

11262

7
2eJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Posgrado e Investigación

CONSUMO DE REFRESCOS DE COLA Y OSTEOPOROSIS EN RATAS OOFORECTOMIZADAS

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

p r e s e n t a

FERNANDO MARTIN GARCIA CONTRERAS



México, D. F.

259415 Marzo de 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TUTOR ACADÉMICO: Dr. JOSÉ DANTE AMATO MARTÍNEZ

COTUTORES: Dr. JOSÉ RAMÓN PANIAGUA SIERRA

Dra. LOURDES CABRERA MUÑOZ

INVESTIGADORES PARTICIPANTES:

1. Dra. IRMA MARTÍNEZ. JEFE DE RADIODIAGNÓSTICO. HOSPITAL DE PEDIATRÍA. CMN S XXI.
2. QUÍMICA MARCELA ÁVILA. HOSPITAL DE PEDIATRÍA. CMN S XXI
3. Dr. ENRIQUE FOYO NIEMBRO. CIRUGÍA EXPERIENTAL. CMN S XXI
4. QUÍMICA OLGA GAJÁ RODRÍGUEZ. UIMEN. HE CMN S XXI.
5. QUÍMICA ADELA RAMÍREZ DEL ÁNGEL. UIMEN. HE CMN S XXI.
6. QUÍMICO CARLOS MONTOYA. UIMEN. HE CMN S XXI.
7. INV ASOCIADO B GUADALUPE GARCÍA BULNES. UIMEN HE CMN S XXI.

AGRADECIMIENTOS:

A mi esposa Lupita y mis hijos Caro y Fernando que me apoyaron y motivaron para llegar hasta el final.

INDICE

RESUMEN ESPAÑOL	4
RESUMEN INGLES	5
ANTECEDENTES CIENTÍFICOS	6
REFRESCO DE COLA	6
REFRESCO DE COLA Y METABOLISMO MINERAL	7
OSTEOPOROSIS	10
OSTEOPOROSIS Y REFRESCOS DE COLA	11
MATERIAL Y MÉTODOS	16
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	28
REFERENCIAS	38

RESUMEN

CONSUMO DE REFRESCOS DE COLA Y OSTEOPOROSIS EN RATAS OOFORECTOMIZADAS.

INTRODUCCIÓN: Los refrescos de cola contienen sustancias que en forma aislada se han tratado de relacionar con osteoporosis, los fosfatos y la cafeína son dos de éstas sustancias. Se utiliza un modelo animal para poner a prueba el efecto del refresco sobre el hueso.

OBJETIVO: A) Determinar si la ingestión de refresco de cola con ácido fosfórico incrementa el desarrollo de osteoporosis en ratas ooforectomizadas. B) Determinar si la desnutrición de las ratas que consumen refresco es la responsable del desarrollo de osteoporosis.

MATERIAL Y MÉTODOS: **Objetivo A:** Se estudiaron ratas hembras de la cepa Sprague Dawley de 9 meses de edad, distribuidas en forma aleatoria en cuatro grupos de diez. A los grupos C, P y A se les realizó ooforectomía bilateral. Al grupo N no se le realizó ninguna intervención quirúrgica. A los cuatro grupos se les ofreció Purina Chow ad libitum, a los grupos C y P se les ofreció refresco de cola de las marcas registradas más populares, a los grupos A y N se les ofreció agua; en todos los grupos la ingestión de líquidos fue ad libitum durante dos meses. Se determinó densidad mineral ósea en fémur, columna lumbar y pelvis, se determinó calcio en ceniza de hueso. En suero sanguíneo se midieron calcio total, calcio iónico, fósforo, fosfatasa alcalina, creatinina, 25-OH-hidroxicolecalciferol y paratohormona. **Objetivo B:** Se estudiaron catorce ratas Sprague Dawley machos de 3 meses de edad, se formaron dos grupos de siete ratas pareadas por peso, se utilizó un sistema de alimentación por pares, a un grupo se le ofreció refresco de cola y se determinó la ingestión diaria de alimento, al otro grupo se le ofreció agua y la misma cantidad de alimento de su contraparte consumidora de refresco de cola, este sistema se utilizó durante dos meses, se midió calcio en ceniza de fémur, calcio iónico, fósforo, albúmina. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis o ANOVA de una vía. Los datos se presenta como media \pm desviación estándar.

RESULTADOS: Para el primer experimento, las características generales de las ratas fueron similares en todos los grupos. La concentración de albúmina en suero sanguíneo fue de 1.43 ± 0.20 , 1.31 ± 0.27 , 1.63 ± 0.55 y 1.71 ± 0.21 g/dl en los grupos C, P, A y N respectivamente con diferencia significativa entre N vs C $p < 0.02$ y N vs P $p < 0.006$. Las concentraciones de fósforo no tuvieron diferencia significativa. El calcio iónico únicamente mostró diferencia entre los grupos P y N. La concentración de fosfatasa alcalina en suero sanguíneo fue de 84 ± 28 , 81 ± 19 , 117 ± 32 y 115 ± 27 en los grupos C, P, N y A respectivamente, con diferencia entre A vs P $p = 0.007$, C vs N $p < 0.02$, A vs C $p < 0.02$ y N vs P $p < 0.001$. La densidad mineral ósea en fémur fue de 0.1549 ± 0.009 , 0.1564 ± 0.007 , 0.1668 ± 0.007 y 0.1889 ± 0.019 g/cm² en los grupos C, P, A y N con diferencia significativa entre C vs A $p < 0.02$, C vs N $p < 0.002$, P vs A $p < 0.02$, P vs N $p < 0.002$ y A vs N $p < 0.006$. La densidad mineral ósea en pelvis mostró únicamente diferencia entre el grupo N y el resto de los grupos y la densidad mineral ósea en columna no mostró diferencia significativa entre los grupos. El contenido de calcio en fémur fue de 0.8818 ± 0.5212 , 0.1425 ± 0.0663 , 1.3581 ± 0.4596 y 1.5207 ± 0.5491 mg/g de tejido seco para los grupos C, P, A y N respectivamente, con diferencia entre P vs N, $p = 0.0002$, P vs C $p = 0.0002$, P vs A $p = 0.0002$ y N vs C $p < 0.02$. En el segundo experimento, las concentraciones de fósforo, fosfatasa alcalina y albúmina no tuvieron diferencia significativa entre ambos grupos. El calcio iónico y el calcio en fémur fueron menores en las ratas que consumieron refresco que las que consumieron agua.

CONCLUSIÓN: El consumo de refrescos de cola incrementó el desarrollo de osteoporosis en ratas ooforectomizadas. Este es independiente del efecto nutricional causado por el consumo de refresco.

ABSTRACT

COLA SOFT DRINKS CONSUMPTION AND OSTEOPOROSIS IN OOPHORECTOMIZED RATS.

INTRODUCTION: Cola soft drinks contain substances that in isolated form have been related to osteoporosis. Phosphate and caffeine are two of these substances. An animal model is used to test the effect of soft drinks on bone.

OBJECTIVE: A) To determine if the intake of cola soft drink with phosphoric acid increases the development of osteoporosis in oophorectomized rats. B) To determine if the malnutrition seen in soft drink-consuming rats is responsible for the development of osteoporosis.

MATERIAL AND METHODS: Objective A: Female Sprague Dawley rats, aged 9 months were randomized to one of four groups, each one formed by 10 rats. Rats belonging to groups C, P and A underwent bilateral oophorectomy. Group N had no surgical intervention. Animals from all the four groups were fed with Purina Chow ad libitum. Groups C and P received cola soft drinks of the two top selling brands. Groups A and N received tap water. In all four groups liquid intake was ad libitum, for two months. Bone mineral density in femur, spine and pelvis was measured as well as calcium content in bone ashes. Total calcium, ionized calcium, phosphates, alkaline phosphatase, creatinine, 25 OH colecalciferol, and PTH were measured. Objective B: Fourteen male Sprague Dawley rats, aged three months were studied. Two groups were formed pairing the animals by weight. A pair-feed system was used. Animals from the first group were fed with Purina Chow ad libitum and cola soft drink. The amount of food consumed daily was measured. The same amount of food consumed by the first animal of each pair was given to the second animal of the pair. Animals of the second group received tap water ad libitum for drinking. This system was followed for two months. Calcium in ashes from the femur, ionized calcium, phosphates, and albumin were measured. Statistical analysis was done with the Kruskal-Wallis test or with one way ANOVA. Data are shown as mean \pm standard deviation.

