

EFECTOS DEL D-003 (10 MG/DÍA) Y LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 SOBRE LA CALIDAD DE VIDA EN MUJERES POST-MENOPÁUSICAS CON RIESGO DE OSTEOPOROSIS

Puente R, López E, Illnait-Ferrer J,* Fernández-Dorta L,* Carbajal-Quintana D,* Fernández-Travieso JC,* Mendoza-Castaño S,* Ferreiro-Más R,* Mesa-Angarica M.

Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas (CIMEQ), *Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC)

Recibido: 26 de mayo de 2017

Aceptado: 22 de septiembre de 2017

Palabras clave: D-003, Omega-3, osteoporosis, mujeres post-menopáusicas
Key words: D-003, Omega-3, osteoporosis, postmenopausal women

RESUMEN. El D-003 es una mezcla de ácidos grasos de alto peso molecular de la cera de la caña de azúcar (*Saccharum Officinarum L*), que reduce la resorción ósea y mejora la densidad del hueso en ratas ovariectomizadas y en mujeres post-menopáusicas, en las cuales incrementó además su calidad de vida. El objetivo del presente estudio consistió en investigar si la terapia combinada D-003 (10 mg/d) + omega-3 (1 g/d) aporta alguna ventaja adicional sobre la calidad de vida en mujeres post-menopáusicas con respecto a la monoterapia con Omega-3. Las pacientes se dividieron aleatoriamente y a doble ciegas en dos grupos, uno que recibió la terapia combinada D-003+Omega-3 y otro que recibió Placebo+Omega-3. Se evaluó la calidad de vida utilizando el Cuestionario Qualeffo 41. La seguridad se evaluó mediante el examen físico, la bioquímica sanguínea y los eventos adversos durante el estudio. Ambos grupos mejoraron significativamente el puntaje total de la escala: 16,6 % (terapia combinada D-003+Omega-3) y 21,1 % (Placebo+Omega-3) vs valores basales $p < 0,001$. El estado mental mejoró en un 9,4 % en el grupo de terapia combinada y 4,5 % en el grupo Omega-3 ($p < 0,05$). Las HDL-C aumentaron en un 12,2 % ($p < 0,01$) en el grupo de terapia combinada y en un 8,2 % en el grupo Omega-3. Los triglicéridos disminuyeron 12,7 % en el grupo D-003+Omega-3, sin cambio en el grupo Omega-3. Ambos tratamientos fueron bien tolerados. Se concluye que la terapia combinada D-003 (10 mg/d) +Omega-3 (1 g/d) y la monoterapia con Omega-3 administrados durante tres meses presentan eficacia, seguridad y tolerabilidad similar en mujeres postmenopáusicas con riesgo moderado a alto de osteoporosis, por lo tanto, la terapia combinada no mostró ventajas adicionales con respecto a la monoterapia con Omega-3 sobre la calidad de vida en estas pacientes. Se precisa de estudios ulteriores para confirmar estos resultados.

ABSTRACT. D-003 is a mixture of high molecular weight fatty acids from sugar cane (*Saccharum Officinarum L*), it reduces bone resorption markers and improves bone density in ovariectomized rats and in postmenopausal women, in which life quality was improved. The objective of the present study was to investigate whether the combined therapy D-003 (10 mg / d) +Omega-3 (1 g/d) provides some additional benefit on quality of life in postmenopausal women. In a randomized, double-blind study, one group received D-003+Omega-3 and the other group received Placebo+Omega-3. The Qualeffo Questionnaire 41 was used to assess the Quality of life. Safety was assessed by physical examination and blood chemistry as well as by adverse events during the study. Both treatments significantly improved the overall score of the Questionnaire (combined therapy: 16.6 % and Omega-3 monotherapy: 21.1 %, vs baseline values $p < 0.001$). Particularly, mental status improved 9.4 % for group combined therapy and 4.5 % for group Omega-3 monotherapy ($p < 0.05$). HDL-C increased by 12.2 % ($p < 0.01$), in group combined therapy and 8.2 % in Omega-3 monotherapy. The triglycerides decreased 12.7 % in group combined therapy with D-003+Omega-3, with no change in group Omega-3 monotherapy. Both treatments were well tolerated. It is concluded that D-003 (10 mg/d) +Omega-3 (1 g/d) combination therapy and Omega-3 monotherapy administered during three months presented similar efficacy, safety and tolerability in postmenopausal women at moderate to high osteoporosis risk, and so, the combination therapy it not shows additional advantages respect Omega-3 monotherapy on life quality in these patients. Furthers studies has been necessary to confirm these results.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis (OP) se caracteriza por un deterioro de la micro-arquitectura del tejido óseo, lo que produce progresiva reducción de la masa ósea, aumento de su fragilidad y riesgo de fracturas frente a traumas mínimos.¹⁻³ Se trata de un proceso progresivo sin síntomas aparentes, constituyendo una enfermedad crónica, no transmisible, que se desarrolla de modo silente.^{4,5}

La OP es más frecuente en personas de la tercera edad y constituye una causa importante de discapacidad, desfiguración y hospitalizaciones, con deterioro de su calidad de vida que incluso aumenta el riesgo de mortalidad por otras causas.¹ Las fracturas de la columna y la cadera son las complicaciones más importantes de la OP.²⁻⁴ La vida sedentaria, el hábito de fumar, el consumo de alcohol, la dieta baja en alimentos que contengan calcio y la baja exposición al Sol; son factores adversos para el equilibrio funcional óseo. El ejercicio desde edades tempranas ayuda a lograr una mayor Densidad Mineral Ósea (DMO) y aún en los ancianos puede mejorar la masa y la fortaleza del hueso.⁶⁻⁸

De acuerdo a sus causas la OP puede clasificarse en primaria o secundaria, resultando la menopausia en la mujer adulta la principal causa de OP primaria atribuible a que la pérdida de estrógenos rompe el equilibrio metabólico durante el remodelado óseo con la resultante disminución de la masa ósea y desarrollo de la enfermedad. Cerca de un 35 % de mujeres post-menopáusicas desarrollan OP, siendo más afectadas que hombres de similar edad si bien, a edades mayores la frecuencia de aparición en el hombre aumenta haciéndose semejante a la mujer.⁹⁻¹¹

