

EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN ÓSEA DE LA TIBIA EN CERDOS EDITADOS GENÉTICAMENTE TPC2KO

Evaluation of the structure and composition of the tibia in TPC2KO genetically edited pigs

Flores-Bolaños, C.; Barceló, M.D.; Gadea, J.*

Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Murcia 30100. España.

***Autor de correspondencia:** jgadea@um.es

Tipo de trabajo: Trabajo de Fin de Grado (Veterinaria).

Recibido: 23/04/2026

Aceptado: 30/04/2026

RESUMEN

El tejido óseo es un sistema dinámico regulado por el equilibrio entre formación y resorción ósea, procesos en los que la señalización intracelular de calcio desempeña un papel clave. El canal iónico TPC2, localizado en lisosomas, participa en la regulación de estas señales, especialmente en la osteoclastogénesis. Sin embargo, su función en modelos porcinos es aún poco conocida. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la delección del gen TPC2 sobre la estructura y composición ósea de la tibia en cerdos editados genéticamente (TPC2KO) en comparación con animales control (WT). Se analizaron tibias de 12 animales (6 por grupo) mediante microtomografía computarizada (micro-CT), microscopía electrónica de barrido (SEM), análisis de textura cortical (GLCM) y espectroscopía de rayos X (SEM-EDX). Los resultados mostraron que los animales TPC2KO presentan un aumento significativo del volumen óseo, de la fracción ósea (BV/TV) y del grosor trabecular. No se observaron diferencias en el espaciado trabecular ni en los índices de conectividad. El análisis por SEM reveló una corteza ósea más compacta y homogénea en los animales KO, lo que fue confirmado por GLCM, indicando menor complejidad estructural. En cuanto a la composición elemental, se observó un incremento significativo de magnesio en los animales TPC2KO, sin cambios en calcio ni fósforo. Este hallazgo sugiere una mineralización ósea menos madura y más dinámica. En conjunto, la delección de TPC2 altera la microarquitectura y composición del hueso, probablemente debido a cambios en la osteoclastogénesis y en la señalización de calcio. Estos resultados refuerzan el valor del modelo porcino TPC2KO para el estudio de la fisiología ósea.

Palabras clave: TPC2, cerdos editados, microtomografía computarizada (micro-CT), Microscopía electrónica de barrido (SEM), remodelado óseo

ABSTRACT

Bone tissue is a dynamic system regulated by the balance between bone formation and resorption, processes in which intracellular calcium signaling plays a crucial role. The lysosomal ion channel TPC2 is involved in these mechanisms, particularly in osteoclastogenesis, although its role in porcine models remains poorly understood. The aim of this study was to evaluate the effect of TPC2 gene deletion on bone structure and composition in the tibia of genetically edited pigs (TPC2KO) compared to wild-type (WT) controls. Tibias from 12 animals (6 per group) were analysed using micro-computed tomography (micro-CT), scanning electron microscopy (SEM), cortical texture analysis (GLCM), and energy-dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX). Micro-CT results showed that TPC2KO animals had significantly increased bone volume, bone volume fraction (BV/TV), and trabecular thickness. No significant differences were found in trabecular spacing or connectivity indices. SEM observations revealed a more compact and homogeneous cortical structure in KO animals, which was supported by GLCM analysis indicating reduced structural complexity. Elemental analysis showed a significant increase in magnesium content in TPC2KO animals, while calcium and phosphorus levels remained unchanged. This suggests a less mature and more dynamic mineralization process. Overall, TPC2 deletion alters both bone microarchitecture and mineral composition, likely due to changes in osteoclastogenesis and calcium signaling. These findings highlight the relevance of the TPC2KO porcine model for studying bone physiology.

Keywords: TPC2, gene-edited pigs, micro-computed tomography (micro-CT), scanning electron microscopy (SEM), bone remodeling

INTRODUCCIÓN

El cerdo (*Sus scrofa domesticus*) es una especie de enorme relevancia a nivel agropecuario y científico. A nivel mundial es la segunda fuente de carne más consumida, detrás de la carne de aves (FAO, 2021). En el ámbito biomédico, su importancia radica en las similitudes anatómicas y fisiológicas con los seres humanos, convirtiéndolo en un valioso modelo para el estudio de enfermedades y la búsqueda de soluciones terapéuticas (Hou et al., 2022).

Los animales utilizados en este estudio son resultado de un cruce de animales editados genéticamente con la técnica CRISPR/Cas9. Esta herramienta ha revolucionado la edición genética porcina gracias a su eficacia, precisión y rapidez. Se trata de un complejo formado por la endonucleasa Cas9 y una guía de ARN (sgRNA), que determina el lugar de corte del ADN al reconocer una secuencia complementaria en el genoma (Gadea et al., 2024). Localizada la región, Cas9 induce un corte de doble cade-

na, desencadenando mecanismos de reparación celular, permitiendo corregir secuencias, eliminar fragmentos o insertar nuevas regiones de ADN. Esto convierte a CRISPR/Cas9 en una tecnología capaz de cortar, eliminar o modificar secuencias de ADN específicas con precisión (Gadea et al., 2024) lo que permite generar modelos animales específicos con aplicaciones en el ámbito sanitario (modelos de enfermedad y xenotrasplantes) o en el campo de la producción animal (resistencia a enfermedades víricas).

El hueso es un tejido conectivo especializado en el soporte del cuerpo, la protección de órganos vitales, el almacenamiento de minerales y la participación en la hematopoyesis. Desde el punto de vista estructural está compuesto por una matriz orgánica, rica en colágeno, que le confiere flexibilidad y resistencia, y una matriz inorgánica, responsable de su dureza. Esta última se encuentra constituida principalmente por hidroxiapatita (HAP), cuyos principales componentes son el calcio y el fósforo. Aunque también contiene porcentajes reducidos de

sodio, cloro, carbonatos y magnesio, que son importantes para la regeneración ósea (García-Garduño & Reyes-Gasga, 2006).

El tejido óseo está compuesto por distintos tipos de células; los osteoblastos, que son responsables de la formación ósea; los osteocitos, que mantienen la matriz, y los osteoclastos, que reabsorben el hueso. El equilibrio del sistema óseo se sostiene mediante un proceso dinámico de reabsorción llevado a cabo por los osteoclastos y de formación ósea por parte de los osteoblastos. La osteoclastogénesis es un procedimiento complejo que dará lugar a la maduración de los osteoclastos los cuales desempeñan un papel crucial en la remodelación, permitiendo la renovación y mantenimiento de la estructura ósea (Yavropoulou & Yovos, 2008).

Los cerdos utilizados en este estudio tenían editados el gen TPC2 (Two-Pore Channel 2) (Navarro-Serna et al., 2021). Este gen codifica una proteína de membrana denominada TPC2 (canal de dos poros tipo 2, two pore channel) localizada principalmente en los lisosomas y endosomas, donde actúa como un canal iónico permeable al calcio. Su apertura es activada por la molécula NAADP, lo que desencadena la liberación de calcio desde los orgánulos hacia el citoplasma (Figura 1). Esta señalización de calcio intracelular es crucial para regular múltiples procesos celulares, como la autofagia, la endocitosis, la exocitosis, además de diversas rutas de diferenciación celular (Lagostena et al., 2025).

