



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL

Evaluación de Inulina de agave azul (*Agave tequilana Weber Var. azul*) e Inulina de achicoria (*Chicorium intybus*) y su combinación con isoflavonas, sobre los niveles de Calcio en ratas Wistar (Hsd:Wi) Ooforectomizadas.

Tesis que para optar por el grado de Maestra en Ciencias.

Presenta:

Marisol Rivera Huerta

Tutor principal: M. en C. María Isabel Gracia Mora

Facultad de Química. UNAM

Comité tutor: Dra. Laura Romero Romero

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM

Dra. Sonia Mayra Pérez Tapia

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN

México, D.F. junio 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

A Isabel Gracia por creer en mí e impulsarme a seguir aprendiendo, gracias por tu amistad y cariño.

A la Dra. Laura Romero y la Dra. Mayra Pérez por todo su apoyo para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Miguel Ángel Martínez Castillo por su orientación para la elaboración del trabajo escrito y por su amistad.

Al Instituto Nacional de Rehabilitación y al MVZ Hugo Lecona Butrón por ayudarme para realizar las Densitometrías óseas en el Instituto.

A mis padres, hermanos, sobrina y mi cuñado por su apoyo incondicional y cuidarme tanto, los Amo.

A Erick, Luis, Mabel, Lidia y Adriana por ayudarme en el desarrollo experimental de este trabajo, gracias por brindarme su amistad, los quiero mucho.

A la Dra. Graciela Guadalupe Tapia Pérez por ayudarme en la realización del análisis estadístico y sobre todo por su amistad.

Al Ing. Manuel Cruz por su amistad y ayuda.

A ti Francisco Sánchez por apoyarme en la realización de este trabajo y estar siempre que lo necesito, gracias por ser parte de mi vida, Te Amo.

Para no omitir a ninguno de ustedes, mis amigos.....Gracias a todos por su apoyo y su cariño.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, es un orgullo formar parte de ella.

RESUMEN

Los fructanos tipo inulina son prebióticos que estimulan de forma selectiva el crecimiento y actividad metabólica de ciertos grupos de bacterias benéficas en el colon (*Bifidobacterias* y *Lactobacilos*). Tienen un efecto positivo en el hospedador al promover la biodisponibilidad del calcio, mejorando el metabolismo óseo de este mineral y previenen la osteoporosis. El presente estudio se realizó con el objetivo de comparar el efecto de los fructanos de alta pureza obtenidos del agave (DP>10) (Metlin®) y la inulina de achicoria sobre el metabolismo óseo del calcio en ratas Hsd:Wistar ooforectomizadas (OSH) a las 5 semanas de edad. El experimento inició cuando las ratas tenían 8 semanas de edad; formando 7 grupos experimentales con 10 animales cada uno y con los siguientes tratamientos: (1) Inulina de agave y OSH, (2) Inulina de achicoria y OSH, (3) Isoflavonas y OSH, (4) Inulina de agave+isoflavonas y OSH, (5) Inulina de achicoria+isoflavonas y OSH, (6) hembras ooforectomizadas y (7) hembras intactas. Las dosis de inulina de agave y achicoria fueron de 385 mg/día/rata y de isoflavonas 33.5 mg/día/rata en el agua de bebida. Las ratas fueron pesadas cada tercer día durante 60 días. Se obtuvieron muestras de sangre y orina de todas las ratas de forma basal, al primer y segundo mes de tratamiento. Pasado este tiempo los animales fueron sacrificados y se disectó el fémur y la vértebra (T13) de 3 animales de cada grupo para realizar el estudio de densitometría ósea (DMO). Los resultados mostraron un aumento de peso en todos los grupos con ooforectomía (OSH) en relación con el grupo de hembras intactas. Se encontraron diferencias significativas en la química sanguínea para los niveles de Ca^{2+} entre el grupo de Metlin® y OSH, no obstante se encuentran dentro de los valores normales, los datos de DMO mostraron un aumento en la densidad ósea en los grupos tratados con Inulina, tanto de achicoria como de agave siendo la de agave la de mejores resultados. En conclusión, la inulina aumenta la biodisponibilidad de calcio en ratas.

Palabras clave: Calcio, Fructanos, Inulina de agave, Inulina de achicoria, Ooforectomía, Densitometría Ósea.

ABSTRACT

Fructans like inulin are prebiotics that selectively stimulate the growth and metabolic activity of certain groups of beneficial bacteria in the colon (*Bifidobacteria* and *Lactobacilli*). Fructans have a positive effect in the host by promoting the bioavailability of calcium, improving bone metabolism of this mineral and prevent osteoporosis. The present study was conducted with the purpose to compare the effect of high purity fructans obtained from agave (DP> 10) (Metlin®) and chicory inulin on calcium metabolism in bones in ovariectomized (OSH) Hsd:Wistar rats at 5 weeks old. The experiment started at 8 weeks old, establishing seven experimental groups with 10 animals each, with the following treatments: (1) agave inulin and OSH, (2) chicory inulin and OSH, (3) Isoflavones and OSH, (4) agave inulin + isoflavones and OSH, (5) Chicory Inulin + isoflavones and OSH, (6) ovariectomized females and (7) intact females. The agave and chicory inulins doses were 385 mg/day/rat and 33.5 mg of isoflavones/day/rat in drinking water. The rats were weighed every three days for 60 days. We obtained blood and urine samples from all rats at baseline, and at the end of the first and second month of treatment. After this time the animals were sacrificed and femur and vertebra (T13) of 3 animals were dissected in each group to get the bone mineral density (BMD) study. The results showed an increase in weight in all groups with oophorectomy (OSH) in relation to intact female group. Even the Ca_2^+ levels showed normal values for all treated groups, we found significant differences in between Metlin® and OSH groups, BMD data showed increased bone density in groups treated with both, chicory as agave Inulin, being agave inulin with best results. In conclusion, inulin increases the bioavailability of calcium in rats.

Keywords: Calcium, fructans, Agave Inulin, Chicory Inulin, oophorectomy, Bone Densitometry.

INDÍCE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Alimentos Funcionales.....	9
1.2. Prebióticos.....	10
1.3. Fuctanos tipo inulina de Achicoria (<i>Chicorium intybus</i>).....	12
1.4. Fructanos tipo inulina de Agave azul (<i>Agave tequilana</i> Weber Var. azul).....	14
1.5. Calcio	16
1.6. Osteoporosis	19
1.6.1. Epidemiología de la osteoporosis.....	20
1.6.2. Clasificación de la Osteoporosis.....	21
1.6.3. Factores de riesgo para la presentación de la Osteoporosis.....	22
1.6.4. Fisiopatología de la Osteoporosis.....	24
1.6.5. Células de la unidad de remodelación ósea.....	24
1.6.5.1. El osteoclasto.....	24
1.6.5.2. El osteoblasto.....	25
1.6.6. Diagnóstico de la Osteoporosis.....	25
1.6.7. Prevención de la Osteoporosis.....	27
2. JUSTIFICACIÓN.....	29
3. HIPÓTESIS.....	30
4. OBJETIVO.....	31
4.1. Objetivo general.....	31
4.2. Objetivo específico.....	31
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
5.1. Productos utilizados.....	32
5.2. Animales.....	32
5.3. Ooforectomía bilateral.....	32
5.4. Frotis vaginales.....	33
5.4.1. Tinción de Papanicolau.....	34
5.4.2. Tinción de Diff-Quick.....	34
5.5. Esquema de tratamiento.....	35
5.6. Morfometría.....	36
5.6.1. Peso.....	36
5.6.2. Longitud.....	36

5.7. Bioquímica sanguínea.....	36
5.8. Urianálisis.....	37
5.9. Densitometría Ósea.....	38
5.10. Necropsia.....	38
5.11. Histopatología.....	39
5.12. Análisis Estadístico.....	39
6. RESULTADOS.....	40
7. DISCUSIÓN.....	46
8. CONCLUSIONES.....	48
9. ANEXOS.....	49
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Factores de riesgo de Osteoporosis

Cuadro 2. Guías de la OMS para la interpretación de la medición de DMO.

Cuadro 3. Fuentes de error en la medición de DMO por DEXA.

Cuadro 4. Esquema de tratamiento.

Cuadro 5. Soluciones patrón Randox® para la detección de analitos.

Cuadro 6. Bioquímica sanguínea de ratas Hsd:Wistar con OSH tratadas, sin tratamiento e intactas.

Cuadro 7. Urianálisis en ratas Hsd:Wistar con OSH tratadas, sin tratamiento e intactas.

Cuadro 8. Promedios de Densitometría ósea en ratas Hsd:Wistar con OSH tratadas, sin tratamiento e intactas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. α -D-glucopyranosyl- $[\beta$ -D-fructofuranosyl] n -1- β -fructofuranoside. (Clinical Nutrition Highlights, 2005)

Figura 2. β -fructopyranosyl- $[\beta$ -D-fructofuranosyl] n -1- β -D-fructofuranoside. (Clinical Nutrition Highlights, 2005)

Figura 3. Fructano tipo inulina de Achicoria. (Dimitris Charalampopoulos, 2009)

Figura 4. Distribución del agave en México. (Recent Advances in Fructooligosaccharides Research, 2007)

Figura 5. Fructano tipo inulina de Agave (Metlin®). (Product Data Sheet, 2007)

Figura 6. Metabolismo de prebióticos en el colon. (Actualizaciones en Osteología, 2007)

Figura 7. Promedios de ganancia de peso durante 60 días en ratas Hsd:Wistar con OSH tratadas, sin tratamiento e intactas.

Figura 8. Promedios de longitud (cm) en ratas Hsd:Wistar con OSH, tratadas e intactas durante 60 días.

Figura 9. Gráfica de evaluación de la DMO en fémur y última vértebra torácica en ratas Hsd:Wistar con OSH, tratadas e intactas durante 60 días.

LISTA DE ABREVIATURAS

DP. Grado de Polimerización

OSH. Ooforectomía

DMO. Densitometría ósea

DPav. Grado de polimerización promedio

DPmax. Grado de polimerización máximo

AGCC. Ácidos grasos de cadena corta

TGI. Tracto gastrointestinal

pH. Logaritmo negativo de la concentración de los iones hidrógeno

PTH. Paratohormona

OP. Osteoporosis

HEPA. High Efficiency Particulate Air

cbp. Cuando baste para

E.U.A. Estados Unidos de América

CONAPO. Consejo Mexicano de Poblaciones

CFU-GM. Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos

DEXA. Dual-Energy X-ray Absorptiometry

OMS. Organización Mundial de la Salud

ALT. Alanina Amino Transferasa

AST. Aspartato Amino Transferasa

FAS. Fosfatasa Alcalina.

1. INTRODUCCIÓN

México está enfrentando una transición epidemiológica con un número creciente de ancianos y un aumento en la esperanza de vida que ha aumentado en promedio casi 39 años durante las últimas siete décadas. La población de 50 años y más, es actualmente de 19 millones, y aumentará a 55 millones para el año 2050. Para entonces, la esperanza de vida promedio en México será de 82 años de edad. Debido a que la osteoporosis es una enfermedad asociada con el envejecimiento, se espera que, en consecuencia, el número de fracturas asociadas con osteoporosis aumente.^{1,2} Prevenir enfermedades musculoesqueléticas, que aumentan con la edad, es un reto para las sociedades que envejecen como en el caso de México³, si bien, existen pocas referencias epidemiológicas en torno a la osteoporosis en nuestro país, las lesiones musculoesqueléticas ocupan el segundo lugar de atención quirúrgica en el Instituto Mexicano del Seguro Social, en ellas se incluyen las fracturas osteoporóticas⁴, es un proceso prevenible y tratable, pero la falta de signos de alerta previos a la aparición de fracturas, conlleva que pocos pacientes sean diagnosticados en fases tempranas y tratados de forma efectiva⁵.

Para reducir los riesgos de enfermedad, en este caso, la presentación de osteoporosis se ha planteado el consumo de alimentos funcionales como los fructanos tipo Inulina de agave que promuevan la biodisponibilidad del calcio en los huesos⁶, los fructanos tipo inulina de agave son prebióticos altamente purificados a diferencia de la inulina de achicoria, ambos favorecen el crecimiento de bacterias benéficas a nivel de colon incrementando la biodisponibilidad del calcio en los huesos, sin embargo, en este estudio se espera que la inulina de agave sola o adicionada con isoflavonas favorezca una mayor biodisponibilidad de calcio en el modelo de ratas ooforectomizadas; este modelo es el más recomendado por ser de fácil acceso y compartir características como son: el aumento en la tasa de recambio óseo, una fase inicial rápida de la pérdida de masa ósea seguida de una fase mucho más lenta, disminución de la absorción intestinal de calcio, esto se presenta debido a la falta de estrógenos.³

1.1 Alimentos Funcionales

En la última década los conceptos básicos en nutrición están cambiando, hasta ahora la idea tradicional de una “dieta adecuada” estaba referida únicamente al aporte de nutrientes suficientes para asegurar la supervivencia de un individuo, satisfacer sus necesidades metabólicas, y complacer su sensación de hambre. En la actualidad el énfasis

se acentúa en la potencialidad de los alimentos para la promoción de la salud, mejorar el bienestar y reducir el riesgo de enfermedades. Así, el concepto de nutrición adecuada tiende a ser sustituido por el de nutrición óptima, en cuyo ámbito aparecen los alimentos funcionales.⁷

En la literatura encontramos que un alimento funcional puede ser un producto alimenticio y bebida derivados de sustancias naturales que se consumen como parte de la dieta diaria y que posee beneficios fisiológicos particulares cuando son consumidos.⁷

El “Consenso Europeo sobre Conceptos Científicos de Alimentos Funcionales”, menciona que un alimento puede considerarse como funcional si se demuestra satisfactoriamente que afecta beneficiosamente a una o más funciones diana del organismo en una forma que sea relevante para cualquier etapa de mejora de la salud y el bienestar y/o la reducción del riesgo de enfermedad.⁷

El consumo regular de un alimento funcional como parte de la dieta habitual es prescrito como recomendable ya que ha sido científicamente demostrado que reducen significativamente la probabilidad de contraer ciertas enfermedades en particular.^{7,8} El desarrollo de alimentos funcionales constituye una oportunidad real de contribuir a la mejora de la calidad de la dieta y a la selección de alimentos que pueden afectar positivamente la salud y el bienestar del consumidor.⁷

1.2 Prebióticos

Los prebióticos son sustancias alimenticias no digeribles (consisten fundamentalmente en polisacáridos) que nutren a un grupo selecto de microorganismos que habitan el intestino y favorecen la multiplicación de bacterias beneficiosas con un efecto positivo en el hospedador,⁹ es considerado un ingrediente de alimentos funcionales que además de destacar por sus propiedades nutritivas, contienen ciertos ingredientes cuyo consumo diario dentro de una dieta equilibrada en seres humanos y animales contribuye a mantener o mejorar el estado de salud y bienestar o la reducción de riesgo de enfermedad.^{10,11}

Los prebióticos conocidos comúnmente son; **fructanos tipo inulina**, galacto-oligosacáridos, lactulosa y oligosacáridos de la leche materna.