El crecimiento y desarrollo del tejido óseo implica los procesos de “modelado” (etapa de crecimiento) y “remodelado” (durante la adultez). En el “remodelado” el hueso crece y mantiene la masa ósea en un proceso en que el tejido que envejece, se reabsorbe y se reemplaza por tejido nuevo, reparando constantemente los micro-daños que eventualmente se producen en este tejido, de este modo el hueso mantiene la capacidad para sostener las cargas a las cuales se enfrenta en la vida cotidiana.¹² Las desviaciones significativas del equilibrio entre la acción de osteoclastos (OC) y osteoblastos (OB) implican una pérdida acelerada o ganancia imperfecta de masa ósea, debido a que los OB no son capaces de llenar los vacíos creados por los OC creando una pérdida neta de hueso.¹³

El calcio (1 g/d en mujeres entre 19 y 50 años y de 1.2 g/d en mujeres mayores) y la vitamina D (400 UI/d en mujeres entre 51 y 70 años y 600 UI/d en mujeres mayores) son esenciales para el crecimiento óseo, la prevención y tratamiento de la OP; de modo que cualquier otra terapia deberá añadirse a estos requerimientos. Sus análogos (calcitriol y alfacalcidol), sin embargo, tienen efectos inconsistentes sobre fracturas, inducen hipercalcemia, pueden causar daño renal y nefrocalcinosis.¹⁴ Cuando estos tratamientos no son suficientes se requiere un tratamiento farmacológico. Los medicamentos fundamentales para tratar y/o prevenir la OP se clasifican en inhibidores de la resorción ósea (antiresortivos) y formadores de hueso (anabólicos), o medicamentos con ambos efectos.¹⁴ Los antiresortivos son los medicamentos más utilizados, y dentro de estos, los bifosfonatos (BF) representan la clase terapéutica fundamental para tratar o prevenir la OP. Los más utilizados son los amino-BF (N-BF), muy biodisponibles en hueso, aunque se absorben poco en el tracto gastrointestinal.¹⁵ Los N-BF inhiben la producción de isoprenoides, favoreciendo la apoptosis de los OC, por alteración de funciones básicas dependientes de proteínas prenildas¹⁵ y reducen la apoptosis de OB y osteocitos, prolongando su vida media lo que favorece la formación ósea. Además, los N-BF inhiben la bomba de protones necesaria para disolver la hidroxiapatita.¹⁶ El tratamiento a largo plazo (≥ 36 meses) con los N-BF reduce el riesgo de fracturas (30 - 60 %) y aumenta la DMO entre un 1 y un 3 %. No obstante, a pesar de su eficacia demostrada, los N-BF producen efectos adversos importantes, fundamentalmente gastrointestinales, que limitan su uso.^{16,17} La búsqueda de sustancias eficaces y más seguras es uno de los objetivos más importantes de la medicina contemporánea.

El D-003, es una mezcla de ácidos grasos insaturados de cadena muy larga, obtenida de la cera de caña, cuyo principal componente es el ácido octacosanoico (C₂₈), y que también contiene los ácidos tetracosanoico (C₂₄), pentacosanoico (C₂₅), hexacosanoico (C₂₆), heptacosanoico (C₂₇), nonacosanoico (C₂₉), triacontanoico (C₃₀), hentriacontanoico (C₃₁), dotriacontanoico (C₃₂), tritriacontanoico (C₃₃), tetratriacontanoico (C₃₄), pentatriacontanoico (C₃₅) y hexacotriacontanoico (C₃₆).¹⁸

El D-003 previno el aumento de la resorción ósea inducida por la ovariectomía en ratas, produciendo un efecto favorable sobre la arquitectura ósea en estas regiones, comparables a los del aleandronato y estradiol, superiores a los de la pravastatina.¹⁹⁻²³ Además, el D-003 disminuyó el número y superficie de los OC en las tres estructuras óseas estudiadas, lo que avala su acción antiresortiva sin modificar el número y superficie de OB, lo que indica que no modifica la formación ósea en la rata ovariectomizada, deficitaria en estrógenos. Tanto el efecto sobre el hueso trabecular como sobre los parámetros de resorción de la rata ovariectomizada han mostrado ser modo dosis-dependiente y demostró persistencia del efecto durante el tratamiento a largo plazo (1 año). El efecto antiresortivo del D-003 se asocia un aumento de la apoptosis de OC, mientras reduce la apoptosis de OB y osteocitos.¹⁹⁻²³ El D-003 también previno la OP inducida por glucocorticoides en ratas, modelo en el cual mostró efectos favorables sobre las variables histomorfométricas del hueso trabecular en ratas, redujo el número y superficie de OC y no afectó el número y superficie de OB, de modo consistente a sus efectos en la rata ovariectomizada.²⁴

Los estudios de toxicología experimental (toxicidad por dosis únicas y repetidas a corto y largo plazo, estudios de genotoxicidad, toxicología de la fertilidad y la reproducción, potencial cancerígeno), no han encontrado toxicidad asociada al tratamiento.²⁵⁻³³

Un estudio clínico previo demostró que el D-003 (10 mg/d) administrado durante seis meses a mujeres post-menopáusicas con DMO reducida disminuyó significativamente (33,7 % versus placebo) la excreción urinaria de DPD/creatinina (marcador de la resorción ósea) sin afectar la concentración sérica de FAHE (marcador de la formación ósea), mostrando además favorables efectos sobre el perfil lipídico de las mujeres de estudio, resultados consistentes con los datos preclínicos.³⁴ Otro estudio aleatorizado y controlado con placebo demostró que el tratamiento con D-003 (10 mg/d) durante tres años aumentó la DMO lumbar y produjo una mejoría de la calidad de

vida con respecto al placebo en mujeres PM con DMO reducida que no recibieron suplementos de calcio.³⁵ Más recientemente se demostró que el tratamiento de mujeres PM y DMO produjo una mejoría de la calidad de vida en tan sólo tres meses de terapia.³⁶ Los estudios clínicos han mostrado que el D-003 resulta muy bien tolerado, sin efectos adversos relacionados con su uso.³²⁻³⁹

Los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) se dividen en dos grupos los n6 y los n3. El ácido linoléico es el más común de los n6- PUFAs y se encuentra presente en gran cantidad de aceites vegetales. Los n3 PUFAs incluyen los ácidos eicosapentacoico (EPA) y docosahexanoico (DHA) y se encuentran presentes en alimentos como el pescado y los aceites de pescado. Los efectos beneficiosos de estos ácidos se describieron por primera vez en los esquimales, que consumen una dieta rica en aceites de pescado (peces de regiones frías) y presentan una baja frecuencia de enfermedades coronarias, asma, diabetes tipo II y esclerosis múltiple. A partir de esta primera observación se han relacionado otros beneficios a los n3- PUFAs en el tratamiento del cáncer, la enfermedad inflamatoria de Bowel, la artritis reumatoide y la psoriasis.⁴⁰

Tanto los ácidos grasos insaturados n-6 como los n3 PUFAs se incorporan a los fosfolípidos de membrana y sirven como precursores para la síntesis de eicosanoides. Los eicosanoides derivados de los n3- PUFA son menos aterogénicos, vasoconstrictores y proinflamatorios que sus análogos de la serie n-6, por lo que una dieta rica en n3-PUFA modula favorablemente la producción de eicosanoides y citoquinas involucradas en enfermedades coronarias, cáncer y enfermedades autoinmunes.