En el tejido óseo, TPC2 participa directamente en la diferenciación de los osteoclastos,

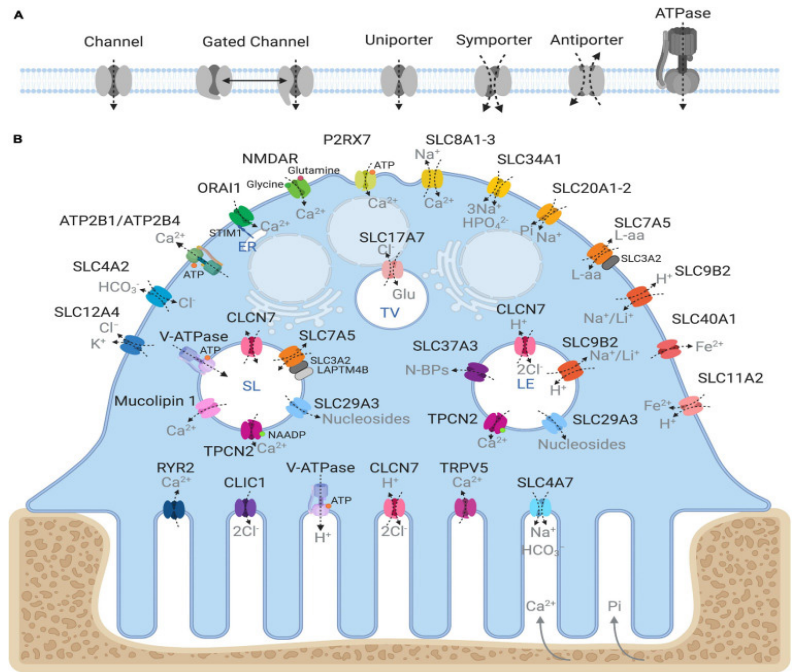


Figura 1. Modelo que resume la localización de los principales transportadores de membrana expresados en los osteoclastos. Los sustratos conocidos se indican de color gris. Los compartimentos intracelulares corresponden al retículo endoplasmático (ER); lisosoma (SL); endosoma (LE) y vesícula transcitótica (TV). La proteína TPC2 (TPCN2) se detecta tanto en el lisosoma como en el endosoma facilitando la señalización de calcio. Fuente: Ribet et al., 2021.

la osteoclastogénesis (Notomi et al., 2012; Notomi et al., 2017). Durante la formación de osteoclastos, la expresión del gen TPC2 aumenta y su actividad favorece la generación de las oscilaciones de calcio inducidas por RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand), necesarias para activar la vía de NFATc1 (Factor Nuclear de Células T activadas 1), el principal regulador transcripcional de la diferenciación osteoclástica. De manera que la disminución de TPC2 reduce la señalización de calcio, disminuye la translocación nuclear de NFATc1 y bloquea la formación de osteoclastos funcionales, afectando negativamente la resorción ósea (Notomi et al., 2021). (Figura 1)

La información hasta ahora disponible proviene de modelos de ratones TPC2KO (Notomi et al., 2012; Notomi et al., 2020; Notomi et al., 2021; Notomi et al., 2017). La posibilidad de utilizar modelos porcinos TPC2KO para conocer cómo la delección del gen TPC2 afecta a la estructura y composición del hueso puede aportar una gran información.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Debido al papel del gen TPC2 en la señalización de calcio y en la regulación de la osteoclastogénesis, se plantea la hipótesis de que su delección dará lugar a diferencias en la estructura y/o composición del tejido óseo en los animales editados genéticamente (TPC2KO) en comparación con los controles (WT).

Para comprobar esta hipótesis, se requiere evaluar tanto la arquitectura ósea como la composición mineral, ya que ambas reflejan los procesos de remodelado y mineralización afectados por la delección de TPC2.

Para rechazar o aceptar esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

1. Análisis de la estructura ósea trabecular de la tibia utilizando la tecnología de microtomografía computarizada (micro-CT).

2. Análisis de la estructura ósea cortical y composición porcentual de elementos mediante microscopia electrónica de barrido y análisis de espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (SEM-EDX).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Los animales utilizados en este estudio se obtuvieron mediante cruces de animales TPC2KO en heterocigosis para este gen (que portaban un alelo mutante y un alelo de tipo wild-type) (Navarro-Serna et al., 2021), lo que dio lugar a camadas con proporciones de herencia mendeliana (Barceló et al., 2023). Por tanto, las camadas incluyeron animales con delección bialélica (KO), delección monoalélica (heterocigotos) y de tipo wild-type (WT). En este trabajo, solo se compararon los animales KO y WT bialélicos. El genotipado se realizó a partir de muestras de piel de las orejas y/o las colas de cada animal. La detección de la mutación se llevó a cabo mediante electroforesis capilar en gel con PCR fluorescente, según el protocolo descrito previamente por Navarro-Serna et al. (2021).

Para este estudio se seleccionaron doce animales de peso y tamaño similares, seis animales WT y otros seis KO, que habían fallecido en el parto (Figura 2).

2. Consideraciones éticas

Este trabajo forma parte de proyectos aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Murcia y el Gobierno Regional de Murcia para el uso de organismos modificados genéticamente (licencia de establecimiento referencia A/ES/16/I-22; referencia de actividad A/ES/16/79; referencias de proyectos GENO-CRISPR CARM A13230307 y PHENOCRISPR CARM A13221206).

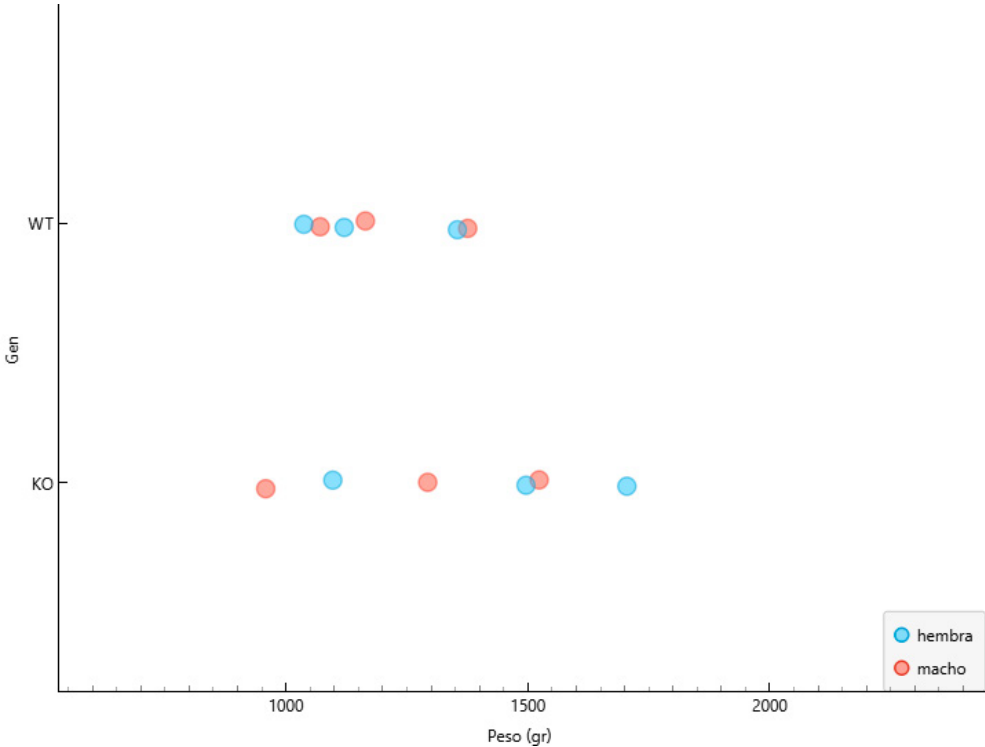


Figura 2. Distribución de pesos de los animales incluidos en el estudio agrupados por genotipo (TPC2KO vs. WT) y sexo (hembra en azul, macho en rojo, n total=12, n por genotipo y sexo=3).

Todos los métodos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices y normativas pertinentes, y bajo supervisión de personal capacitado y con experiencia. En este estudio no se utilizaron animales vivos, por lo tanto, las directrices ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments. <https://arriveguidelines.org/>) no son aplicables.

3. Evaluación de la estructura ósea mediante micro TC

3.1. Disección de las tibias

Una vez seleccionados los animales se diseccionaron las tibias de cada animal, para retirar cuidadosamente la piel y la musculatura que las

rodeaba el hueso sin llegar a dañar la estructura ósea, con la ayuda de tijeras, pinzas y bisturí. Las tibias diseccionadas se guardaron en bolsas individuales, y debidamente identificadas en conservación de congelación hasta el momento de su análisis (Figura 3).

3.2. Escaneado con micro-CT para la obtención de imágenes de alta resolución

Para obtener las imágenes de microtomografía computerizada (micro-CT) de las tibias se utilizó el escáner Quantum GX2 microCT Imaging System (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA)) disponible en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia (Figura 4).