RESULTS: For the first experiment, the general characteristics of the rats were similar in all the groups. Serum albumin concentration was 1.43 ± 0.20 , 1.31 ± 0.27 , 1.63 ± 0.55 , and 1.71 ± 0.21 g/dl in groups C, P, A and N respectively with significant difference between N and C ($p < 0.02$), and N and P ($p < 0.006$). Serum phosphate concentrations were no significantly different among groups. Ionized calcium was significantly different between groups P and N. Serum alkaline phosphatase concentration was 84 ± 28 , 81 ± 19 , 117 ± 32 , and 115 ± 27 in groups C, P, N, and A respectively, with significant differences between A and P ($p < 0.007$), C and N ($p < 0.02$), A and C ($p < 0.02$), and N and P ($p < 0.02$). Serum creatinine concentration was within normal ranges. Serum levels of 25 OH vitamin D was 15.16 ± 9.6 , 13.68 ± 9.9 , 26.58 ± 7.0 , and 41.07 ± 22.7 ng/dl in groups C, P, A, and N respectively; there were significant differences between C and A ($p < 0.02$), C and N ($p < 0.009$), P and A ($p < 0.02$), and P and N ($p < 0.001$). Femoral bone mineral density was 0.1549 ± 0.009 , 0.1564 ± 0.007 , 0.1668 ± 0.007 , and 0.1889 ± 0.019 g/cm², in groups C, P, A, and N respectively; there were significant differences between C and A ($p < 0.02$), C and N ($p < 0.002$), P and A ($p < 0.02$), P and N ($p < 0.002$), and A and N ($p < 0.006$). Pelvic bone mineral density only showed differences among group N and the rest of the groups. Spine bone mineral density did not show significant differences among groups. Femoral calcium content was 0.8818 ± 0.5212 , 0.1425 ± 0.0663 , 1.3581 ± 0.4596 , and 1.5207 ± 0.5491 mg/g of dry tissue for groups C, P, A, and N respectively; there were significant differences between P and N ($p = 0.0002$), P and C ($p = 0.0002$), P and A ($p = 0.0002$), and N and C ($p < 0.02$). In the second experiment there were no significant differences of phosphate, alkaline phosphatase and albumin between the two groups. Serum ionized calcium and femoral calcium content were lower in the group of rats consuming soft drink than in the group of rats consuming water.

CONCLUSION: Cola soft drink consumption increased the development of osteoporosis in oophorectomized rats. This effect was independent from the nutritional change caused by soft drink consumption.

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

REFRESCOS DE COLA

El consumo de refrescos en México es uno de los más altos del mundo y tiende a aumentar. En 1993 México ocupó el segundo lugar mundial en el consumo de refrescos, con una cifra de 142 litros *per capita* anuales, sólo superado por Estados Unidos de Norteamérica¹. Del total de 14,000 millones de litros de refresco que se vendieron en 1993, 55% fueron para la firma Coca-Cola y 30% fueron para la firma Pepsi-Cola.

El consumo de Coca-Cola ha aumentado de 306 botellas de 355 ml por persona en 1993 a 333 botellas de 355 ml en 1994 y en 1995 disminuyó a 322, quizá en relación con la crisis económica².

El consumo de refrescos de cola está distribuido en forma irregular en el territorio nacional. Ciudades como

Monterrey, México y Toluca tienen consumos anualizados per capita de 685, 351 y 189 botellas de 355 ml respectivamente, en contraste con otros estados como Chiapas y Oaxaca donde el consumo es muy bajo².

Se cree que los refrescos son bebidas inocuas y en ocasiones se consumen como golosinas. Se han usado como tratamiento para deshidratación³ y hay estratos de la población en los que se administran en biberón a lactantes y preescolares⁴.

Los refrescos se han asociado potencialmente a trastornos de muy diversa índole⁵

REFRESCOS DE COLA Y METABOLISMO DE MINERALES

Está descrito que el consumo de refrescos con ácido fosfórico puede ser un factor de riesgo para la producción de litiasis renal⁶⁻⁸, osteoporosis⁹ e hipocalcemia con tetania y convulsiones^{4,10}.

El contenido de fosfatos en los refrescos de cola de

mayor consumo en la República mexicana es de 19.7 y 16.1 mg/100 ml en las dos marcas registradas predominantes en el mercado⁹.

Desde hace tiempo se reconoció que la administración de fosfatos exógenos puede producir hiperfosfatemia e hipocalcemia¹⁰⁻¹². La administración de fosfatos exógenos y la hiperfosfatemia inducen inhibición de la enzima renal 1, α -hidroxilasa de la vitamina D que cataliza la conversión del 25-OH-colecalciferol (calcidiol) en 1 α , 25 dihidroxicolecalciferol (calcitriol), metabolito activo de la vitamina D, cuya disminución se relaciona con la osteoporosis¹³⁻¹⁶.

Las concentraciones de fósforo de los refrescos de cola son superiores a las de la leche humana y apenas inferiores a las de la leche de vaca¹⁷.

Recientemente se informó que el consumo de 1.5 litros o más de refrescos de cola a la semana, puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de hipocalcemia en lactantes, preescolares y escolares^{4, 18}.

La ingestión de grandes cantidades de refresco también puede desplazar a otros nutrientes de la dieta, principalmente a la leche, lo que puede reducir peligrosamente el aporte de calcio¹⁹.

Por otro lado, la concentración de ácido fosfórico hace que el pH de los refrescos de cola sea muy ácido (alrededor de 2.3); el ingreso de hidrogeniones puede dar lugar a acidosis metabólica.

OSTEOPOROSIS

Por osteoporosis se entiende la reducción de la masa ósea por unidad de volumen. Desde el punto de vista histológico, el trastorno se caracteriza por disminución del grosor del hueso cortical compacto y por reducción del número y tamaño de las trabéculas del hueso esponjoso.

La osteoporosis es la enfermedad ósea metabólica más frecuente y es una causa importante de morbilidad en las mujeres mayores de 50 años y en los ancianos²⁰

Se han identificado diversos factores de riesgo para la osteoporosis posmenopáusica, entre los que destacan:

1. Deficiencia de estrógenos ²¹
2. Baja paridad y ausencia de amamantamiento²⁰
3. Menarca tardía²²
4. Deficiencia de calcio en la dieta²³
5. Inmovilización prolongada y sedentarismo^{20,24}
6. Tabaquismo^{20,25}
7. Consumo abundante de alcohol²⁶

8. Consumo de cafeína²⁷⁻³
9. Talla peso bajos³¹
10. Alta ingestión de fosfatos³²
11. Acidosis metabólica¹⁴⁻¹⁶

El desarrollo de osteoporosis, se favorece por pH sanguíneo bajo¹⁴⁻¹⁶, ingreso excesivo de fósforo³² y consumo de cafeína²⁷⁻³⁰, que en forma separada o combinada se han relacionado con su presentación.

La hipótesis de que el consumo de refrescos con ácido fosfórico podría favorecer la osteoporosis se emitió desde 1982 en un artículo en el que no se presentan experimentos, ni observaciones⁹. En los últimos años han aparecido artículos en los que se demuestra la relación de consumo de refrescos de cola con aumento en la incidencia de fracturas³³⁻³⁵, aunque también apareció uno en el que no pudo demostrarse esta relación³⁶.

OSTEOPOROSIS Y REFRESCOS DE COLA

De los diversos ingredientes que contienen los

refrescos de cola, el ácido fosfórico ha sido el principal sospechoso de causar los trastornos del metabolismo del calcio³³. En 1982 se propuso ésta posible asociación⁹.

En 1989 se publicó un estudio en el que se muestra una relación entre el consumo de refrescos de cola y la ocurrencia de fracturas óseas en mujeres atletas con edades entre 21 y 80 años. Se infirió que la posible causa era el contenido de fósforo de los refrescos de cola, los cuales pudieron haber causado osteoporosis y como consecuencia, fracturas³³.

En 1994 el grupo de autores del artículo comentado en las líneas anteriores³³ publicó otro estudio donde se documentó asociación entre el consumo de refrescos de cola y la presencia de fracturas óseas en mujeres jóvenes con edad promedio de 14.3 años de edad. La razón de momios que se calculó fue de 3.59 con un intervalo de confianza al 95% de 1.21 a 10.75, $p=0.022$. En este estudio, la ingestión elevada de calcio tuvo un efecto protector con una razón de momios de 0.284 e intervalo de confianza al 95% de 0.087 a 0.920, $p=0.036$ ³⁴. En

ninguno de estos dos estudios^{33, 34} se midió densidad mineral ósea ni se hicieron estudios histológicos de hueso, lo que puede debilitar las conclusiones de los autores.

En 1997 se publicó un estudio de casos y controles en población griega en el que se trató de determinar si el consumo de productos ricos en calcio, la ingestión de bebidas no alcohólicas y la actividad física son factores de riesgo para la fractura de huesos de niños en edad escolar. Los resultados del estudio muestran una razón de momios para el consumo de bebidas de cola y fracturas óseas de 1.7 con un intervalo de confianza al 95% de 1.2 a 2.6. Sin embargo, también se vio ésta asociación entre el consumo de jugos de frutas y la presencia de fracturas óseas con una razón de probabilidades de 1.6 e intervalo de confianza del 95% de 1.2 a 2.3. En este estudio se concluyó que la asociación se debe a que los niños con mayor actividad física pueden tener mayor riesgo de presentar fracturas, a la vez que requieren mayor consumo de líquidos³⁵

Entre 1988 y 1992 se realizó otro estudio publicado

en 1997, en el que ingresaron 1000 mujeres con edad entre 44 y 98 años. El objetivo fue determinar la asociación entre el consumo de refrescos y la densidad mineral ósea en mujeres adultas. Los resultados no mostraron asociación entre la ingestión de refrescos después de ajustar el análisis por edad, obesidad, ingestión de calcio, ejercicio, consumo de tabaco o alcohol, tiazidas, estrógenos u hormonas tiroideas³⁶.

