02 ^{a,b}
	OVX+PHCA2	1.74±0.04 ^{a,c}	9.12±0.34	0.11± 0.01 ^a
	OVX+PHCA 4	1.74±0.03 ^{a,c}	9.64±0.19 ^{a,b,c}	0.07 ± 0.01 ^{a,c}

^a*P* < 0.05 vs. grupo SHAM

^b*P* < 0.05 vs. grupo OVX+VH

^c*P* < 0.05 vs. Grupo OVX+E2

5.3 EFECTO SOBRE LA ESTRUCTURA OSEA

5.3.1 Fémur

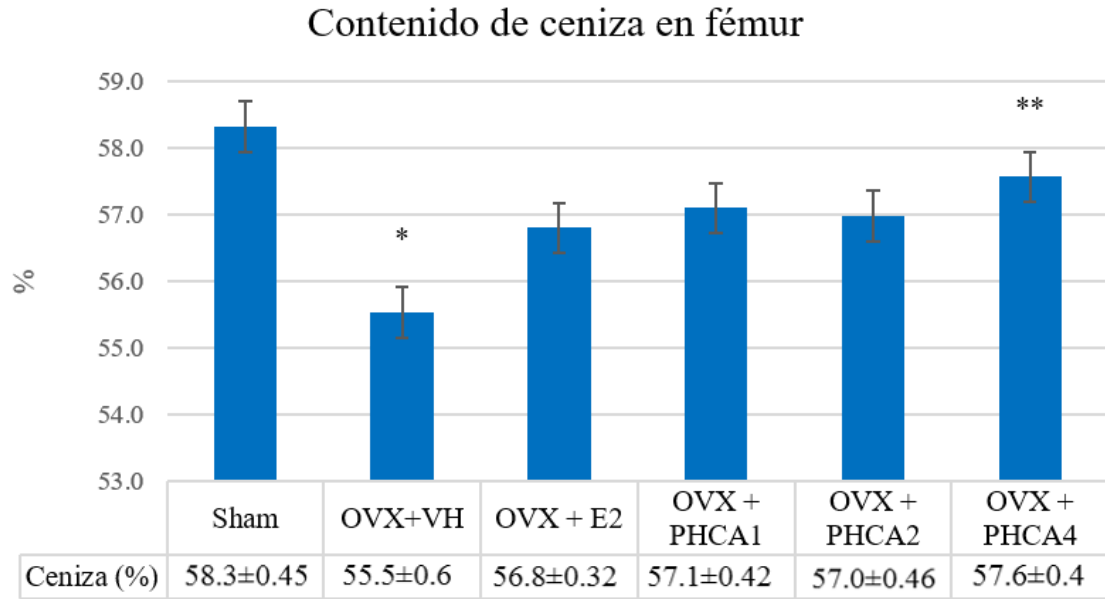
No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) a nivel del peso del fémur fresco. Sin embargo, al evaluar el porcentaje de ceniza entre los grupos se observa que la ovariectomía reduce ($p < 0.05$) el contenido de ceniza del fémur comparada con el grupo control SHAM. Al comparar el efecto de los diferentes tratamientos solo el grupo al que se le administró $4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de péptidos de colágeno de anchoveta muestra una recuperación significativa ($p < 0.05$) a este nivel ().

Al evaluar el grosor del fémur, midiendo la distancia entre el endostio y el periostio, no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los grupos.

Al analizar la masa ósea del hueso esponjoso encontramos que la deficiencia de estrógenos en el grupo no tratado (OVX+VH) redujo en un 45 % la masa ósea al compararlo con el control (SHAM), incrementando el área de las cavidades intratrabeculares.

En la y en la se muestran cortes histológicos del fémur longitudinales y transversales respectivamente. Gracias al corte transversal podemos observar el efecto de la deficiencia de estrógenos sobre el hueso cortical a través de la aparición de cavidades en lo que debería ser hueso compacto.

Figura 10 Efecto de los diferentes tratamientos sobre el contenido de ceniza en el fémur.



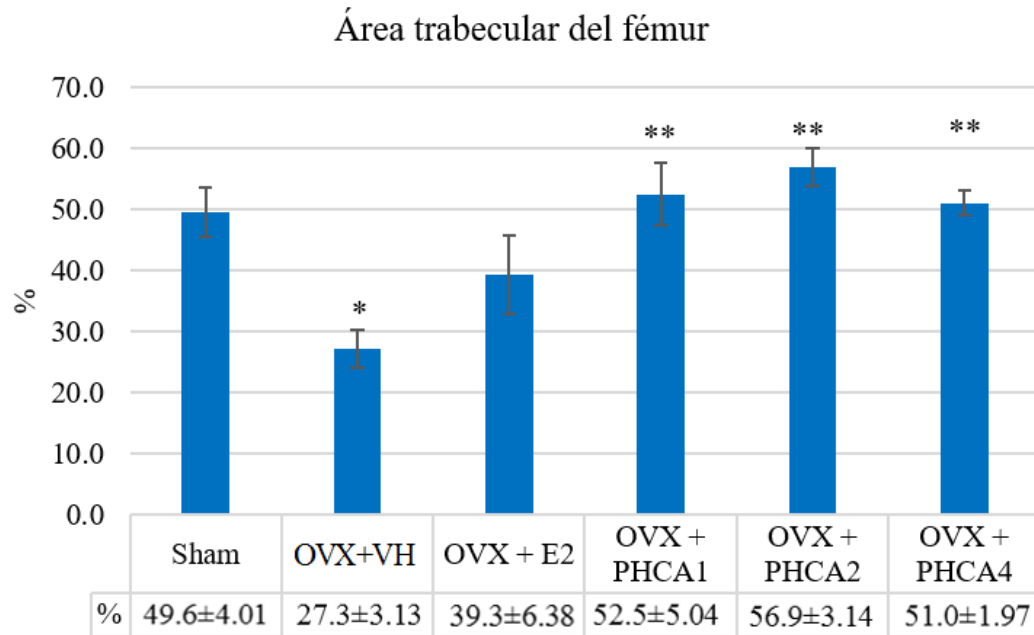
* $P < 0.01$ vs. grupo SHAM

** $P < 0.05$ vs. grupo OVX+VH

SHAM: control+agua; OVX+VH: ovariectomizadas+agua; OVX+E2: Ovariectomizadas tratadas con estradiol; OVX+ PHCA1: ovariectomizadas tratadas con 1g.kg-1de colágeno; OVX+ PHCA2: ovariectomizadas tratadas con 2g.kg-1de colágeno y OVX+ PHCA4: ovariectomizadas tratadas con 4g.kg-1de colágeno. Datos expresados como la media del porcentaje de ceniza \pm SEM para cada grupo evaluado.

N total = 35

Figura 11 Efecto de los diferentes tratamientos sobre el porcentaje del área trabecular del fémur.