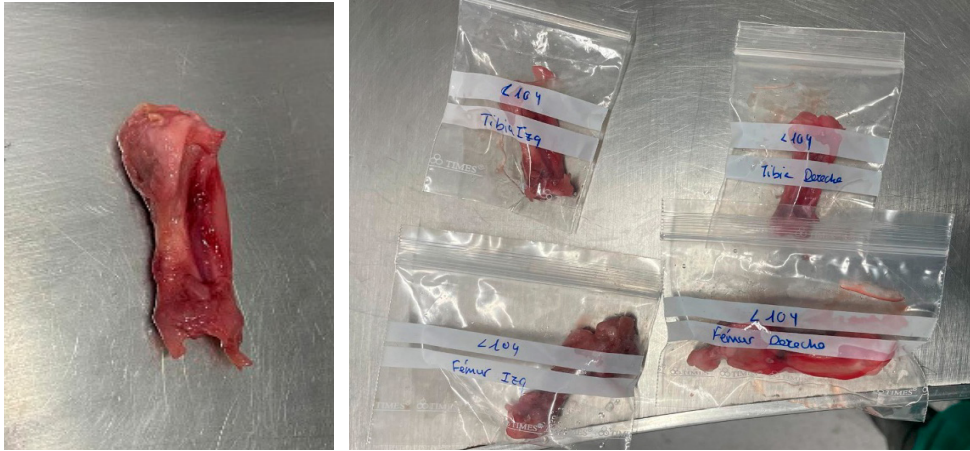


Figura 3. Tibias disecadas, envasadas e identificadas adecuadamente para su conservación.



Figura 4. Detalle de la presentación de las muestras óseas (tibias) en el escáner *Quantum GX2 microCT Imaging System* (PerkinElmer, Shelton, CT, USA), disponible en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia, previo a la adquisición de imágenes de microtomografía computarizada (micro-TC).

La adquisición de las imágenes se realizó con un campo de visión de 36 mm, un reconocimiento centrado en una región de 10 mm, y un tamaño de vóxel de 20 μm , para evaluar los parámetros estructurales del hueso trabecular.

Las tibias se colocaron en el equipo orientadas de una manera específica y homogénea en todas las muestras para garantizar que las imágenes resultantes fueran lo más similares posible, lo que permitió obtener resultados homogéneos.

Las imágenes fueron almacenadas en formato DICOM. Para cada muestra se obtuvieron 511 cortes. Se seleccionaron los cortes comprendidos entre los números 290 y 340, ya que en ese intervalo se identificaba claramente la referencia anatómica de la tuberosidad de la tibia.

3.3. *Análisis de las imágenes obtenidas*

Para el análisis de las imágenes se usó Bone J2, una aplicación de libre acceso (<https://bonej.org/>) (Domander et al., 2021; Doube et al., 2010) asociada al programa de análisis de imagen ImageJ (<https://imagej.net/software/imagej/>) (Schneider et al., 2012), que permite evaluar diferentes parámetros óseos a partir de las imágenes obtenidas del micro-CT.

Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Volumen total TV (mm^3): es el volumen total de la muestra, en la que se consideran los espacios internos.
- Volumen de hueso BV (mm^3): Volumen total de hueso mineralizado dentro de la región analizada. BV/TV (%): se refiere al porcentaje del volumen de hueso en relación con el volumen total. Es utilizado en patologías que alteran las características óseas ya que refleja perfectamente la ganancia/pérdida de hueso.
- Grosor trabecular Tb.Th (mm): es el grosor o diámetro medio de los soportes óseos (trabéculas) en una estructura ósea esponjosa. Un valor más alto puede indicar una estructura ósea más fuerte.
- Espaciado trabecular Tb.Sp (mm): se corresponde la distancia media entre estas trabéculas, que representa la anchura de las cavidades medulares entre ellas. Es un indicador de la porosidad del hueso. Un mayor espaciado puede indicar una menor densidad ósea. Las mediciones de grosor y espaciado trabecular son parámetros importantes para analizar la calidad ósea.
- Característica de Euler (Euler char). El número de estructuras conectadas en una red puede determinarse calculando dicha característica. Este concepto describe la relación entre vértices, aristas y caras. Se trata de un número que describe las propiedades de las formas geométricas o los espacios sin necesidad de utilizar una unidad de medida específica. El hueso trabecular es una de esas redes en las que puede calcularse la conectividad (Conn) a partir de las características de Euler del hueso y la densidad de la conectividad (Conn.D), dividiendo la estimación de la conectividad por el volumen de la muestra (Odgaard & Gundersen, 1993). Estos parámetros informan sobre la estructura de las trabéculas óseas; no obstante, no se refieren al número de estructuras trabeculares, sino a la densidad de sus conexiones. Mide cuán interconectadas están las trabéculas óseas, y una mayor densidad de conexiones implica una estructura más fuerte y un menor riesgo de fractura.
- Área total de la superficie del hueso trabecular (mm^2). Refleja la complejidad y extensión de la estructura.
- Nivel medio de gris (mean grey value): se refiere al valor promedio de intensidad en la imagen micro-CT, se relaciona con la densidad mineral ósea del tejido, pero no es una medida directa de densidad absoluta.

Con el software BoneJ2, además de medir los parámetros numéricos, obtuvimos imágenes de todas las muestras en formato 2D y 3D, lo que nos permitió observar gráficamente su complejidad estructural y visualizar sus dimensiones trabeculares (Figura 5).

4. Evaluación de la estructura ósea cortical y de la composición ósea mediante microscopía electrónica y difracción de rayos X.

4.1. Corte, fijación y preparación de las muestras

El proceso comenzó con el corte en láminas finas de las tibias, de entre 5 y 10 mm de grosor,

evitando el sobrecalentamiento del hueso durante el corte para no alterar su microestructura. Para ello, se empleó un minitaladro equipado con un disco de diamante de doble cara de 22 mm de diámetro y 0.15 mm de grosor, que permitió realizar cortes precisos.

A continuación, las láminas obtenidas se sometieron a un proceso de fijación, mediante una inmersión en una solución de glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 24 horas a 4°C. (Figura 6)

Tras la fijación, las muestras se sometieron a un proceso de secado introduciéndolas en estufa a 40°C durante 72 horas para eliminar la humedad. Posteriormente, se montaron en un soporte de aluminio con cinta de carbono para

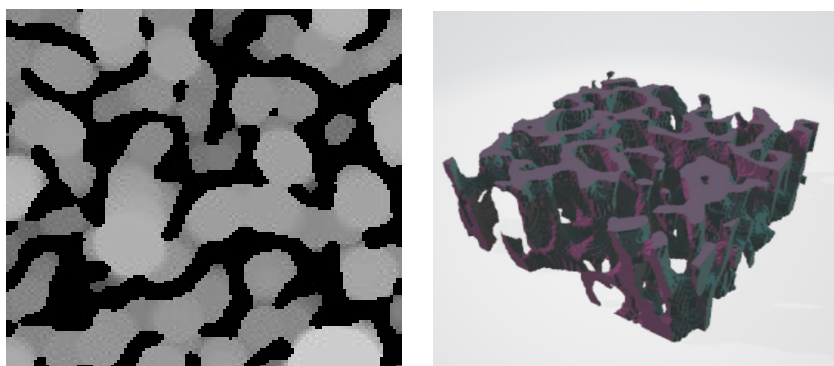


Figura 5. Ejemplos de imágenes en 2D y reconstrucción en 3D de la estructura ósea de la tibia, obtenidas a partir de imágenes de microtomografía computarizada (microTC) y procesadas con el software *BoneJ2* (<https://bonej.org/>).

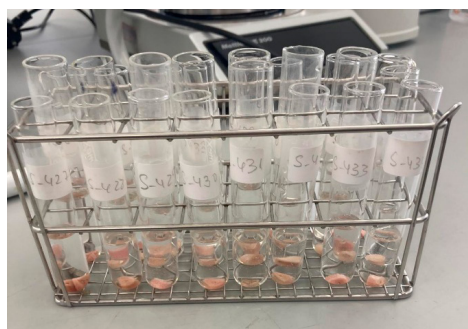


Figura 6. Muestras óseas fijadas por inmersión en una solución de glutaraldehído al 2.5 % en PBS.

evitar el movimiento y asegurar la conductividad. Por último, se aplicó un recubrimiento de platino de 5 nm (Leica EM ACE 600, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) a las muestras montadas para crear una capa conductora y mejorar la calidad de las imágenes microscópicas (Figura 7).