Los estudios clínicos realizados hasta el momento muestran discrepancias en sus resultados. Sin embargo, excepto en el estudio de Rancho Bernardo³⁶, se encontró asociación entre el consumo de refrescos de cola y el desarrollo de osteoporosis aún en forma indirecta, aunque el estudio de Rancho Bernardo es el único en que se determinó la densidad mineral ósea.

Se ha tratado de explicar la relación del consumo de refrescos de cola con osteoporosis por su contenido de fósforo. Sin embargo, se ha prestado poca atención al posible efecto que pueden tener la cafeína y el pH ácido sobre el metabolismo del hueso.

El objetivo del presente estudio es determinar si el consumo de refrescos de cola disminuye la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo, y a la vez que evaluar si el efecto nutricional provocado por la disminución en el consumo de alimento es el principal responsable de esta disminución.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó un diseño experimental de posprueba y control para determinar si el consumo de refresco disminuye la densidad mineral ósea y se utilizó un diseño de posprueba para determinar el efecto nutricional.

Características de los grupos experimentales para el primer objetivo.

Los animales fueron alimentados con Purina Chow ad libitum. Los líquidos variaron como sigue:

Los grupos experimentales se formaron con ratas ooforectomizadas, las cuales recibieron dos marcas registradas de refresco de cola durante dos meses, respectivamente denominados C y P.

1. El grupo C recibió refresco I ad libitum.
2. El grupo P recibió refresco II ad libitum.

Características de los grupos control

1. El grupo A se formó con ratas ooforectomizadas que recibieron agua ad libitum.
2. El grupo N se formó con ratas sin ooforectomía que recibieron agua ad libitum.

Para el segundo objetivo, se usaron dos grupos de ratas macho, de la cepa Sprague Dawley, de 3 meses de edad.

A un grupo se le ofreció refresco de cola y Purina Chow ad libitum.

Al otro grupo se le ofreció la misma cantidad de alimento que ingirió la rata correspondiente al grupo que consumió refresco.

Descripción general del estudio

Se estudiaron 40 ratas hembras Sprague Dowley de 9 meses de edad distribuidas en forma aleatoria en cuatro grupos denominados C, P, A y N. A los grupos C, P y A se les realizó ooforectomía bilateral, con una técnica quirúrgica similar a la descrita por Giardino y cols³⁷.

Al grupo N no se le realizó ooforectomía. A los cuatro grupos se les ofreció Purina Chow ad libitum. Al grupo C se le ofreció el refresco I ad libitum, al grupo P se le ofreció el refresco II ad libitum y a los grupos A y N se les ofreció agua ad libitum. A los cuatro grupos se les proporcionó el mismo esquema de alimentación durante un periodo de dos meses.

Las ratas se colocaron en jaulas individuales y se determinó la ingestión diaria de líquidos. La ingestión diaria de alimento se consideró como la media aritmética de alimento consumido en tres días consecutivos al final del estudio.

Al cabo de dos meses se efectuó densitometría ósea de columna lumbar, fémur y pelvis, con un densitómetro Hologic QDR modelo 1500 (Hologic Inc, Waltham, Mass) y la imagen se analizó con el paquete RAT WHOLE BODY V5.67. Para la medición, la rata se anestesió con ketamina a dosis de 25 mg/kg y xilasina o droperidol a dosis de 2 mg/kg intraperitoneal, con lo cual se logró mantener estática a la rata. Después, se colocó al animal en decúbito ventral y se midió la densidad

mineral ósea en las zonas mencionadas. El rastreo de cuerpo completo se realizó en un área de 182 X 162 mm. El coeficiente de variación fue de 2% para el estudio de cuerpo completo.

En el experimento para el segundo objetivo se midió el consumo de alimento diario de las ratas del grupo que consumieron refresco de cola y la cantidad registrada se le ofreció a una rata del grupo control en un sistema denominado "alimentación por pares" durante un periodo de dos meses.

Las muestras de sangre se tomaron por punción de la arteria aorta con las ratas anestesiadas con droperidol; después de la toma de sangre se sacrificaron para la disección de los fémures.

El contenido de calcio en hueso, se midió en cenizas de fémur por el método de ion selectivo con un aparato BGElectrolyte (I.L. Diagnostics), previo procesamiento del hueso, mediante eliminación de las masas musculares y almacenamiento en alcohol al 70%. Dos días antes del procedimiento final se dejó el hueso a temperatura de

37° C en un recipiente sin alcohol. Se registró el peso del hueso (peso seco), se trituroó en un mortero y se colocó en un crisol alto de porcelana de 40 ml, se calentó con mechero para la eliminación de gases se expuso a una temperatura de $550 \pm 10^{\circ}\text{C}$ en mufla durante 6 horas. Las cenizas se diluyeron con 1 ml de ácido nítrico al 65% y 4 ml de agua desionizada.

En el suero sanguíneo se midieron calcio total, albúmina, creatinina y fosfatasa alcalina con un equipo Synchron Clinical System CX7delta (Beckman Instruments Inc. Diagnostic System Group. Brea, California).

El calcio ionizado se midió por el método electrodo de ion selectivo en un aparato BGElectrolyte (I.L. Diagnostics).

El calcidiol y el calcitriol se midieron por radioinmunoanálisis (Amersham International plc, Amersham UK).

La fracción 1-34 de la paratohormona se midió por radioinmunoanálisis con el estuche RIK-6118 PTH 1-34

(para rata) de Peninsula Laboratories Inc.

Análisis estadístico: Los datos se muestran como media \pm desviación estándar y las diferencias entre grupos se determinaron según las características de los datos con pruebas de Kruskal-Wallis o ANOVA de una vía. Las diferencias se consideraron significativas si el valor de p era menor o igual a 0.05.

RESULTADOS

Para el primer objetivo, el peso de las ratas al inicio del estudio fue similar. El peso final mostró un incremento significativo en relación con el peso inicial ($p < 0.005$). No hubo diferencia significativa entre los grupos (cuadro 1). En los grupos que consumieron refresco la ingestión excedió en tres veces a la que exhibieron los que consumieron agua ($p < 0.002$), (cuadro 1). La ingestión diaria de alimentos fue casi de la mitad en los grupos que consumieron refresco en comparación con los que consumieron agua (cuadro 1).

La albúmina en suero sanguíneo fue mayor en los grupos que consumieron agua en comparación con los que consumieron refrescos ($p < 0.02$) (cuadro 2). La concentración de fósforo en suero sanguíneo no mostró diferencia significativa entre los grupos en tanto que los de calcio ionizado exhibieron diferencia significativa entre los grupos N vs C y N vs P ($p < 0.02$) (cuadro 2).

La actividad total de fosfatasa alcalina en el suero

sanguíneo fue menor en los grupos que ingirieron refrescos que en los grupos que consumieron agua ($p < 0.02$) (cuadro 2). La concentración de creatinina en suero sanguíneo mostró niveles más altos en los grupos C y N que en los grupos P y A (cuadro 2).

La concentración en suero sanguíneo de 25-OH-colecalciferol fue menor en los grupos que consumieron refrescos, que en los grupos que consumieron agua, su concentración fue de 15.16 ± 9.6 , 13.68 ± 9.9 , 26.58 ± 7.0 y 41.07 ± 22.7 ng/dl en los grupos C, P, A y N respectivamente, con diferencia significativa entre C vs A ($p < 0.02$), C vs N ($p < 0.009$), P vs A ($p < 0.02$) y P vs N ($p < 0.001$), como puede verse en la figura 1.

La densidad mineral ósea (DMO) en el fémur no mostró diferencia significativa entre los grupos que ingirieron refrescos de cola, si bien fue mas baja que en el grupo A y el grupo N. Los valores respectivos fueron de 0.1549 ± 0.009 , 0.1564 ± 0.007 , 0.1668 ± 0.007 y 0.1889 ± 0.019 g/cm² en los grupos C, P, A y N con diferencia significativa entre C vs A ($p < 0.02$), C vs N ($p < 0.002$), P vs A ($p < 0.02$), P vs N ($p < 0.002$) y A vs N ($p < 0.006$)

figura 2.

La densidad mineral ósea en la pelvis sólo mostró diferencia significativa entre el grupo N y el resto de los grupos, sus valores fueron de 0.1944 ± 0.2 , 0.1892 ± 0.01 , 0.2003 ± 0.02 y 0.2229 ± 0.01 g/cm² en los grupos C, P, A y N respectivamente, con diferencia significativa entre C VS N ($p < 0.005$), P vs N ($p = 0.0005$) y A vs N ($p < 0.007$), (figura 3).

La densidad mineral ósea de columna lumbar no mostró diferencias significativas entre los grupos (figura 4).

El contenido de calcio en el fémur fue menor en el grupo P con respecto al resto de los grupos, los valores encontrados fueron de 0.8818 ± 0.5212 , 0.1452 ± 0.0663 , 1.3581 ± 0.4596 y 1.5207 ± 0.5491 para los grupos C, P, A y N respectivamente, con diferencia significativa entre P vs N ($p = 0.0002$), P vs C ($p = 0.0002$), P vs A ($p = 0.0009$) y N vs C ($p < 0.02$) (figura 5).