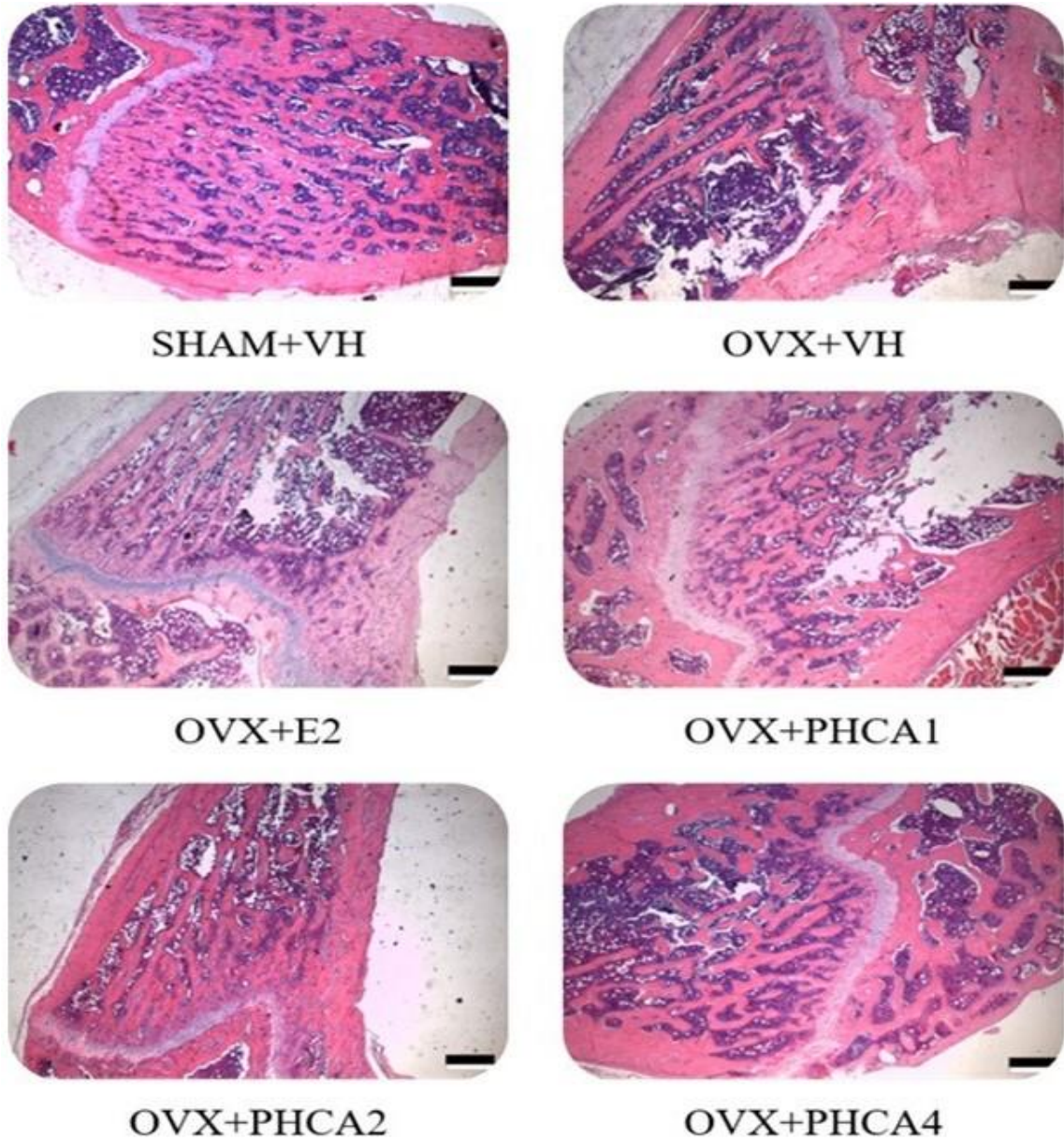


* P < 0.01 vs. grupo SHAM

** P < 0.01 vs. grupo OVX

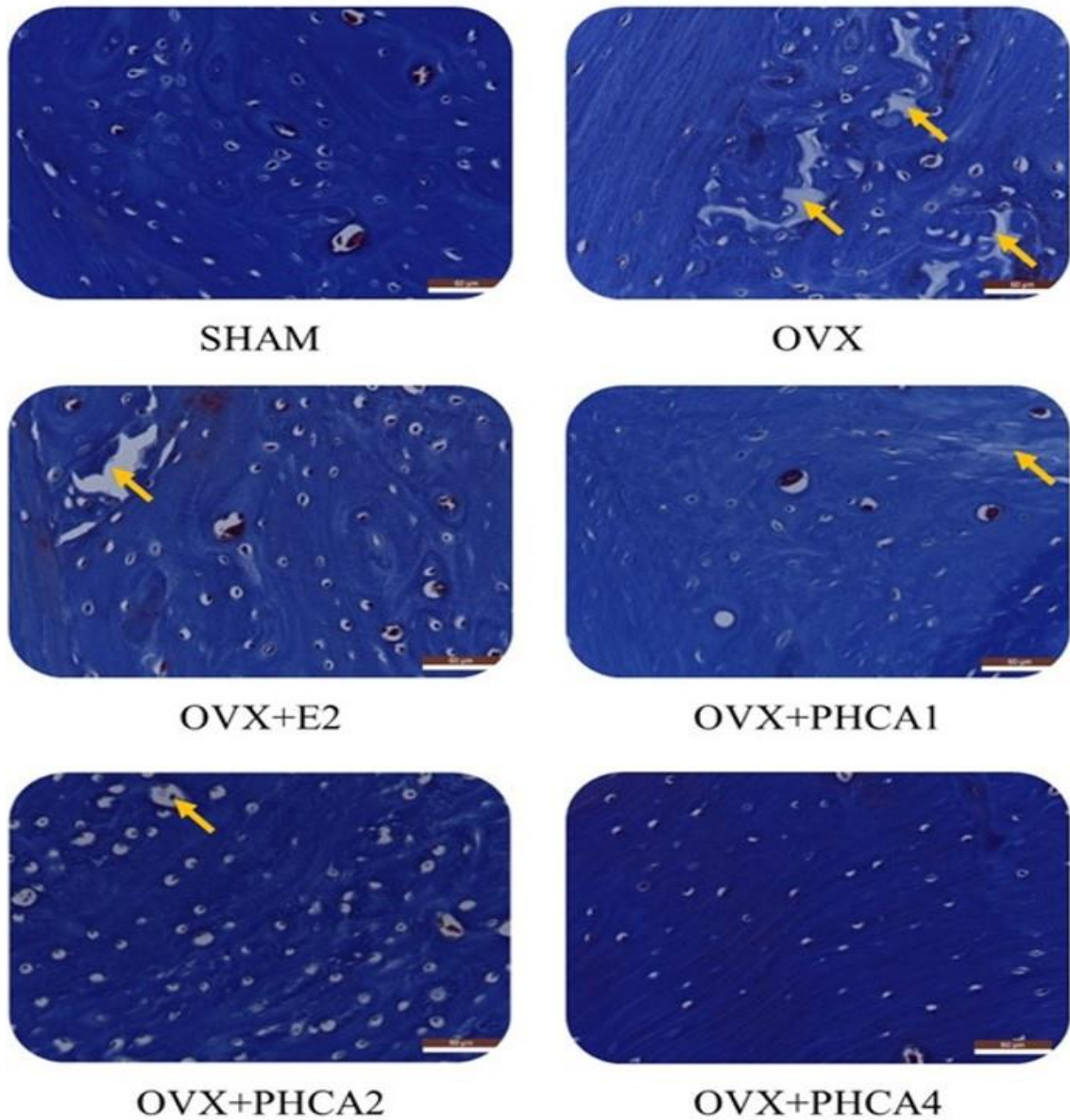
SHAM: control+agua; OVX+VH: ovariectomizadas+agua; OVX+E2: Ovariectomizadas tratadas con estradiol; OVX+ PHCA1: ovariectomizadas tratadas con 1g.kg-1de colágeno; OVX+ PHCA2: ovariectomizadas tratadas con 2g.kg-1de colágeno y OVX+ PHCA4: ovariectomizadas tratadas con 4g.kg-1de colágeno. Datos expresados como la media ± SEM del porcentaje del área trabecular media respecto al área total para cada grupo evaluado. N total=36.

Figura 12 Cortes longitudinales del fémur.



Tinción eosina & hematoxilina. Aumento 2.5x, escala 100 μ m. SHAM: control+agua; OVX+VH: ovariectomizadas+agua; OVX+E2: Ovariectomizadas tratadas con estradiol; OVX+ PHCA1: ovariectomizadas tratadas con 1g.kg⁻¹de colágeno; OVX+ PHCA2: ovariectomizadas tratadas con 2g.kg⁻¹de colágeno y OVX+ PHCA4: ovariectomizadas tratadas con 4g.kg⁻¹de colágeno.

Figura 13 Cortes transversales del fémur.



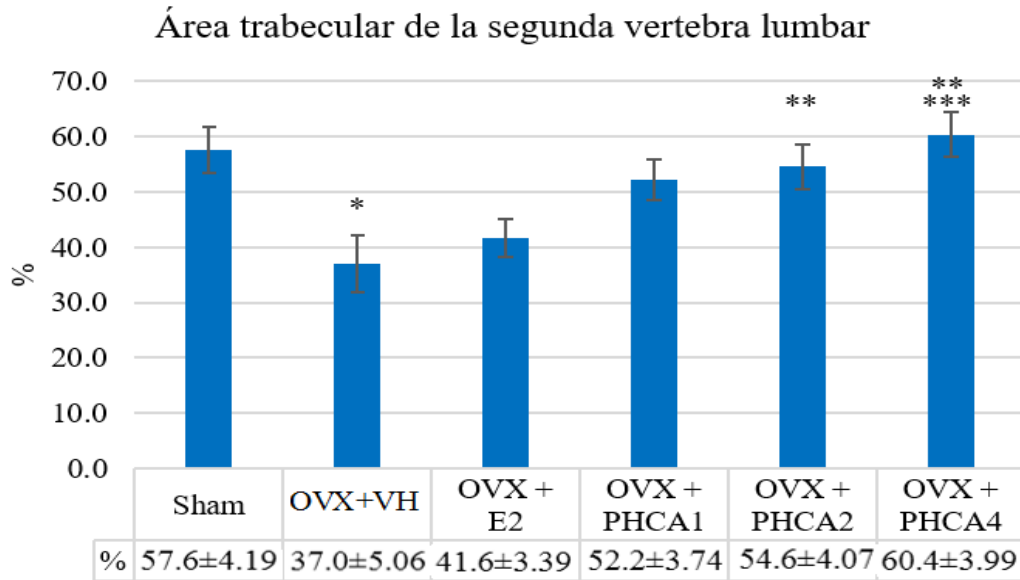
Tinción tricromica de Masson. Aumento 40x, escala 500 μm . Las flechas amarillas señalan las regiones donde se perdió masa ósea. SHAM: control+agua; OVX+VH: ovariectomizadas+agua; OVX+E2: Ovariectomizadas tratadas con estradiol; OVX+PHCA1: ovariectomizadas tratadas con 1g.kg^{-1} de colágeno; OVX+ PHCA2: ovariectomizadas tratadas con 2g.kg^{-1} de colágeno y OVX+ PHCA4: ovariectomizadas tratadas con 4g.kg^{-1} de colágeno.

5.3.2 Vertebra

Al analizar la masa ósea del hueso esponjoso de la segunda vértebra lumbar encontramos que la deficiencia de estrógenos en el grupo no tratado (OVX) redujo en un 36% la masa ósea al compararlo con el control (SHAM), incrementando el área de las cavidades intratrabeculares ().

El suplemento de la dieta con, 2 g.kg⁻¹ y 4g.kg⁻¹ resulto en una recuperación estadísticamente significativa de la masa ósea (p<0.05) (). El tratamiento con estradiol no logró recuperar la masa ósea de manera significativa(p>0.05).