Figura 7. Muestras óseas tras la fijación, montadas en soportes de aluminio con cinta de carbono para evitar el movimiento y asegurar la conductividad, preparadas para su análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

4.2. Análisis de la estructura ósea cortical

Las muestras óseas se observaron mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM, modelo Apreo S LowVac IML, Thermo Fisher, Waltham, MA USA) disponible en el Servicio de Microscopía y Análisis de Imagen de la Universidad de Murcia. Se adquirieron imágenes con un voltaje de aceleración de 20 kV (HV) y una distancia de trabajo (WD) de 9,9 mm, empleando el detector de electrones secundarios (SE) para obtener información topográfica de la superficie. Se tomaron micrografías a diferentes niveles de magnificación (Mag): inicialmente todas las muestras se observaron a 50x para tener una visión general de la superficie cortical de la tibia; posteriormente cuatro muestras

procedentes de cuatro sujetos machos (dos WT y dos KO), se observaron a 1500x para identificar posibles diferencias ópticas entre las muestras como detalles en la forma y distribución de los poros, la textura de la matriz mineral o la presencia de irregularidades (Figura 8).

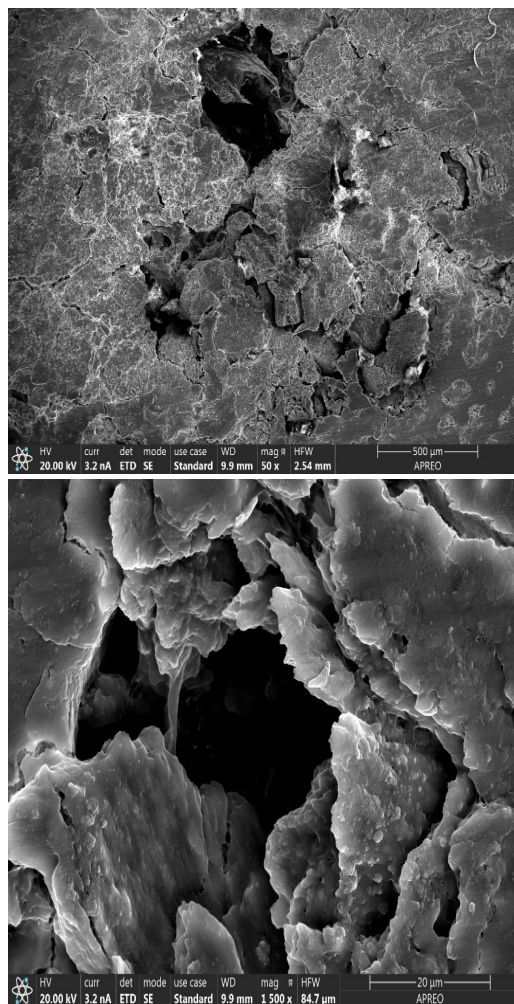


Figura 8. Microfotografías de muestras de la corteza ósea de tibia obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) a aumentos de 50X (imagen superior), 1500X (imagen inferior).

4.3. *Análisis de textura cortical mediante matrices de co-ocurrencia de niveles de gris (Gray Level Co-occurrence Matrix, GLCM)*

Para cuantificar las características de la estructura cortical de la tibia se analizaron las imágenes tomadas a 50x aumentos mediante un análisis de textura basado en matrices de co-ocurrencia de niveles de gris (Gray Level Co-occurrence Matrix, GLCM) a partir de imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM), utilizando el software ImageJ.

Las imágenes fueron convertidas a formato de 8 bits (256 niveles de gris) y sometidas a una normalización del contraste previa al análisis, con el objetivo de minimizar diferencias debidas a la adquisición de la imagen. En cada imagen se seleccionaron cinco regiones de interés (ROIs) de dimensiones equivalentes y localizadas en áreas corticales comparables, garantizando la consistencia espacial entre muestras y animales.

Todas las imágenes fueron analizadas utilizando un único ángulo de orientación (0°) en el cálculo de la GLCM, con el fin de evitar posibles sesgos derivados de la anisotropía direccional y asegurar la comparabilidad entre muestras. A partir de las matrices GLCM se calcularon los siguientes parámetros texturales:

- Angular Second Moment (ASM) o Energy, que mide la uniformidad de la textura y el grado de orden estructural. Valores elevados de ASM indican una textura más homogénea, regular y poco compleja, mientras que valores bajos reflejan una mayor heterogeneidad e irregularidad estructural.
- Contraste, que cuantifica la variación de los niveles de gris y las diferencias entre píxeles vecinos. Valores elevados de contraste se asocian a una mayor rugosidad microestructural y a cambios bruscos en la organización de la matriz, mientras que valores reducidos indican superficies más suaves y uniformes.

- Correlation, que evalúa la dependencia lineal entre los niveles de gris de píxeles adyacentes. Valores altos de correlación indican patrones más predecibles y organizados, mientras que valores bajos reflejan una estructura más aleatoria o caótica.
- Inverse Difference Moment (IDM) o Homogeneity, que mide la similitud local de los niveles de gris. Valores elevados de IDM son indicativos de una textura homogénea, mientras que valores bajos se asocian a una textura más irregular.
- Entropy, que refleja el grado de complejidad y desorden de la textura. Una entropía elevada indica patrones complejos y desorganizados, mientras que valores bajos corresponden a estructuras más simples y ordenadas.

4.4. *Análisis de la composición porcentual de elementos mediante microscopia electrónica de barrido y análisis de espectroscopia de rayos X de dispersión de energía*

Los análisis de la composición química de las muestras óseas mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo (FESEM-EDX) se realizaron con un microanalizador Octane Plus EDAX ((AMETEK/EDAX LLC, Mahwah, NJ, USA) con un voltaje de 20kV, acoplado al microscopio Apreo S LowVac IML (Thermo Fisher, Waltham, MA USA).

Para cada muestra se seleccionaron siete áreas de análisis distribuidas sobre la superficie cortical. En las cuatro primeras se analizaron espectros en modo automático, sin restringir la búsqueda de elementos, con el fin de identificar los componentes principales detectados de forma automática por el sistema.

En las tres áreas restantes, se añadieron manualmente a la lista de búsqueda los elementos potasio (K), hierro (Fe), zinc (Zn) y estroncio (Sr), con la finalidad de verificar su presencia en concentraciones bajas.

Este procedimiento permitió identificar los elementos principales presentes en la matriz ósea cortical y comparar sus proporciones relativas entre los diferentes grupos experimentales.

Las variables analizadas fueron las siguientes:

- Porcentaje en peso (Weight %): porcentaje del peso total que representa cada elemento en la zona analizada.
- Porcentaje atómico (Atomic %): porcentaje relativo del número de átomos de cada elemento, se calcula a partir del porcentaje en peso teniendo en cuenta el peso atómico de cada elemento.
- Intensidad neta (Net Int): intensidad neta del pico característico del elemento, cuanto mayor sea más fuerte es la señal del elemento.
- Error porcentual (Error %) estimado en la medición del elemento.

5. Análisis estadístico

En primer lugar, se realizó una prueba para comprobar si las variables seguían una distribución normal. Como el número de datos era de 24 (dos mediciones por animal), debemos utilizar la

prueba de Shapiro-Wilk. Para las variables que se van a medir, el valor de P es mayor de 0.05 (excepto para la variable Surface área $p=0.023$). Por tanto, siguen una distribución normal y se pueden utilizar tests paramétricos como ANOVA.

Posteriormente se realizó un análisis de ANOVA de una vía y un factor anidado (individuo dentro de genotipo). Y se analizaron las correlaciones de Pearson entre las variables. Los resultados se muestran como media $\pm$ error estándar de la media (sem). El nivel de significación se consideró con $p<0.05$. Todos los análisis se realizaron con el software IBM SPSS Statistics v28 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

RESULTADOS

1. Evaluación de la estructura ósea mediante micro-CT

Se observaron diferencias entre ambos grupos de animales en cuanto al volumen del hueso, la relación entre el volumen del hueso y el volumen total y el grosor trabecular, con valores superiores en los animales TPC2KO que en los animales WT ($p<0.05$, Tabla 1). Por el

Tabla 1. Valores de la estructura ósea (media $\pm$ error estándar de la media) en tibias de animales con delección del gen TPC2 (TPC2KO) y animales del grupo control (WT). Valores de probabilidad para el factor genotipo eID (Gen): factor correspondiente al individuo, anidado dentro del grupo de genotipo.