Se denomina fructano a cualquier carbohidrato que tenga uno o más enlaces fructosil-fructosa, por lo tanto, los fructanos son oligosacáridos de fructosa o polisacáridos de fructosa de longitud variable y los encontramos **lineales**, como las inulinas que son carbohidratos polidispersos de unidades de fructosa unidas por enlaces $\beta(2\rightarrow1)$ de origen vegetal, mientras que los levanos son carbohidratos de fructosa unidos por enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ de origen fundamentalmente bacteriano pero pueden estar presente también en algunos hongos y **ramificados**, que es una combinación de los dos tipos anteriores y son las neoinulinas o de tipo gramíneo, estos fructanos contienen enlaces $\beta(2\rightarrow1)$ y/o $\beta(2\rightarrow6)$.^{11,12}

Una manera de identificarlos es por el grado de polimerización (DP) que se representa con el promedio y el número máximo de unidades de fructosa, residuos o restos, conocido como el Promedio y el Máximo grado de polimerización (DPav y DPmax) respectivamente.⁷

Desde el punto de vista químico los fructanos tipo inulina de cadena lineal pueden ser representados como α -D-glucopyranosyl-[β -D-fructofuranosyl]_{n-1}- β -fructofuranoside ($G_{py}F_n$ o GF_n) (Figura 1) o β -fructopyranosyl-[β -D-fructofuranosyl]_{n-1}- β -D-fructofuranoside ($F_{py}F_n$ o F_m) (Figura 2). El enlace fructosyl-glucosa es siempre $\beta(2\leftrightarrow1)$ como en la sucrosa y el enlace fructosyl-fructosa es $\beta(2\rightarrow1)$ o $\beta(2\rightarrow6)$.⁷

Los fructanos tipo inulina, son carbohidratos de reserva energética presente en más de 36,000 especies de plantas, aislada por primera vez en 1804, a partir de la especie *Inula helenium*, por un científico alemán de apellido Rose, se encuentra en bulbos, raíces, tubérculos, en la raíz de achicoria y en los agaves a distintos porcentajes.^{12,13}

Encontramos que en los fructanos tipo inulina, se incluyen a la inulina nativa, inulina hidrolizada enzimáticamente u oligofructosa y fructooligosacáridos sintéticos, en el caso de la inulina nativa se le llama así porque es extraída de raíces frescas, procesada por la industria alimentaria para obtener fructanos de cadena corta, específicamente oligofructosa con un grado de polimerización de 2–10; en promedio 5 como resultado de hidrólisis enzimática parcial o fructanos de cadena larga con la aplicación de técnicas de separación física industrial.^{14, 15}

Los fructanos por su configuración β del C-2 anomérico en sus monómeros de fructosa no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas α - glucosidasas que se encuentran en la parte superior del tracto gastrointestinal del hombre y de los animales, por lo que permanecen intactos en su recorrido hasta llegar al intestino grueso.^{6,16}

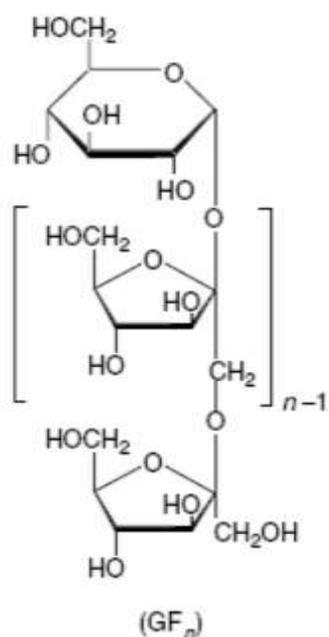


Figura 1

α -D-glucopyranosyl-[β -D-fructofuranosyl]_{n-1} β -fructopyranosyl-[β -D-fructofuranosyl]_{n-1}- β -
 β -fructofuranoside (G_{py}F_n o GF_n)

D-fructofuranoside (F_{py}F_n o F_m)

(Madrigal L, Sangronis E, 2007)

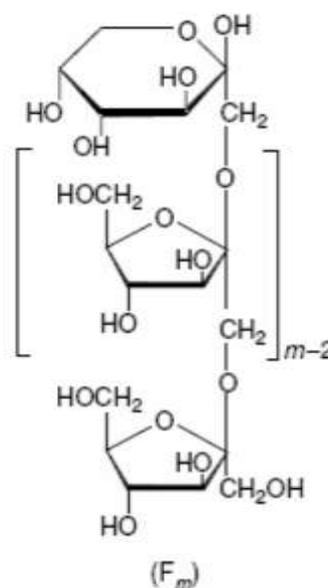


Figura 2

Actualmente, la inulina se obtiene de manera industrial de la planta *Chicorium intybus* (achicoria) y del *Agave azul*.⁷

1.3 Fructano tipo Inulina de Achicoria (*Chicorium intybus*)

La achicoria es una planta herbácea perenne, de la familia de las Asteráceas, que mide entre 80 y 90 cm de alto. Sus raíces son blancas en su interior y amarillo-marrón en el exterior. Las hojas son de forma oblonga y dentada. Esta planta se encuentra geográficamente distribuida en muchas regiones del mundo: Europa central y del norte,

Liberia, Turquía, Afganistán, China, en el sur de América, Etiopía, Madagascar, India, Australia y Nueva Zelanda. En general, cuando la achicoria se cultiva para aprovechar sus raíces, se requiere de climas húmedos y calientes.^{13,16}

La inulina de achicoria (figura 3) es un fructano lineal β (2 \rightarrow 1) fructosil-fructosa, en donde, n, corresponde al número de unidades de fructosa unidas a una glucosa terminal, con un grado de polimerización entre 3 y 60, con un valor promedio de aproximadamente 10.^{7,17}

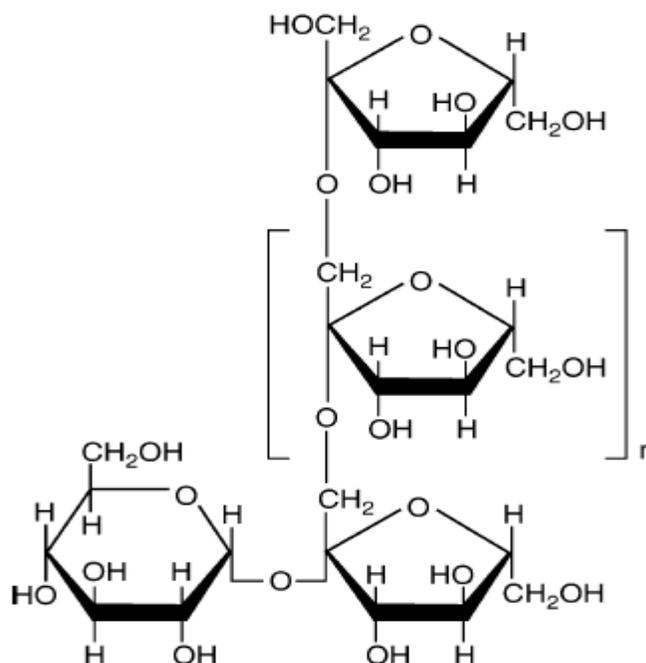


Figura 3. Fructano tipo Inulina de Achicoria (Dimitris Charalampopoulos, 2009)

Cuando la inulina se somete a hidrólisis enzimática parcial usando una endoinulinasa se produce oligofructosa, que es una mezcla de las moléculas GpyFn y FpyFn, con un DP de 2 a 7 en promedio 4, cuando está se mezcla con la inulina de achicoria se obtiene un producto comercial conocido como Synergy1[®] que se conoce como una inulina enriquecida, su uso está indicado para mejorar la absorción de calcio y mineralización ósea.¹⁸

1.4 Fructano tipo Inulina de Agave azul (*Agave tequilana* Weber Var. azul)

El género *Agave* es originario de Mesoamérica, distribuyéndose desde los 34° Latitud Norte hasta los 60° Latitud Sur, coincidiendo en nuestro país el centro de origen con la mayor diversidad de especies (figura 4), tiene una relación milenaria con la historia de México, ha sido útil para una amplia gama de aplicaciones en el desarrollo cultural mexicano. El género pertenece al orden Asparagales y la familia *Agavaceae*, existen alrededor de 200 especies de agaves en todo el mundo y 150 de ellas se pueden encontrar en la República Mexicana. En las piñas del agave se encuentra un alto contenido de fructosa que son polímeros compuestos principalmente de unidades de fructosa unidas a una molécula de sacarosa.^{11,17,19}

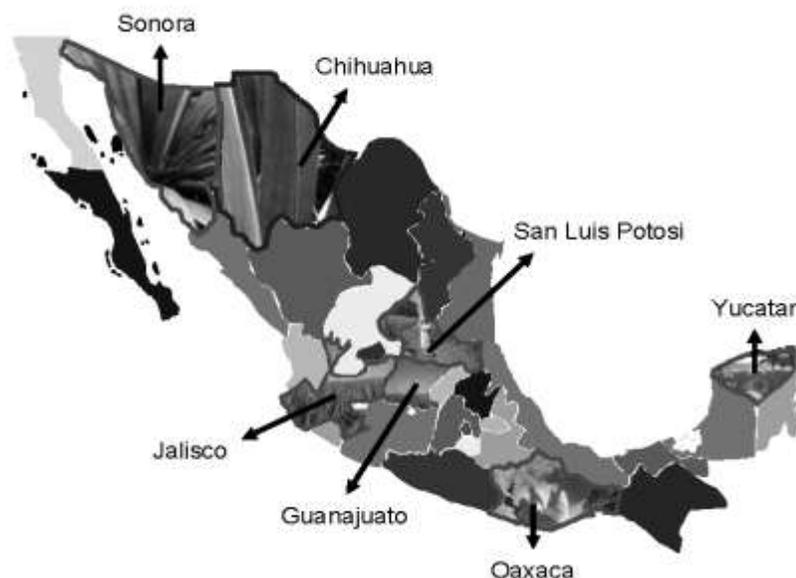


Figura 4. Distribución del Agave en México (López Mercedes G, 2007)

El agave azul ofrece algunas ventajas como fuente de inulina en relación con otras, por ejemplo, el 25% del peso de la planta de agave es inulina. El agave tiene un excelente grado de polimerización. Esto permite que, con la tecnología adecuada de separación y purificación, se puedan obtener fibras tanto con alto como con bajo grado de polimerización.²⁰

Nekutli en el año 2002 llevó a cabo la caracterización de los fructanos presentes en el agave azul mediante un proceso de obtención y purificación novedoso, con bajo consumo de energéticos para la producción de fructanos de agave de alta pureza, con una composición de peso molecular estandarizado, de una manera energéticamente eficiente para uso en la industria alimentaria. Vale la pena señalar que esto dió como resultado la obtención y el registro de marca de dos grupos de moléculas: FOS (Fructooligosacáridos) con un grado de Polimerización (DP) de 3 a 11 registrado como Metlos® e Inulina con un DP de 12 a 60 registrada como Metlin®²⁰, inulina utilizada para realizar el presente trabajo.