Figura 14 Efecto de los diferentes tratamientos sobre el porcentaje del área trabecular de la segunda vértebra lumbar.



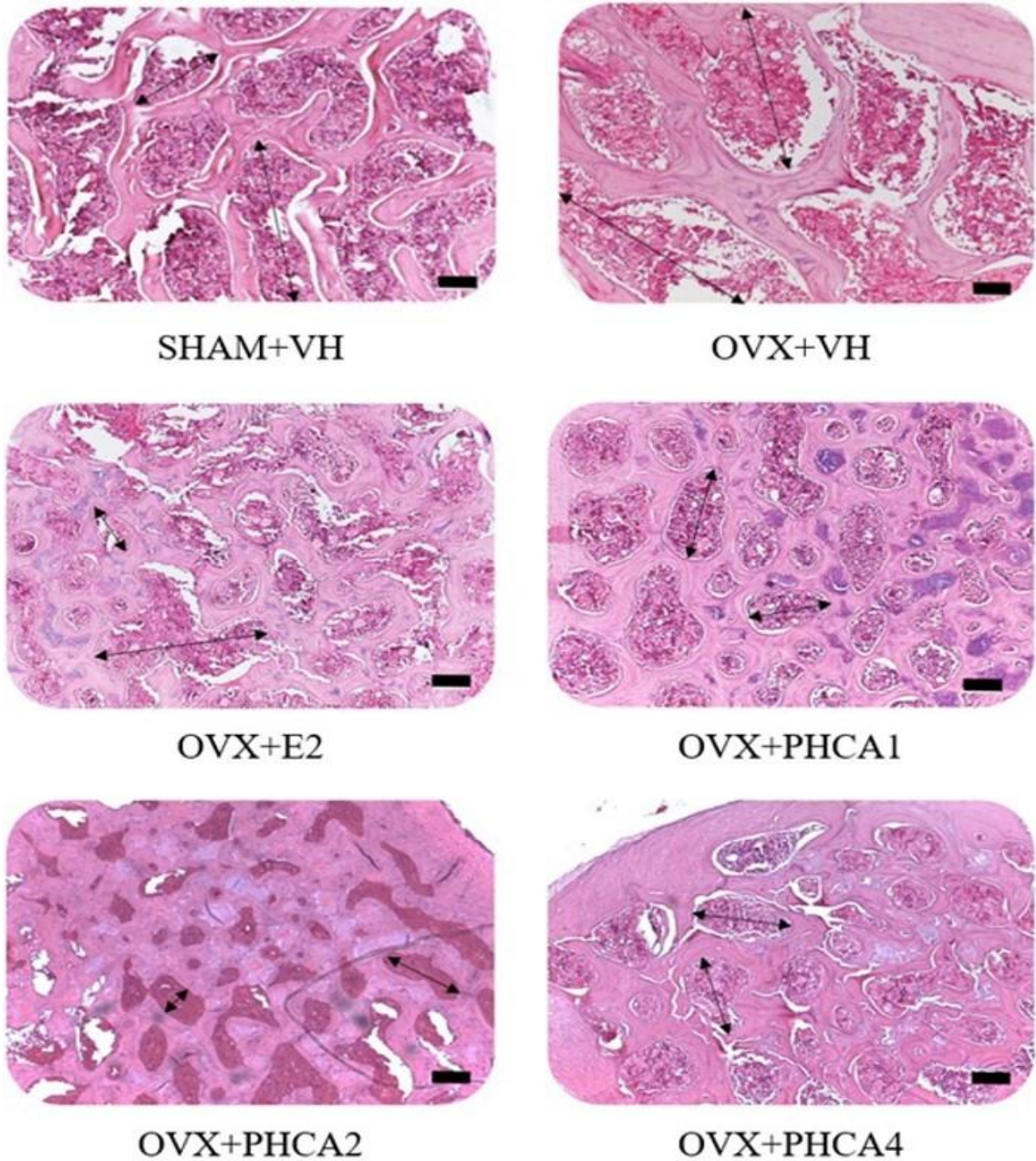
* P < 0.05 vs. Grupo Sham

** P < 0.05 vs. grupo OVX+VH

*** P < 0.05 vs. grupo OVX+E2

SHAM: control+agua; OVX+VH: ovariectomizadas+agua; OVX+E2: Ovariectomizadas tratadas con estradiol; OVX+ PHCA1: ovariectomizadas tratadas con 1g.kg-1de colágeno; OVX+ PHCA2: ovariectomizadas tratadas con 2g.kg-1de colágeno y OVX+ PHCA4: ovariectomizadas tratadas con 4g.kg-1de colágeno. Datos expresados como la media ± SEM del porcentaje del área trabecular media respecto al área total para cada grupo evaluado. N total=36.

Figura 15 Cortes transversales de la segunda vértebra lumbar.



Tinción eosina & hematoxilina. Aumento 10x, escala 100 μm . Las flechas indican la longitud del espacio inter trabecular, donde se ha perdido masa ósea. SHAM: control+agua; OVX+VH: ovariectomizadas+agua; OVX+E2: Ovariectomizadas tratadas con estradiol; OVX+ PHCA1: ovariectomizadas tratadas con 1g.kg^{-1} de colágeno; OVX+ PHCA2: ovariectomizadas tratadas con 2g.kg^{-1} de colágeno y OVX+ PHCA4: ovariectomizadas tratadas con 4g.kg^{-1} de colágeno.

5.4 ANÁLISIS BIOMECANICO DEL FÉMUR

El ensayo de flexión en tres puntos realizado sobre el fémur derecho de seis animales de cada grupo revela que la carga tolerada al ejercer una fuerza de compresión en un ángulo de 90° es menor en los fémures de los animales ovariectomizados al compararlos con los del grupo control.

La administración de estradiol y péptidos hidrolizados de anchoveta en sus tres dosis producen un incremento sobre la carga tolerada por el fémur ($p < 0.05$ para el grupo OVX+PHCA1) al compararlas con los resultados obtenidos en el grupo ovariectomizado + vehículo (Tabla 8).

El valor de desplazamiento en esta prueba representa la deformación que presenta la estructura, en este caso el fémur por acción de la fuerza ejercida sobre él y es proporcional a la magnitud de la misma dentro del límite elástico. Para este parámetro no se identificó una diferencia significativa entre ninguno de los grupos estudiados.

En base a los resultados de carga y desplazamiento determinados con la prueba de flexión en tres puntos y al momento de inercia (I) del hueso calculado en función a los valores obtenidos durante la evaluación histomorfométrica del hueso, considerando al

fémur como una elipse hueca se cuantificaron el esfuerzo (σ), la deformación (ϵ) y la elasticidad (E).

Tabla 8. Valores de Carga y Desplazamiento obtenidos luego de la prueba de flexión en tres puntos.

		Carga (P)	Desplazamiento(δ)
		Media \pm SEM (N)	Media \pm SEM (mm)
Tratamiento	SHAM	118.68 \pm 5.51	0.51 \pm 0.01
	OVX+VH	107.99 \pm 2.49	0.49 \pm 0.03
	OVX+E2	123.47 \pm 6.1*	0.49 \pm 0.03
	OVX+PHCA1	125.34 \pm 4.62*	0.52 \pm 0.04
	OVX+PHCA2	112.25 \pm 2.88	0.52 \pm 0.03
	OVX+PHCA4	111.02 \pm 4.12	0.45 \pm 0.03

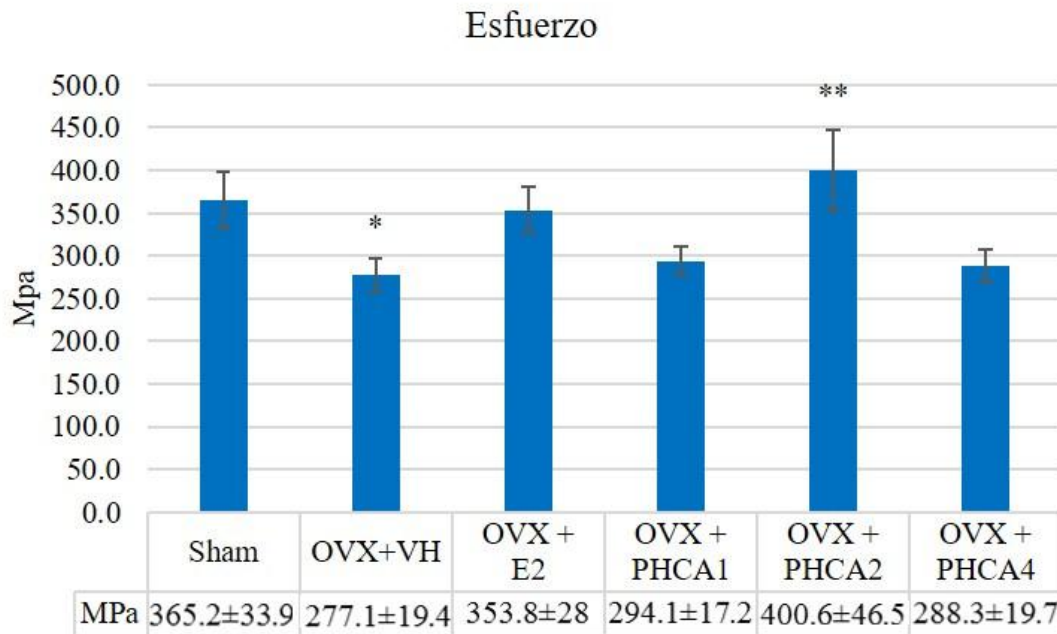
* P < 0.05 *versus* OVX+VH

Con respecto al esfuerzo encontramos que la ovariectomía disminuye la resistencia interna del fémur frente a una fuerza ejercida sobre él y que la administración diaria de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta a razón de 2 g.kg⁻¹ (OVX+PHCA2) incrementa de manera significativa este parámetro (p<0.01) ().