En el experimento para el segundo objetivo, el peso

de las ratas al inicio del estudio fue prácticamente igual pues se pareó por el peso de los animales. El consumo de alimento fue igual en ambos grupos. En el grupo que consumió refresco su ingestión fue de 144 ± 2.3 ml/día en tanto que el grupo que consumió agua su ingestión fue de 35.3 ± 2.4 ml/día ($p < 0.0001$). El peso final en el grupo que consumió refresco fue de 256.81 ± 16.3 g vs 183.5 ± 19.1 g del grupo que consumió agua ($p < 0.0001$). La concentración en suero sanguíneo del calcio ionizado fue de 1.44 ± 0.2 mmol/l en el grupo que consumió agua vs 1.22 ± 0.07 mmol/l en el grupo que consumió refresco ($p = 0.02$). El contenido mineral óseo (calcio) medido en cenizas de hueso fue de 5.83 ± 0.7 mg/g de tejido seco en el grupo que consumió agua vs 2.29 ± 0.6 mg/g de tejido seco en el grupo que consumió refresco ($p < 0.0001$).

CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

GRUPOS	Refresco I (C)	Refresco II (P)	AGUA (A)	CONTROL (N)
Peso Inicial (g)	305.9 ± 20	302.9 ± 16	302.7 ± 15	304.5 ± 13
Peso final (g)	344.2 ± 5	345.7 ± 19	337.8 ± 26	335.9 ± 22
Consumo de líquidos (ml)	141 ± 4.6*	144 ± 4.6*	37 ± 5.86	35 ± 7
Consumo de alimento (g)	11.76 ± 2.85&	10.05 ± 3.26\$	17.97 ± 1.75	19.15 ± 1.75

Análisis estadístico con Kruskal-Wallis. *C y P vs A y N $p < 0.002$; &C vs A y N $p < 0.0005$; \$P vs A y N $p < 0.0001$

CUADRO 2. MEDICIONES EN SUERO POR ESPECTROFOTOMETRÍA

GRUPOS	Refresco I (C)	Refresco II (P)	AGUA (A)	CONTROL (N)
ALBÚMINA (g/dl)	1.31 ± 0.27*	1.43 ± 0.2**	1.63 ± 0.55	1.71 ± 0.21
CREATININA (mg/dl)	0.65 ± 0.08#	0.52 ± 0.11##	0.54 ± 0.05###	0.64 ± 0.009
CALCIO TOTAL (g/dl)	9.22 ± 0.31	8.4 ± 1.22	9.11 ± 0.35	9.48 ± 0.25
CALCIO IONIZADO (mmol/l)	1.4 ± 0.08	1.36 ± 0.06&	1.41 ± 0.05	1.4 ± 0.02
FÓSFORO (g/dl)	5.78 ± 0.83	4.86 ± 0.82	5.63 ± 1.25	4.9 ± 0.99
FOSFATASA ALCALINA (mg/dl)	81 ± 19 \$	84 ± 24\$\$	117 ± 32	115 ± 27

Análisis estadístico con Kruskal-Wallis.* C vs N p<0.02; ** P vs N p<0.006; # C vs A y P p<0.02;## P vs N p<0.05; ### A vs N p<0.02;& P vs N y C p<0.04;\$ C vs A y N p<0.02;P vs A y N p<0.02

DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación revelan una disminución de la masa ósea, juzgada por dos métodos diferentes como la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo.

El estudio densitométrico mostró disminución de la masa ósea en el fémur de las ratas ooforectomizadas que fue mayor en las que consumieron refrescos de cola que en las que consumieron agua.

La densidad mineral ósea en la columna lumbar fue menor en las ratas ooforectomizadas. Sin embargo ésta disminución no alcanzó significado estadístico entre las que consumieron refrescos de cola y las que consumieron agua, probablemente por un error de tipo II. En forma similar no hubo diferencia estadísticamente significativa en la densidad mineral ósea de la pelvis.

Para demostrar diferencia significativa en la columna lumbar y pelvis, quizá faltó tiempo de exposición y mayor tamaño de muestra, puesto que la masa

muscular de la columna, especialmente los psoas, están desarrollados para mantener la estabilidad corporal, lo que quizá represente un mecanismo protector contra el desarrollo de osteoporosis en la columna lumbar. Éste efecto está de acuerdo con los resultados obtenidos en ratas ooforectomizadas por Yeh³⁸ y Kalu³⁹.

El contenido de calcio en el fémur fue menor en las ratas ooforectomizadas y de éstas, la disminución fue significativamente mayor en las que consumieron refrescos de cola.

Los mecanismos implicados en la disminución de masa ósea como inhibición de la 1α hidroxilasa, hipercalciuria, hipocalcemia e hiperparatiroidismo, el bajo contenido de calcio en los huesos de las ratas que consumieron refrescos de cola, la disminución de la vitamina D, indica disminución de la mineralización del osteoide, por lo que la posibilidad de desarrollo no sólo de osteoporosis sino también de osteomalacia es muy alta.

En la literatura hay poca discusión acerca de la relación entre el consumo de refrescos de cola y el

desarrollo de osteoporosis.

En 1982⁹ se propuso la relación entre el consumo de bebidas con ácido fosfórico y el desarrollo de osteoporosis. El exceso en la ingestión de fosfatos en la dieta de animales no primates acelera la resorción ósea⁴⁰, dietas desbalanceadas en calcio y fósforo causaron osteoporosis e hiperparatiroidismo en monos⁴¹. Se conoce que las modificaciones en la ingestión de fosfatos en las dietas de pacientes sanos se realiza mediante ajustes en la reabsorción tubular del fósforo inorgánico y de las microvellosidades intestinales y causan una relación inversa en las concentraciones de la 1,25 dihidroxicolecalciferol, las dietas altas en fosfatos causan incremento en las concentraciones sanguíneas de fósforo inorgánico⁴². Sin embargo, de acuerdo con la concentración de fosfatos inorgánicos de los refrescos de cola y la cantidad ingerida de los mismos por las ratas, su ingestión máxima de fósforo fue de 28.36 mg/día, en tanto que la ingestión en la dieta fue de 60 mg/día, con ingestión promedio de 10 g/día de Purina Chow, lo que con el calcio ingerido con la misma dieta representa una relación P:Ca de 0.86:1 y las

concentraciones de fósforo en suero sanguíneo estuvieron dentro de los parámetros normales. Se intentó relacionar el consumo de refrescos y su contenido de fosfatos con el desarrollo de osteoporosis. Sin embargo como podemos observar en los resultados, a pesar de una relación P:Ca baja se presentó disminución de la densidad mineral ósea. Esto obliga a postular que además de la ingestión de fosfatos, debería tomarse en cuenta la posibilidad de que hayan intervenido otros factores como el pH ácido de los refrescos o su contenido de cafeína. En efecto, en otros estudios en que se encontró mayor frecuencia de fracturas óseas en individuos que consumieron refrescos con alto contenido en ácido fosfórico, posiblemente el efecto sea por la interacción de sus demás componentes y no únicamente por el ácido fosfórico³³⁻³⁵.

Si bien la explicación proporcionada en uno de estos trabajos³⁵ es muy superficial, ya que no establece que las cantidades de fosfatos ingeridas, así como de cafeína, pueden ocasionar una reducción en la producción de vitamina D3 activa y un hiperparatiroidismo secundario, los jugos de frutas que también se valoraron en dicha investigación no fueron evaluados en relación

con su contenido de elementos capaces de disminuir la densidad mineral ósea que a su vez predisponga a la aparición de fracturas óseas ni explica tampoco porqué no se presentó ésta asociación con el consumo de bebidas diferentes a los refrescos.

Desconocemos en éste momento la cantidad mínima de refresco necesaria para que se desarrolle la enfermedad ósea metabólica, y el modelo posiblemente no refleja el volumen de consumo promedio en humanos, aunque en ciudades como Monterrey y Distrito Federal, el consumo de refrescos con respecto al consumo de agua llega a triplicarse.

Se debe realizar un estudio donde se pueda medir la cantidad mínima y el tiempo mínimo necesarios para que se afecte el metabolismo del calcio y del hueso.

Las concentraciones de ácido fosfórico, el pH, la concentración de cafeína y carbohidratos contenidos en los refrescos de cola necesarias para alterar el metabolismo óseo, posiblemente no sean las que se han publicado en forma aislada y posiblemente entre en juego

un efecto sinérgico entre los diversos componentes de los refrescos.

Con respecto al papel de la nutrición se encontró que las ratas que consumieron refrescos de cola ingirieron casi la mitad de alimento que las ratas que consumieron agua, a la vez que más de tres veces el volumen de líquido al día. Lo anterior pudiera explicar la menor concentración de albúmina del suero, en las ratas que consumieron refresco que en las que recibieron agua. Es decir la alta ingestión de fosfatos y la disminución de la ingestión de alimento y por lo tanto de calcio, son factores que pueden influir en el desarrollo de la osteoporosis⁴³.