Weiss y colaboradores,⁴¹ en un estudio con pacientes de edad media y avanzada (45 - 90 años), demostraron que a mayor relación n6/n3 PUFAs en la dieta menor densidad mineral ósea, lo que sugiere que las proporciones y tipos de PUFAs en la dieta resultan clave en la preservación de la integridad de la masa ósea. De la misma forma Hogstrom y colaboradores (2007) encontraron que las concentraciones sanguíneas de n3 PUFA, especialmente DHA se correlacionan de manera positiva con el pico de densidad mineral ósea corporal y de columna vertebral,⁴² lo cual se relaciona con el hecho de que los n3 PUFAs ejercen un efecto protector sobre el metabolismo óseo a través de una disminución de la resorción ósea en presencia de niveles consistentes de formación ósea.⁴³

Posteriormente se demostró que altas concentraciones de n3 PUFAs en la dieta se asocian con riesgo menor de fracturas totales en mujeres postmenopáusicas, indicando que los ácidos grasos de la dieta pueden influir en el riesgo de fracturas.⁴⁴ En línea con estas evidencias el estudio de Framingham demostró que el consumo de pescado previene la pérdida de masa ósea.⁴⁵

Considerando que tratamiento con D-003 + ácidos grasos omega-3 pudiera producir una mejora de la calidad de vida en mujeres PM con riesgo de osteoporosis con respecto al grupo Omega-3 + placebo y que ambos tratamientos resultan seguros y bien tolerados; el presente estudio se propuso investigar si el tratamiento con D-003 (10 mg/d)+omega-3 (1 g/d) administrado por tres meses resulta en un incremento significativo adicional de la calidad de vida en mujeres PM con riesgo de osteoporosis

MATERIALES Y MÉTODOS

Este ensayo se realizó en el Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas (CIMEQ), con la colaboración del Centro de Productos Naturales del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) (RPCEC00000184).

A cada posible participante se le explicó el objetivo y características de la investigación, posibles riesgos y beneficios, la posibilidad de poder abandonar ensayo en el momento en que lo desee sin perjuicio para su atención médica, así como el carácter confidencial de sus datos. Se les solicitó su consentimiento por escrito y en caso de aceptar su participación en las condiciones del ensayo se indicaron complementarios de laboratorios.

El estudio se desarrolló en condiciones ambulatorias y se basó en un diseño prospectivo, aleatorizado, a doble ciego, con dos grupos paralelos que recibieron: D-003 (10 mg/d)+Omega-3 o Placebo+Omega-3, administrados una vez al día durante tres meses.

Para establecer las condiciones basales del paciente se les solicitó información sobre los antecedentes patológicos personales, se les aplicó el Cuestionario Qualeffo-41,⁴⁶ se practicó un examen físico y se evaluaron los exámenes de laboratorio clínico.

Se reclutaron mujeres con PM quirúrgica o natural (definida por amenorrea mantenida por un término \geq 1 año) que accedieron a participar en el estudio que presentaron un riesgo de moderado a alto en la escala de riesgo de osteoporosis aplicada y que no presentaron ningún criterio de exclusión.

Se excluyeron mujeres con enfermedades crónicas diagnosticadas, tales como: enfermedades activas hepáticas o renales, disfunción tiroidea conocida, neoplasias diagnosticadas, presión arterial diastólica $>$ 90 mm Hg, diabetes mellitus descompensada, que presentaran los siguientes valores en los exámenes de laboratorio: glucosa en ayunas $>$ 7 mmol/L; creatinina $>$ 130 μ mol/L; alanino amino-transferasa (ALT) o aspartato amino-transferasa (AST) $>$ 55. También fueron excluidas, aquellas que estuvieran consumiendo TRH, bifosfonatos, esteroides anabólicos, calcitonina, fluoruro de sodio o corticoides en los seis meses previos a la inclusión y mujeres con antecedentes de infarto del miocárdico agudo (IMA), revascularización quirúrgica o accidente vascular encefálico (ictus) en los seis meses previos, con historia clínica habitual de alergia a medicamentos o con cualquier otra condición especial que a criterio del médico pusiera en riesgo la salud y su vida durante el estudio.

Se predefinieron como causas potenciales de baja las razones siguientes: no deseos de continuar por cualquier razón, cuando se produjeron EA moderadas o severas que así lo requirieran, ya fueran clínicas o documentadas por los

análisis complementarios, cuando existieron violaciones mayores del protocolo de estudio, tales como falta de adhesión a la ingestión del tratamiento > 1 semana y/o consumo de sustancias con reconocido efecto anti-osteoporótico que no fueran los tratamientos bajo estudio.

Las pacientes fueron citadas a consulta cada 30 d durante los tres meses de estudio, en las cuales se realizó examen físico, interrogatorio sobre posibles efectos adversos, se aplicó el Cuestionario Qualeffo-41.⁴⁶ En la última consulta se repitieron los exámenes de bioquímica sanguínea.

A cada paciente se le entregaron dos envases codificados con el número de tratamiento: uno con placebo o D-003 (5mg) y el otro con Omega-3 (1000 mg de aceite de pescado conteniendo 180 mg de EPA y 120 mg de DHA). El Grupo Placebo+Omega-3, recibió dos tabletas de placebo + una cápsula blanda de Omega-3 y el Grupo D-003+Omega-3 recibió dos tabletas revestidas de D-003 (5 mg) + una cápsula de Omega-3, en ambos casos a ingerir una vez al día, con la comida. No se permitió el consumo simultáneo de bifosfonatos, esteroides anabólicos, calcitonina, fluoruro u otros medicamentos que pudieran modificar el tejido óseo.