El suplemento de la dieta con 2 g.kg⁻¹ de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta al día incrementó significativamente la elasticidad del fémur al compararlo

con los resultados obtenidos en el grupo control SHAM, el grupo OVX y las otras dos dosis de péptidos de colágeno evaluadas ().

Figura 16 Efecto de diferentes tratamientos sobre la resistencia interna del fémur frente a una fuerza que actúa sobre él.

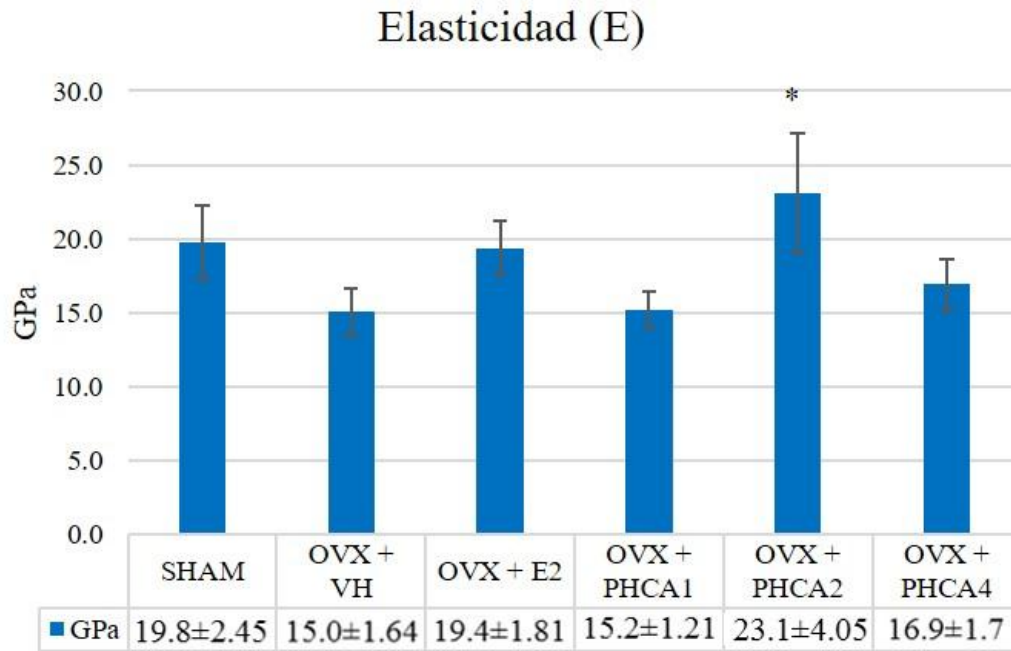


* P < 0.05 vs. grupo Sham

** P < 0.01 vs. grupo OVX+VH

SHAM: control+agua; OVX+VH: ovariectomizadas+agua; OVX+E2: Ovariectomizadas tratadas con estradiol; OVX+ PHCA1: ovariectomizadas tratadas con 1g.kg⁻¹de colágeno; OVX+ PHCA2: ovariectomizadas tratadas con 2g.kg⁻¹de colágeno y OVX+ PHCA4: ovariectomizadas tratadas con 4g.kg⁻¹de colágeno. Datos expresados como Mega pascales (MPa), equivalentes donde 1MPa equivale a 1 N/mm². Resultados calculados en base a una n de 34 muestras.

Figura 17 Efecto de diferentes tratamientos sobre la capacidad del fémur en recuperar su forma frente a una fuerza que actúa sobre él



* $P < 0.05$ vs. Grupos OVX+VH y OVX+PHCA1

SHAM: control+agua; OVX+VH: ovariectomizadas+agua; OVX+E2: Ovariectomizadas tratadas con estradiol; OVX+ PHCA1: ovariectomizadas tratadas con 1g.kg^{-1} de colágeno; OVX+ PHCA2: ovariectomizadas tratadas con 2g.kg^{-1} de colágeno y OVX+ PHCA4: ovariectomizadas tratadas con 4g.kg^{-1} de colágeno. Datos expresados como GigaPascales (GPa) para una $n=34$

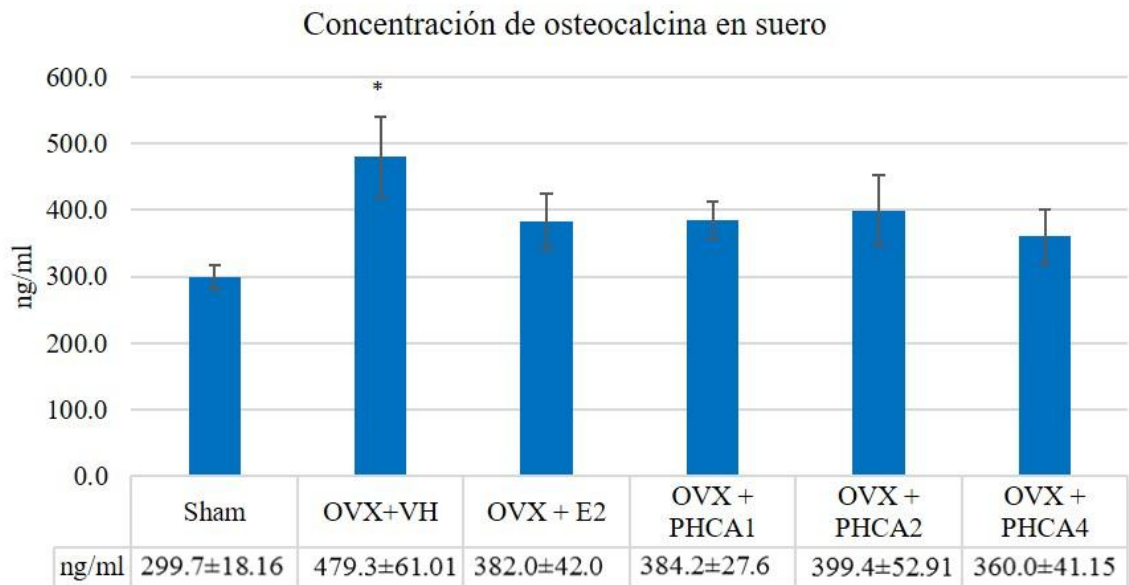
5.5 MARCADORES BIOQUÍMICOS EN SUERO

Los valores de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en las muestras fueron menores a los del límite de detección de los kits.

El análisis de la concentración de Osteocalcina en suero reveló que la ovariectomía aumenta significativamente la presencia de este marcador al compararla con el grupo control SHAM ($P < 0.01$) ().

Los análisis realizados a la concentración del telopeptido C terminal del colágeno en suero no resultaron concluyentes.

Figura 18 Concentración de osteocalcina en suero (ng/ml).



* $P < 0.05$ vs. grupo SHAM

SHAM: control+agua; OVX+VH: ovariectomizadas+agua; OVX+E2: Ovariectomizadas tratadas con estradiol; OVX+ PHCA1: ovariectomizadas tratadas con 1g.kg⁻¹de colágeno; OVX+ PHCA2: ovariectomizadas tratadas con 2g.kg⁻¹de colágeno y OVX+ PHCA4: ovariectomizadas tratadas con 4g.kg⁻¹de colágeno. Datos expresados como ng/ml de suero para una n de 36 muestras.

6 DISCUSIÓN

Es sabido que los estrógenos poseen diversos efectos biológicos en animales y en humanos relacionados en procesos de crecimiento, diferenciación celular y el metabolismo de diferentes tejidos objetivos (Compston, 2001). Además de su influencia sobre el sistema reproductivo y el metabolismo óseo el estradiol desempeña un papel modulador de la ingesta de alimentos.

La ovariectomía bilateral, reduce significativamente los niveles de estradiol, así mismo produce un incremento rápido de la ingesta de alimentos lo cual promueve un rápido aumento de peso y del tejido adiposo en ratas hembras (Eckel, 2011). En este estudio, todos los grupos de ratas ovariectomizadas a excepción del grupo tratado diariamente con una dosis de 1 g.kg^{-1} de péptido colágeno hidrolizado de anchoveta: PHCA1 presentaron un incremento en el peso corporal significativamente mayor al del grupo control (SHAM) ($p > 0.05$). Esta diferencia se puede deber a que el suplemento de la dieta con proteína de acuerdo a lo reportado por estudios previos (Geraedts et al., 2011; Hutchison et al., 2015) estimula la liberación de la hormona colecistoquinina (CCK) por las células del duodeno y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) por las células L del intestino; ambas hormonas implicadas en el control de la ingesta de alimentos. Sin embargo, un reciente estudio (Nobile et al., 2016) encontró que este efecto anorexigénico ocasionado por el consumo de proteína llega a un “plateau” que sería lo que ocurrió en nuestro caso para los grupos tratados con 2 g.kg^{-1} y 4 g.kg^{-1} de

péptido colágeno hidrolizado de anchoveta, en estos grupos las calorías aportadas por las altas dosis de proteína administradas superarían el efecto inhibitor del apetito causado por el aumento de las hormonas antes citadas generando un incremento del peso corporal aún mayor al observado en el grupo OVX no tratado (OVX+VH). Esto explicaría también la hiperplasia renal observada en los grupos que recibieron un suplemento proteico.