Los fructanos presentes en el agave poseen una estructura cuya molécula presenta los tres tipos de fructanos antes mencionados: inulina, levanos y neoinulina (Figura 5). Este tipo de enlaces son característicos de las especies del orden Asparagales, a la cual el agave pertenece. El DP de los fructanos presentes va de 3 a 60 unidades, aunque el 99% entra en el intervalo de 3 a 29 unidades. El DP promedio en la piña y parte inferior de las hojas es de 14. La concentración de fructanos en una planta de 6 años es de aproximadamente el 27% en la piña y en la parte inferior de las hojas. Estudios preliminares en ratones indican que este tipo de fructanos poseen características funcionales aún mayores que los de la inulina obtenida comercialmente a partir de la achicoria.^{20, 21}

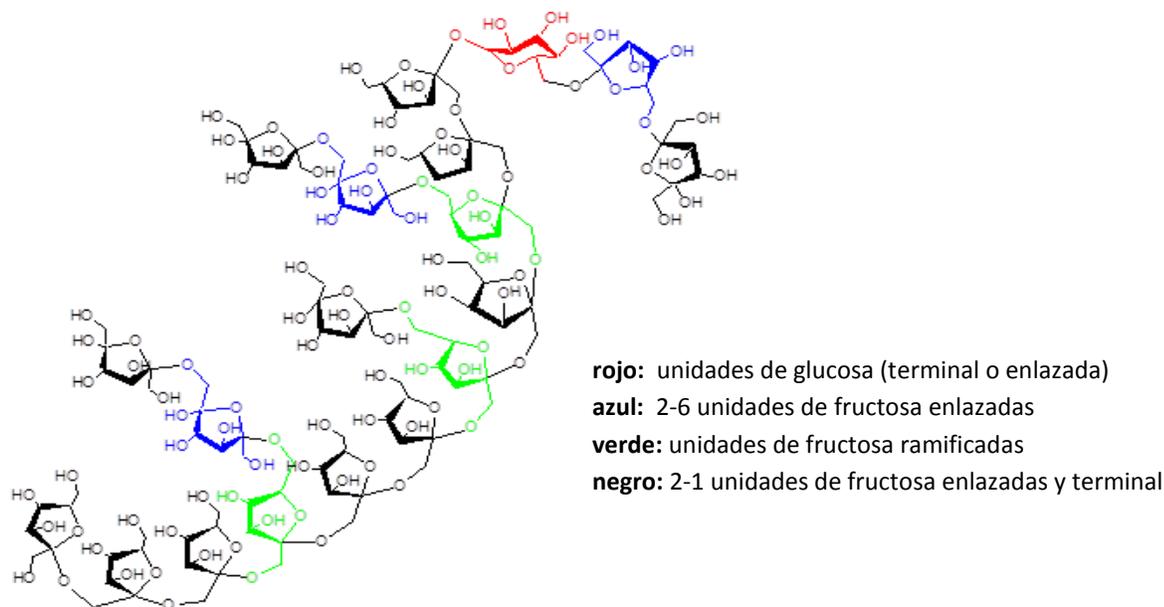


Figura 5. Fructano tipo Inulina de Agave (Metlin®)

Los fructanos tipo inulina de agave o achicoria, se emplean como ingredientes en los alimentos y bebidas ofreciendo ventajas tecnológicas e importantes beneficios a la salud. Estudios en modelos experimentales y humanos muestran consistentemente que la adición de fructanos tipo inulina en la dieta incrementa la absorción de calcio en un 10-25 % dependiendo del tipo de fructano.^{8,20}

El calcio es un componente principal del tejido óseo, dando la integridad estructural que es esencial para el soporte del crecimiento, el consumo inadecuado de calcio durante toda la vida está relacionado con la disminución de la densidad ósea y con un alto índice de fracturas. Encuestas nacionales sobre la nutrición revelan que la mayoría de las personas no toman la cantidad de calcio suficiente para que sus huesos crezcan y se mantengan sanos, su deficiencia afecta a las personas mayores, particularmente a las mujeres postmenopáusicas que presentan una absorción de calcio menos eficiente.^{22,23}

1.5 Calcio

El calcio es uno de los constituyentes iónicos más importantes en el organismo, es el quinto elemento por orden de abundancia, interviene en la conducción nerviosa, la contractilidad muscular, en el mecanismo de secreción y acción de diversas hormonas y enzimas citosólicas, en la permeabilidad de las membranas, en el proceso de coagulación de la sangre y la mineralización del hueso.²⁴

El calcio sérico total se compone de 3 fracciones:

1. 50%, en forma de calcio ionizado, es la porción biológicamente activa regulada directamente por las hormonas.
2. 10%, formando complejos con fosfatos, citratos y bicarbonato. Junto con la anterior constituye la fracción difusible y ultrafiltrable del calcio.
3. 40%, lo constituye el calcio unido a proteínas, principalmente albúmina y el resto a las globulinas, es la fracción no difusible.²⁵

Las recomendaciones de ingesta diaria de calcio son variables a lo largo de la vida y buscan obtener un balance equilibrado de este mineral. Ante un déficit en su ingesta se provoca una disminución de la absorción y una menor concentración de calcio en sangre,²⁵ mínimos descensos inducen las acciones de la parathormona (PTH) en forma de:

1) movilización de calcio esquelético hacia el plasma estimulando la resorción ósea; 2) aumento de la resorción tubular de calcio y; 3) incremento de la absorción intestinal por estímulo de la hidroxilación de 25 (OH)D₃ a calcitrol en el túbulo renal. Con todo ello se eleva la calcemia.²⁴

La PTH también regula el fósforo plasmático aumentando su aporte desde el hueso e intestino pero en el riñón aumenta la fosfaturia, en parte a través del sistema AMPc (Adenosín Monofosfato Cíclico), en mayor magnitud. El efecto dominante es este último, por lo que la PTH es una hormona hipofosfatemiante. Ello contribuye al efecto hipercalcemiante de la hormona, ya que la hipofosfatemia tiende a aumentar el calcio plasmático.²⁴

A nivel intestinal, el calcio se absorbe en duodeno y yeyuno, por medio de transporte activo regulado por la vitamina D y mediante transporte pasivo que ocurre a lo largo del tracto gastrointestinal por difusión paracelular que comprende el pasaje de Ca⁺² a través de uniones celulares estrechas, la mayor parte de Ca⁺² es absorbida en intestino delgado aunque estudios recientes han demostrado que también en intestino grueso y es aquí en donde los fructanos tipo inulina ejercen su acción.²⁴

Los fructanos tipo inulina son metabolizados y fermentados en el intestino grueso a través de bacterias benéficas del colon, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, dando como resultado la producción de gases (H₂, CH₄, CO₂), metabolitos como el formato, ácidos carboxílicos de cadena corta, principalmente acético, propiónico y butírico más conocidos como ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que disminuyen el pH del lumen intestinal incrementando la solubilidad de minerales como Ca, Fe y Zn también se producen otros compuestos como son amoniaco, aminas y fenoles (Figura 6).^{26,27}

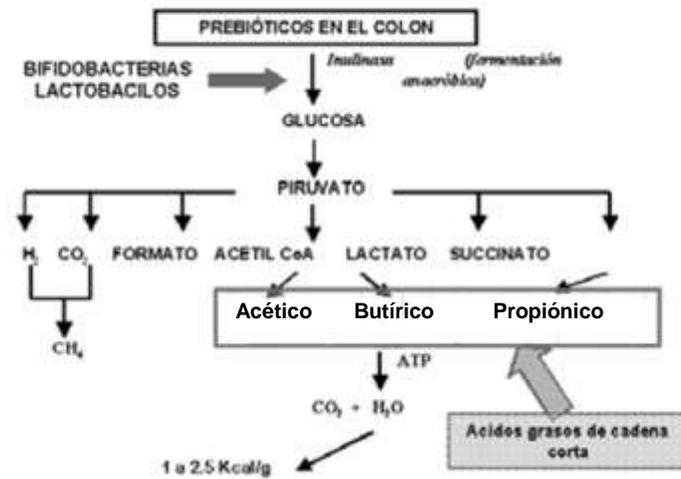


Figura 6. Metabolismo de prebióticos en el colon de mamíferos y aves
(Zeni Susana N, 2007)

Las *Bifidobacterias*, son bacilos Gram positivos, habitantes naturales del tracto gastrointestinal (TGI) que representan del 3-10 % en la microflora del adulto y el 90% en los infantes alimentados con leche materna⁷, aparecen pocos días después del nacimiento y producen la enzima β-galactosidasa, modifican las condiciones de acidez y ayudan a la formación de ácido láctico y acético. El aumento en la concentración de las *Bifidobacterias* en la flora intestinal incrementa la conversión de carbohidratos a ácidos orgánicos (láctico y acético), estimula el peristaltismo del intestino y contribuye a regularizar el tránsito intestinal.¹⁰

Los *Lactobacillus* son bacterias ácido-lácticas, Gram positivos, anaerobios, pueden ser homo o heterofermentativos, según las características de su metabolismo fermentativo y mesofílicos o termofílicos, contribuye a la formación de AGCC. La relación entre microorganismos explica el incremento de ácidos de cadena corta ante la presencia de prebióticos.^{10,28}

El acetato es metabolizado en áreas sistémicas como el músculo y usado para generar ATP, mientras que el propionato puede ser transportado al hígado. El butirato juega un rol esencial en el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal, ya que es el sustrato energético utilizado para el metabolismo, proliferación y diferenciación celular.^{6,27}

El aumento en la concentración de lactato y acetato disminuye el pH intraluminal, inhibiendo el crecimiento de *E. coli*, *Clostridium* y otras bacterias patógenas pertenecientes a los géneros *Listeria*, *Shigella* o *Salmonella* y a su vez incrementa el recuento de *Bifidobacterias* y *Lactobacilos*.

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que después de 15 a 20 días de tomar inulina se modifica la flora intestinal, estimulando el crecimiento de las *Bifidobacterias* y disminuyendo el recuento de bacteroides, fusobacterias y clostridios.¹⁴

El lactato disminuye el pH cecal que conduce a una mayor solubilización de Ca_2^+ y Mg_2^+ de manera que su concentración aumenta, el ciego duplica su tamaño lo que da como resultado una mayor superficie de absorción para estos minerales.

Al mejorar la absorción de calcio se reduce la tasa de recambio óseo por la supresión de la PTH y en consecuencia una reducción de la actividad osteoclástica lo que ayuda a prevenir la osteoporosis.²⁶

1.6 Osteoporosis

El término osteoporosis (OP) significa “hueso poroso” es una enfermedad sistémica en la cual hay pérdida de calcio ocasionando una menor densidad ósea por lo que los huesos se vuelven frágiles y pueden romperse incluso por traumatismos leves.^{9,24}

La osteoporosis ha estado presente desde el principio de la Historia, en el siglo VI Paulus Aegineta describe una enfermedad ósea que es la que hoy día se conoce como osteoporosis. Más tarde el italiano Marcus Donatus (1597) repitió la descripción de osteoporosis.²⁵

En los inicios del siglo XIX, Sir Astley Cooper se percató «que los huesos se hacían más suaves y menos “luminosos” en los estados avanzados de la vida» y que «estos estados del hueso favorecían el desarrollo de fracturas». El término osteoporosis fue acuñado por Johann Lobstein; sin embargo, el padecimiento que realmente estaba describiendo con este nombre fue probablemente la osteogénesis imperfecta. En 1940, la Academia Americana de Médicos y Endocrinólogos describieron la osteoporosis postmenopáusica y propusieron que es consecuencia de problemas en la formación del hueso debido a deficiencia de estrógenos.²⁹

Existe una definición de osteoporosis dada por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) en 1993 y modificada en el 2001 para comprender mejor las alteraciones que se producen en el hueso de las pacientes con esta enfermedad que dice: “La osteoporosis es un trastorno esquelético caracterizado por una disminución de la resistencia ósea que predispone a un mayor riesgo de fractura”, en este sentido la resistencia ósea se refiere a la densidad y calidad ósea, la densidad ósea se expresa en gramos de mineral por área o volumen, esta determinada por el pico de masa ósea y la cantidad de pérdida ósea; la calidad ósea se refiere a la macro y microarquitectura, recambio óseo, tamaño, daño acumulado y mineralización.^{30,31}

Sin tratamiento y medidas preventivas adecuadas, la OP progresa de manera silenciosa e indolora hasta la ruptura de algún hueso, especialmente en cadera, columna vertebral y la parte distal del antebrazo; provocando un decremento de la calidad de vida y pérdida de independencia personal.⁹

1.6.1 Epidemiología de la Osteoporosis

Existen estudios epidemiológicos en el mundo que han demostrado que la osteoporosis y sus consecuencias representan un grave problema en los sistemas de salud, debido a los altos costos y los recursos que se necesitan para la atención de los pacientes que la padecen.³²

La prevalencia real de la osteoporosis es difícil de establecer, ya que como se mencionó anteriormente, es una enfermedad asintomática que es diagnosticada en el momento en que se presenta una fractura por fragilidad ósea.³³

Existen diferencias étnicas y de sexo en la densidad ósea y en la incidencia de fracturas osteoporóticas; las mujeres tienen una densidad ósea menor que los hombres de la misma raza y después de la menopausia, la incidencia de fracturas es dos a tres veces mayor que en los hombres. Las mujeres de raza blanca caucásica tienen una mayor incidencia de fracturas que las hispanas y que las afroamericanas. Las mujeres asiáticas tienen la mitad del riesgo de sufrir fracturas de cadera por osteoporosis que las mujeres de raza blanca caucásica, aun cuando las caucásicas presentan una menor densidad ósea, posiblemente debido a que tienen un cuello femoral más corto que cuando se ve afectado es causa de fractura de cadera.^{33,34}

En E.U.A. por ejemplo, es una enfermedad frecuente que ocasiona cerca de 1,2 millones de fracturas cada año, la osteoporosis y sus complicaciones pueden incluso llevar a la muerte; un 12 a 20% de los ancianos que experimentan fractura de cadera mueren en un año.³⁴

En México, la Asociación Mexicana de Metabolismo Óseo y Mineral (AMMOM) y la Fundación Internacional de Osteoporosis (OIF) estimó que 1 de cada 3 mujeres y 1 de cada 8 hombres mayores de 50 años estaban en riesgo de sufrir alguna alteración en la densidad mineral ósea.³⁵

En México, la fragilidad y las fracturas en huesos que derivan de la osteoporosis recientemente se han convertido en un punto clave de investigación, estas lesiones musculoesqueléticas ocupan el segundo lugar de atención quirúrgica en el Instituto Mexicano del Seguro Social, en ellas se incluyen las fracturas osteoporóticas. En el 2009, el 17% de mujeres y el 9% de hombres de 50 años y más, presentaban osteoporosis en la columna lumbar; el 16% de las mujeres y el 6% de los hombres presentaban osteoporosis en la cadera, se espera que en el año 2050 los casos de fractura aumenten considerablemente, esto es debido a que se enfrenta una transición epidemiológica, con un número creciente de personas de edad avanzada y un aumento en la esperanza de vida. De acuerdo con datos recientes de la CONAPO (Consejo Mexicano de Población), la población de 60 años y más esta representada por 8.5 millones y en el año 2050 se espera que aumente a 33.8 millones, la esperanza de vida de los mexicanos para ese entonces será de 81.9 años de edad.^{2,32,36}

1.6.2 Clasificación de la osteoporosis

La osteoporosis, ha sido dividida en dos categorías mayores considerando las diferencias en la densidad ósea, patrones de incidencia específica de fracturas asociadas en relación a la edad y sexo, así como el mecanismo de pérdida ósea.²⁹

- Osteoporosis tipo I o primaria: Es llamada “osteoporosis involutiva”, comienza en la etapa media de la vida y avanza con la edad.³⁷