En cada consulta el consumo de las tabletas y cápsulas se controló sistemáticamente durante los interrogatorios y se realizó conteo de tabletas y cápsulas remanentes considerándose la adhesión al tratamiento como satisfactoria si el consumo de cada paciente fue $\geq 90\%$ de las tabletas y cápsulas suministradas para cada período.

La aleatorización se realizó en bloque, según tabla de números aleatorios progresivos y relación 1/1 generada a través de un vector. A las pacientes se les entregaron los medicamentos, debidamente enmascarados, en la consulta de acuerdo a un orden progresivo creciente una vez confirmada su inclusión en el estudio. De esta manera, se evitó la ocurrencia de "saltos" en numeración a la entrega de los medicamentos.

La evaluación del puntaje total del cuestionario Qualeffo-41⁴⁶ se consideró primera variable de eficacia y como segunda variable la evaluación por dominios del Cuestionario de Calidad de Vida de la Sociedad Internacional de OP (Qualeffo-41) y la cuantificación del colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), colesterol total (CT) y colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-C).

Se registraron los reportes de experiencias adversas, indicadores del examen físico (peso, frecuencia y presión arterial). Los indicadores bioquímicos se determinaron por métodos enzimáticos convencionales, utilizando juegos de reactivos y se realizaron en el equipo automatizado Hitachi del laboratorio clínico del CIMEQ. Durante el ensayo se mantuvo un control de calidad sobre la exactitud y la precisión de los métodos, de modo que se mantuvieran dentro de los límites establecidos.

Las manifestaciones clínicas de EA fueron valoradas por el médico, clasificando su intensidad de acuerdo a los criterios siguientes: Leve: no requirió de antídoto o tratamiento, ni suspensión del tratamiento investigado; moderada: requirió suspensión del tratamiento por decisión del médico y requirió o no tratamiento; Severa: puso en peligro la vida del sujeto, pudiendo llegar a ser fatal. Por tanto, necesariamente requirió suspensión del medicamento y conllevó a la hospitalización y/o muerte del paciente. Según su relación de causalidad con el tratamiento las EA se clasificaron de acuerdo a la clasificación utilizada por la Organización Mundial de la Salud.⁴⁷

Se consideró como fracaso terapéutico si en el grupo de pacientes que recibió la terapia combinada D-003+Omega-3 no se modificaron las variables primaria y colaterales y/o que aparecieran EA moderados o severos imputables al tratamiento, cuya frecuencia fuera significativamente superior a la del grupo Placebo+Omega-3.

Los datos fueron analizados según el principio de Intención de Tratar por lo que todos los datos de las pacientes incluidas, fuesen bajas o no, fueron analizados.

En la estadística descriptiva las variables continuas se expresaron como medias \pm DE (desviación estándar) o ESM (error estándar de la media), mientras que las variables categóricas se expresaron en número (n) y porcentaje (%).

Las principales variables demográficas de ambos grupos en condiciones basales se compararon utilizando el test de la U de Mann Whitney cuando se trataba de variables continuas; y con el de la Probabilidad Exacta de Fisher para las variables categóricas.

Los cambios de las variables continuas dentro de cada grupo se analizaron mediante el test de Wilcoxon, comparando los valores post tratamiento con los basales. Las comparaciones entre grupos de los valores absolutos y de los cambios de estas variables se realizaron con el test de la U de Mann Whitney. Se confirmaron las diferencias encontradas con el ajuste de Bonferroni para múltiples comparaciones en un mismo experimento⁴⁸ y mediante análisis de varianza (ANOVA).

Los cambios de variables continuas dentro de cada grupo se analizaron mediante el test de ANOVA. Las comparaciones entre grupos de sus valores absolutos se realizaron con el test de la U de Mann Whitney. La diferencia en la frecuencia de reporte de EA en ambos grupos se analizó con el test de la probabilidad Exacta de Fisher. Todos los test utilizados fueron de dos colas. *A priori* se estableció un nivel de $\alpha = 0,05$ para la significación estadística. Se utilizó el sistema estadístico Statistics para Windows y el análisis estadístico de los resultados se realizó en el Centro de Productos Naturales. Este estudio pretendió detectar una diferencia de un 5 % en el cambio de los valores de la escala en el grupo tratado con D-003+Omega-3 con respecto al tratado con Placebo+Omega-3, con un valor de $\beta = 0,20$ y un $\alpha = 0,05$, para lo cual cada grupo estuvo integrado por 25 pacientes (n total = 50) (MedCalc, 2000). Como se previó una tasa de abandonos del 10 % fueron reclutadas 55 pacientes. El plan de análisis estadístico y toda la conducción del estudio se cumplió de acuerdo a lo planificado.

RESULTADOS

Este estudio incluyó 50 mujeres post-menopáusicas de un total de 55 reclutadas. Cinco pacientes no se incluyeron por diversas causas: dos por disfunción tiroidea y tres presentaron un riesgo leve (< 10 puntos) en la evaluación de la encuesta de riesgo de Osteoporosis.

La frecuencia de factores de riesgo de OP reveló que, además de la post menopausia, criterio de inclusión, los otros factores de riesgo más frecuentes fueron el bajo consumo de calcio (100 %), las fracturas previas (78 %) historia de fracturas familiares (74 %) y sedentarismo (64 %). Por otro lado, las pacientes mostraron una frecuencia relativamente alta de factores de riesgo coronario como la hipercolesterolemia (64 %) y la hipertensión arterial (64 %) (Tabla 1).