La osteoporosis es una enfermedad esquelética multifactorial, que se caracteriza por la reducción de la masa ósea y la alteración de la micro arquitectura estructural del tejido óseo, dando lugar a una pérdida de resistencia mecánica y a un incremento significativo del riesgo de fracturas (Anonymous, 2002).

El modelo de ratas ovariectomizadas es el más empleado durante la investigación de la osteoporosis por deficiencia de estrógenos, frecuente durante la etapa postmenopáusicas. La ovariectomía genera un cambio a nivel del metabolismo óseo provocando que la tasa de resorción supere la de formación generando pérdida de masa ósea. Se ha reportado que se pueden observar diferencias estadísticamente significativas a nivel femoral desde el día 30 luego de la operación y el día 60 para el caso de la vértebra lumbar (Lelovas et al., 2008). En el presente estudio se evaluaron parámetros físicos del hueso después de la ovariectomía y el efecto de los tratamientos con estradiol como control positivo y péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta en tres diferentes dosis.

En los últimos años se ha observado un creciente interés por la valorización de subproductos industriales, siendo la industria pesquera una gran fuente de materias primas en este sentido. Las fuentes más abundantes de colágeno son la piel de cerdo, cuero bovino y, de cerdo y vacuno huesos, sin embargo, el uso industrial de colágeno de origen marino está creciendo en importancia.

La superficie de una escama de pescado es una capa ósea conformada por fibras de colágeno tipo I orientadas aleatoriamente y un gran número de cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{O}_4)_6(\text{OH})_2$). Finas capas de las fibras de colágeno se apilan para formar una base fibrilar bajo la capa ósea (Okuda et al., 2011). La dirección de las fibras en cada capa difiere del resto, proveyendo gracias a esta estructura supramolecular jerárquica la gran fuerza mecánica que poseen las escamas. Los peces presentan colágeno no solo en sus escamas sino también en la piel, huesos, aletas y cartílago, sin embargo, las escamas al no ser consideradas un alimento por su gran contenido de minerales son el principal foco de los estudios destinando a emplear colágeno con varios propósitos como la producción de alimentos, productos nutraceuticos, biomateriales médicos y otros usos industriales promoviendo un uso más efectivo de los recursos biológicos marinos.

La anchoveta peruana (*Engraulis ringes*) es una especie de crecimiento rápido y sus hábitos altamente gregarios permiten la formación de enormes y extensos cardúmenes en periodos de alta disponibilidad lo cual facilita que sus capturas sean de gran

magnitud. En el Pacífico Sudeste su distribución geográfica abarca el litoral peruano y chileno(IMARPE, 2007).

Si bien existen reportes de colágeno extraído de diferentes especies marinas, de su caracterización y la evaluación de sus propiedades, éste es el primero en describir el colágeno de tipo I de anchoveta peruana (*Engraulis ringes*) y desarrollar y evaluar el posible efecto de su consumo sobre la salud.

Los péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta evaluados provienen en su totalidad de escamas de anchoveta cuya composición natural consiste en un 56% agua, 22.5 % ceniza y 18.5% proteína la cual ha sido identificada previamente como colágeno tipo I. El producto final luego del proceso de lavado, desmineralización, extracción y secado por atomización posee un 93% de proteína, un 5% de humedad y un 2% de ceniza.

El colágeno tipo 1 se caracteriza por su conformación de dos cadenas tipo α y una cadena tipo β con un peso molecular promedio de alrededor de 110 kDa, luego del proceso de hidrolisis el 90% de los péptidos evaluados tienen un peso molecular menor a 10 kDa, diferentes estudios han demostrado que los hidrolizados poseen una mejor digestibilidad y mejores características hipo alergénicas que la proteína completa (Ballmer-Weber et al., 2016; Jung et al., 2016) aportando, dependiendo de sus características, efectos adicionales a los nutricionales como por ejemplo capacidad antioxidante (Mendis et al., 2005; Nagai et al., 2006; Phanturat et al., 2010; Senphan

& Benjakul, 2014) y antiinflamatoria (Hartog et al., 2013) lo cual resulta importante para el tratamiento de enfermedades como la osteoporosis post-menopáusicas (Dou et al., 2016; Law et al., 2016).

Luego del colágeno, el segundo componente principal de las escamas de pescado, al igual que en el hueso es la hidroxiapatita (Pon-On et al., 2016b) por lo que se podría pensar que parte de ese contenido de calcio y fósforo de las escamas estaría pasando al hidrolizado y produciendo un efecto positivo sobre el hueso al suplementar la dieta con este producto (Pon-On et al., 2016a), sin embargo al analizar el proximal de los péptidos hidrolizados de anchoveta encontramos que solo contiene un 1.58% de ceniza y que el contenido de calcio aportado por su consumo diario aún para la mayor de la dosis ($4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) no llega a 2 mg por lo que concluimos que cualquier efecto encontrado luego de la administración de los péptidos hidrolizados de anchoveta debe ser atribuido a la porción proteica de este suplemento.

Con respecto al perfil de aminoácidos, se determinó que los péptidos son ricos en glicina ($\approx 26\%$ del contenido proteico total), prolina e hidroxiprolina ($\approx 20\%$ del contenido proteico total), el consumo del di péptido Prolina-Hidroxiprolina ha sido asociados con la estimulación de la formación de colágeno por los fibroblastos y con un incremento en la diferenciación de los osteoblastos regulando la expresión de los factores de transcripción Runx2, Osterix, y Colla1 (Kimira et al., 2014). Del mismo modo el di péptido Glicina-Hidroxiprolina también proveniente del hidrolisis del colágeno ha demostrado tener un efecto estimulando la diferenciación de fibroblastos

in vitro (Shigemura et al., 2011; Sugihara et al., 2012). Estos resultados nos estarían dando una luz respecto a la manera en como el consumo de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta podrían estar ejerciendo su efecto.

En este estudio se evaluó el grosor del fémur como marcador del hueso cortical (hueso compacto), midiendo la distancia entre el endostio y el periostio. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos ($p < 0.05$), sin embargo, a nivel histológico se puede apreciar la aparición de pequeñas cavidades formando lagunas en lo que debería ser tejido compacto dado que la principal función del hueso cortical es la de soporte. Estos agujeros estarían indicando la pérdida de tejido óseo la cual se ve reflejada también en el análisis del contenido de ceniza del fémur donde se encuentra que la disminución de estrógenos provocada por la ovariectomía reduce significativamente el contenido mineral del hueso ($p < 0.01$) y que El suplemento de la dieta con una dosis diaria de $4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de péptidos de colágeno de anchoveta provoca una recuperación significativa a este nivel. El tratamiento con estradiol, El suplemento de la dieta con $1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de péptidos de colágeno de anchoveta también produjeron un incremento del contenido mineral del fémur, aunque en menor medida al compararlos con el grupo no tratado (OVX+VH).

Al analizar la masa ósea del hueso esponjoso en una primera instancia a través de la cuantificación del porcentaje del área trabecular de la cabeza del fémur encontramos que la deficiencia de estrógenos en el grupo no tratado (OVX + VH) redujo en un 45 % la masa ósea al compararlo con el control (SHAM), incrementando el área de las

cavidades intra-trabeculares, estos resultados concuerdan con lo reportado en base a estudios previos hallados en la bibliografía ((D'Elia et al., 2009) donde se señala que el hueso esponjoso o trabecular es más sensible que el cortical frente a cambios hormonales debido a que es más activo metabólicamente y participa en el proceso de regulación del calcio corporal (D'Elia et al., 2009). Todos los grupos tratados con péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta presentaron una recuperación significativa ($p < 0.05$) de la masa ósea cuantificada a través de este parámetro, superando incluso cuantitativamente los valores observados para el grupo control.

Así mismo, se evaluó la histomorfometría del hueso trabecular a nivel de la segunda vértebra lumbar donde encontramos que la deficiencia de estrógenos en el grupo no tratado (OVX+VH) redujo en un 36% la masa ósea al compararlo con el control (SHAM). El suplemento de la dieta con 2 g.kg^{-1} y 4 g.kg^{-1} resulto en una recuperación estadísticamente significativa de la masa ósea ($p < 0.05$), superando incluso cuantitativamente los valores observados para el grupo control (SHAM). El grupo control positivo tratado con estradiol mostro una recuperación, sin embargo, los resultados no llegaron a niveles estadísticamente significativos ($p > 0.05$).

El éxito de la ovariectomía se aprecia en la atrofia encontrada en los huesos de los animales ovariectomizados y en la pérdida de masa ósea identificada y discutida anteriormente. Estos resultados concuerdan con lo señalado en otros reportes donde se indica que la deficiencia de estrógenos altera el metabolismo óseo normal incrementando la actividad osteoclástica (Li et al., 2011; Weitzmann & Pacifici,

2006) y a través de ella la resorción mediada por un incremento de la producción del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y de la sensibilidad de las células estromales frente a la presencia de $IL-1\beta$ aumentando de esta manera la liberación de citoquinas, $IL-6$, y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) entre otros (Tella & Gallagher, 2014; Zhao, 2012). Se ha comprobado también que estos cambios afectan la organización de las fibras de colágeno y reducen su diámetro (Wallace et al., 2010) lo cual está directamente relacionado con la fuerza necesaria para generar fracturas (X. Wang et al., 2002).