Parámetro	TPC2KO	WT	Genotipo P value	ID (Gen) P value
Peso (gr)	1411.50 $\pm$ 128.45	1185.83 $\pm$ 5.17	0.080	
Volumen de hueso	2.40 $\pm$ 0.06	2.27 $\pm$ 0.06	0.046	0.022
Fracción de volumen óseo	0.37 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	0.016	<0.001
Grosor trabecular	0.18 $\pm$ 0.00	0.17 $\pm$ 0.00	<0.001	<0.001
Espaciado trabecular	0.29 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.01	0.384	<0.001
Área de superficie	51.49 $\pm$ 1.17	51.38 $\pm$ 1.06	0.834	<0.001
Nivel medio de Gris	289.95 $\pm$ 59.62	263.81 $\pm$ 52.92	0.320	<0.001
Característica de Euler	-150.75 $\pm$ 9.10	-144.58 $\pm$ 11.98	0.219	<0.001
Corrección de Euler-	-168.67 $\pm$ 8.59	-164.52 $\pm$ 13.58	0.467	<0.001
Conectividad-	169.66 $\pm$ 8.59	165.52 $\pm$ 13.58	0.467	<0.001
Densidad de la conectividad-	25.89 $\pm$ 1.31	25.26 $\pm$ 2.07	0.467	<0.001

contrario, se obtuvieron valores similares para el espaciado trabecular, el área de superficie y la densidad trabecular. Los valores de gris que estiman la densidad ósea también fueron similares. Todo ello apunta a que existe un patrón de osificación ligeramente diferente entre ambos genotipos. (Figura 9, Tabla 1)

Se analizaron las correlaciones de Pearson entre las variables medidas. De manera interesante los pesos de los animales no estaban correlacionados con ninguna de las variables del hueso. El volumen óseo (BV) y la fracción ósea sobre el volumen total (BV/TV) estaban directamente relacionados con el área de la superficie ósea trabecular y el nivel medio de gris e inversamente relacionados con el espaciamiento trabecular (Tb,Sp).

El grosor (Tb,Th) y el espaciamiento trabecular (Tb,Sp) estuvieron correlacionados entre sí. La densidad de la conectividad se correlacionó negativamente con el grosor y el espacia-

miento trabecular, y positivamente con el área superficial (Tabla 2, Figura 10).

2. Evaluación de la composición ósea mediante microscopía electrónica y difracción de rayos X.

2.1. Estructura ósea evaluada por microscopía electrónica.

Los resultados relacionados con el análisis cualitativo de las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico mostraron a 1500x aumentos que los animales WT presentaban una matriz con amplia porosidad, con cavidades irregulares, una superficie rugosa y una organización heterogénea. En cambio, las muestras TPC2KO presentaban una superficie más compacta y homogénea, con porosidad reducida, ausencia de cavidades grandes y una textura más lisa (Figura 11).

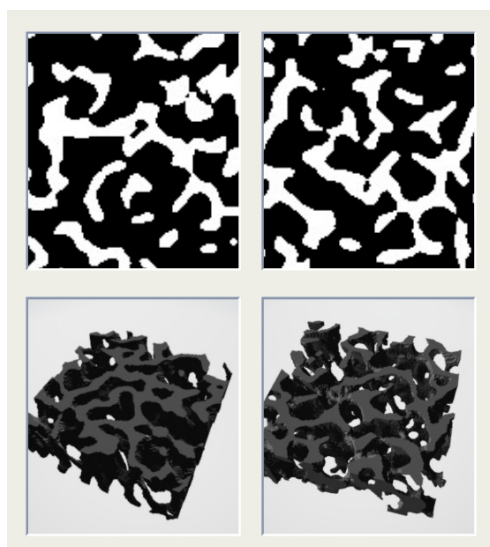


Figura 9. Imágenes en 2D y reconstrucciones en 3D de la estructura ósea de la tibia, obtenidas mediante microtomografía computarizada (microTC) y procesadas con el software BoneJ2 (<https://bonej.org/>). El panel izquierdo corresponde a un animal con delección del gen TPC2 (TPC2 KO), mientras que el panel derecho corresponde a un animal del grupo control (WT).

Tabla 2. Correlaciones de Pearson entre el peso y las variables medidas en los huesos.

	Peso	BV	BV/TV	Tb,Th	Tb,Sp	Área	Nivel Gris	Euler char	Conn.D
Peso (gr)	--								
BV	.403	--							
BV/TV	.403	.994**	--						
Tb,Th	.398	.395	.395	--					
Tb,Sp	-.112	-.625**	-.625**	.411*	--				
Área	.098	.701**	.701**	-.335	-.964**	--			
Nivel Gris	.248	.682**	.682**	-.119	-.705**	.680**	--		
Euler char	-.243	-.400	-.400	.376	.786**	-.800**	-.374	--	
Conn. D	.151	.270	.270	-.429*	-.715**	.712**	.287	-.978**	--

*p value <0.05 **p values<0.01
BV: Volumen hueso. BV/TV: Fracción de volumen óseo. Tb,Th: Grosor trabecular. Tb,Sp: Espaciado trabecular. Euler char: Característica de Euler. Conn.D: Densidad de conectividad

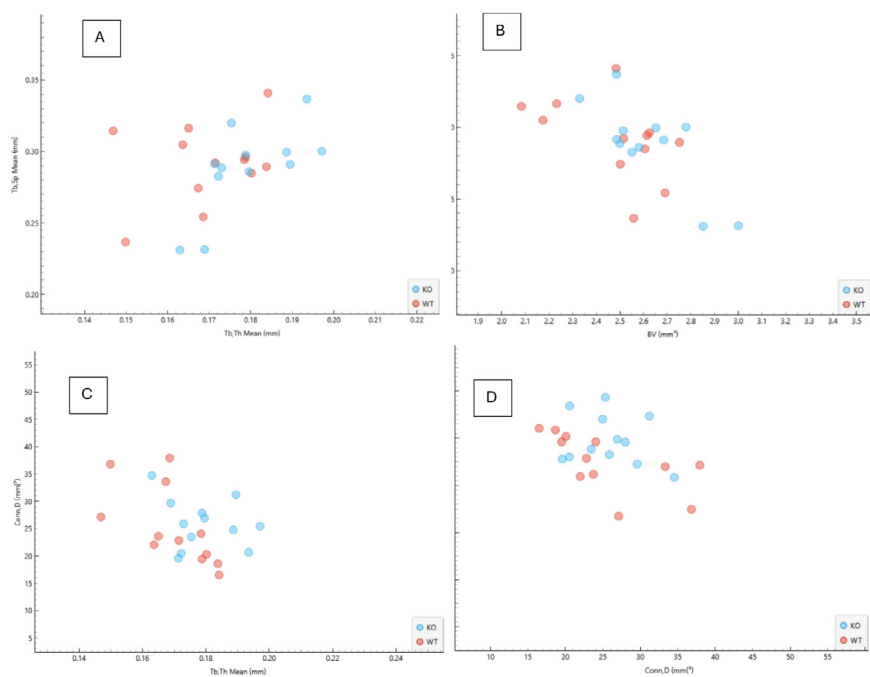


Figura 10. Distribución de puntos de las variables analizadas de la estructura ósea en tibias de animales con delección del gen TPC2 (TPC2KO, azul) y animales del grupo control (WT, rojo). A. Grosor (Tb,Th) y espaciado trabecular (Tb Sp) ($r=0.411$, $p<0.05$). B. Volumen óseo (BV) y espaciado trabecular (Tb Sp) ($r=-0.625$, $p<0.01$). C. Grosor trabecular (Tb,Th) y densidad de conectividad (Conn. D) ($r=-0.429$, $p<0.05$) y D. Espaciado trabecular (Tb Sp) y densidad de conectividad (Conn. D) ($r=-0.715$, $p<0.01$).

En el resto de las imágenes a 50x aumentos no se aprecian diferencias significativas entre las diferentes muestras.

2.2. Análisis de textura cortical mediante GLCM

Los valores medios ($\pm$ desviación estándar) de los parámetros GLCM analizados en animales TPC2 KO y WT se resumen en la Tabla 3.