En el modelo de "alimentación por pares" se vio una disminución del contenido mineral óseo en las ratas que consumieron refresco comparados con el de las ratas control, a pesar de la desnutrición que presentaron éstas.

El desarrollo de osteoporosis se ha relacionado con ingestión baja de vitamina D, magnesio, boro, fluoruro,

vitamina K, vitamina B12, vitaminas B6 y ácido fólico⁴⁴, por lo que debe considerarse además de la cafeína, el ácido fosfórico de los refrescos de cola, un efecto provocado por la desnutrición.

Un hallazgo importante es haber encontrado concentraciones de 25 hidroxicolecalciferol más bajas en las ratas que consumieron refrescos, en términos de que los mecanismos implicados en el desarrollo de la hipocalcemia como la inhibición de la 1 α hidroxilasa debería causar acumulación de 25 hidroxicolecalciferol, lo anterior lleva a plantear la hipótesis de algún mecanismo alternativo como la inhibición de la 25 hidroxilasa hepática o un efecto causado por el hiperparatiroidismo. De los resultados presentados no es posible determinar la causa real de ésta disminución. Sin embargo, el desarrollo de osteoporosis se asocia con reducción en la actividad del colecalciferol⁴⁵⁻⁴⁸.

La concentración de creatinina reveló diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Sin embargo, no consideramos importante la diferencia desde el punto de vista clínico, pues los valores siempre se

encontraron dentro de la normalidad.

El calcio ionizado únicamente mostró disminución significativa en el grupo P, lo cual pudiera estar relacionado con los niveles más bajos de calcio encontrados en el fémur en éste grupo. Sin embargo, se sabe que la hipocalcemia y los niveles bajos de vitamina D estimulan la secreción de paratohormona, la cual tiende a normalizar los niveles de calcio y causar desmineralización, de tal forma que tanto el calcio total como el calcio ionizado pueden mantenerse sin cambio por resorción ósea incrementada. Haber encontrado niveles bajos de calcio ionizado en el grupo P puede explicarse por alta resorción ósea.

La concentración de fosfatos en el suero no mostró diferencia significativa entre los grupos, probablemente por efecto de hiperfosfaturia secundaria, la cual no se determinó.

La actividad de fosfatasa alcalina estuvo reducida en el suero de las ratas que consumieron refresco de cola, en comparación con las que consumieron agua. Ésta

disminución indica una detención en la osteoformación lo cual forma parte del desarrollo de la osteoporosis. Sin embargo en forma aislada la fosfatasa alcalina no se ha podido asociar con fracturas en pacientes con osteoporosis⁴⁹.

El consumo de cafeína se ha relacionado con el desarrollo de osteoporosis²⁷⁻³⁰, por su inducción de hipercalciuria⁵⁰. Sin embargo, hay estudios donde se considera poca la evidencia de la asociación de la cafeína con la osteoporosis⁵¹⁻⁵³.

El consumo de refrescos de cola con pH ácido conlleva exceso de hidrogeniones que pueden producir acidosis metabólica en ratas inmaduras⁵⁴. La acidemia puede causar hipocalcemia e incremento de la resorción ósea que puede inducir aumento transitorio de calcio, lo que inhibe la secreción de paratohormona y produce hipercalciuria¹³. La acidosis metabólica disminuye la actividad de la 1α hidroxilasa renal y por lo tanto de calcitriol¹⁹. Por el incremento de resorción ósea y disminución de calcitriol, la acidosis metabólica pudiera causar osteoporosis.

Los componentes de los refrescos de cola que pueden causar enfermedad ósea metabólica, en las cantidades presentes en ellos, en forma aislada no explican completamente su papel, por lo que quizá el mecanismo de daño es a través de sus interacciones.

Con éste estudio se puede concluir que el consumo de refrescos de cola está asociado con el desarrollo de enfermedad ósea metabólica, pero falta por discernir el tipo de enfermedad ósea metabólica, el tiempo y la dosis mínima necesarios para su desarrollo y determinar cuál o cuáles de los componentes de los refrescos de cola son los que causan directamente su desarrollo o si son necesarias las interacciones entre los componentes para lograr que se presente.

Queda abierta ésta línea de investigación en un área poco explorada, pero que por la alta exposición a los refrescos de cola y el incremento paulatino en la expectativa de vida y una mayor incidencia de enfermedad ósea metabólica, hacen de éste tema un problema de salud pública.

REFERENCIAS

1. Ramos G. Seguirá en expansión la industria refresquera, opinan industriales. Se consumen en México 142 litros anuales por persona. El Economista 1994 Sep 29:40 (col 1-3).
2. Puertas A. La verdadera guerra de Coca-Cola. Expansión 1996; 5: 36-48.
3. Gingnard JP. Potassium in Coca-Cola (letter). Lancet 1983; 1:474.
4. Mazariegos-Ramos E, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero JF, Paniagua R, Amato D. Alteraciones en el metabolismo del calcio y fosfato secundarias a la ingestión de refrescos fosforados. Bol Med Hosp Infant Mex 1995;52:6-10.
5. Amato D, Maravilla A, García-Contreras F, Paniagua R. Los refrescos y la salud. Rev Invest Clin 1997;49:387-95.
6. Weiss GH, Sluss PM, Linke CA. Changes in urinary magnesium, citrate, and oxalate levels due to cola consumption. Urology 1992; 39:331-3.
7. Shuster J, Jenkins A, Logan C, Barnett T, Riehle R,

- Zackson D, et al. Soft drink consumption and urinary stone recurrence: a randomized prevention trial. J Clin Epidemiol 1992; 45:911-6.
8. Shuster J, Finlayson B, Scheaffer RL, Sierakowski R, Zoltek J, Dzegede S: Primary liquid intake and urinary stone disease. J Chronic Dis 1985;38:907-14.
9. Massey LK, Strang MM. Soft drink consumption phosphorus intake and osteoporosis. J Am Diet Assoc 1982;80:581-3.
10. Benabe JE, Martínez Maldonado M. Disorders of calcium metabolism En: Narins RG, ed. Maxwell & Kleeman's Clinical Disorders of Fluid and Electrolyte Metabolism. 5^a. ed. New York: McGraw-Hill;1994:1009-44.
11. Mizraki A, London RD, Gribetz D, Neonatal hypocalcemia: its causes and treatment. New Engl J Med 1968;278:1163-5.
12. Carpenter TO, Key LL Jr. Disorders of the metabolism of calcium, phosphorus and other divalent ions. En: Ichikawa I, ed. Pediatric Textbook of Fluids and Electrolytes. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990:237-68.

13. Lemman J. The effect of chronic acid loads in normal man: further evidence for the participation of bone mineral in the defense against chronic metabolic acidosis. *J Clin Invest* 1966;45:1608-14.
14. Kruger NS, Sessler NE, Bushinsky DA. Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity in vitro. *Am J Physiol* 1992;262:F442-8
15. Krapft R, Vetsch R, Vetsch W, Hultr HN. Chronic metabolic acidosis increases the serum concentration of 1,25 dihydroxyvitamin D in humans by stimulating its production rate: critical role of acidosis-induced renal hypophosphatemia. *J Clin Invest* 1992;90:2456-63.
16. Kraut JA, Coburn JW. Bone, acid, and osteoporosis. *New Engl J Med* 1994; 330:1776-81.
17. National Research Council. Recommended Dietary Allowances. 10^a ed. Washington DC: National Academy Press 1989:184-187.
18. Mazariegos-Ramos E, Rodríguez Morán M, Guerrero Romero JF, Paniagua R, Amato D. Consumption of soft drinks with fosforic acid as a risk factor for the development of hypocalcemia in children: a case-control study. *J Pediatric* 1995;126:940-2.

19. Won-Lee S, Russel J, Avioli LV. 25-hydroxycholecalciferol: conversion impaired by systemic metabolic acidosis. *Science* 1977;195:994-6.
20. Aloia JF, Cohn SH, Vaswani A, Yeh JK, Yuen K, Ellis K. Risk factors for postmenopausal osteoporosis. *Am J Med* 1985; 78:95-100.
21. Lindsay R, Hart DM, Forrest C, Baird C. Prevention of spinal osteoporosis in oophorectomized women. *Lancet* 1980;2:1151-4.
22. Tuppurainen M, Kroger H, Saarikoski S, Honkanen R, Alhava E. The effect of gynecological risk factors on lumbar and femoral bone mineral density in peri and postmenopausal women. *Maturitas* 1995;21:137-45.
23. Nordin B. The pathogenesis of osteoporosis. *Lancet* 1961;1:1011-14.
24. Johnell O, Nilsson BE. Life style and bone mineral mass in perimenopausal women. *Calcif Tiss Int* 1984;36:354-6
25. Daniel HW. Osteoporosis of the slender smoker. *Arch Intern Med* 1976;136:298-304.
26. Saville PD, Changes in bone mass with age and alcoholism. *J Bone Jt Surg* 1965;47^a:492-99.