Con el fin de evaluar la biomecánica del hueso se realizó un ensayo de flexión en tres puntos (Engesaeter et al., 2009; Guede et al., 2013) sobre el fémur derecho de seis animales de cada grupo. Los resultados concuerdan con lo esperado donde la carga tolerada al ejercer una fuerza de compresión en un ángulo de 90° es menor en los fémures de los animales ovariectomizados no tratados (OVX+VH) (≈ 108 N) al compararlos con los animales del grupo control SHAM (≈ 119 N). Al considerar la forma y el área de la región transversal del hueso evaluado a través del cálculo de del segundo momento de inercia considerando la diáfisis del hueso como una elipse hueca se estimó el esfuerzo (σ), la deformación (ϵ) y el módulo de elasticidad o de Young (E) el cual representa la rigidez del material, en este caso la diáfisis compuesta principalmente por hueso cortical.

El valor de desplazamiento para esta prueba representa la deformación que tolera la estructura, en este caso el fémur por acción de la fuerza ejercida sobre él y es

proporcional a la magnitud de la misma dentro del límite elástico. No se identificó una diferencia significativa entre ninguno de los grupos estudiados probablemente debido a que este valor depende de factores intrínsecos de cada individuo analizado por lo que para poder comparar la carga y el desplazamiento es necesario estandarizarlos como esfuerzo y deformación (Guede et al., 2013).

El esfuerzo es la resistencia interna de un objeto frente a una fuerza que actúa sobre él, normalizando la variable “carga tolerada” (Guede et al., 2013) al considerar en su fórmula las medidas de la muestra evaluada con el fin de permitir la comparación de los diferentes grupos, ya que debemos reconocer que no todos los huesos son iguales y sus dimensiones varían no solo de un hueso a otro si no a lo largo de la diáfisis de una misma muestra. Al analizar esta variable encontramos que la pérdida de estrógenos inducida por la ovariectomía bilateral disminuye a cabo de 4 meses la resistencia interna del fémur durante la prueba de flexión en tres puntos a la que fue sometido y que la administración diaria de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta durante 12 semanas a razón de 2 g.kg^{-1} (OVX+PHCA2) incrementa de manera significativa este parámetro ($p < 0.01$) al comparar los resultados con los del grupo no tratado (OVX=VH). Cabe mencionar que el tratamiento tradicional con estradiol a modo de terapia hormonal de reemplazo, con 1 g.kg^{-1} y con 4 g.kg^{-1} de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta durante 12 semanas también presenta resultados positivos, aunque en menor medida.

El suplemento de la dieta con 2 g.kg^{-1} de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta incrementó también significativamente la elasticidad del fémur al compararlo con el grupo control SHAM, el grupo OVX + VH, el tratamiento con estrógeno (OVX+E2) y las otras dos dosis de péptidos de colágeno evaluadas.

La osteocalcina es una proteína de la matriz ósea secretada por los osteoblastos y constituye aproximadamente un 15% de las proteínas no colagénicas del hueso (Civitelli et al., 2009). El análisis de la concentración de osteocalcina en suero reveló que la ovariectomía aumenta significativamente la presencia de este marcador al compararla con el grupo control SHAM ($P < 0.01$). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ce y su equipo (Ce et al., 2014) donde se explica esta diferencia en el hecho de que la deficiencia de estrógenos ocasionada por la ovariectomía bilateral en el caso de este estudio o por la menopausia reduce la absorción intestinal de calcio, esto disminuye la disponibilidad de calcio en sangre lo que a su vez estimula la resorción ósea e incrementa la disponibilidad de osteocalcina circulante (Ce et al., 2014). Nuestros resultados de ceniza confirmarían esta teoría donde se observa una relación inversamente proporcional entre el contenido mineral del fémur y la concentración de osteocalcina en suero.

En conjunto todos estos resultados sugerirían en que la administración 2 g.kg^{-1} de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta incrementa significativamente la masa ósea trabecular a través de un aumento de las fibras de colágeno que conforman la matriz extracelular ósea. Los resultados del análisis biomecánico confirmarían esta

teoría ya que este tratamiento recupero la resistencia del fémur frente a una fuerza ejercida directamente sobre él, sino que también incremento su elasticidad.

Con respecto a la administración oral de 1 g.kg⁻¹ y 4 g.kg⁻¹ péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta durante tres meses cabe mencionar que ambas dosis también resultaron efectivas para la recuperación del área trabecular tanto a nivel femoral como a nivel de la segunda vértebra lumbar mejorando significativamente los resultados presentados por el grupo control negativo (OVX+VH) y por el tratamiento tradicional con estradiol (OVX+E2) y que los parámetros de la evaluación biomecánica también reflejaron una tendencia positiva hacia la recuperación de la salud y la resistencia de los huesos frente a la flexión.

La bibliografía a través de estudios in vivo (de Almeida Jackix et al., 2010; Guillerminet et al., 2012; Nomura et al., 2005), in vitro (Guillerminet et al., 2010; Kim et al., 2013; Tsuruoka et al., 2007) y ensayos clínicos (Kumar et al., 2015; Zdzieblik et al., 2015) ha demostrado el efecto positivo del colágeno hidrolizado de diferentes orígenes como porcino (Wu et al., 2004), aviar (Watanabe-Kamiyama et al., 2010) , o marino producido de piel de salmón (Xu et al., 2010) o bacalao (Han et al., 2009) sobre el metabolismo óseo. Productos derivados de colágeno como la gelatina o los péptidos hidrolizados de colágeno poseen propiedades bioactivas entre las que se encuentran la estimulación de la diferenciación de osteoblastos, mejoras en el proceso de absorción de calcio intestinal, y capacidades antioxidantes y anti-inflamatorias. Sin embargo, quedaba por dilucidar si los péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta

compartían estos efectos ya que el grado de hidrolisis y el perfil de aminoácidos de la materia prima influyen estas propiedades.

El suplemento oral diario de la dieta durante 12 semanas con péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta ha demostrado para todas las dosis evaluadas poseer efectos benéficos sobre la estructura, la histomorfología y la biomecánica ósea en ratas sometidas a una ovariectomía bilateral presentando resultados mejores que los encontrados en el grupo tratado de manera convencional con una terapia de reemplazo.

De acuerdo a los resultados mostrados y discutidos en el presente documento a corto plazo la mejor dosis resultó ser la administrada al grupo “OVX+PC2” (2 g.kg^{-1}) debido a que no solo produjo un incremento significativo del área trabecular a nivel del fémur y de la de la segunda vértebra lumbar, sino que también mejoró significativamente las características biomecánicas del hueso mostrando una mejor resistencia a las fracturas.

Durante el desarrollo del estudio la alimentación de las ratas fue ad libitum por lo que la hiperfagia inducida por la caída de estrógenos en los animales ovariectomizados sumada al suplemento de la dieta con proteína en los grupos OVX+PC1, OVX+PC2 y OVX+PC3 generó hiperplasia renal por lo que en futuros estudios sería importante considerar y controlar este factor.

Estos resultados demuestran el potencial del suplemento oral de la dieta con péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta como una alternativa viable para el tratamiento

de la osteoporosis generada por deficiencia de estrógenos sin las desventajas atribuidas a la aplicación de los tratamientos convencionales.

7 CONCLUSIONES

El suplemento oral diario de la dieta durante 12 semanas con péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta demostró para todas las dosis evaluadas poseer efectos benéficos sobre la estructura, la histomorfología y la biomecánica ósea en ratas sometidas a una ovariectomía bilateral.

El suplemento de la dieta con péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta en sus tres dosis resultó en general una recuperación del área trabecular a nivel del fémur y de la segunda vértebra lumbar.

El suplemento de la dieta con 2 g.kg^{-1} de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta incrementó significativamente la elasticidad del fémur al compararlo con el grupo control SHAM, el grupo OVX + VH, el tratamiento con estrógeno (OVX+E2) y las otras dos dosis de péptidos de colágeno evaluadas.

La pérdida de estrógenos inducida por la ovariectomía bilateral disminuye al cabo de 4 meses la resistencia interna del fémur durante la prueba de flexión en tres puntos, administración diaria de péptidos hidrolizados de colágeno de anchoveta durante 12 semanas a razón de 2 g.kg^{-1} (OVX+PHCA2) incrementa de manera significativa este parámetro ($p < 0.01$)

8 RECOMENDACIONES

Durante el desarrollo del estudio la alimentación de las ratas fue ad libitum por lo que la hiperfagia inducida por la caída de estrógenos en los animales ovariectomizados sumada al suplemento de la dieta con proteína en los grupos OVX+PC1, OVX+PC2 y OVX+PC3 genero hiperplasia renal por lo que en futuros estudios sería importante considerar y controlar este factor.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Addison WN, A. F. (2007). Pyrophosphate Inhibits Mineralization of Osteoblast Cultures by Binding to Mineral, Up-regulating Osteopontin, and Inhibiting Alkaline Phosphatase Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15872–15883.
2. Anderson, H. (2003). Matrix vesicles and calcification. *Current Rheumatology Reports*, 5(3), 222–226.
3. Anonymous. (2002). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *NIH Consensus Statement.*, 17(1), 1-45.
4. Ballmer-Weber, B., Brockow, K., Fiocchi, A., Theler, B., Vogel, L., Ring, J., . Nutten, S. (2016). Hydrolysed egg displays strong decrease in allergenicity and is well tolerated by egg-allergic patients. *Allergy*, 71(5), 728-732.
5. Belill, K., Settle, T., Angel, C., Kim, S., & Rothwell, S. (2014). Femoral strength after induced lesions in rats (*Rattus norvegicus*). *Comparative Medicine*, 64(3), 186-192.
6. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2012). *Biochemistry*, Seventh Edition. New York: W. H. Freeman and Company.
7. Bord, S., Ireland, D., Beavan, S., & Compston, J. (2003). The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone*, 32(2), 136-141.