Tabla 1. Características basales de la población de estudio

	D-003+Omega-3 (n=25)		Placebo+Omega-3 (n=25)		Total (n=50)	
Edad (X ± DE)	65,6 ± 7,7		68,0 ± 8,3		66,8 ± 8,0	
Riesgo de Osteoporosis	12,0 ± 1,3		11,7 ± 1,5		11,8 ± 1,4	
Índice kg/m ² (X ± DE)	26,1 ± 4,9		25,5 ± 3,9		25,8 ± 4,4	
Antecedentes	n	%	n	%	n	%
Bajo consumo de calcio	25	100,0	25	100,0	50	100,0
Fracturas previas	20	80,0	19	76,0	39	78,0
Fracturas familiares	21	84,0	16	64,0	37	74,0
Hipercolesterolemia	16	64,0	16	64,0	32	64,0
Hipertensión arterial	16	64,0	16	64,0	32	64,0
Sedentarismo	17	68,0	15	60,0	32	64,0
Diabetes mellitus	6	24,0	7	28,0	13	26,0
Consumo de corticoides	4	16,0	5	20,0	9	18,0
Tabaquismo	2	8,0	2	8,0	4	8,0
Medicaciones concomitantes (MC)						
Pacientes que consumieron MC	24	96,0	24	96,0	48,0	96,0
Diuréticos	12	48,0	10	40,0	11	44,0
IECA	10	40,0	8	32,0	18	36,0
Hipoglicemiantes orales	5	20,0	6	24,0	11	22,0
Antiasmáticos	3	12,0	7	28,0	10	20,0
β-bloqueadores	6	24,0	2	8,0	8	16,0
Hipolipemiantes	3	12,0	4	16,0	7	14,0
Antiplaquetarios	1	4,0	4	16,0	5	10,0
Circulatorios	2	8,0	2	8,0	4	8,0

(X ± DE) X media, DE desviación estándar, IECA inhibidores enzima convertidora de angiotensina

Ninguna comparación resultó significativa

Test de la U de Mann Whitney para comparaciones de variables continuas

Test de la Probabilidad Exacta de Fisher para comparaciones de variables categóricas

Todas las características demográficas, incluida la distribución de medicaciones concomitantes, y las variables determinadas en condiciones basales fueron estadísticamente similares en ambos grupos, lo que avala la homogeneidad de los grupos a comparar y que la aleatorización utilizada fue satisfactoria.

La adhesión al tratamiento fue excelente, ya que, 48 de 50 pacientes (96 %) consumieron las medicaciones, lo que sobrepasa el criterio de adhesión satisfactoria.

Se estudiaron los cambios en el puntaje del Cuestionario Qualeffo 41 sobre calidad de vida de las pacientes tratadas con D-003 (10 mg/d) +Omega-3 y con la monoterapia Omega-3 (Tabla 2). Ambos tratamientos mejoraron significativamente el puntaje total de la escala (p < 0,001 vs valores basales) a partir del mes de tratamiento. Al culminar los tres meses de tratamiento, se alcanzaron porcentajes de reducción de 16,6 % en el grupo que recibió la terapia combinada y 21,1 % en el grupo tratado con la monoterapia. Por otra parte, en ambos grupos mejoraron significativamente los dominios relacionados con el dolor, la actividad física y la percepción general de salud con respecto a los valores basales. No se encontraron diferencias significativas entre grupos con respecto al análisis del puntaje total y por dominios, excepto para el dominio relacionado con el estado mental donde se alcanzaron porcentajes de reducción de 9,4 % para el grupo D-003+Omega-3 y 4,5 % en el grupo tratado con omega-3 (p < 0,05).

Tabla 2. Efectos sobre el puntaje del Cuestionario Qualeffo ($X \pm EEM$)

	Basal	1 mes	2 meses	3 meses	%
Dolor					
D-003+Omega-3	43,6 ± 6,1	30,4 ± 5,6***	23,2 ± 5,1***	18,8 ± 4,7****	-56,9
Placebo+Omega-3	47,8 ± 5,2	27,4 ± 4,6****	23,0 ± 4,8****	18,2 ± 4,1****	-61,9
Actividad Física					
D-003+Omega-3	31,5 ± 3,4	28,3 ± 3,5**	26,2 ± 3,3**	24,5 ± 3,2**	-22,2
Placebo+Omega-3	33,1 ± 2,9	30,9 ± 3,1*	28,3 ± 2,8**	24,3 ± 2,6***	-26,6
Actividades de recreación					
D-003+Omega-3	48,6 ± 5,2	48,6 ± 5,2	51,9 ± 5,6	53,0 ± 4,8	+9,1
Placebo+Omega-3	50,1 ± 4,1	48,2 ± 4,7	51,4 ± 4,7	50,2 ± 4,5	+0,2
Percepción general de salud					
D-003+Omega-3	66,3 ± 4,0	62,3 ± 3,7	60,0 ± 3,1	59,7 ± 2,8*	-10,0
Placebo+Omega-3	70,7 ± 3,0	63,0 ± 3,8*	64,0 ± 3,0*	60,7 ± 2,6**	-14,1
Estado mental					
D-003+Omega-3	30,7 ± 4,2	28,6 ± 4,0 ⁺	29,9 ± 3,9	27,9 ± 4,1 ⁺	-9,1
Placebo+Omega-3	35,9 ± 3,6	36,7 ± 3,7	34,1 ± 3,6	34,3 ± 3,3	-4,5
Puntaje Total					
D-003+Omega-3	44,1 ± 3,3	39,6 ± 3,3***	38,2 ± 2,9***	36,8 ± 2,8***	-16,6
Placebo+Omega-3	47,5 ± 2,5	41,2 ± 2,6***	40,2 ± 2,6***	37,5 ± 2,5***	-21,1

X media, EEM error estándar de la media

*p < 0,016, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 Comparación vs valores basales (Test de Wilcoxon, Ajuste de Bonferroni)

⁺p < 0,05 Comparación entre grupos (Test de la U de Mann Whitney)

Los efectos de la terapia combinada D-003 (10 mg/d)+Omega-3 respecto a la monoterapia con Omega-3 sobre el perfil lipídico de las pacientes incluidas en el estudio muestran que, en ambos grupos se produjo un incremento significativo de la HDL-C con respecto al nivel basal ($p < 0,01$), alcanzándose porcentajes de 12,2 % en el grupo D-003+Omega-3 y de 8,2 % en el grupo que recibió Placebo+Omega-3. Las variables colesterol total y LDL-C se mantuvieron sin cambios significativos en ambos grupos. Los niveles de triglicéridos disminuyeron en un 12,7 % en el grupo tratado con D-003+ Omega-3, aunque no alcanzaron significación estadística con respecto al nivel basal ni al grupo tratado con la monoterapia con Omega-3 (Tabla 3).