Los animales WT presentaron valores significativamente más elevados de contraste, lo que indica una mayor variación local de los

niveles de gris y sugiere una mayor rugosidad y complejidad microestructural de la corteza tibial en comparación con los animales TPC2KO. De forma consistente, los animales KO mostraron valores ligeramente superiores de homogeneidad (IDM) y valores inferiores de entropía, lo que apunta a una organización cortical más uniforme y menos compleja. No se observaron diferencias claras entre genotipos en los parámetros ASM ni Correlation.

En conjunto, los resultados del análisis GLCM indican que la corteza tibial de los ani-

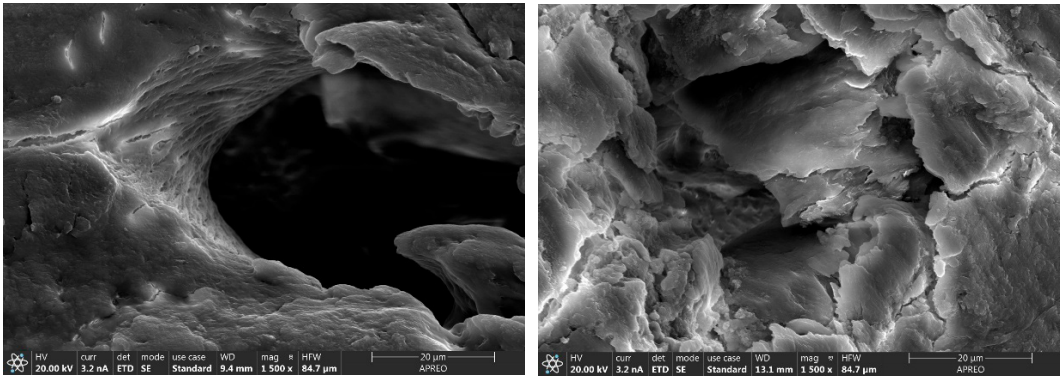


Figura 11. Microfotografías de muestras de la corteza ósea de tibia obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE SEM) a 1500x aumentos. Imagen izquierda: tibia de animal con delección del gen TPC2 (TPC2KO). Imagen derecha: animal del grupo control (WT).

Tabla 3. Análisis de la textura cortical mediante matrices de co-ocurrencia de niveles de gris (Gray Level Co-occurrence Matrix, GLCM) medidos en tibias de animales con delección del gen TPC2 (TPC2KO) y animales del grupo control (WT). Valores de probabilidad para el factor genotipo y el factor correspondiente al individuo, anidado dentro del grupo de genotipo ID (Gen).

Parámetro	TPC2KO	WT	Genotipo P value	ID (Gen) P value
ASM	0.24 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.04	0.571	0.281
Contraste	203.49 $\pm$ 0.24	278.85 $\pm$ 0.25*	0.031	< 0.001
Correlación	0.38 $\pm$ 0.04	0.40 $\pm$ 0.04	0.756	0.590
Homogeneidad	0.23 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.02	0.256	0.002
Entropía	8.08 $\pm$ 0.15	8.28 $\pm$ 0.16	0.358	0.022

ASM, Angular Second Moment (ASM)

males TPC2KO presenta una textura más homogénea y menos compleja que la observada en los animales WT, caracterizada principalmente por un menor contraste y una menor entropía. Este patrón sugiere una organización microestructural más uniforme de la matriz cortical en ausencia de TPC2, mientras que los animales WT muestran una estructura más heterogénea y rugosa.

Estas diferencias, detectables ya a nivel microestructural, son compatibles con alteraciones tempranas en los procesos de formación y organización de la matriz ósea cortical, y refuerzan la utilidad del análisis GLCM como herramienta sensible para identificar cambios sutiles en la arquitectura ósea asociados al genotipo.

2.3. Evaluación de la composición elemental del hueso

2.3.1. Calibración del sistema de evaluación de composición elemental del hueso

En el presente estudio se abordó la comparación de los resultados obtenidos tras la evaluación de la composición mediante un sistema automático del espectro frente al sistema en el que se añadieron manualmente a la lista de búsqueda los elementos potasio (K), hierro (Fe), zinc (Zn) y estroncio (Sr).

Tras el análisis de los datos, se llegó a la conclusión de que los valores obtenidos para sodio por el proceso manual deben excluirse debido a que presentan un error cercano al 100 % y valores próximos a cero y significativamente menores a los obtenidos por el sistema automático ($p < 0.01$). Por lo tanto, el análisis de este elemento se basa únicamente en los valores obtenidos por el sistema automático. Por el contrario, los valores de hierro (Fe) y potasio (K) solo están disponibles en la valoración manual.

Finalmente, se observó que el porcentaje atómico de nitrógeno (N) fue mayor en el sistema manual en comparación con el sistema automático, con valores de 12,27% y 11,87%,

respectivamente ($p = 0.045$). En las tablas definitivas se presentan los datos de porcentajes en peso y atómico de los diversos elementos. Los datos de los elementos C, Ca, Mg, N, O y P provienen de las siete áreas medidas por sistema automático (cuatro) y manual (tres). Por su parte, los valores de Fe y K solo proceden de las tres áreas medidas por sistema manual y los de Na, exclusivamente, de las cuatro áreas medidas por sistema automático.

2.3.2. Comparativa de la composición elemental en huesos de animales TPC2KO y WT

Se observó que los valores de Mg en el grupo TPC2KO son superiores a los del grupo control tanto en porcentajes de peso como atómicos (Tablas 4 y 5).

DISCUSIÓN

El cerdo es uno de los modelos más adecuados para el estudio de la estructura ósea y de patologías del sistema esquelético, debido a la similitud anatómica y fisiológica con el ser humano (Luthje et al., 2018). La estructura del hueso cortical y trabecular, así como su ritmo de crecimiento y remodelado, presentan características comparables en humanos, convirtiéndose en un modelo adecuado para el análisis de procesos de mineralización, remodelado óseo y enfermedades del hueso (Luthje et al., 2018).

Este estudio tuvo por objetivo evaluar las posibles diferencias en estructura y composición ósea entre animales TPC2KO y sus controles. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en los parámetros volumen óseo (BV), la fracción ósea sobre el volumen total (BV/TV) y el grosor trabecular (Tb.Th), con valores superiores en los animales TPC2KO respecto a los controles WT. Estos hallazgos sugieren que la delección del gen TPC2 podría alterar la dinámica de remodelado óseo, favoreciendo la acumulación de tejido mineralizado y modificando la organización trabecular.

Tabla 4. Valores de porcentaje en peso de los diversos elementos químicos medidos en tibias de animales con delección del gen TPC2 (TPC2KO) y animales del grupo control (WT). Valores de probabilidad para el factor genotipo y el factor correspondiente al individuo, anidado dentro del grupo de genotipo ID (Gen).

Parámetro	TPC2 KO	WT	Genotipo P value	ID (Gen) P value
C	6.631±0.280	6.289±0.280	0.338	<0.001
Ca	32.910±0.487	32.813±0.487	0.888	<0.001
Fe	0.271±0.011	0.281±0.011	0.536	0.015
K	0.002±0.001	0.005±0.001	0.124	<0.001
Mg	0.416±0.018	0.359±0.018	0.024	<0.001
N	8.482±0.129	8.302±0.118	0.303	<0.001
Na	1.630±0.070	1.660±0.070	0.791	<0.001
O	39.930±0.393	39.623±0.393	0.581	0.004
P	16.347±0.171	16.347±0.171	0.998	<0.001

C, carbono; Ca, calcio; Fe, hierro; K, potasio; Mg, magnesio; N, nitrógeno; Na, sodio; O, oxígeno; P, fósforo.

Tabla 5. Valores de porcentaje atómico de los diversos elementos químicos medidos en tibias de animales con delección del gen TPC2 (TPC2KO) y animales del grupo control (WT). Valores de probabilidad para el factor genotipo y el factor correspondiente al individuo, anidado dentro del grupo de genotipo ID (Gen).