8. Boskey, A. (2013). Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKEY Reports*, 2, 447.
9. Boskey, A., Wright, T., & Blank, R. (1999). Collagen and Bone Strength. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(3), 330-335.
10. Ce, C., Zhou, L., Yu, D., Zhao, Y., & Yang, N. (2014). Serum osteocalcin levels and bone mineral density in ovariectomized rats. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 5(1), 1-8.
11. Cheung, J., Mak, Y., Papaioannou, S., Evans, B., Fogelman, I., & Hampson, G. (2003). Interleukin-6 (IL-6), IL-1, receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin production by human osteoblastic cells: comparison of the effects of 17-beta oestradiol and raloxifene. *The Journal of Endocrinology*, 177(3), 423-433.
12. Chi, C.-F., Hu, F.-Y., Wang, B., Li, Z.-R., & Luo, H.-Y. (2015). Influence of Amino Acid Compositions and Peptide Profiles on Antioxidant Capacities of Two Protein Hydrolysates from Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Dark Muscle. *Marine Drugs*, 13, 2580–2601.
13. Civitelli, R., Armamento-Villareal, R., & Napoli, N. (2009). Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporosis International*, 20(6), 843-851.
14. Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical journal of the american society of nephrology*, 3(3), 131-139.
15. Compston, J. (2001). Sex Steroids and Bone. *Physiological Reviews*, 81(1), 419-447.

16. Coxam, V. (2005). Données nouvelles sur la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose. *Médecine/sciences*, 21, 297-301.
17. Datta HK, N. W. (2008). The Cell Biology of Bone Metabolism. *Journal of Clinical Pathology.*, 61, 577-587.
18. de Almeida Jackix, E., Cúneo, F., Amaya-Farfan, J., de Assunção, J., & Quintaes, K. (2010). A food supplement of hydrolyzed collagen improves compositional and biodynamic characteristics of vertebrae in ovariectomized rats. *Journal of Medicinal Food*, 13, 1385-1390.
19. D'Elia, G., Caracchini, G., Cavalli, L., & Innocenti, P. (2009). Bone fragility and imaging techniques. *Clinical Cases in mineral and bone metabolism*, 6, 234-246.
20. Dou, C., Cao, Z., Ding, N., Hou, T., Luo, F., Kang, F., . . . Dong, S. (2016). Cordycepin Prevents Bone Loss through Inhibiting Osteoclastogenesis by Scavenging ROS Generation. *Nutrients*, 8, 231.
21. Drezner, M. K. (2006). Osteomalacia and Rickets. En M. J. Seibel, S. P. Robins, J. P. Bilezikian, & S. P. Markus J. Seibel (Ed.), *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism: Principles and Clinical Applications*. 739-754. San Diego, CA, USA: ACADEMIC PRESS.
22. Eckel, L. A. (2011). The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. *Physiology & Behavior*, 104(4), 517–524.
23. Ehrlich, P., & Lanyon, L. (2002). Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporosis International*, 13(9), 688-700.

24. Engesaeter, L., Ekeland, A., & Langeland, N. (2009). Methods for Testing the Mechanical Properties of the Rat Femur. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 49, 512-518.
25. Exposito, J., Cluzel, C., Garrone, R., & Lethias, C. (2002). Evolution of collagens. *The anatomical record*, 268, 302-316.
26. Farzaneh, S., & Zarghi, A. (2016). Estrogen Receptor Ligands: A Review (2013-2015). *Scientia Pharmaceutica*, 84, 409-427.
27. Feng, X. (2009). Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Current Chemical Biology*, 3, 189–196.
28. Finot, P. (2000). Physicochemical considerations of protein utilization. *Nestle Nutrition Workshop Series Clinical & Performance Program*, 109–119.
29. Florencio-Silva, R., Sasso, G., Sasso-Cerri, E., Simões, M., & Cerri, P. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2015/421746
30. Fratzl, P. (2008). *Collagen: Structure and Mechanics*. Germany: Springer.
31. Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1531-46.
32. Geraedts, M., Troost, F., Fischer, M., Edens, L., & Saris, W. (2011). Direct induction of CCK and GLP-1 release from murine endocrine cells by intact dietary proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(3), 476-484.
33. Gómez-Guillén, M., Perez-Mateos, M., Gomes-Estaca, J., Lopez-Caballero, E., Gimenez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for

- developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology*, 3–16.
34. Gonzales, C., Cárdenas-Valencia, I., Leiva-Revilla, J., Anza-Ramirez, C., Rubio, J., & Gonzales, G. (2010). Effects of different varieties of Maca (*Lepidium meyenii*) on bone structure in ovariectomized rats. *Forsch Komplementmed*, 17, 137-143.
35. Guede, D., González, P., & JR., C. (2013). Biomecánica y hueso (I): Conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 5, 43-50.
36. Guillerminet, F., Beaupied, H., Fabien-Soulé, V., Tomé, D., Benhamou, C., Roux, C., & Blais, A. (2010). Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: an in vitro and in vivo study. *Bone*, 46, 827-834.
37. Guillerminet, F., Fabien-Soulé, V., Even, P., Tomé, D., Benhamou, C., Roux, C., & Blais, A. (2012). Hydrolyzed collagen improves bone status and prevents bone loss in ovariectomized C3H/HeN mice. *Osteoporosis International*, 23, 1909-1919.
38. Han, X., Xu, Y., Wang, J., Pei, X., Yang, R., Li, N., & Li, Y. (2009). Effects of cod bone gelatin on bone metabolism and bone microarchitecture in ovariectomized rats. *Bone*, 44(5), 942-947.
39. Hartog, A., Cozijnsen, M., de Vrij, G., & Garssen, J. (2013). Collagen hydrolysate inhibits zymosan-induced inflammation. *Experimental Biology and Medicine*, 238, 798-802.

40. He, F. (2011). Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-protocol* Bio101: e80. DOI: 10.21769/BioProtoc.80.
41. Hutchison, A., Feinle-Bisset, C., Fitzgerald, P., Standfield, S., Horowitz M. Clifton, P., & Luscombe-Marsh, N. (2015). Comparative effects of intraduodenal whey protein hydrolysate on antropyloroduodenal motility, gut hormones, glycemia, appetite, and energy intake in lean and obese men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 102, 1323-1331.
42. IMARPE. (Marzo de 2007). *Instituto del Mar del Peru - IMARPE*. Obtenido de http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/articulos/imarpe/recursos_pesqueras/
43. ISO 5983-2. (2009) Animal Feeding Stuffs – Determination of Nitrogen Content and Calculation of Crude Protein Content, Geneva, *Switzerland International Organization for Standardization*
44. ISO 5984. (2002) Animal Feeding Stuffs – Determination of Crude Ash, Geneva, *Switzerland International Organization for Standardization*
45. Jähn, K., & Bonewald, L. (2012). Bone Cell Biology: Osteoclasts, Osteoblasts, Osteocytes. En F. Glorieux, J. Pettifor, & H. Jüppner, *PEDIATRIC BONE: Biology & Diseases*, 1-8. Elsevier Inc.
46. Janiszewska, M., Kulik, T. B., Dzedzic, M. A., & Żołnierczuk-Kieliszek, D. (2014). The contemporary look at the problem of recognizing and diagnosing postmenopausal osteoporosis and eliminating the risk of a fall. *Przegląd Menopauzalny*, 13, 42-47.