Tabla 3. Efectos sobre el perfil lipídico

	Perfil lipídico		Cambio (%)
	Basal	3 meses	
LDL-C (mmol/L)			
D-003+Omega-3	3,72 ± 0,92	3,76 ± 0,95	+1,07
Placebo+Omega	3,63 ± 1,06	3,79 ± 0,97	+4,4
Colesterol total (mmol/L)			
D-003+Omega-3	5,64 ± 1,04	5,78 ± 0,97	+2,5
Placebo+Omega	5,64 ± 1,03	5,90 ± 1,06	+4,6
HDL-C (mmol/L)			
D-003+Omega-3	1,39 ± 0,30	1,56 ± 0,38**	+12,2
Placebo+Omega	1,46 ± 0,34	1,58 ± 0,38**	+8,2
Triglicéridos (mmol/L)			
D-003+Omega-3	1,42 ± 0,55	1,24 ± 0,59	-12,7
Placebo+Omega	1,46 ± 0,64	1,40 ± 0,71	-4,1

**p < 0,01 Comparación vs valores basales (Test de Wilcoxon)

En los indicadores de seguridad. No se observaron diferencias significativas en las variables físicas y de bioquímica sanguíneas investigadas. Los valores individuales se mantuvieron dentro del rango de valores normales (Tabla 4) (Tabla 5).

Tabla 4. Efectos sobre los indicadores físicos de seguridad

	Basal	1 mes	2 meses	3 meses
Peso (kg)				
D-003+Omega-3	69,76 ± 13,98	69,68 ± 14,00	69,74 ± 13,88	69,68 ± 13,80
Placebo+Omega-3	68,84 ± 12,05	68,84 ± 12,05	68,72 ± 12,01	68,84 ± 11,98
Frecuencia (latidos/minuto)				
D-003+Omega-3	77,92 ± 5,52	76,56 ± 6,07	75,08 ± 6,23	75,20 ± 4,04
Placebo+Omega-3	76,72 ± 3,95	76,56 ± 5,96	78,56 ± 5,96	76,32 ± 2,87
Presión arterial diastólica (mm Hg)				
D-003+Omega-3	75,20 ± 5,86	76,40 ± 6,38	76,00 ± 6,45	76,00 ± 6,45
Placebo+Omega-3	76,00 ± 7,07	77,20 ± 5,42	75,00 ± 9,35	77,40 ± 6,31
Presión arterial sistólica (mm Hg)				
D-003+Omega-3	121,40 ± 11,13	120,80 ± 10,77	119,60 ± 11,72	119,80 ± 12,62
Placebo+Omega-3	121,40 ± 12,54	120,40 ± 12,41	120,80 ± 16,56	123,60 ± 12,63

(X ± DE) X media, DE desviación estándar

Ninguna comparación resultó significativa (Test de la U de Mann Whitney y Test de Wilcoxon)

Tabla 5. Efectos sobre indicadores de seguridad de bioquímica sanguínea

	Basal	3 meses
ALT (UI)		
D-003+Omega-3	18,04 ± 6,59	19,28 ± 5,84
Placebo+Omega-3	16,56 ± 6,14	18,20 ± 6,51
AST (UI)		
D-003+Omega-3	24,60 ± 7,82	25,52 ± 6,91
Placebo+Omega-3	23,52 ± 5,96	24,20 ± 6,18
Glucosa (mmol/L)		
D-003+Omega-3	4,38 ± 0,73	4,60 ± 0,66
Placebo+Omega-3	4,35 ± 0,80	4,51 ± 0,74
Creatinina (µmol/L)		
D-003+Omega-3	68,24 ± 12,41	68,68 ± 14,39
Placebo+Omega-3	69,16 ± 14,77	69,32 ± 12,95

(X ± DE) X media, DE desviación estándar. Ninguna comparación resultó significativa (Test de la U de Mann Whitney y Test de Wilcoxon)

Sólo dos pacientes causaron bajas del estudio. Ambas se produjeron en el grupo placebo+omega-3 y se debieron a violaciones del protocolo. Cuatro pacientes reportaron EA, dos correspondieron al grupo placebo+omega-3 (vértigo y cefalea) y dos al grupo D-003+Omega-3 (elevación transitoria de la presión arterial y enfisema pulmonar), que fueron clasificadas como moderadas y posiblemente relacionadas con el tratamiento (Tabla 6).

Tabla 6. Experiencias adversas (EA) ocurridas durante el estudio

EA	D-003+Omega-3		Placebo+Omega-3	
	n	%	n	%
Vértigo	0	0,0	1	4,0
Cefalea intensa	0	0,0	1	4,0
Elevación transitoria de la presión	1	4,0	0	0,0
Enfisema pulmonar	1	4,0	0	0,0
Total de EA	2	8,0	2	8,0
Total de pacientes que reportaron EA	2	8,0	2	8,0

Ninguna comparación resultó significativa (Test de la Probabilidad Exacta de Fisher)

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente ensayo, ambos tratamientos mejoraron el puntaje total del Cuestionario Qualeffo: D-003 (10 mg/d)+Omega-3 (56,9 %) y placebo)+Omega-3 (61,9 %). En particular mejoraron

los dominios de dolor y los de actividad física, que afectan más directamente la percepción de calidad de vida. Sin embargo, la terapia combinada no mostró ventajas adicionales con respecto a la monoterapia con Omega-3 sobre la calidad de vida en estas pacientes, por lo tanto, no se cumplió el objetivo fundamental planteado en este estudio.

Resulta interesante destacar que otras sustancias con efecto anti-resortivo administradas por mediano plazo (26 semanas), como el aleandronato (10 - 70 mg/d),¹⁷ bifosfonato de amplio uso clínico, no han mostrado mejorar la calidad de vida de acuerdo a los resultados de la encuesta utilizada en este estudio, a diferencia de los resultados obtenidos con medicamentos antiinflamatorios como el naproxeno, lo que indirectamente demuestra la influencia del mejoramiento del dolor sobre el resto de los dominios de la escala.

Por otra parte, se observó que en el grupo de terapia combinada D-003+Omega-3 hubo una mejoría en el dominio del estado mental que fue estadísticamente significativa con respecto a la monoterapia con Omega-3 (9,1 % y 4,5 % respectivamente), resultado que no se había obtenido con anterioridad en ensayos previos con el D-003, por lo tanto, se requiere de futuros estudios para confirmar o no este hallazgo.

Las dosis de D-003 y Omega-3 utilizadas en este ensayo son dosis a las cuales se han obtenido resultados beneficiosos sobre la salud ósea lo que pudo haber influido en la no obtención de una eficacia superior con la terapia combinada, por lo que sería interesante evaluar la terapia combinada D-003+Omega-3 utilizando dosis inferiores de ambos productos. En este sentido, puede especularse acerca de la posibilidad de que el D-003 y el Omega-3 tengan algunos puntos de contacto en cuanto al mecanismo por el cual ejercen sus efectos sobre el hueso lo cual influiría en lograr una eficacia superior con la terapia combinada con respecto a las monoterapias.