Su característica es que existe pérdida acelerada y desproporcionada de hueso trabecular, por lo que las fracturas típicas ocurren en aquellos sitios del esqueleto que contienen grandes cantidades de este tipo de hueso como son vértebras y partes distales de los antebrazos (fractura de Colles). Afecta principalmente a

mujeres que se encuentran dentro de los 25 años postmenopausia, se sabe que es el resultado de factores relacionados con deficiencia de estrógenos que provocan una disminución de la tasa de absorción intestinal de Calcio.²⁹ Se observa disminución de la actividad PTH (Parathormona) para compensar el aumento de la reabsorción ósea.³⁸

Para su identificación, es necesario basarse en las diferencias en su presentación clínica, en los cambios densitométricos y hormonales y en la relación del modelo de enfermedad con menopausia y edad.²⁴

- Osteoporosis tipo II o secundaria: En este grupo quedan clasificados todos aquellos casos de OP que son una consecuencia o bien una manifestación acompañante de otras enfermedades o de su tratamiento³⁸ y representa menos del 5% de los casos de osteoporosis. El adelgazamiento óseo es más gradual y afecta los dos tipos de hueso el trabecular y cortical, produciendo fracturas en cadera, pelvis y porción proximal del húmero, así como múltiples fracturas en cuña de vértebras. En este tipo es posible identificar al agente causal de la enfermedad, afecta tanto a varones como mujeres mayores de 75 años.²⁹

1.6.3 Factores de riesgo para la presentación de osteoporosis.

A pesar de que la osteoporosis es una enfermedad usualmente asociada a la edad existen una serie de factores de riesgo que han sido identificados por medio de estudios epidemiológicos que conllevan una mayor probabilidad para desarrollarla, Cuadro 1.³⁸

En México existe un estudio de factores de riesgo en fracturas que han determinado que en nuestra población la edad avanzada, el peso corporal bajo y el alcoholismo se asocian a fracturas de cadera¹

El riesgo de padecer una fractura de cadera en una mujer a partir de los 50 años es de 15.6% lo cual, supone la mitad de riesgo de sufrir una fractura vertebral en un 32% siendo la más frecuente de las fracturas osteoporóticas.³⁸

Cuadro 1. Factores de riesgo de Osteoporosis.

Factores genéticos o constitucionales:	<ul style="list-style-type: none"> • Edad • Sexo • Raza caucásica y/o asiática • Antecedente familiar de OP y/o fractura de cadera
Estilo de vida y nutrición:	<ul style="list-style-type: none"> • Baja ingesta de calcio en la dieta • Déficit de vitamina D • Tóxicos: Tabaquismo, alcoholismo • Sedentarismo • Nutrición no equilibrada: exceso de proteínas, dieta vegetariana, exceso de café.
Déficit de hormonas sexuales	<ul style="list-style-type: none"> • Menarquía tardía (>15 años) • Amenorrea prolongada: superior a 1 año • Menopausia precoz (< 45 años) • Hipogonadismo en el varón
Tratamiento farmacológico crónico	<ul style="list-style-type: none"> • Glucocorticoides y ACTH • Anticonvulsivantes • Tiroxina sobredosificada • Heparina • Antiandrógenos • Antiácidos con fosfato o aluminio • Tamoxifeno (premenopausia)
Patologías que afectan el metabolismo óseo	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades endocrinas <ul style="list-style-type: none"> ○ Diabetes mellitus ○ Hipertiroidismo ○ Síndrome de Cushing ○ Acromegalia • Alteraciones de la absorción intestinal y hepatopatías crónicas <ul style="list-style-type: none"> ○ Gastrectomía ○ Síndromes de mala absorción ○ Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa ○ Cirrosis biliar primaria • Enfermedades renales <ul style="list-style-type: none"> ○ Insuficiencia renal crónica ○ Glomerulopatías • Enfermedades hematológicas <ul style="list-style-type: none"> ○ Leucemia y linfoma ○ Mieloma múltiple ○ Anemia perniciosa • Enfermedades inflamatorias crónicas <ul style="list-style-type: none"> ○ Amiloidosis ○ Artritis reumatoide ○ Espondilitis anquilosante

1.6.4 Fisiopatología de la Osteoporosis

La fisiopatología de la osteoporosis se encuentra estrechamente relacionada con el metabolismo del calcio. A lo largo de la vida el hueso esta expuesto a un proceso de formación y resorción ósea continua, al nacer no se encuentra completamente consolidado y con el paso de los años es que el hueso adquiere la rigidez que la caracteriza aproximadamente a los 20 años de edad.³³

El hueso es un órgano vivo formado por tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, con capacidad para renovarse y por tanto mantener sus condiciones de resistencia. Esta renovación tiene lugar de forma permanente y ha recibido el nombre de “remodelación ósea”. La velocidad con la que se lleva a cabo se conoce como “recambio o *turnover óseo*”.³⁹ El volumen de hueso remodelado por cada unidad es de unos 0.025 mm³ y la tasa de renovación anual del esqueleto aproximadamente un 10% (25-30% el hueso trabecular y 3-4 % el cortical).²⁴

Las células principalmente involucradas en este proceso de remodelación ósea son los osteoblastos (encargados de formarlo) y los osteoclastos (encargados de destruir el hueso).³⁹

1.6.5 Células de la unidad de remodelación ósea.

1.6.5.1 El osteoclasto

Son células grandes, móviles, multinucleadas, que reabsorben las superficies óseas formando unas lagunas y surcos en forma de pliegues “borde en cepillo”. Proviene de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos.^{28,40}

Los osteoclastos degradan la fracción orgánica de la matriz ósea mediante la producción de dos tipos de enzimas lisosómicas; las cisteínproteinasas (como la fosfatasa ácida tartrato resistente) que funcionan con pH ácido y las colagenasas, que actúan a pH neutro. La reabsorción ósea se desarrolla en dos fases, primero se solubiliza el mineral y luego se digiere la matriz orgánica, hasta que finalmente los osteoclastos mueren por apoptosis. La comunicación entre los osteoclastos y las demás células óseas se realiza de forma indirecta, mediante intermediarios químicos, factores paracrinos y factores de unión de la matriz.^{24,40}

1.6.5.2 El osteoblasto

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso, derivan de células mesenquimatosas pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares, también llamadas células madre. Son células polarizadas diferenciadas que sintetizan el colágeno y la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día en el ser humano. Participan en el proceso de mineralización de la matriz orgánica produciendo vesículas de matriz que acumulan iones Calcio y Fosfato y son ricas en fosfatasa alcalina y pirofosfatasa, enzimas que inducen la creación de centros de nucleación para el depósito de las sales minerales.⁴⁰

Los osteoblastos o sus precursores, expresan receptores para muchas hormonas, incluyendo la parathormona (PTH), la 1,25-dihidroxitamina D, las hormonas sexuales y los glucocorticoides. También sintetizan una amplia variedad de factores de crecimiento y citocinas, al tiempo que son influidos por ellos.²⁰ Su vida activa se encuentra entre una y diez semanas, al finalizar este periodo pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes llamadas células de revestimiento (bone lining cells) que son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso o transformarse en osteocitos (15%). Ambos tipos celulares representan estadios más avanzados de maduración.⁴⁰

Los osteocitos tienen prolongaciones que los unen entre sí,³⁹ son osteoblastos que han concluido su función de síntesis de matriz, tomando la responsabilidad de registrar la tensión que soporta el hueso circundante, el envío de señales a células vecinas para iniciar la remodelación ósea, así como de llevar a cabo el proceso de osteólisis osteocítica, en la cual se reabsorben las sales amorfas de calcio y fosfato depositadas en la fase mineral.²⁹

Cuando hay deficiencia de estrógenos o tratamientos con glucocorticoides se puede presentar la apoptosis de los osteocitos.⁴¹

1.6.6 Diagnóstico de la Osteoporosis

Aunque la osteoporosis se considera un proceso asintomático, silente y no se manifiesta clínicamente hasta que se produce una fractura, debemos valorar algunos elementos que nos permitan sospechar esta patología y realizar los estudios complementarios necesarios para llegar a su diagnóstico. Los datos que nos orientan hacia la sospecha diagnóstica de

osteoporosis los podemos obtener a través de la historia clínica, la exploración física, las pruebas de laboratorio y la radiología simple.³⁰

El diagnóstico es principalmente por densitometría ósea (DMO), puede ser usada para establecer o confirmar el diagnóstico de osteoporosis y predecir el riesgo futuro de fracturas. A menor densidad mineral ósea mayor riesgo de fractura.⁴² Las fracturas más frecuentes relacionadas con la osteoporosis son las vertebrales y se acompañan de aumento de morbilidad, mortalidad y riesgo de otras fracturas posteriores.⁴³

Para el estudio de la DMO existen diferentes metodologías, pero la absorciometría radiológica de doble fotón (DEXA) es la más popular por haber servido para establecer los criterios diagnósticos de osteoporosis por la Organización Mundial de la Salud en 1994 y que considera la disminución de la masa ósea como el principal determinante de la enfermedad.^{30,43}

En 1994 la OMS establece los criterios densitométricos para el diagnóstico de la osteoporosis (Cuadro 2),⁴⁴ seleccionó el valor T (T-score) para diagnosticar osteoporosis. El T-score es la medida expresada en desviaciones estándar (DE) por abajo o arriba del promedio del valor de DMO de mujeres caucásicas jóvenes sanas. La DEXA permite medir con bastante precisión la DMO en diferentes partes y en la totalidad del cuerpo valiéndose de un programa informático apropiado. La técnica usa radiación ionizante con 2 haces fotónicos de diferente energía y mide la masa ósea en g/cm^2 ; la diferente atenuación que sufren los fotones al pasar a través de los tejidos del cuerpo permite determinar la densidad mineral.^{1,43}

Cuadro 2. Guías de la OMS para la interpretación de la medición de DMO.²⁹

T-score (DE)	Interpretación
< 1.0	Normal
1.0 a 2.5	Osteopenia
> 2.5	Osteoporosis
> 2.5 y fracturas por fragilidad ósea	Osteoporosis establecida o grave

Existe una serie de condiciones que pueden producir imprecisiones en la medición de la DMO de columna y convertir los resultados del fémur en una alternativa importante (Cuadro 3). El interés sobre el fémur proximal ha aumentado ya que es particularmente importante para la predicción del riesgo de fractura de cadera.¹

Cuadro 3. Fuentes de error en la medición de DMO por DEXA¹

- ◆ Osteomalacia.
- ◆ Osteoartrosis (osteófitos, esclerosis de plataformas vertebrales).
- ◆ Calcificaciones vasculares.
- ◆ Sobreposición de objetos metálicos.
- ◆ Medios de contraste (enemas de bario, mielogramas).
- ◆ Fracturas previas (columna, muñeca, cadera).
- ◆ Escoliosis severa.
- ◆ Displasias esqueléticas, acondroplasia.
- ◆ Cambios posquirúrgicos en columna (laminectomía y artrodesis).
- ◆ Calibración inadecuada del densitómetro.

En los primeros años después de la menopausia se observa mayor pérdida de hueso trabecular, por ello el sitio más importante a medir por densitometría es la columna lumbar; después de los 65 años el fémur es clínicamente más importante, debido al impacto sobre la salud que tiene la fractura de cadera. Es por ello que el fémur puede ser eventualmente la región de elección para la medición de DMO en el anciano.¹

1.6.7 Prevención de la Osteoporosis

La importancia de la OP como enfermedad en el adulto de edad avanzada y el impacto de las fracturas relacionadas con ella, demandan la implementación de una serie de medidas preventivas. La prevención primaria es la que se realiza durante las etapas tempranas de la vida mediante la adopción de hábitos saludables para los huesos que influya sobre la adquisición de la densidad ósea máxima o masa “pico” que se alcanza en la juventud (alrededor de los 20 y 30 años de edad). La prevención secundaria se realiza en aquellos momentos en que aumenta la pérdida de masa ósea y consiste en medidas para evitarla.^{1,25}

Una alternativa en la prevención de la aparición de osteoporosis es el uso de fructanos tipo inulina en la dieta para aumentar la retención de minerales, pueden ser adicionados a diversos alimentos como en helados, fórmulas infantiles, cereales, yogurt, pastelería, aderezos, suplementos alimenticios, etc.

Ahora bien, se ha encontrado que los fructanos tipo inulina al promover el crecimiento de *Bifidobacterias* y *Lactobacillus* incrementan la actividad de la β glucosidasa en el intestino grueso lo que promueve una mejor absorción de las isoflavonas que a su vez ayudarán a preservar la arquitectura ósea evitando la resorción ósea.^{22, 45}

Los fitoestrógenos se definen como una serie de compuestos de naturaleza no esteroidea, procedentes de distintas especies vegetales. Existen cuatro clases químicas principales: isoflavonas, lignanos, cumestanos y derivados del resorcinol.⁴⁶

El alimento con mayor concentración de fitoestrógenos es la soya que contiene grandes cantidades de isoflavonas (genisteína, daidzeína y gliciteína), estructural y funcionalmente son comparables al 17 β - estradiol con una acción similar mediante su unión a los receptores de estrógenos sin sus efectos secundarios y se ha demostrado que pueden mejorar la masa ósea en modelos animales de osteoporosis.^{26, 47}

En estudios realizados en animales de experimentación se ha comprobado que la suplementación dietética con isoflavonas previene la pérdida ósea en ratas post-ovariectomía. Así administrando genisteína o proteína de soya intacta, se observó un aumento en el número de osteoblastos y de su actividad formadora de hueso, sin apreciarse efectos sobre la reabsorción ósea medida por el número de osteoclastos.⁴⁶

Del mismo modo, ratas ovariectomizadas a las que se administró genisteína mostraron una recuperación parcial de la masa ósea en comparación con los controles y los cambios histomorfológicos tras la ovariectomía (volumen óseo, grosor trabecular, espaciado entre las trabéculas) se restauraron a los niveles normales en el grupo de animales tratados.⁴⁸

En consecuencia, una combinación dietética de prebiótico y las isoflavonas puede tener una promesa potencial para mantener o mejorar la salud de los huesos.²²

2. JUSTIFICACIÓN

La osteoporosis constituye un importante problema de salud pública debido a que se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad, particularmente las fracturas de cadera y vertebrales, las cuales son una carga enorme para el sistema de salud debido a los altos costos económicos en la atención de estas fracturas y los derivados de la discapacidad que ellas producen. El uso de modelos animales adecuados para evaluar eficacia preventiva y terapéutica de nuevos tratamientos, resultan en una aportación de valor a fin de implementar medidas oportunas para combatir esta enfermedad.