27. Hernández-Avila M, Stampfer MJ, Ravnikar VA, Willet WC, Schiff I, Francis M, Longscope C, McKinlay SM, Caffeine and other predictors of bone density among pre and perimenopausal women. *Epidemiology* 1993;4:128-34.
28. Bauer DC, Browner WS, Cauley JA, Orwoll ES, Scott JC, Black DM, Tao JL, Cummings SR. Factors associated with appendicular bone mass in older women. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 1993; 118:741-2.
29. Hernández-Avila M, Colditz GA, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willet WC. Caffeine, moderate alcohol intake, and risk of fractures of the hips and forearm in middle-aged women. *Am J Clin Nutr* 1991;54:157-63.
30. Barrett-Conor E, Chang JC, Edelstein SL. Coffee-associated osteoporosis offset by daily milk consumption. The Rancho Bernardo Study. *JAMA* 1994; 271:280-3.
31. Gertz BD, et al. Monitoring Bone resorption in early postmenopausal women by an Immuno assays for cross linked collagen peptides in urine. *J Bone Min Res* 1994;54:26-29.

32. Calvo MS. The effects of the high phosphorus intake on calcium homeostasis. *Adv Nutr Res* 1994;9:183-207.
33. Wyshak G, Frish RE, Alright TE et al. Non-alcoholic carbonated beverage consumption among women former college athletes. *J Orthop Res* 1989;7:91-99.
34. Wyshak G, Frish R. carbonated Beverages, Dietary Calcium, the Dietary Calcium/Phosphorus Ratio, and Bone Fractures in Girls and Boys. *J Adolesc Health* 1994;15:210-215.
35. Petridou E, Karpathios T, Dessypris N, Simou E, Trichopoulos D. The role of dairy products and non alcoholic beverages in bone fractures among schoolage children. *Scand J Soc Med* 1997; 25:119-25.
36. Kim SH, Morton D, Barrett-Connor EL. Carbonated Beverage Consumption and Bone Mineral Density among Older Women: The Rancho Bernardo Study. *Am J Public Health* 1997; 87:276-279.
37. Giardino R, Fini M, Giavaresi G, Mongiorgi R, Ghudi S, Zati A. Experimental surgical model in osteoporosis study. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1993;69:453-60.
38. Yeh JK, Chen MM, Aloia JF. Ovariectomy-induced high turnover in cortical bone is dependent on pituitary hormone in rats. *Bone* 1996;18:443-50.

- 39.Kalu DN, Echon R, Hollis BW. Modulation of ovariectomy-related bone loss by parathyroid hormone in rats. Mech Ageing Dev 1990;56:49-62.
- 40.Draper H.H, Bell R.R. Nutrition and osteoporosis. En Draper H.H., ed.:Advances in Nutrition Research, Vol 2. New York: plenum Press, 1977.
- 41.Krook L, Barrett RB. Simian bone disease: A secondary hyperparathyroidism. Cornell Vet. 1962; 50:459
- 42.Loghman-Adham. Adaptation to changes in dietary phosphorus intake in health and in renal failure. J Lab Clin Med 1997; 129:176-88
- 43.Lukert BP, Carey M, Mccarty B, Tiemann S, Goodnight L, Helm M, Hassanein R, Stevenson C, Stoskopft M, Doolan L. Influence of nutritional factors on calcium-regulating hormones and bone loss. Calcif Tissue Int 1987; 40:357.
- 44.Bunker VW. The role of nutrition in osteoporosis. Br J Biomed Sci 1994; 51:228-40.
- 45.Hofeldt FD. Vitamin D deficiency: a culprit in metabolic bone disease. Prog Food Nutr Sci 1993;17:377-99.
- 46.Artwell D, Riis BJ, Christiansen C. Comparison of vitamin D metabolism in early healthy and late

- osteoporotic postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 1990;47: 332-7.
47. Fujita T, Matsui T, Nakao Y, Shiozawa S, Imai Y. Cytokines and osteoporosis. *Ann NY Acad Sci* 1990;587:371-5.
48. Nordin BE, Morris HA. Osteoporosis and vitamin D. *J Cell Biochem* 1992; 49:19-25
49. Akesson K, Ljunghall S, Gardsell P, Sernbo Y, Obrant KJ. Serum osteocalcin and fracture susceptibility in elderly women. *Calcif Tissue Int* 1993;53:86-90.
50. Massey LK, Whiting SJ. Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. *J Nutr* 1993;123:1611-4.
51. Douglas Benhamou CL, Tourliere D, Asselin F, Influence of aging on vitamin D metabolism. *Rev Rhum Ed Fr* 1993;60:445-9.
52. Wardlaw GM. Putting osteoporosis in perspective. *J Am Diet Assoc* 1993; 93: 1000-6.
53. David TF, Marian TH, Jennifer JA, Peter WFW. Caffeine and the risk of hip fracture: The Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1990; 132:675-84.

54. Amato D, Maravilla A, Montoya C, Gajá O, Revilla C, Guerra R, Paniagua R. Acute effects of phosphoric acid containing soft drink intake on calcium and phosphate metabolism in immature and adult rats. Rev Inv Clin 1998 (En prensa).

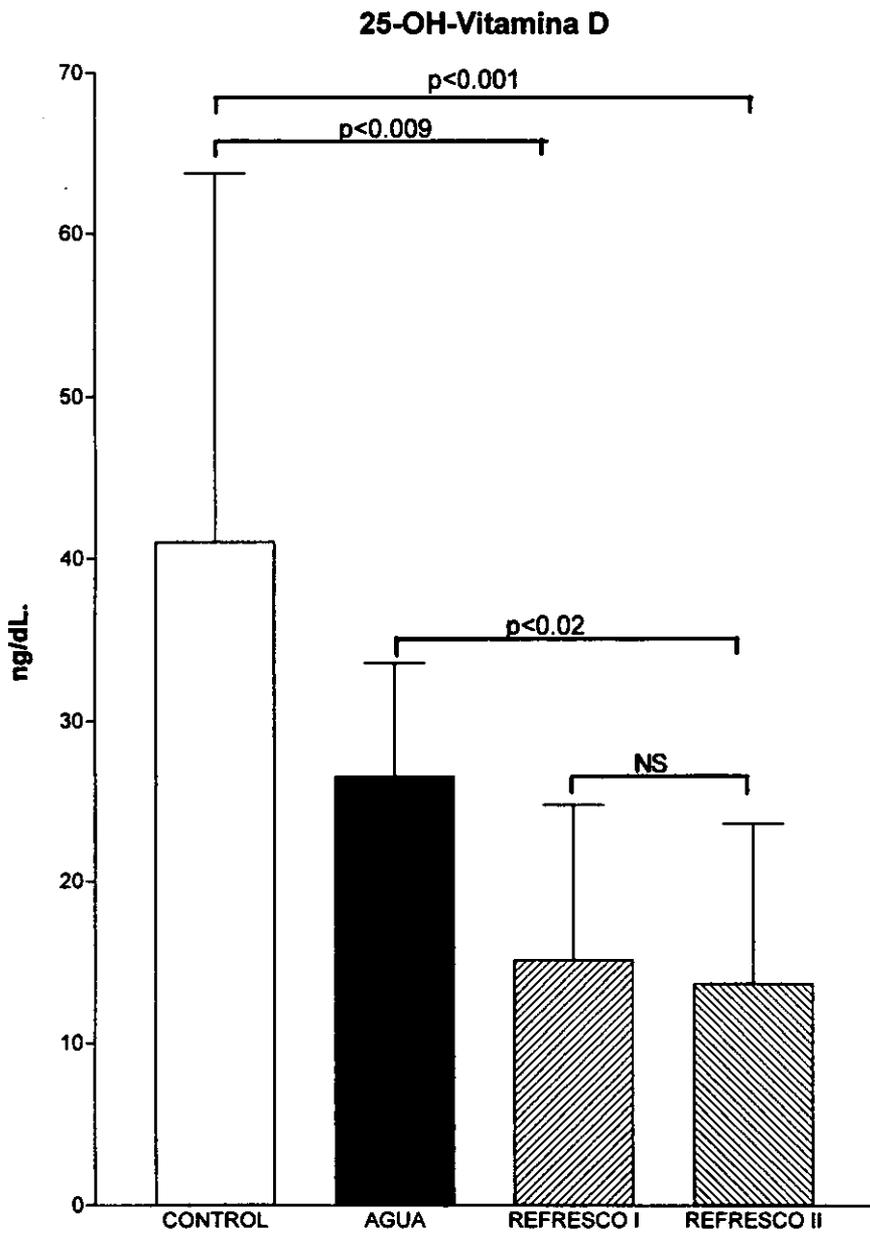


Fig 1. Concentracion de 25-OH-vitamina D.
Análisis estadístico con Kruskal-Wallis.