Más allá de los efectos sobre la calidad de vida, queda por demostrar el efecto de la terapia combinada D-003+Omega-3 en el metabolismo óseo y el impacto que pudiera tener en la estabilidad del recambio de este tejido. Existen dos mecanismos potencialmente involucrados en el impacto positivo que tienen los ácidos grasos Omega-3 sobre el hueso: el decremento de la citoquinas pro-inflamatorias para la regulación del recambio óseo⁴⁹ y la modulación sobre el balance de calcio. Estudios realizados en modelos animales e *in vitro* sugieren una interacción beneficiosa entre el calcio y los ácidos grasos omega-3 la cual, está basada en una regulación de la absorción del calcio duodenal dependiente de vitamina D y un decremento en la excreción de calcio.⁵⁰

En ambos grupos se produjo un incremento significativo de las HDL-C con respecto al nivel basal de modo consistente con resultados anteriores.³⁴⁻³⁹ Los niveles de triglicéridos disminuyeron en un 12,7 % en el grupo tratado con D-003+Omega-3, aunque no alcanzaron significación estadística con respecto al nivel basal ni al grupo tratado con la monoterapia con omega-3.

Las variables colesterol total y LDL-C se mantuvieron sin cambios significativos en ambos grupos, lo cual no coincide con estudios previos. Una explicación para estos resultados podría deberse a que de acuerdo al cronograma del ensayo clínico los exámenes de laboratorio correspondiente a la consulta final se realizaron a continuación de las navidades y fin de año, período en el cual habitualmente hay un resquebrajamiento de los hábitos dietéticos saludables.

Los resultados en cuanto a las variables de seguridad y tolerabilidad evaluadas confirman que ambos tratamientos resultaron seguros y bien tolerados.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que la terapia combinada D-003 (10 mg/d)+Omega-3 (1 g/d) y la monoterapia con Omega-3 administrados durante tres meses presentan eficacia, seguridad y tolerabilidad similar en mujeres postmenopáusicas con riesgo moderado a alto de osteoporosis, por lo tanto, la terapia combinada no mostró ventajas adicionales con respecto a la monoterapia con Omega-3 sobre la calidad de vida en estas pacientes. Se precisa de estudios ulteriores para confirmar estos resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armas LA, Recker RR. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012; 41(3):475-486.
2. Warriner AH, Saag KG. Osteoporosis diagnosis and medical treatment. *Orthop Clin North Am.* 2013; 44(2):125-135.
3. Lobersztajn A, Trémollières F. Menopause and bone. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2012; 41(7): F28-F32.
4. Varner JM. Osteoporosis: a silent disease. *Ala Nurse.* 2012; 39(3):10-11.
5. Abd Jalil MA, Shuid AN, Muhammad N. Role of medicinal plants and natural products on osteoporotic fracture healing. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 20:12-17.
6. Schurman L, Bagur A, Claus-Hermberg H, Messina OD, Negri AL, Sánchez A, *et al.* Guidelines for the diagnosis, prevention and treatment of osteoporosis. *Medicina.* 2013; 73(1):55-74.
7. Leslie WD, Schousboe JT. A review of osteoporosis diagnosis and treatment options in new and recently updated guidelines on case finding around the world. *Curr Osteoporos Rep.* 2011; 9(3):129-140.
8. Schuiling KD, Robinia K, Nye R. Osteoporosis update. *J Midwifery Womens Health.* 2011; 56(6):615-627.
9. Diab DL, Watts NB. Postmenopausal osteoporosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013; 21:34-37.
10. Hudec SM, Camacho PM. Secondary causes of osteoporosis. *Endocr Pract.* 2013; 19(1):120-128.