3. HIPÓTESIS

El metabolismo mineral óseo de las ratas Hsd:Wistar ooforectomizadas será mejor al consumir diariamente inulina sola o en combinación con isoflavonas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Comparar el efecto de la inulina de agave e inulina de achicoria y su combinación con isoflavonas sobre la absorción del calcio en hembras Hsd:Wistar ooforectomizadas.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluación de variaciones morfométricas tales como peso y longitud en hembras Hsd:Wistar intactas y en hembras ooforectomizadas tratadas con inulina de agave y achicoria así como su combinación con isoflavonas.
- Determinación de niveles de calcio en sangre y orina en hembras Hsd:Wistar intactas y en hembras ooforectomizadas tratadas con inulina de agave y achicoria así como su combinación con isoflavonas.
- Determinación de la densidad mineral ósea (DMO) en fémur y vértebra (T13) en hembras Hsd:Wistar intactas y en hembras ooforectomizadas tratadas con inulina de agave y achicoria así como su combinación con isoflavonas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Productos utilizados:

- Suplemento alimenticio en polvo a base de inulina de agave azul (*Agave tequilana Weber*) con Número de lote: I04E10.
- Suplemento alimenticio en polvo de inulina de achicoria (*Cichorium intybus*) con Número de lote: IQ1LQ9.
- Isoflavonas (una mezcla de extracto estandarizado de manzanilla, extracto de té verde, extracto estandarizado de isoflavonas de soya) con Número de lote: FT108284.

5.2 Animales

Se utilizaron 60 ratas hembras ooforectomizadas y un grupo control de 10 ratas hembras intactas de la cepa Wistar (Hsd:Wi) de 8 a 9 semanas de edad con un peso promedio de $200.40g \pm 25.76g$, fueron alojadas bajo condiciones ambientales controladas que incluían extracción e inyección de aire con 18 recambios por hora; éste se realizó mediante filtros HEPA filtrándose partículas hasta de $3 \mu m$ en el aire de inyección. La temperatura se mantuvo a $23 \text{ }^{\circ}C \pm 1 \text{ }^{\circ}C$ y la humedad relativa en 55%, los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12/12 hrs.⁴⁹, se les proporcionó alimento Harlan Teklad 2018 S para ratón/rata y agua filtrada hasta $0.22 \mu m$ y clorada hasta 10 ppm *ad libitum*, para su alojamiento se utilizaron cajas de polisulfonato transparente con las dimensiones siguientes: 32 x 47 x 20 cm. (5 ratas/caja), la cama (Aspen Pine Shaving) que se cambió cada tercer día, los bebederos se lavaron un día a la semana y se esterilizaron.

5.3 Ooforectomía bilateral

El procedimiento se realizó cuando las ratas tenían de 4 a 5 semanas de edad, primero se pesaron en una báscula OHAUS para poder dosificar la Xilacina como tranquilizante a una dosis de $0.83mg/100 \text{ gr.}^{50}$ y la Ketamina como anestésico a una dosis de $4.17mg/100 \text{ gr.}^{50}$ ambos se administraron por vía Intraperitoneal (Ip), sujetando al animal en una posición decúbito dorsal, la administración se hizo con una jeringa de insulina calibre 23G y una vez que estaban dormidas se aplicó duralágrima en los ojos para evitar la resequedad

cubriéndolo en su totalidad y vigilando que estuviera cubierto hasta que la rata se recuperara de la anestesia .

La resección de los ovarios se realizó de manera lateral a la altura del ilar, la zona se rasuró y se embrocó con benzal, posteriormente se hizo una pequeña incisión de piel y del músculo oblicuo externo abdominal de menos de 1 cm, con la pinza sin dientes se buscó el ovario y una vez localizado se pinzó por debajo a la altura del oviducto y se procedió a hacer un nudo con sutura absorbible de 3 ceros por debajo de la pinza después, con una navaja de bisturí se cortó el oviducto por encima de la pinza y se retiró el ovario, al finalizar el procedimiento quirúrgico se cerró músculo y piel con sutura absorbible.

Una vez suturada la región costal de ambos lados, se roció vetoquinol® para ayudar a la cicatrización y evitar infección, se administró Ketoprofeno como analgésico a una dosis de 1 a 2 mg/Kg⁵⁰ por vía subcutánea (Sc) utilizando una jeringa de insulina de 0.5 ml calibre 23. Las ratas se colocaron en una caja con cama y algodón para mantener su temperatura y cuando despertaban se agrupaban 5 animales por jaula, adicionando unos pellets remojados en el piso además del alimento en el comedero y agua *ad libitum*. Las ratas se identificaron por medio de muescas en la oreja.

5.4 Frotis Vaginales

Después de 15 días post-cirugía, a todas las hembras de los grupos experimentales se les tomó un frotis vaginal, utilizando un hisopo impregnado con agua destilada el cual se introdujo cuidadosamente en la vagina, aproximadamente 1 cm, removiendo suavemente las células de las paredes y colocando la muestra en dos portaobjetos, uno se sumergió en alcohol al 70% durante 15 minutos y se secó a temperatura ambiente y el otro se dejó sin fijar en el alcohol.

El estudio del ciclo estral de las ratas mediante citologías es un recurso experimental importante debido a su corta duración, su fácil interpretación y lo simple de la técnica de recolección.⁵¹

La determinación del ciclo estral se llevó a cabo por medio de la tinción Diff Quick y Papanicolau con el propósito de asegurarnos que todas las ratas operadas (sin ovarios) estaban en etapa de diestro o inactiva y llevar a cabo el tratamiento correspondiente a cada grupo (Cuadro 4) y en el caso del grupo control o intacto la determinación del ciclo

estral se llevó a cabo sólo para identificar la etapa del ciclo estral en la que se encontraban, ver Anexo 9.1 y 9.2

5.4.1 Tinción de Papanicolaou

La tinción de Papanicolaou es una tinción tricrómica que ha sido empleada universalmente en la citología exfoliativa, principalmente para el diagnóstico de cáncer cérvico-uterino, sin embargo, es de gran utilidad para colorear células inflamatorias, neoplásicas, etc. Ofrece un excelente panorama para el diagnóstico citológico en frotis vaginales, ya que tiene la capacidad de acentuar el detalle celular y realizar una mejor diferenciación celular.⁵²

Técnica:

1. Fijar la muestra con etanol de 96° durante 15 minutos
2. Lavar con agua de la llave (10 pases)
3. Teñir con Hematoxilina de Harris (1-2 minutos)
4. Lavar con agua de la llave (10 pases con 2 cambios)
5. Virar con alcohol-ácido al 1% (un pase)
6. Lavar con agua de la llave (10 pases con 2 cambios)
7. Introducir en etanol 96° (10 pases)
8. Teñir con colorante OG-6 (2 minutos)
9. Introducir en etanol 96° (10 pases con 2 cambios)
10. Teñir con colorante EA-50 (2 minutos)
11. Introducir en etanol 96° (10 pases con 3 cambios)
12. Deshidratar con etanol absoluto (10 pases con 3 cambios)
13. Aclarar con xilol (10 pases con 3 cambios)
14. Colocar resina sintética y cubreobjetos sobre la muestra que se encuentra en el portaobjetos.

5.4.2 Tinción de Diff-Quik

Es una tinción tipo Romanowsky, muy utilizada en la mayoría de los laboratorios y clínicas veterinarias para identificar células nucleadas, ya que a diferencia de la tinción de Papanicolaou, únicamente se utiliza un fijador y dos colorantes. Es fácil y rápida de usar. Para realizarla es conveniente contar con frotis delgados (monocapa), y secar rápidamente la muestra para obtener mejores resultados.⁵²

Técnica:

1. Secar al aire
2. Fijar con metanol (1 minuto)
3. Teñir con Solución I (naranja) (1 minuto)
4. Teñir con Solución II (morada) (1 minuto)
5. Lavar con agua de la llave
6. Dejar secar a temperatura ambiente
7. Colocar resina sintética y cubreobjetos sobre el material que se encuentra en el portaobjetos.

5.5 Esquema de tratamiento

La dosis de Metlin® y la inulina de achicoria fue de 385 mg/día/rata y la dosis de isoflavona fue de 33.5 mg/día/rata;⁵³ se proporcionaron en el agua de bebida considerando que cada rata tiene un consumo de agua de 10 ml/100 g⁵⁴ el cambio de los bebederos en todos los grupos, se hizo cada tercer día. El tratamiento para cada grupo se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Esquema de tratamiento.

Grupo	Hembras con OSH	Tratamiento	No. de animales	Duración del estudio
1	Si	(Metlin®)	10	8 semanas
2		Inulina de achicoria	10	
3		Isoflavonas	10	
4		(Metlin®)+ Isoflavonas	10	
5		Inulina de achicoria + Isoflavonas	10	
6		No	10	
7	No	No	10	

OSH: Ooforectomía

5.6 Morfometría

5.6.1 Peso, se expresó en gramos. Se determinó con una frecuencia de 2-3 días (28 mediciones en 60 días) utilizando una balanza OHAUS, precisión ± 1 mg.

5.6.2 Longitud, se expresó en centímetros. Se registró de forma basal, al primer y segundo mes, los animales, se colocaron sobre una regla graduada en mm, haciendo coincidir el cero de la regla con el hocico y tomando la medida coincidente con los últimos pelos de la base de la cola

5.7 Bioquímica sanguínea

Se realizaron tres tomas de muestras sanguíneas considerando el 10% de la volemia; el muestreo se realizó de forma basal, primero y segundo mes en cada grupo experimental de manera individual, la vía de acceso fue el seno conjuntival por medio de un capilar sin heparina previa anestesia con isofluorano en un contenedor con algodón impregnado de 0.6 ml de isofluorano, las ratas se introdujeron aproximadamente de 1 a 1.5 min/rata. Al terminar de sangrar se utilizó duralágrima en el ojo para calmar la irritación que la técnica pudiera haber ocasionado.

La sangre obtenida fue centrifugada a 654 gravedades durante 10 minutos en una centrífuga Zeigen (80-2S), se separó el plasma, se vació en tubos Eppendorf estériles y se congeló a -4°C hasta su utilización, todas las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Daytona Rx de Randox automático con uso manual opcional, para la validación de la técnica se utilizan soluciones patrones para la lectura de cada analito, Cuadro 5.

Cuadro 5. Soluciones patrón Randox® para la detección de analitos.

ANALITO	Solución patrón Randox®
Aspartato amino transferasa (AST)	Catálogo No. AS 1202 o AS1267
Alanina amino transferasa (ALT)	Catálogo No: AL 1200 y/o AL 1268
Actividad de fosfatasa alcalina (FAS)	Catálogo No: AP 501
Glucosa	Catálogo No. GL 2612
Colesterol	Catálogo No: CH201
Triglicéridos	Catálogo No. TR 213
Creatinina	Catálogo No: CR 510
Fósforo	Catálogo No. PH 1016
Calcio	Catálogo No. CA2390

5.8 Urianálisis

Se realizaron tres tomas de muestras de orina; basal, primero y segundo mes en cada grupo experimental de manera individual, cada hembra se alojó en una jaula del rack metabólico por un periodo menor de 24 hrs con agua y alimento *ad libitum*.

Los analitos fueron los siguientes:

- Creatinina

La determinación de creatinina se llevó a cabo por el método cinético de Jaffe modificado (sin desproteinización) utilizando el espectrofotómetro Daytona Rx de Randox con control de temperatura de ± 0.5 °C que sea capaz de leer la absorbancia con exactitud, con una sensibilidad de 0.001 a 510 nm. El ancho de banda debe ser de 10 nm o menos, la desviación de la luz de 0.5% o menos y la exactitud de longitud de onda dentro de los 2 nm. La solución patrón Randox® No: CR 510

- Calcio

El método para la determinación de calcio fue Arsenazo III (ácido bisbencen-arzónico 2,2-(1,8-hidroxi-3,6-disulfonaftilen-2,7-biazol) que reacciona con el calcio en solución ácida para formar un complejo azul-púrpura. El color desarrollado tiene un máximo de absorbancia a 650 nm y es proporcional a la concentración de calcio en la muestra, la lectura se realizó en el espectrofotómetro Daytona Rx de Randox que lee la absorbancia exactamente a 650 nm con una sensibilidad de 0.001, mide la intensidad de la luz a diferentes longitudes de onda, estudia los cambios energéticos producidos en un compuesto químico al ser incidido por ondas de radiación electromagnética. La solución patrón Randox® No: CA2390

5.9 Densitometría ósea

Al término del estudio al momento de realizar la necropsia se obtuvo el fémur izquierdo y la vértebra T13 de 3 ratas de cada grupo para el estudio de Densidad Mineral Ósea (DMO) que se llevó a cabo en un densitómetro Discovery QDR series Hologic adaptado a animales pequeños en el Instituto Nacional de Rehabilitación.

5.10 Necropsia

Al finalizar el estudio los animales fueron sacrificados utilizando la cámara de CO₂ administrando el gas de forma gradual y cbp para ocasionar la muerte de los animales y poder realizar una necropsia para la obtención de los órganos listados a continuación almacenándolos en un frasco con formalina al 10% amortiguada durante 48 horas para su correcta fijación.