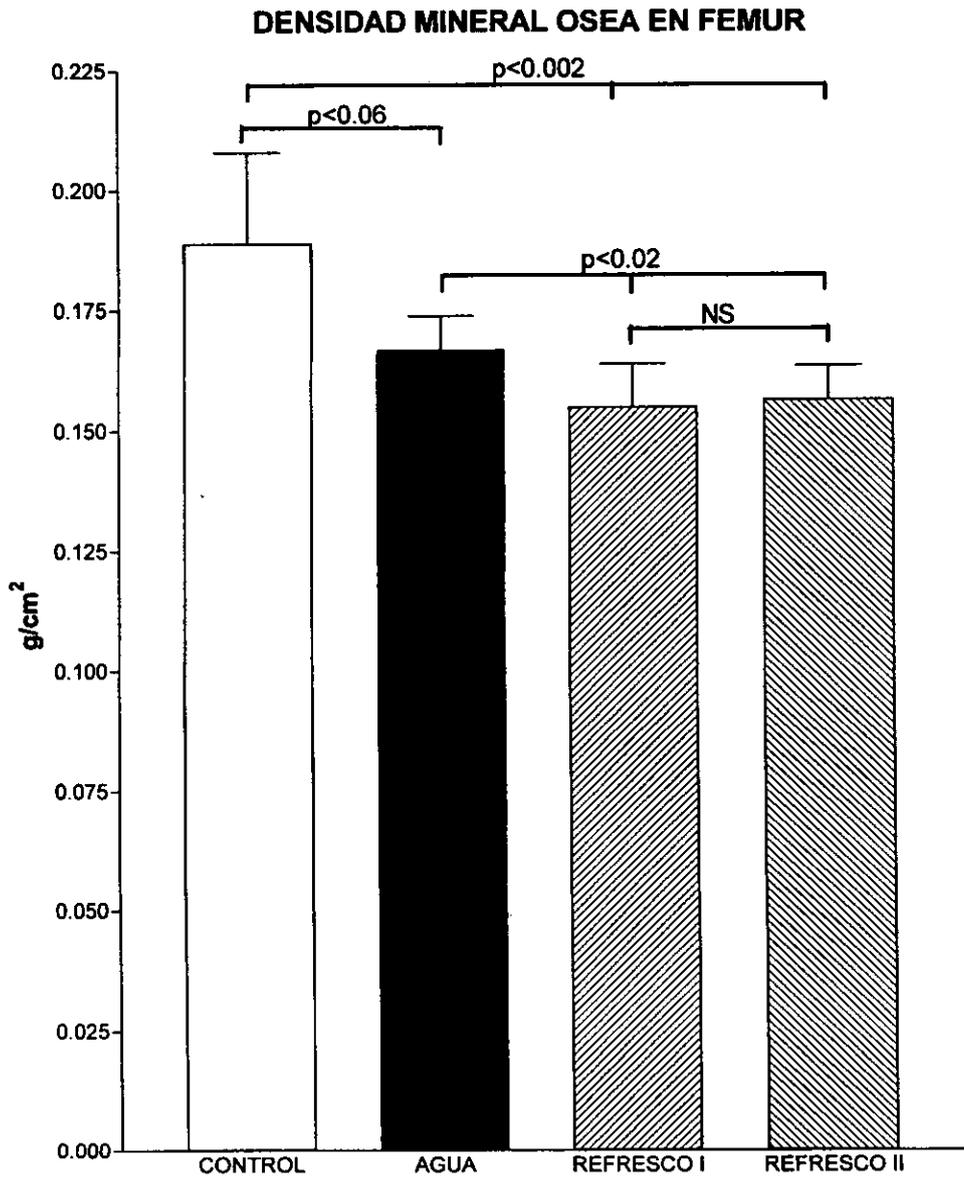


Fig 2. Densidad mineral osea en femur.
Análisis estadístico con Kruskal-Wallis.

DENSIDAD MINERAL OSEA EN PELVIS

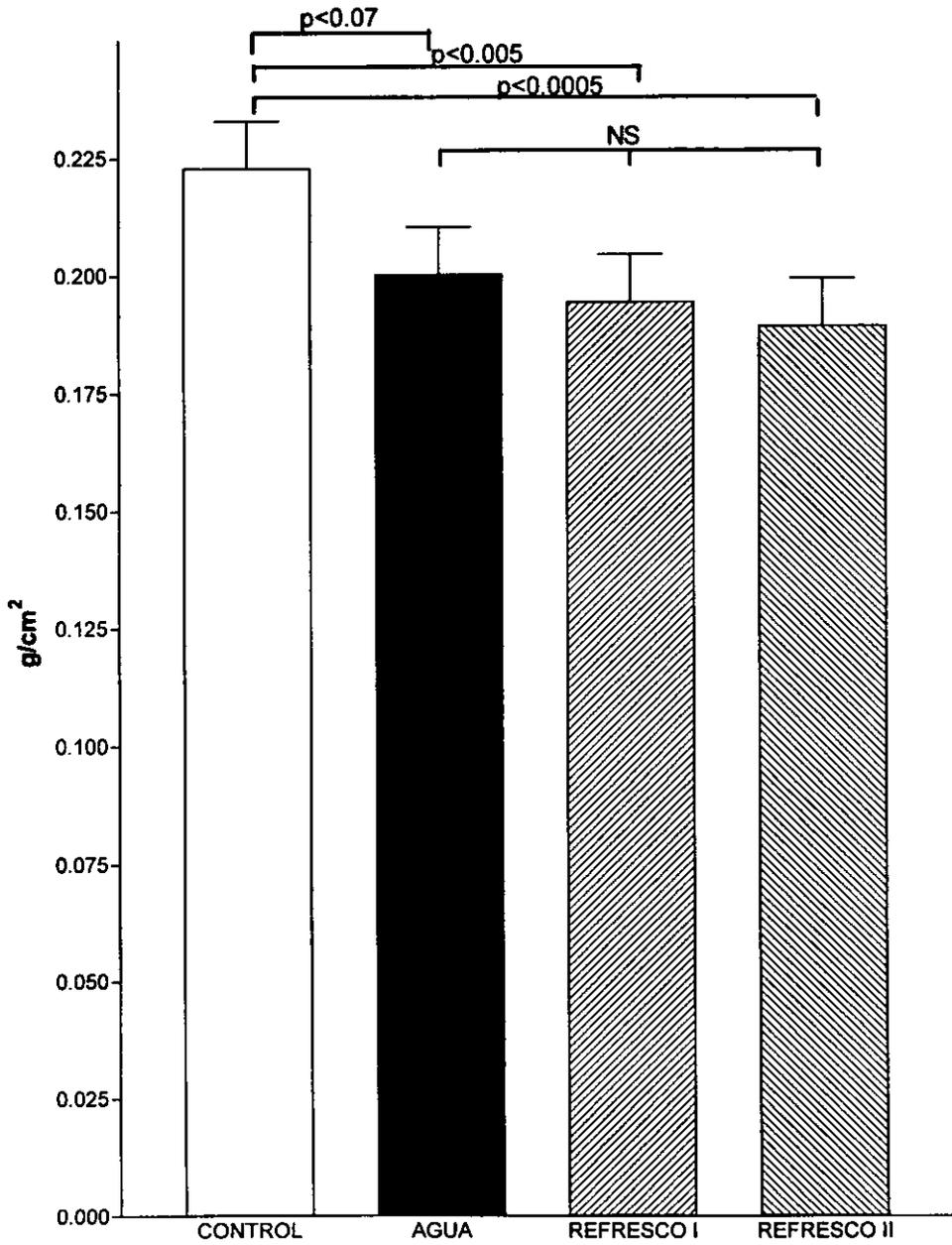
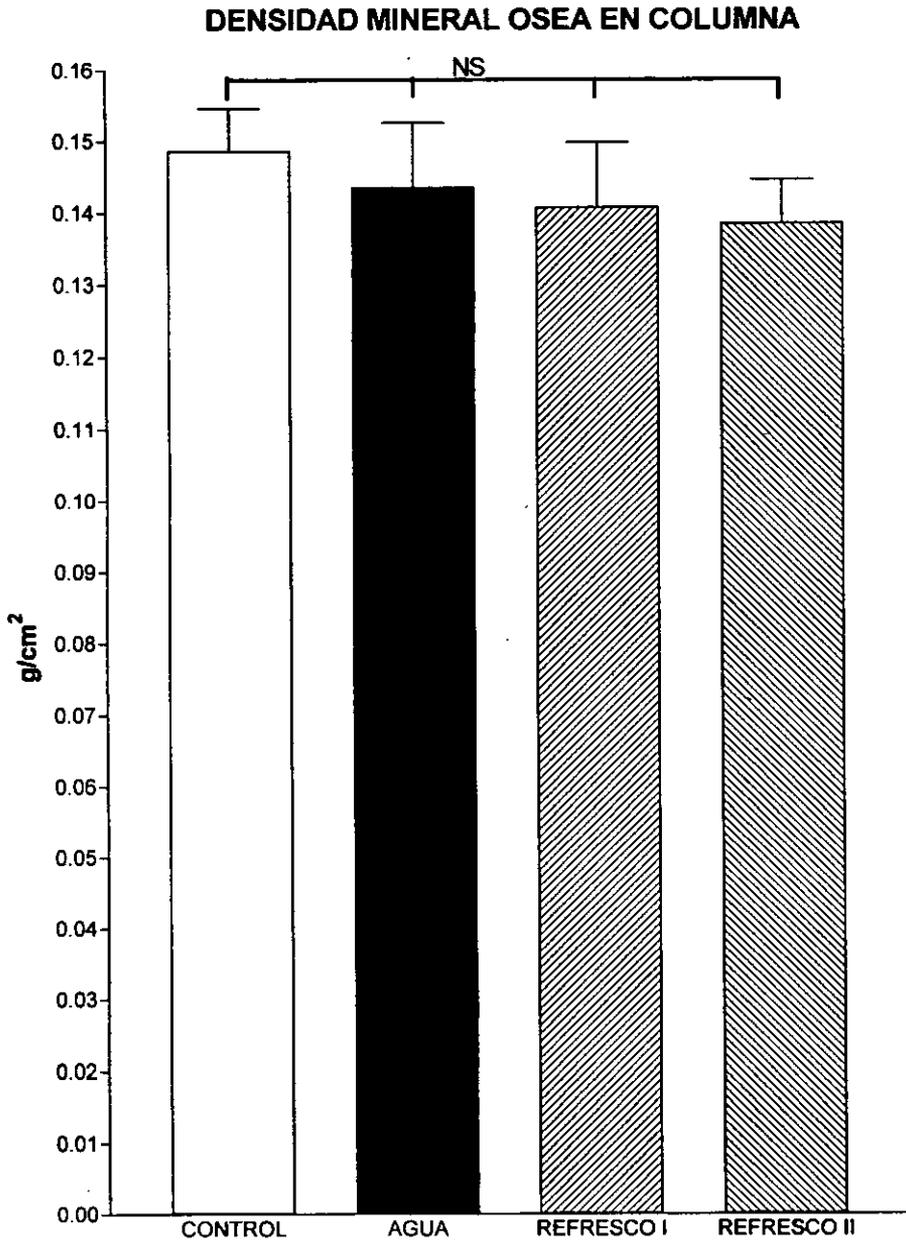