11. Cianferotti L, Brandi ML. Guidance for the diagnosis, prevention and therapy of osteoporosis in Italy. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2012; 9(3):170-178.
12. Robling AG, Turner CH. Mechanical signaling for bone modeling and remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009; 19(4):319-338.
13. Mackiewicz Z, Niklińska WE, Kowalewska J, Chyczewski L. Bone as a source of organism vitality and regeneration. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011; 49(4):558-569.
14. McClung M, Harris ST, Miller PD, Bauer DC, Davison KS, Dian L, *et al.* Bisphosphonate therapy for osteoporosis: benefits, risks, and drug holiday. *Am J Med.* 2013; 126(1):13-20.
15. Diab DL, Watts NB. Bisphosphonate drug holiday: who, when and how long. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2013; 5(3):107-111.
16. Hampson G, Fogelman I. Clinical role of bisphosphonate therapy. *Int J Womens Health.* 2012; 4:455-469.
17. Bone H. Development and Evaluation of New drugs for Osteoporosis. Cap 65, en *Osteoporosis*, Vol 2, Second Edition Academic Press, 2001, p533-538.
18. Más R. D-003. *Drugs R&D.* 2002; 3(5):349-355.
19. Mendoza S, Noa M, Mas R, Mendoza N. Effect of D-003, a mixture of high molecular weight primary acids from sugar cane wax, on liver damage induced by paracetamol in rats. *Int J Tissue Reaction.* 2003; 25:91-98.
20. Noa M, Mendoza S, Mas R. Lack of protective effect of D003, a mixture of high molecular weight primary acids from sugar cane wax, on liver damage induced by galactosamine in rats. *J Med Food.* 2005; 8:343-347.
21. Noa M, Más R, Mendoza S, Gámez R, Mendoza N. Effects of D-003, a mixture of high molecular weight aliphatic acids from sugar cane wax, on bones from ovariectomized rats. *Drugs Exptl Clin Res.* 2004; 30:35-41.
22. Mendoza S, Noa M, Más R, Mendoza N. Effects of D-003 (5-200 mg/kg), a mixture of high molecular weight aliphatic acids from sugarcane wax, on bones and bone cell apoptosis in ovariectomized rats. *Int J Tiss React.* 2005; XXVII:213-222.
23. Mendoza S, Noa M, Mas R. A comparison of the effects of D-003, a mixture of high molecular weight aliphatic acids from sugarcane wax, and pravastatin, on bones and osteoclast apoptosis of ovariectomized rats. *Drugs Exp Clin Res.* 2005; 31:181-191.
24. Noa M, Mendoza S, Más R, Mendoza N, León F. Effect of D-003, a mixture of very high molecular weight aliphatic acids, on prednisolone-induced osteoporosis in Sprague Dawley rats. *Drugs R&D.* 2004; 5:281-290.
25. Gámez R, Más R, Noa M, Menéndez R. Acute and subchronic oral toxicity of D-00- in rats. *Toxicol Letters.* 2000; 118:31-41.
26. Gámez R, Mas R, Noa M, Menéndez R, García H, González JE, *et al.* Six-month toxicity study of oral administration of D-003 in Sprague Dawley rats. *Drugs R&D.* 2002; 3:375-386.
27. Gámez R, Más R, Noa M, Menéndez R, García H, González J, *et al.* Effects of chronic administration of D-003, a mixture of sugar cane wax high molecular weight acids, in beagle-dogs. *Drugs Exp & Clin Res.* 2004; 30:75-88.
28. Gámez R, González JE, Rodeiro I, Fernández I, Alemán C, Rodríguez MD, *et al.* In vivo genotoxic evaluation of D-003, a mixture of very long chain aliphatic alcohols. *J Med Food.* 2001; 4:85-92.
29. Gámez R, Rodeiro I, Fernández I, Acosta P. Preliminary evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of D-003: A mixture of very long chain fatty acids. *Teratog Carcinog Mutag.* 2002; 22:175-181.
30. Rodríguez MD, Gámez R, González JE, García H, Acosta CP, Goicochea E. Lack of developmental toxicity of D-003: a mixture of long-chain fatty acids in rats. *Food Chem Toxicol.* 2003; 41:89-93.
31. Rodríguez MD, González JE, Alemán C, Rodeiro I, Arango E, Gámez R, *et al.* Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of D-003, a mixture of long-chain fatty acids, in rats and-rabbits. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42:1977-1985.
32. Rodríguez MD, Gutiérrez A, Marrero G, García H. Perinatal/postnatal study of D-003, a mixture of long-chain fatty acids in rats. *J Med Food.* 2006; 9:223-230.
33. Gámez R, Noa M, Mas R, Mendoza N, Pardo B, Menéndez R, *et al.* Long-term carcinogenicity of D-003, a mixture of high molecular weight acids from sugarcane wax, in Sprague Dawley rats: a 24 months study. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45:2352-2358.
34. Ceballos A, Mas R, Castaño G, Fernández L, Mendoza S, Menéndez R, *et al.* The effect of D-003 (10 mg/day) on biochemical parameters of bone remodelling in postmenopausal women: a randomized, double-blind study. *Int J Clin Pharmacol Res.* 2005; 25:175-186.
35. Ceballos A, Castaño G, Mendoza S, González J, Mas R, Fernández L, *et al.* Effect of D-003 (10 mg/d) on the bone mineral density of the lumbar spine and femoral neck in postmenopausal women: a randomized, double-blinded study. *Korean J Intern Med.* 2011; 26:168-178.
36. Ceballos A, Illnait J, Fernández JC, Mendoza S, Fernández L, Mas R, *et al.* Efectos del D-003 sobre la calidad de vida en mujeres postmenopáusicas con riesgo de osteoporosis de moderado a alto. *Investigaciones Medico Quirúrgicas.* 2013; 5(1):25-43.

37. Arruzazabala ML, Molina V, Carbajal D, Fernández L, Más R, Illnait J, *et al.* Effects of D-003, a new substance purified from sugar cane wax, on platelet aggregation and plasma levels of arachidonic acid metabolites in healthy volunteers. *Int J Pharmacol Clin Res.* 2004; 24:56-64.
38. Arruzazabala ML, Molina V, López E, Castaño G, Fernández L, Carbajal D, *et al.* Effects of sugarcane wax acids on platelet aggregation in hypercholesterolemic patients: a dose-titration, randomised, placebo-controlled trial. *Arzn-Forsch Drug Res.* 2008; 58: 376-384.
39. Arruzazabala ML, López E, Molina V, Illnait J, Carbajal D, Mas R, *et al.* Efectos del D-003, una mezcla de ácidos grasos de la caña de azúcar, sobre el perfil lipídico y la agregación plaquetaria de pacientes con diabetes tipo 2. Un ensayo controlado con placebo. *Acta Bioq Clin Lat.* 2010; 44(1):15-24.
40. Vanek C, Connor WE. Do n-3 fatty acids prevent osteoporosis? *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(3):647-648.
41. Weiss LA, Barrett-Connor E, von Mühlen D. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(4):934-938.
42. Höglström M, Nordström P, Nordström A. n-3 Fatty acids are positively associated with peak bone mineral density and bone accrual in healthy men: the NO2 Study. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(3):803-807.
43. Griel AE, Kris-Etherton PM, Hilpert KF, Zhao G, West SG, Corwin RL. An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans. *Nutr J.* 2007; 16:58-62.
44. Orchard TS, Cauley JA, Frank GC, Neuhouser ML, Robinson JG, Snetselaar L, *et al.* Fatty acid consumption and risk of fracture in the Women's Health Initiative. *Am J Clin Nutr.* 2010; 92(6):1452-1460.
45. Farina EK, Kiel DP, Roubenoff R, Schaefer EJ, Cupples LA, Tucker KL. Protective effects of fish intake and interactive effects of long-chain polyunsaturated fatty acid intakes on hip bone mineral density in older adults: the Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr.* 2011; 93(5):1142-1151.
46. Lips P, Leplege A. Development and validation of a quality of life questionnaire for patients with vertebral fractures: Qualeffo-41. *Quality of Life Res.* 2000; 9(Suppl 6):763-766.
47. Requerimientos para la notificación y el reporte de Eventos Adversos Graves e Inesperados en los ensayos clínicos. Regulación No. 45-2007, Centro para el Control Estatal de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos, MINSAP, La Habana, Cuba, 2007.
48. O'Brien PC, Shampo MA. Statistical considerations for performing multiple tests in a single experiment. Comparing two therapies with respect to several endpoints. *Mayo Clin Proc.* 1988; 63:1140-1143.
49. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical Implications of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK System for Bone and Vascular Diseases. *JAMA.* 2004; 292(4):490-495.
50. Orchard TS, Pan X, Cheek F, Steven W, Rebecca D. Jackson RD. A systematic review of omega-3 fatty acids and osteoporosis. *Br J Nutr.* 2012; 107(2): S253-S260.