- Bazo
- Hígado
- Riñón
- Corazón
- Intestino delgado
- Intestino grueso
- Dos linfonodos
- Fémur derecho
- Útero (en 3 ratas de cada grupo)

5.11 Histopatología

Una vez fijados los órganos en formol, se procesaron en un Histoquinet Leica (TP 1020), el cual aclara, impregna y parafina los tejidos al sumergirlos automáticamente en un periodo de 20 a 24 horas. La inclusión se realizó en un incluidor marca Leica para posteriormente realizar cortes de 3 μm utilizando un micrótomo Leica (RM 2125 RT). Los tejidos se llevaron al tren de tinción de rutina (Hematoxilina Eosina) y finalmente las laminillas fueron montadas con resina para su revisión en el microscopio óptico.

5.12 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se llevo a cabo utilizando el paquete estadístico IBM-SPSS 19. Los análisis para peso, longitud, se llevó a cabo por el método de Análisis de Varianza para mediciones repetidas y para densitometría ósea un analisis de varianza de un solo factor.

EL análisis estadístico de los analitos para bioquímica sanguínea y Urianálisis, se hizo por el método de ANOVA para mediciones repetidas en el paquete estadístico IBM-SPSS 19, con la variable intra-sujetos: Mes (Basal, M1, M2) y la variable Tratamiento (Metlin[®], Inulina de achicoria, Isoflavonas, Metlin[®] + Isoflavonas, Inulina de achicoria + Isoflavonas, OSH, Intactas)

6. RESULTADOS

6.1 Medidas morfométricas

a) Peso

Sin importar el tratamiento, se encontró una ganancia de peso mayor en todas las hembras ooforectomizadas en relación a las hembras intactas durante los 60 días que duró el estudio (P=0.001) (Figura 7).

En el Anexo 9.3 se muestran las medias y desviaciones estándar de peso en todos los grupos.

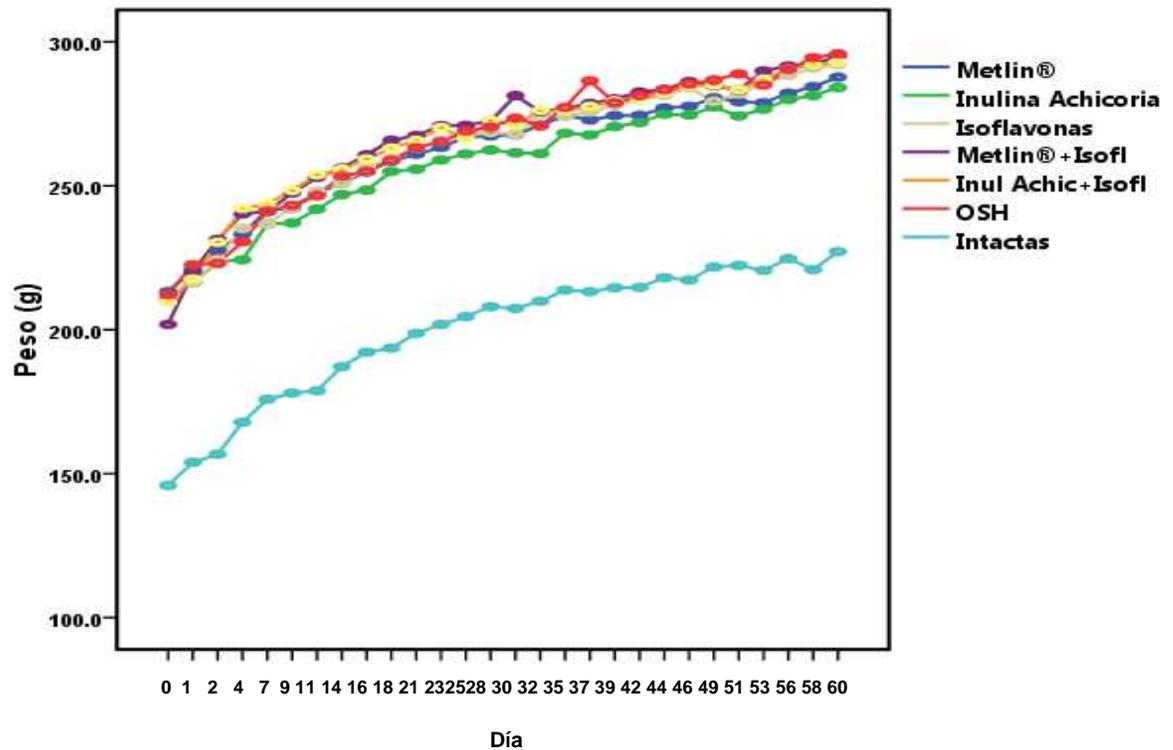
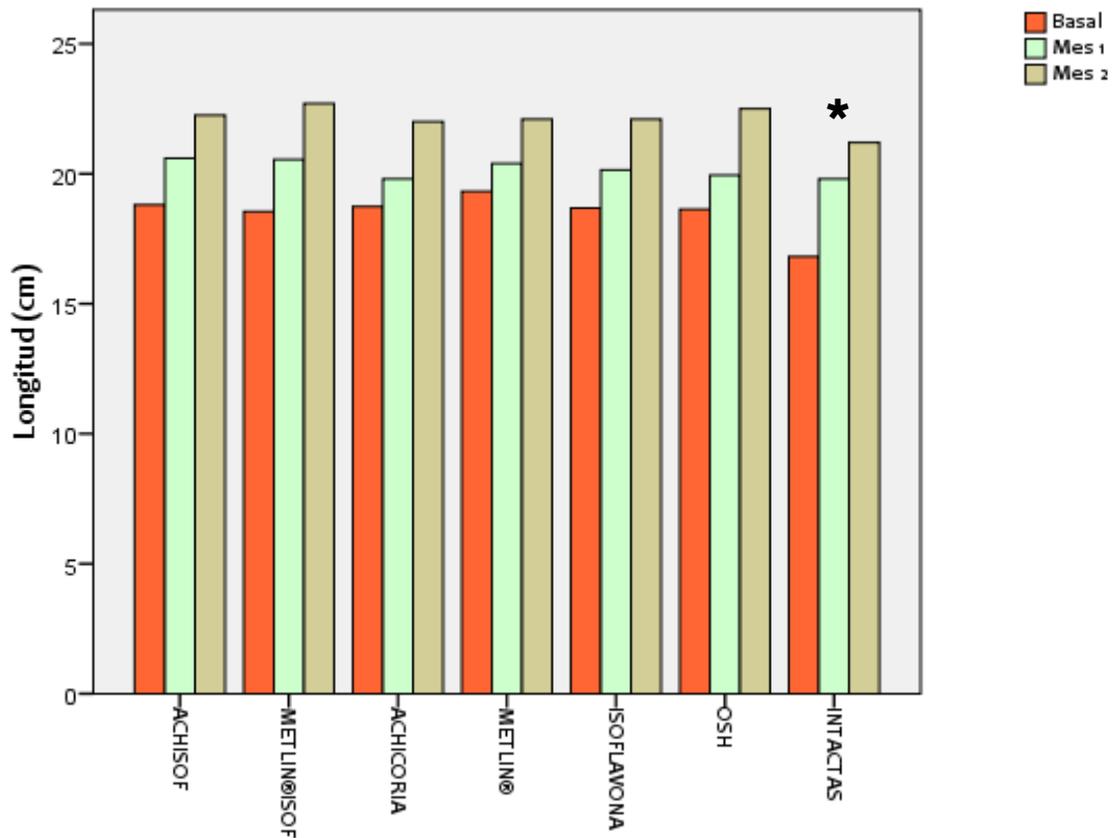


Figura 7. Promedios de ganancia de peso durante 60 días en ratas Hsd:Wistar con OSH: tratadas, sin tratamiento e intactas.

b) Longitud

Al término del estudio se observó una diferencia significativa ($P=0.01$) de todos los grupos sometidos a OSH que resultaron con una mayor longitud en relación a las hembras intactas.



* $P=0.01$

Figura 8. Promedios de longitud (cm) en ratas Hsd:Wistar con OSH, tratadas e intactas, durante 60 días.

6.2 Bioquímica sanguínea

En el Cuadro 6, se muestran las medias y errores estándar de cada analito examinado dividido por tratamiento en la primer columna se muestra los valores normales de referencia.

Cuadro 6. Bioquímica sanguínea de ratas Hsd:Wistar con OSH: tratadas, sin tratamiento e intactas.

ANALITOS	Valores normales	Metlin®	Inulina de achicoria	Isoflavonas	Metlin® + Isoflavonas	Inulina de achicoria + Isoflavonas	OSH	Intactas
AST UL	114.5 ±25.4	174±5.4 ^a	178.5±5.4 ^a	183±5.4 ^a	182±5.4 ^a	181±5.4 ^a	166.3±5.4 ^a	172±5.4 ^a
ALT UL	58.5±10.2	51.2±1.8 ^{ab}	54.6±1.8 ^b	52.7±1.8 ^{ab}	54.3±1.8 ^b	53.9±1.8 ^{ab}	47.1±1.8 ^a	51±1.8 ^{ab}
FAS UL	389.7 ±49.3	349±20.53 ^a	350.2±20.53 ^a	338.8±20.53 ^a	363.4±20.53 ^a	379±20.53 ^a	359.6±20.53 ^a	303.7±20.53 ^a
Glucosa mmol L	7.9±0.8	7.8±0.26 ^a	7.7±0.26 ^a	7.5±0.26 ^a	7.4±0.26 ^a	7.3±0.26 ^a	6.9±0.26 ^a	7.1±0.26 ^a
Colesterol mmol/L	2.0±0.5	2±0.08 ^{ab}	1.83±0.08 ^{ab}	2±0.08 ^{ab}	2±0.08 ^{ab}	2.2±0.08 ^b	1.9±0.08 ^{ab}	1.78±0.08 ^a
Trigliceridos mmol/L	0.66±0.16	0.9±0.1 ^{ab}	0.61±0.1 ^a	0.72±0.1 ^{ab}	0.62±0.1 ^{ab}	0.75±0.1 ^{ab}	0.82±0.1 ^{ab}	1.15±0.1 ^b
Creatinina µmol/L	50.7±13.0	68.4±2.2 ^{ab}	68.5±2.2 ^{ab}	70.4±2.2 ^{bd}	62±2.2 ^{abc}	70±2.2 ^{bcd}	64.3±2.2 ^{ab}	61.2±2.2 ^a
Fósforo mmol/L	1.54±0.26	2.16±0.06 ^a	2.1±0.06 ^a	1.85±0.06 ^a	2.06±0.06 ^a	2.03±0.06 ^a	1.94±0.06 ^a	1.98±0.06 ^a
Calcio mmol/L	2.80±0.03	2.66±0.05 ^b	2.57±0.05 ^{ab}	2.50±0.05 ^{ab}	2.58±0.05 ^{ab}	2.47±0.05 ^{ab}	2.34±0.05 ^a	2.57±0.05 ^{ab}

Literales diferentes denotan diferencias significativas (P≤0.01)

Se observó una diferencia significativa de 6.8 U/L en los niveles de ALT en las hembras con OSH en relación a las tratadas con Metlin®+Isoflavonas y las tratadas con Inulina de achicoria (P=0.01), sin embargo, carece de relevancia biológica al encontrarse dentro de los valores normales de referencia. Lo mismo sucede con los niveles de calcio, en las hembras con OSH tratadas con Metlin® presentaron una diferencia significativa (P=0.01) comparadas con las hembras con OSH sin tratamiento sin embargo todos los datos obtenidos para este analito se encuentra dentro de los valores normales de referencia.

6.3 Urianálisis

El Cuadro 7, muestra las medias y errores estándar de cada analito examinado dividido por tratamiento, la primera columna muestra los valores normales. En el anexo 9.4 y 9.5 se muestra el Análisis de Varianza para creatinina y calcio.

Cuadro 7. Urianálisis en ratas Hsd:Wistar con OSH: tratadas, sin tratamiento e intactas.

ANALITOS	Valores Normales	Metlin®	Inulina de achicoria	Isoflavonas	Metlin® + Isoflavonas	Inulina de achicoria + Isoflavonas	OSH	Intactas
Creatinina $\mu\text{mol/L}$	4,878.80 ± 437.58	4,348 $\pm 342.13^a$	4,139 $\pm 342.13^a$	4,157 $\pm 342.13^a$	3,979 $\pm 342.13^a$	4,260 $\pm 342.13^a$	4,069 $\pm 342.13^a$	3,019 $\pm 342.13^b$
Calcio mmol/L	1.43± 0.082	1.48 $\pm 0.19^a$	1.60 $\pm 0.19^a$	1.80 $\pm 0.19^a$	1.32 $\pm 0.19^{ac}$	1.93 $\pm 0.19^{ab}$	1.83 $\pm 0.19^a$	1.61 $\pm 0.19^a$

Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$)

Los valores obtenidos de creatinina se encontraron debajo de los límites normales de referencia en todos los tratamientos, no obstante, este hallazgo carece de relevancia biológica. En el caso de los niveles de calcio en orina, se observa que es menor en el grupo tratado con Metlin®+Isoflavonas en relación a todos los demás grupos sin embargo, solamente presenta una diferencia significativa ($P < 0.05$) con el grupo tratado con Inulina de achicoria + isoflavonas.

6.4 Necropsia

Macroscópicamente no se encontraron alteraciones en ninguna de las ratas.

6.5 Histopatología

Los cambios microscópicos observados en todos los cortes de los órganos revisados fueron discretos e inespecíficos, ninguna de las alteraciones se presentó en los individuos de un solo grupo por lo que no pueden ser asociadas a un tratamiento en particular

Se evaluaron secciones histológicas de fémur de todos los grupos, en las cuales no se observó actividad osteoclástica relevante, así como tampoco otras alteraciones, ver Anexo 9.6 y 9.7.

6.5 Densitometría Ósea

El Cuadro 8, muestra las medias y errores estándar obtenidos de cada fémur y vértebra analizados en el Densitómetro, para cada uno de los tratamientos, en el anexo 9.8 y 9.9 se muestra la tabla con el análisis univariado para vértebra y fémur respectivamente.