Fig 3. Densidad mineral osea en pelvis.
Análisis estadístico con Kruskal-Wallis.



**Fig 4. Densidad mineral osea en columna lumbar.
Análisis estadístico con Kruskal-Wallis**

CONTENIDO DE CALCIO EN FEMUR DE RATA

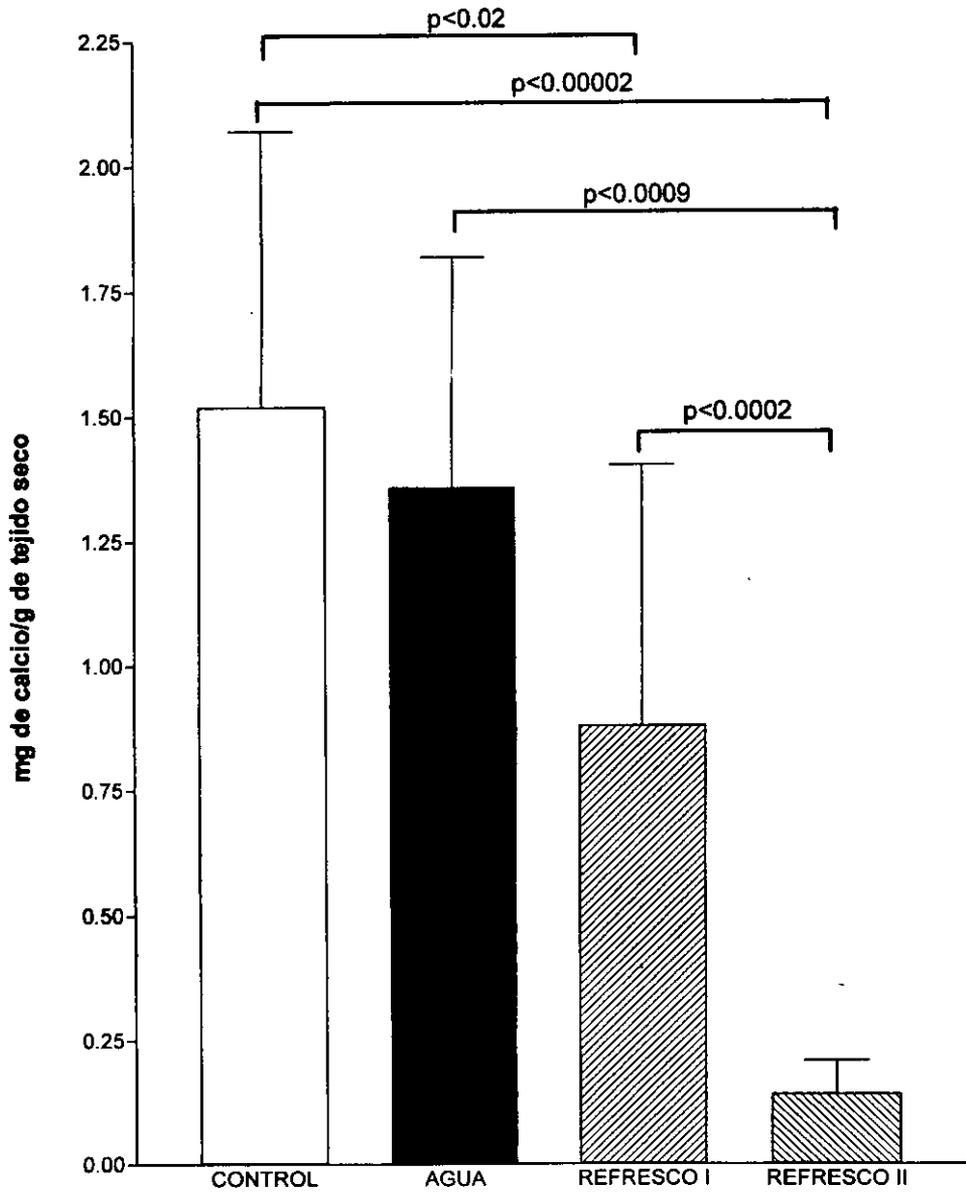


Fig 5. Contenido mineral oseó en fémur.
Análisis con Kruskal-Wallis.

PTH 1-34

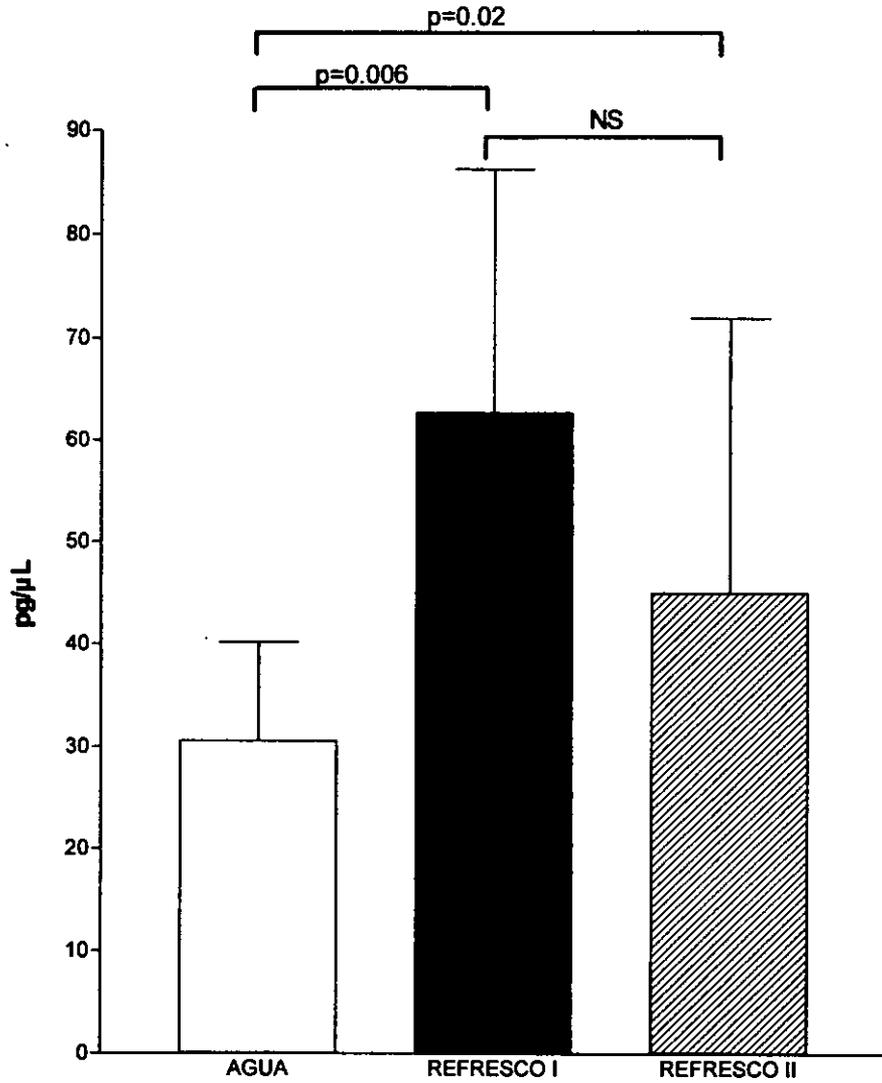


Fig 6. Concentración de PTH 1-34 de rata en los grupos ooforectomizados. Analisis estadístico con la prueba de Kruskal-Wallis.