ELEMENTO	TPC2KO	WT	Genotipo P value	ID (Gen) P value
C	11.486±0.420	11.012±0.420	0.425	<0.001
Ca	18.036±0.385	17.897±0.385	0.798	<0.001
Fe	0.105±0.005	0.109±0.005	0.504	0.003
K	0.001±0.001	0.003±0.001	0.204	0.014
Mg	0.364±0.016	0.313±0.016	0.022	<0.001
N	12.071±0.125	11.842±0.114	0.176	<0.001
Na	1.520±0.060	1.540±0.060	0.869	0.002
O	53.987±0.521	53.463±0.521	0.477	<0.001
P	11.540±0.186	11.481±0.186	0.822	<0.001

C, carbono; Ca, calcio; Fe, hierro; K, potasio; Mg, magnesio; N, nitrógeno; Na, sodio; O, oxígeno; P, fósforo.

Este efecto es coherente con el papel descrito de TPC2 en la osteoclastogénesis, donde su actividad regula las oscilaciones de calcio necesarias para la diferenciación y función osteoclástica (Notomi et al., 2012; Notomi et al., 2017; Notomi et al., 2021). Sin embargo, la regulación del remodelado óseo es un proceso complejo que involucra múltiples canales y transportadores iónicos (Ribet et al., 2021). Por tanto, los cambios observados no pueden atribuirse exclusivamente a la pérdida de TPC2, sino al efecto combinado de distintas vías reguladoras.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) refuerzan esta interpretación: las muestras TPC2KO presentan una superficie más compacta y homogénea, con menor porosidad y ausencia de cavidades grandes, en contraste con la estructura más rugosa y heterogénea observada en los WT. Esta apreciación cualitativa es coherente con los resultados del análisis GLCM indican que la corteza tibial de los animales TPC2KO presenta una textura más homogénea y menos compleja que la observada en los animales WT.

Uno de los hallazgos más relevantes de este estudio fue el incremento significativo del contenido de magnesio (Mg) en el tejido óseo de los animales TPC2KO en comparación con los controles WT, mientras que el resto de los elementos analizados, incluidos Ca y P, no mostraron diferencias significativas entre grupos.

La presencia de Mg en el hueso se ha descrito como resultado de una sustitución parcial por Ca^{2+} en la estructura de la hidroxiapatita biogénica, dando lugar a apatitas menos cristalinas y más solubles (Serre et al., 1998; Londoño-Restrepo et al., 2019). Este tipo de mineral se asocia a un tejido óseo más joven, en fase de remodelado activo o con un grado de maduración mineral incompleto. Por lo que el aumento de Mg observado en los animales TPC2KO podría reflejar una alteración en la dinámica de mineralización ósea, compatible con un tejido mineral menos maduro y más dinámico, confiriendo al hueso más flexibilidad y menor rigidez.

Por otra parte, el Mg desempeña además un papel relevante en la regulación de la actividad de osteoblastos y osteoclastos. Niveles elevados de Mg se han asociado con una mayor actividad osteoblástica y con fases tempranas de mineralización. De manera que el incremento de Mg detectado en los animales TPC2KO podría estar relacionado con una alteración del equilibrio entre formación y resorción ósea (Bystrov et al., 2023; Garbo et al., 2020).

Este hallazgo resulta consistente con el papel descrito de TPC2 en la regulación lisosomal del Ca^{2+} y en la señalización intracelular implicada en la diferenciación osteoclástica. La alteración de estas vías podría modificar indirectamente los mecanismos de incorporación y maduración del tejido óseo, dando lugar a una apatita con mayor contenido en Mg, observándose como una mineralización ósea alterada (Notomi et al., 2012; Notomi et al., 2017; Ribet et al., 2021).

Las alteraciones estructurales y en la composición observadas en el hueso de los animales TPC2KO entran dentro de otros estudios que utilizan al cerdo como modelo para analizar las consecuencias óseas de modificaciones genéticas (Braux et al., 2020; Barceló et al., 2025). Trabajos previos han demostrado que la delección o alteración de genes implicados en procesos celulares fundamentales puede traducirse en cambios detectables en la microestructura y composición del hueso. Un ejemplo relevante son los modelos porcinos con el gen CFTR modificado, en los que se han descrito alteraciones en la microestructura ósea y en la composición mineral desde el nacimiento, lo que muestra la sensibilidad del tejido óseo a cambios genéticos específicos (Braux et al., 2020). En la misma línea, estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación en el modelo porcino TPC2KO se ha demostrado mediante microtomografía computarizada del fémur que los animales TPC2KO presentan fémures de menor longitud, con una reducción signi-

ficativa del volumen óseo total, así como una disminución de la densidad y del volumen tanto del hueso cortical como del trabecular, en comparación con animales control WT (Barceló et al 2025). Estos resultados sugieren alteraciones en los procesos de formación y mineralización ósea asociadas a la pérdida de TPC2, respaldando que la delección de este gen podría tener un impacto generalizado sobre el tejido óseo, afectando a diferentes regiones anatómicas (Barceló et al., 2025). En la actualidad se están realizando estudios en la estructura ósea del oído de cerdos TPC2KO que pueden aportar información complementaria a la descrita en este estudio (Barceló et al, datos no publicados).

Las limitaciones de este trabajo deben ser consideradas a la hora de interpretar los resultados obtenidos. En primer lugar, el tamaño muestral, aunque se lograron detectar diferencias significativas en determinados parámetros estructurales y composicionales, podría limitar los resultados. Por otra parte, el estudio se ha realizado sobre muestras óseas post mortem, lo que impide evaluar la evolución de los cambios asociados a la delección de TPC2 a lo largo de la vida del animal. Estas limitaciones muestran la necesidad de futuros estudios que permitan profundizar en los mecanismos moleculares y funcionales implicados. Estos estudios deberían incluir estudios longitudinales que permitan determinar la progresión de los cambios estructurales y de la composición del hueso a lo largo del desarrollo, así como evaluaciones densitométricas que permitan analizar la microestructura y la resistencia ósea. Además, serán necesarios estudios moleculares que exploren en profundidad la interacción entre TPC2 y otras vías de señalización implicadas en la homeostasis ósea. En conjunto, estos avances facilitarán una comprensión más precisa del papel de TPC2 en la fisiología ósea y respaldarán su potencial como diana terapéutica en patologías relacionadas con el remodelado del tejido óseo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las tibias de los cerdos TPC2KO apoyan la hipótesis de que la delección de TPC2 altera la estructura ósea: los animales KO presentaron un aumento del volumen óseo, de la fracción ósea sobre el volumen total y del grosor trabecular en comparación con los controles WT, mientras que el espaciado trabecular, el área de superficie y los índices de conectividad no mostraron diferencias significativas. Las observaciones cualitativas por SEM evidenciaron una corteza más compacta y homogénea en los KO, lo que es coherente con una remodelación alterada, estas diferencias fueron confirmados con datos cuantitativo del análisis de GLCM. El análisis SEM-EDX reveló un incremento significativo de magnesio (Mg) sin cambios en el contenido de calcio (Ca) y fósforo (P), lo que es compatible con una mineralización menos madura y una mayor dinámica de formación. Aunque el tamaño de la muestra y el carácter post mortem limitan la generalización, la convergencia entre micro-CT, SEM y composición elemental sugiere que la pérdida de TPC2 modula la osteoclastogénesis y la mineralización, lo que podría tener un impacto funcional sobre la resistencia del tejido. Estos resultados refuerzan el valor del modelo porcino TPC2KO para estudiar los mecanismos de remodelación ósea y abren la puerta a investigaciones para cuantificar la repercusión biomecánica y explorar el posible papel de TPC2 como diana terapéutica en los trastornos óseos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen su apoyo y ayuda al personal del Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI) de la Universidad de Murcia (Servicios de Microscopía, Análisis de Imagen y Experimentación Animal), así como a los miembros del Departamento de Fisiología.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Trabajo realizado gracias a la financiación de la Fundación Séneca–Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, en el marco de los proyectos 22065/PI/22, 22545/PDC/24, 3031/GERM/25 y FSRM/10.13039/100007801.