Al término del estudio se observaron diferencia significativas en la densitometría ósea de vértebra (T13), las ratas tratadas con Metlin® tuvieron densidades mayores que el grupo tratado con Inulina de achicoria+Isoflavonas y OSH (P=0.01). El grupo tratado con Metlin®+Isoflavonas tuvieron densidades mayores que los demás grupos (P=0.01). Mientras que en fémur, los tratamientos con Metlin® y con inulina de achicoria con y sin Isoflavonas no mostraron diferencias entre si (P>0.01) ni con las intactas. Estos grupos tuvieron promedios de densidad ósea mayores que las ratas con OSH (P<0.01). La mayor densidad ósea se observó en el grupo tratado con Metlin® +Isoflavonas (0.243 g/cm²), mostrando una diferencia significativa (P=0.01) con los grupos Metlin®, OSH e intactas.

Cuadro 8. Promedios de Densitometría ósea en ratas Hsd:Wistar con OSH tratadas, sin tratamiento e intactas.

Hueso	Metlin® g/cm ²	Inulina de achicoria g/cm ²	Isoflavonas g/cm ²	Metlin® + Isoflavonas g/cm ²	Inulina de achicoria + Isoflavonas g/cm ²	OSH g/cm ²	Intactas g/cm ²
Fémur	0.231±.003 ^{abc}	0.239±.003 ^{bdc}	0.234±.003 ^{abdc}	0.243±.003 ^{bd}	0.236±.003 ^{bdc}	0.225±.003 ^{ac}	0.233±.003 ^{abc}
Vértebra	0.212±.004 ^{bd}	0.205±.004 ^{abe}	0.207±.004 ^{abe}	0.220±.004 ^{bdf}	0.195±.004 ^{ace}	0.195±.004 ^{ae}	0.205±.004 ^{abe}

* Literales diferentes denotan diferencias significativas (P≤0.01)

** DMO en g/cm²

RESULTADOS

Las DMO para fémur y vértebra correspondientes a los grupos experimentales se muestran en la figura 9.

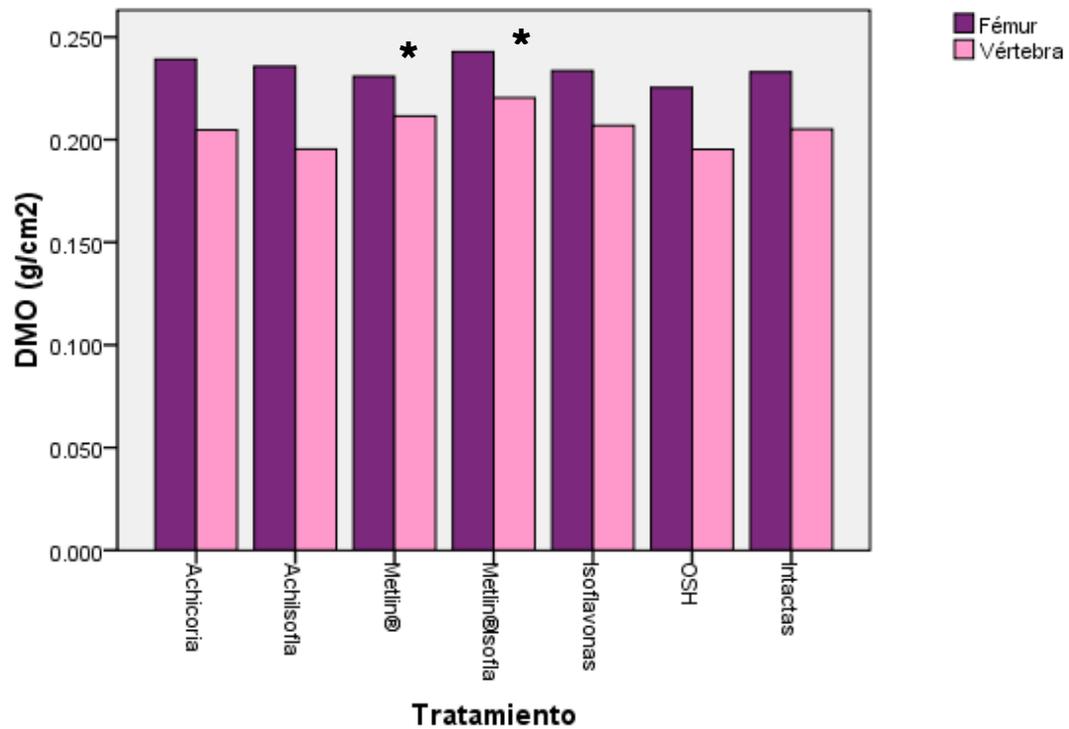


Figura 9. Gráfica de evaluación de la DMO en fémur y última vértebra torácica en ratas Hsd:Wistar con OSH, tratadas e intactas durante 60 días.

7. DISCUSIÓN

El modelo de ratas ooforectomizadas (OSH) es considerado por la FDA (Food and Drug Administration) apropiado para la investigación de problemas referentes a la pérdida de hueso, un factor de riesgo en la osteoporosis; varios reportes indican que la deficiencia de estrógenos impiden la absorción intestinal de calcio que parece ser dependiente de tiempo y edad. La deficiencia de estrógenos induce también a efectos secundarios como la hiperfagia, aumento de peso, y la adiposidad por una reducción del gasto de energía y disminución en la tasa metabólica.^{55, 56} Los resultados obtenidos en ganancia de peso y longitud mostraron un aumento en todas las hembras con OSH en relación a las hembras intactas.

Normalmente sólo el 30% del calcio de la dieta es absorbido por el cuerpo y depositado en el hueso,²⁴ se ha comprobado que el consumo de alimentos funcionales pueden contribuir al aumento en la biodisponibilidad de este mineral. Hay estudios que demuestran que los prebióticos no sólo aumentan la absorción de Ca^{2+} sino también su depósito en el hueso de la rata.^{27, 30, 36}

Se menciona que los fructanos tipo inulina pueden ser más eficaces cuando los animales de experimentación tienen una mayor demanda de calcio como en la edad de rápido crecimiento (4 a 10 semanas) o en la deficiencia de estrógenos. En las ratas, a partir de los 45 días, aparece la diferencia de crecimiento ligada al sexo siendo mayor en machos que en hembras.^{26, 55} Los tratamientos se iniciaron cuando las ratas tenían 8 a 9 semanas de edad y se terminó cuando tenían 16 y 17 semanas de edad, sin embargo aunque los niveles de calcio en las ratas tratadas con Metlin® presentaron los niveles más altos estos no rebasaron los niveles normales.

Se ha demostrado que los niveles de calcio en orina son más bajos en ratas tratadas con inulina; estos estudios muestran que los fructanos tipo inulina aumentan la absorción de calcio intestinal y lo mismo sucede con la Densidad Mineral Ósea (DMO) en fémur y columna en donde se ve incrementada significativamente.⁵⁷ Los resultados muestran que las ratas tratadas con Metlin®+Isoflavonas presentan niveles de calcio en orina más bajo y una diferencia significativa ($P<0.05$) con el grupo tratado con Inulina de achicoria+Isoflavonas.

Se menciona que los fructanos tipo inulina al promover el crecimiento de bacterias (*Bifidobacterias* y *Lactobacillus*) promueven la absorción y la biodisponibilidad de los fitoestrógenos que a su vez ayudarán a preservar la arquitectura ósea,²² esto es debido a

que las isoflavonas al presentar una actividad similar a los estrógenos tienen la capacidad de influir en la absorción de minerales, por lo que al ser un complemento de la inulina se observara un aumento significativo de minerales como el calcio y fósforo.³ Los resultados obtenidos en este trabajo no muestran estos aumentos significativos en minerales como el calcio y fósforo en sangre y orina, resultados que puede atribuirse al tiempo del tratamiento.

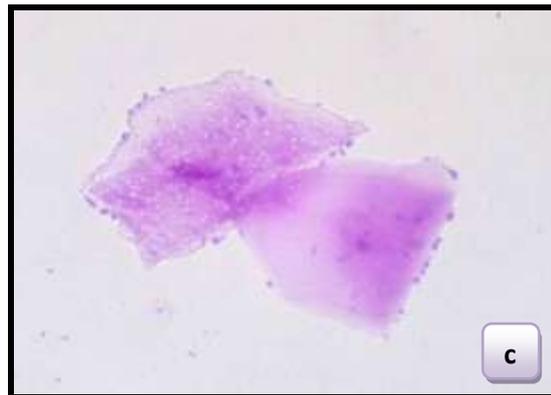
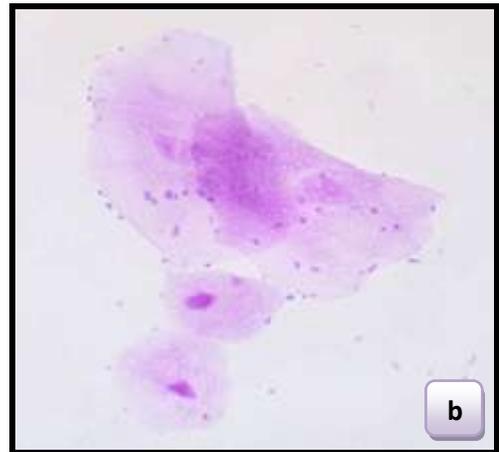
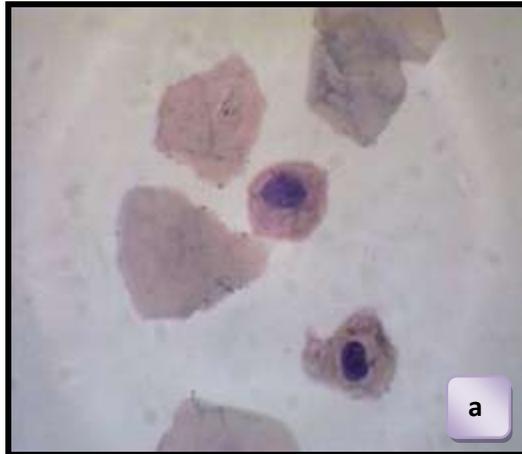
Existe una gran variabilidad de los parámetros bioquímicos con los diferentes estados de la DMO o con la frecuencia de pérdida ósea unida al envejecimiento normal; un paciente puede presentar una DMO normal con parámetros bioquímicos elevados, como puede ser también, que un paciente presente un recambio óseo bajo un día y al día siguiente, dada esta variabilidad, ese recambio puede estar en el punto extremo. En estudios realizados con ratas se ha encontrado que el incremento de los niveles de calcio en orina son mayores en ratas con OSH, aun cuando no se observen diferencias en el calcio y fósforo sérico.³ En este trabajo se observa que el grupo tratado con Metlin®+Isoflavonas presenta menor concentración de calcio en orina y una mayor densitometría ósea tanto en fémur como en vértebra en comparación con los demás grupos.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que la inulina de agave, Metlin®, aumenta la absorción de calcio significativamente en comparación con la inulina de achicoria a nivel intestinal en el colon. Esta disponibilidad de calcio es mayor al usar como complemento las isoflavonas, aun cuando los niveles de calcio y fósforo sérico no presentan cambios significativos, sin embargo, podemos observar que en orina los niveles de calcio son menores en el grupo tratado con Metlin® + Isoflavonas en comparación con los demás grupos, pero solamente se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con el grupo tratado con Inulina de achicoria + Isoflavonas. Los resultados obtenidos de las necropsias y la histopatología no proporcionan datos relevantes al estudio, debido a la duración del mismo; probablemente debido a que las alteraciones histomorfológicas siempre son posteriores a los cambios bioquímicos y funcionales. En cuanto a la DMO encontramos que el tratamiento con Metlin® + Isoflavonas presento los mejores resultados en vértebra seguidos de la DMO en fémur, lo que indica que la biodisponibilidad del calcio en este grupo fue mejor, sin embargo es necesario investigar los efectos de Metlin® en comparación con la Inulina de achicoria en tiempos más prolongados e incluir análisis de otros marcadores óseos para obtener resultados más concluyentes.

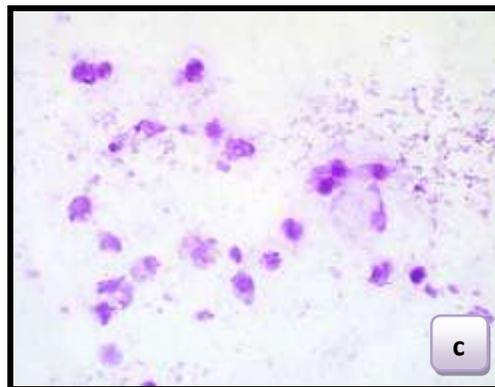
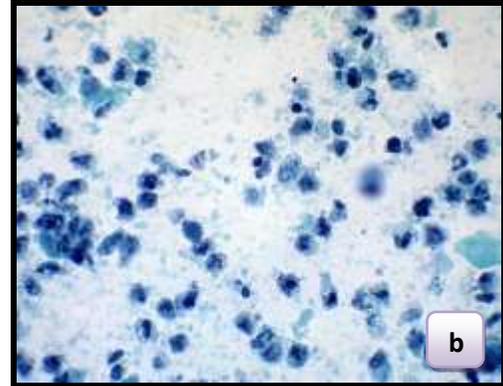
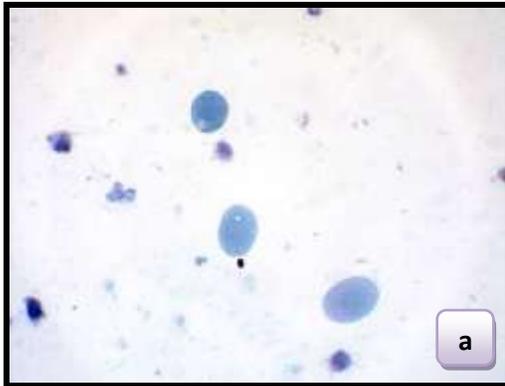
9. ANEXOS

9.1 Frotis vaginal de hembras intactas (sin ooforectomía).



Estro. Predominan las células sin núcleo, cornificadas. a) Tinción de Papanicolau 40X, b) y c) Tinción de Diff-Quik 40X.