47. Jenkins, C. L., Bretscher, L. E., Guzei, I. A., & Raines, R. T. (2003). Effect of 3-hydroxyproline residues on collagen stability. *Journal of the American Chemical Society*, *125*, 6422–6427.
48. Johonell, O., & Kanis, J. (2006). An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis international*, *17*, 1726–1733.
49. Jung, T., Yun, S., Lee, W., Kim, J., Ha, H., Yoo, M., . . . Han, K. (2016). Hydrolysis by Alcalase Improves Hypoallergenic Properties of Goat Milk Protein. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *36*(4), 516-522.
50. Kafantari, H., Kounadi, E., Fatouros, M., Milonakis, M., & Tzaphlidou, M. (2000). Structural alterations in rat skin and bone collagen fibrils induced by ovariectomy. *Bone*, *26*, 349-353.
51. Katzenellenbogen, B., Choi, I., Delage-Mourroux, R., Ediger, T., Martini, P., Montano, M., Katzenellenbogen, J. (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *74*, 279-285.
52. Kim, H., Kim, M., & Leem, K. (2013). Osteogenic activity of collagen peptide via ERK/MAPK pathway mediated boosting of collagen synthesis and its therapeutic efficacy in osteoporotic bone by back-scattered electron imaging and microarchitecture analysis. *Molecules*, *18*, 15474-15489.
53. Kimira, Y., Ogura, K., Taniuchi, Y., Kataoka, A., Inoue, N., Sugihara, F., . . . Mano, H. (2014). Collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline promotes

- differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453, 498-501.
54. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, N. (2005). Characterisation of Acid- Soluble Collagen from Skin and Bone of Bigeye Snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89(3), 363-372.
55. Kumar, S., Sugihara, F., Suzuki, K., Inoue, N., & Venkateswarathirukumara, S. (2015). A double-blind, placebo-controlled, randomised, clinical study on the effectiveness of collagen peptide on osteoarthritis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(4), 702-707.
56. Kwun, S., Laufgraben, M. J., & Gopalakrishnan, G. (2012). Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 14, 251–256.
57. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227,680-685.
58. Law, Y., Chiu, H., Lee, H., Shen, Y., Venkatakrishnan, K., & Wang, C. (2016). Consumption of onion juice modulates oxidative stress and attenuates the risk of bone disorders in middle-aged and post-menopausal healthy subjects. *Food & Function*, 7(2), 902-912.
59. LC, H., Khosla, S., Dunstan, C., Lacey, D., Spelsberg, T., & Riggs, B. (1999). Estrogen Stimulates Gene Expression and Protein Production of Osteoprotegerin in Human Osteoblastic Cells. *Endocrinology*, 140, 4367-4370.

60. Lelovas, P. P., Xanthos, T. T., Thorma, S. E., Lyritis, G. P., & Dontas, I. a. (2008). The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *Comparative Medecine*, 58(5), 424-430.
61. Li, J., Tawfeek, H., Bedi, B., Yang, X., Adams, J., Gao, K., . . . Pacifici, R. (2011). Ovariectomy disregulates osteoblast and osteoclast formation through the T-cell receptor CD40 ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2), 768–773.
62. Marjoribanks, J., Farquhar, C., Roberts, H., Lethaby, A., & Lee, J. (2017). Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.CD004143
63. Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H., & Kim, S. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, 77(17), 2166-2178.
64. Mödder, U., Riggs, B., Spelsberg, T., Fraser, D., Atkinson, E., Arnold, R., & Khosla, S. (2004). Dose-response of estrogen on bone versus the uterus in ovariectomized mice. *European Journal of Endocrinology*, 151(4), 503-10.
65. Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, A., Shigematsu, T., & Kida, K. (2002). Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. *Process Biochemistry*, 37, 1403–1412.
66. Nagai, T., Nagashima, T., Abe, A., & Suzuki, N. (2006). Antioxidative Activities and Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibition of Extracts

Prepared from Chum Salmon (*Oncorhynchus Keta*) Cartilage and Skin.
International Journal of Food Properties, 9(4), 813-822.

67. Nair , A. B., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), 27–31.
68. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, D. a. (2001). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*, 285, 785-95.
69. Nobile, V., Duclos, E., Michelotti, A., Bizzaro, G., Negro, M., & Soisson, F. (2016). Supplementation with a fish protein hydrolysate (*Micromesistius poutassou*): effects on body weight, body composition, and CCK/GLP-1 secretion. *Food & Nutrition Research*, 60. doi:10.3402/fnr.v60.29857
70. Nomura, Y., Oohashi, K., Watanabe, M., & Kasugai, S. (2005). Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. *Nutrition*, 21((11-12)), 1120-1126.
71. Okuda, M., Ogawa, N., Takeguchi, M., Hashimoto, A., Tagaya, M., Chen, S., Ikoma, T. (2011). Minerals and aligned collagen fibrils in tilapia fish scales: structural analysis using dark-field and energy-filtered transmission electron microscopy and electron tomography. *Microscopy & microanalysis*, 17(5), 788-798.
72. Oursler, M., Cortese, C., Keeting, P., Anderson, M., Bonde, S., Riggs, B., & Spelsberg, T. (1991). Modulation of Transforming Growth Factor- β Production in Normal Human Osteoblast-Like Cells by 17β -Estradiol and Parathyroid Hormone. *Endocrinology*, 129(6), 3313-3320.

73. Paschalis EP, R. R. (2003). Distribution of collagen cross-links in normal human trabecular bone. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH*, 18(11), 1942-1946.
74. Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Roytrakul, S. (2010). Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Journal of Food Science and Technology*, 43, 86–97.
75. Pon-On, W., Suntornsaratoon, P., Charoenphandhu, N., Thongbunchoo, J., Krishnamra, N., & Tang, I. (2016). Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. *Materials Science and Engineering*, 62, 183-189.
76. Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Resultados de búsqueda*, a004978. doi:10.1101/cshperspect.a004978
77. Sandoval, R. (2005). *OSTEOINMUNOLOGIA: BASES CELULARES Y MOLECULARES DEL REMODELAMIENTO ÓSEO*. SANTA FÉ DE BOGOTA: PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.
78. Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). *Gelatin Handbook. Theory and Industrial Practice*. Wiley-VCH.
79. Senaratne, L., Park, P., & Kim, S. (2006). Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 97(2), 191-197.

80. Senphan, T., & Benjakul, S. (2014). Antioxidative activities of hydrolysates from seabass skin prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp. *Journal of Functional Foods*, 6, 147–56.
81. Shigemura, Y., Akaba, S., Kawashima, E., Park, E., Nakamura, Y., & Sato, K. (2011). Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate. *Food Chemistry*, 129(3), 1019-1024.
82. Shoulders, M., & Raines, R. (2009). Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 929–958.
83. Stromberg, M. (1976). Anatomy of the Laboratory Rat. Osteology. Baltimore.: The Williams and Wilkins Co.
84. Sugihara, F., Inoue, N., Kuwamori, M., & Taniguchi, M. (2012). Quantification of hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly) in human blood after ingestion of collagen hydrolysate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(2), 202-203.
85. Swatschek, D., Schatton, W., Kellermann, J., Müller, W., & Kreuter, J. (2002). Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 107-113.
86. Tella, S., & Gallagher, J. (2014). Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 142, 155–170.
87. Tsuruoka, N., Yamato, R., Sakai, Y., Yoshitake, Y., & Yonekura, H. (2007). Promotion by collagen tripeptide of type I collagen gene expression in human

- osteoblastic cells and fracture healing of rat femur. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 2680-2687.
88. Turner, C. (2006). Bone strength: current concepts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068, 429-446.
89. Tzaphlidou, M. (2008) Bone architecture: collagen structure and calcium/phosphorus maps. *Journal of Biological Physics*, 34, 39-49.
90. Tzaphlidou, M. and Berillis, P. (2005) Collagen fibril diameter in relation to bone site. A quantitative ultrastructural study. *Micron* 36, 703-705.
91. Tzaphlidou, M. (2008). Bone Architecture: Collagen Structure and Calcium/Phosphorus Maps. *Journal of Biological Physics*, 34, 39-49.
92. Unnanuntana, A., Gladnick, B. P., Donnelly, E., & Lane, J. M. (2010). The Assessment of Fracture Risk. *Journal of bone and joint surgery*, 92, 743-753.
93. Viguet-Carrin, S., Garnero, P., & Delmas, P. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis international*, 17, 319-336.
94. Wallace, J. M., Erickson, B., Les, C. M., Orr, B. G., & Banaszak Holl, M. M. (2010). Distribution of Type I Collagen Morphologies in Bone: Relation to Estrogen Depletion. *Bone*, 46(5), 1349-1354.
95. Wang, X., Shen., X., Li, X., & Agrawal, C. (2002). Age related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*, 31, 1-7.

96. Wang, Y., Li, M., Zhang, H., Tang, M., Guo, C., Deng, A., Xiao, L. (2016). Opposite Function of ER α and ER β in Controlling 17 β -Estradiol-mediated Osteogenesis in Osteoblasts. *Archives of Medical Research*, 47, 255-261.
97. Watanabe-Kamiyama, M., Shimizu, M., Kamiyama, S., Taguchi, Y., Sone, H., Morimatsu, F., Komai, M. (2010). Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 835-841.
98. Weatherholt, A., Fuchs, R., & Warden, S. (2012). Specialized connective tissue: bone, the structural framework of the upper extremity. *Journal of Hand Therapy*, 25, 123-31.
99. Weitzmann, M., & Pacifici, R. (2006). Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 1186–1194.
100. Wu, J., Fujioka, M., Sugimoto, K., Mu, G., & Ishimi, Y. (2004). Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 22, 547-553.
101. Xu, Y., Han, X., & Li, Y. (2010). Effect of marine collagen peptides on long bone development in growing rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1485-1489.
102. Yan Zhang, Y., Lai, W.-P., Leung, P.-C., Wu, C.-F., & Wong, M.-S. (2007). Short- to Mid-Term Effects of Ovariectomy on Bone Turnover, Bone Mass and Bone Strength in Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 898-903.

103. Young, M. (2003). Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporosis International*, 35-42.
104. Zdzieblik, D., Oesser, S., Baumstark, M., Gollhofer, A., & König, D. (2015). Collagen peptide supplementation in combination with resistance training improves body composition and increases muscle strength in elderly sarcopenic men: a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition*, 114, 1237-1245.
105. Zhao, R. (2012). Immune Regulation of Osteoclast Function in Postmenopausal Osteoporosis: A Critical Interdisciplinary Perspective. *International Journal of Medical Sciences*, 9, 825–832.