REFERENCIAS

1. Barceló, M. D., García-García, M. I., Pardo Fernández, F. J., Quintero, A., Cano Davó, J. A., Piñero Silva, C., & Gadea, J. (2025, noviembre 18–21). *Evaluación de la estructura ósea del fémur mediante microtomografía computarizada en modelos porcinos TPC2KO*. XVIII Congreso Nacional SE-CAL, Bilbao, España.
2. Barceló, M. D., Navarro-Serna, S., Piñeiro Silva, C., Fernández-Martín, I., Crespo, S., Briski, O., Parrington, J., & Gadea, J. (2023). *Manejo y rendimiento reproductivo de una colonia de cerdos knock out para el gen TPC2 en heterosis*. En XX Jornadas de Producción Animal AIDA (p. 218). Zaragoza, España.
3. Ben-Zvi, Y., Reznikov, N., Shahar, R., & Weiner, S. (2017). 3D architecture of trabecular bone in the pig mandible and femur: Inter-trabecular angle distributions. *Frontiers in Materials*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmats.2017.00029>
4. Braux, J., Jourdain, M. L., Guillaume, C., Untereiner, V., Piot, O., Baehr, A., Klymiuk, N., Winter, N., Berri, M., & Buzoni-Gatel, D. (2020). CFTR-deficient pigs display alterations of bone microarchitecture and composition at birth. *Journal of Cystic Fibrosis*, 19, 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.10.023>
5. Bystrov, V. A., Komlev, V. S., Fedotov, A. Y., Kovalchuk, M. V., & Barinov, S. M. (2023). Magnesium substitution in hydroxyapatite: Experimental and DFT analysis. *Materials*, 16(1), 135. <https://doi.org/10.3390/ma16010135>
6. Domander, R., Felder, A. A., & Doube, M. (2021). BoneJ2: Refactoring established research software (Version 2). *Wellcome Open Research*, 6. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16619.2>
7. Doube, M., Kłosowski, M. M., Arganda-Carreras, I., Cordelières, F. P., Dougherty, R. P., Jackson, J. S., Schmid, B., Hutchinson, J. R., & Shefelbine, S. J. (2010). BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone*, 47, 1076–1079. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.08.023>
8. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021). *FAOSTAT database*. <https://faostat.fao.org/>
9. Gadea, J., Navarro-Serna, S., Piñero-Silva, C., Quintero, A., Barceló, M. D., Crespo, S., Carrillo, J., Romero, J., García Olmo, D. C., Parrington, J., Romar, R., & Matás, C. (2024). Metodología para la generación de cerdos editados genéticamente. *Animales de Laboratorio*, 102.
10. Garbo, C., Locs, J., Dindune, A., Berzina-Cimdina, L., & Cimdins, R. (2020). Multion substituted hydroxyapatite: Structural and mechanical correlations. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 8359–8377. <https://doi.org/10.2147/IJN.S271977>
11. García-Garduño, M. V., & Reyes-Gasga, J. (2006). La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(2), 90–95.
12. Hou, N., Du, X., & Wu, S. (2022). Advances in pig models of human diseases. *Animal Model and Experimental Medicine*, 5, 141–152. <https://doi.org/10.1002/ame2.12214>
13. Lagostena, L., Minicozzi, V., Meucci, M., Gradogna, A., Milenkovic, S., Palombi, F., Ceccarelli, M., Filippini, A., & Carpaneto, A. (2025). The two-pore channel 2 in human physiology and diseases: Functional characterisation and pharmacology. *International Journal of Molecular Sciences*, 26. <https://doi.org/10.3390/ijms26199708>

14. Londoño-Restrepo, S. M., Millán-Montero, M., & Rodríguez-García, M. E. (2019). Comparative study of biogenic hydroxyapatite obtained from bovine, porcine, and human bones: Thermal stability, crystallinity, and chemical composition. *Scientific Reports*, 9, 8240. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44717-6>
15. Luthje, F. L., Skovgaard, K., Jensen, H. E., & Kruse Jensen, L. (2018). Pigs are useful for the molecular study of bone inflammation and regeneration in humans. *Laboratory Animals*, 52, 630–640. <https://doi.org/10.1177/0023677218766391>
16. Navarro-Serna, S., Hachem, A., Canha-Gouveia, A., Hanbashi, A., Garrappa, G., Lopes, J. S., Paris-Oller, E., Sarrias-Gil, L., Flores-Flores, C., Bassett, A., Sánchez, R., Bermejo-Álvarez, P., Matás, C., Romar, R., Parrington, J., & Gadea, J. (2021). Generation of nonmosaic, two-pore channel 2 biallelic knockout pigs in one generation by CRISPR-Cas9 microinjection before oocyte insemination. *CRISPR Journal*, 4, 132–146. <https://doi.org/10.1089/crispr.2020.0082>
17. Notomi, T., Ezura, Y., & Noda, M. (2012). Identification of two-pore channel 2 as a novel regulator of osteoclastogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 35057–35064. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.357459>
18. Notomi, T., Kuno, M., Hiyama, A., Nozaki, T., Ohura, K., Ezura, Y., & Noda, M. (2017). Role of lysosomal channel protein TPC2 in osteoclast differentiation and bone remodeling under normal and low-magnesium conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 292, 20998–21010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.817585>
19. Notomi, T., Hiyama, A., & Nozaki, T. (2020). Establishment of RANKL-highly sensitive RAW264 subclones in accordance with high expression of TPC2. *Journal of Translational Science*, 6. <https://doi.org/10.15761/JTS.1000266>
20. Notomi, T., Kise, C., Kobayashi, R., Otsuka, M., Momota, Y., Ezura, Y., & Kawazoe, T. (2021). TPC1 and TPC2 promote osteoclastogenesis. *Journal of Hard Tissue Biology*, 30, 333–338. <https://doi.org/10.2485/jhtb.30.333>
21. Odgaard, A., & Gundersen, H. J. G. (1993). Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3D reconstructions. *Bone*, 14, 173–182. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(93\)90245-6](https://doi.org/10.1016/8756-3282(93)90245-6)
22. Ribet, A. B. P., Ng, P. Y., & Pavlos, N. J. (2021). Membrane transport proteins in osteoclasts: The ins and outs. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 644986. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.644986>
23. Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
24. Serre, C. M., Papillard, M., Chavassieux, P., Voegel, J. C., & Boivin, G. (1998). Influence of magnesium substitution on the physical properties of hydroxyapatite: XRD and FTIR studies. *Biomaterials*, 19(24), 2323–2329. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00118-5)
25. Yavropoulou, M. P., & Yovos, J. G. (2008). Osteoclastogenesis: Current knowledge and future perspectives. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 8(3), 204–216. PMID: 18799853.

LISTA DE ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS

Abreviatura	Definición (EN)	Definición (ES)
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments	Investigación animal: directrices para la comunicación de experimentos in vivo
ASM	Angular Second Moment	Momento angular de segundo orden
BV	Bone Volume	Volumen óseo
BV/TV	Bone Volume Fraction (Bone Volume/Total Volume)	Fracción de volumen óseo (volumen óseo/volumen total)
Conn	Connectivity	Conectividad
Conn.D	Connectivity Density	Densidad de conectividad
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas / proteína asociada a CRISPR 9
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine	Imágenes digitales y comunicaciones en medicina
EDX	Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy	Espectroscopía de rayos X por dispersión de energía
FE-SEM	Field Emission Scanning Electron Microscopy	Microscopía electrónica de barrido con emisión de campo
GLCM	Gray Level Co-occurrence Matrix	Matriz de co-ocurrencia de niveles de gris
HAP	Hydroxyapatite	Hidroxiapatita
HV	High Voltage	Alto voltaje
IDM	Inverse Difference Moment	Momento de diferencia inversa
KO	Knockout	Knockout (inactivación genética)
micro-CT	Micro-Computed Tomography	Microtomografía computarizada
NAADP	Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate	Fosfato de dinucleótido de adenina del ácido nicotínico
NFATc1	Nuclear Factor of Activated T cells 1	Factor nuclear de células T activadas 1
PBS	Phosphate Buffered Saline	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand	Ligando del receptor activador del factor nuclear κ B
ROI	Region of Interest	Región de interés
SEM	Scanning Electron Microscopy	Microscopía electrónica de barrido
SEM-EDX	Scanning Electron Microscopy coupled with Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy	Microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopía de rayos X por dispersión de energía
sgRNA	Single Guide RNA	ARN guía simple
Tb.Sp	Trabecular Spacing	Espaciado trabecular
Tb.Th	Trabecular Thickness	Espesor trabecular
TPC2	Two-Pore Channel 2	Canal de dos poros 2
TV	Total Volume	
WD	Working Distance	
WT	Wild Type	