9.2 Frotis vaginal de hembras ooforectomizadas.



Diestro. Gran cantidad de leucocitos, se pueden encontrar escasas células queratinizadas o nucleadas, a) y b) Tinción de Papanicolau 40X y c) Tinción de Diff-Quik 40X.

9.3 Pesos y desviaciones estándar por día de hembras ooforectomizadas con tratamiento e intactas.

Tratamiento	Día	Media	Error típico	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Inulina de achicoria + Isoflavonas	1	209,480	4,176	201,135	217,825
	2	217,650	4,464	208,730	226,570
	3	230,390	4,730	220,937	239,843
	4	242,150	5,027	232,104	252,196
	5	243,680	5,100	233,488	253,872
	6	248,440	5,340	237,768	259,112
	7	253,810	5,611	242,597	265,023
	8	255,760	5,692	244,386	267,134
	9	259,350	5,931	247,497	271,203
	10	263,070	6,131	250,818	275,322
	11	265,810	6,147	253,526	278,094
	12	270,240	6,231	257,788	282,692
	13	266,310	5,983	254,353	278,267
	14	272,680	9,886	252,925	292,435
	15	271,080	8,008	255,077	287,083
	16	276,200	6,496	263,220	289,180
	17	276,030	6,466	263,108	288,952
	18	277,580	7,530	262,532	292,628
	19	279,520	6,867	265,798	293,242
	20	279,900	6,887	266,138	293,662
	21	282,380	6,864	268,663	296,097
	22	284,620	6,910	270,812	298,428
	23	284,990	6,855	271,290	298,690
	24	283,420	7,045	269,342	297,498
	25	287,050	7,139	272,783	301,317
	26	290,540	7,125	276,302	304,778
	27	291,980	7,141	277,710	306,250
	28	293,010	7,233	278,555	307,465
Metlin® + Isoflavonas	1	201,830	4,176	193,485	210,175
	2	220,020	4,464	211,100	228,940

	3	231,400	4,730	221,947	240,853
	4	240,250	5,027	230,204	250,296
	5	241,030	5,100	230,838	251,222
	6	247,490	5,340	236,818	258,162
	7	252,920	5,611	241,707	264,133
	8	256,200	5,692	244,826	267,574
	9	260,790	5,931	248,937	272,643
	10	265,870	6,131	253,618	278,122
	11	267,460	6,147	255,176	279,744
	12	270,940	6,231	258,488	283,392
	13	271,000	5,983	259,043	282,957
	14	272,550	9,886	252,795	292,305
	15	281,330	8,008	265,327	297,333
	16	275,780	6,496	262,800	288,760
	17	276,820	6,466	263,898	289,742
	18	278,660	7,530	263,612	293,708
	19	280,230	6,867	266,508	293,952
	20	282,590	6,887	268,828	296,352
	21	283,490	6,864	269,773	297,207
	22	286,250	6,910	272,442	300,058
	23	284,670	6,855	270,970	298,370
	24	283,250	7,045	269,172	297,328
	25	289,940	7,139	275,673	304,207
	26	291,660	7,125	277,422	305,898
	27	292,040	7,141	277,770	306,310
	28	295,200	7,233	280,745	309,655
Inulina de achicoria	1	210,540	4,176	202,195	218,885
	2	216,430	4,464	207,510	225,350
	3	223,600	4,730	214,147	233,053
	4	224,320	5,027	214,274	234,366
	5	236,740	5,100	226,548	246,932
	6	237,070	5,340	226,398	247,742
	7	241,860	5,611	230,647	253,073
	8	246,980	5,692	235,606	258,354
	9	248,480	5,931	236,627	260,333
	10	255,030	6,131	242,778	267,282

	11	255,810	6,147	243,526	268,094
	12	258,960	6,231	246,508	271,412
	13	261,090	5,983	249,133	273,047
	14	262,470	9,886	242,715	282,225
	15	261,450	8,008	245,447	277,453
	16	261,230	6,496	248,250	274,210
	17	268,030	6,466	255,108	280,952
	18	267,680	7,530	252,632	282,728
	19	270,590	6,867	256,868	284,312
	20	271,970	6,887	258,208	285,732
	21	274,900	6,864	261,183	288,617
	22	274,610	6,910	260,802	288,418
	23	277,270	6,855	263,570	290,970
	24	275,270	7,045	261,192	289,348
	25	276,630	7,139	262,363	290,897
	26	279,980	7,125	265,742	294,218
	27	281,370	7,141	267,100	295,640
	28	284,170	7,233	269,715	298,625
Metlin®	1	213,260	4,176	204,915	221,605
	2	220,860	4,464	211,940	229,780
	3	227,590	4,730	218,137	237,043
	4	233,200	5,027	223,154	243,246
	5	241,570	5,100	231,378	251,762
	6	242,230	5,340	231,558	252,902
	7	247,300	5,611	236,087	258,513
	8	251,010	5,692	239,636	262,384
	9	254,900	5,931	243,047	266,753
	10	258,610	6,131	246,358	270,862
	11	260,980	6,147	248,696	273,264
	12	263,350	6,231	250,898	275,802
	13	266,970	5,983	255,013	278,927
	14	267,350	9,886	247,595	287,105
	15	267,780	8,008	251,777	283,783
	16	271,070	6,496	258,090	284,050
	17	274,430	6,466	261,508	287,352
	18	272,860	7,530	257,812	287,908

	19	274,400	6,867	260,678	288,122
	20	274,500	6,887	260,738	288,262
	21	277,040	6,864	263,323	290,757
	22	277,590	6,910	263,782	291,398
	23	280,600	6,855	266,900	294,300
	24	279,220	7,045	265,142	293,298
	25	278,850	7,139	264,583	293,117
	26	282,190	7,125	267,952	296,428
	27	284,460	7,141	270,190	298,730
	28	287,730	7,233	273,275	302,185
Isoflavonas	1	209,590	4,176	201,245	217,935
	2	216,360	4,464	207,440	225,280
	3	224,270	4,730	214,817	233,723
	4	235,200	5,027	225,154	245,246
	5	236,720	5,100	226,528	246,912
	6	242,390	5,340	231,718	253,062
	7	248,280	5,611	237,067	259,493
	8	250,860	5,692	239,486	262,234
	9	256,280	5,931	244,427	268,133
	10	259,550	6,131	247,298	271,802
	11	263,120	6,147	250,836	275,404
	12	265,640	6,231	253,188	278,092
	13	267,570	5,983	255,613	279,527
	14	268,540	9,886	248,785	288,295
	15	267,990	8,008	251,987	283,993
	16	274,930	6,496	261,950	287,910
	17	274,140	6,466	261,218	287,062
	18	275,630	7,530	260,582	290,678
	19	277,920	6,867	264,198	291,642
	20	280,120	6,887	266,358	293,882
	21	281,440	6,864	267,723	295,157
	22	284,170	6,910	270,362	297,978
	23	279,380	6,855	265,680	293,080
	24	282,000	7,045	267,922	296,078
	25	285,660	7,139	271,393	299,927
	26	288,320	7,125	274,082	302,558

	27	290,850	7,141	276,580	305,120
	28	292,130	7,233	277,675	306,585
OSH	1	212,190	4,176	203,845	220,535
	2	222,570	4,464	213,650	231,490
	3	223,030	4,730	213,577	232,483
	4	230,580	5,027	220,534	240,626
	5	241,280	5,100	231,088	251,472
	6	243,220	5,340	232,548	253,892
	7	246,570	5,611	235,357	257,783
	8	253,420	5,692	242,046	264,794
	9	255,050	5,931	243,197	266,903
	10	258,900	6,131	246,648	271,152
	11	263,240	6,147	250,956	275,524
	12	265,380	6,231	252,928	277,832
	13	269,080	5,983	257,123	281,037
	14	270,450	9,886	250,695	290,205
	15	273,510	8,008	257,507	289,513
	16	270,870	6,496	257,890	283,850
	17	277,280	6,466	264,358	290,202
	18	286,490	7,530	271,442	301,538
	19	278,850	6,867	265,128	292,572
	20	281,360	6,887	267,598	295,122
	21	283,350	6,864	269,633	297,067
	22	285,420	6,910	271,612	299,228
	23	286,780	6,855	273,080	300,480
	24	288,880	7,045	274,802	302,958
	25	285,040	7,139	270,773	299,307
	26	290,480	7,125	276,242	304,718
	27	294,520	7,141	280,250	308,790
	28	295,860	7,233	281,405	310,315
	1	145,880	4,176	137,535	154,225
	2	153,940	4,464	145,020	162,860
	3	156,770	4,730	147,317	166,223
	4	167,830	5,027	157,784	177,876
	5	175,840	5,100	165,648	186,032
	6	177,970	5,340	167,298	188,642

Sin OSH (Intactas)	7	178,760	5,611	167,547	189,973
	8	187,190	5,692	175,816	198,564
	9	192,170	5,931	180,317	204,023
	10	193,660	6,131	181,408	205,912
	11	198,740	6,147	186,456	211,024
	12	201,840	6,231	189,388	214,292
	13	204,540	5,983	192,583	216,497
	14	188,060	9,886	168,305	207,815
	15	207,410	8,008	191,407	223,413
	16	209,890	6,496	196,910	222,870
	17	213,790	6,466	200,868	226,712
	18	213,240	7,530	198,192	228,288
	19	214,580	6,867	200,858	228,302
	20	214,670	6,887	200,908	228,432
	21	218,140	6,864	204,423	231,857
	22	217,300	6,910	203,492	231,108
	23	221,790	6,855	208,090	235,490
	24	222,360	7,045	208,282	236,438
	25	220,640	7,139	206,373	234,907
	26	224,720	7,125	210,482	238,958
	27	220,900	7,141	206,630	235,170
	28	227,170	7,233	212,715	241,625

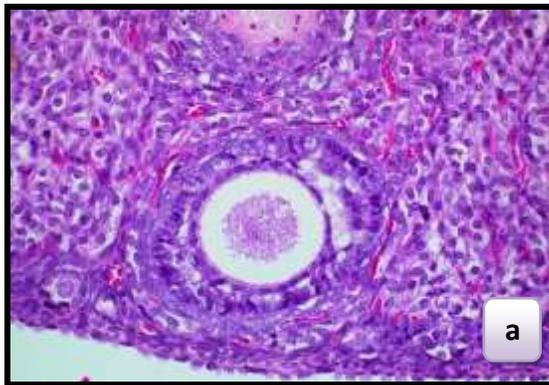
9.4 Análisis de varianza para Creatinina en orina.

Origen	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig. (0.05)
Mes	5.359E7	1.956	2.739E7	13.574	.001
Mes*Tratamiento	1.258E7	11.737	1072137.693	.531	.888
Error	.006	56	.000		

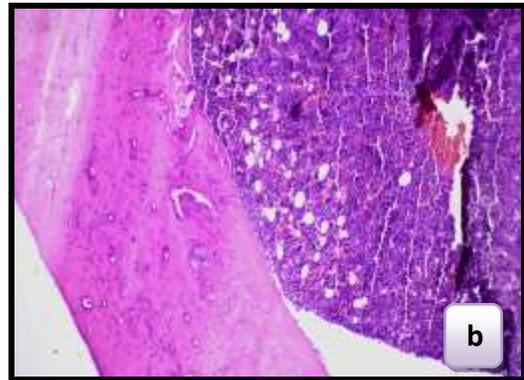
9.5 Análisis de varianza para Calcio en orina.

Origen	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig. (0.05)
Mes	6.307	1.729	3.648	4.591	.016
Mes*Tratamiento	6.853	10.375	.661	.831	.603
Error	86.560	108.940	.795		

9.6 Evaluación histológica de ovario y fémur en hembras intactas (sin ooforectomía).

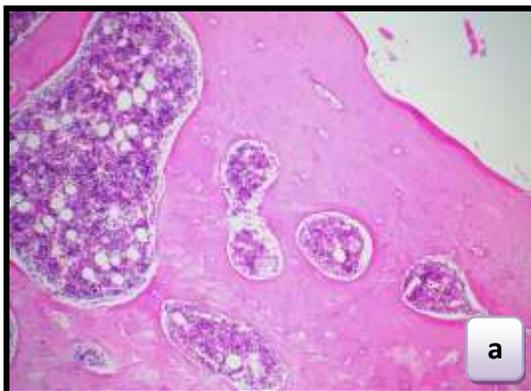


a) Folículo ovárico

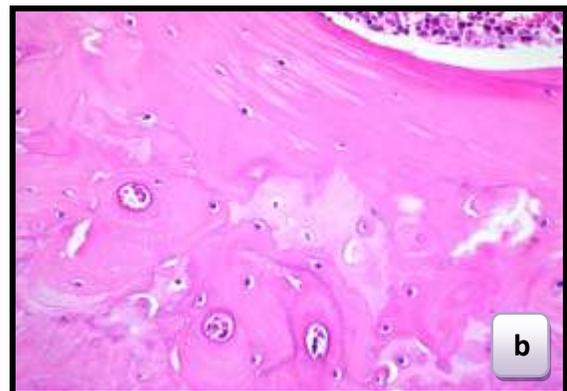


b) Fémur normal

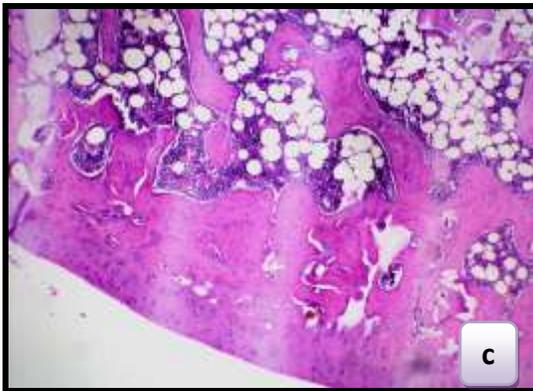
9.7 Evaluación histológica del fémur en hembras ooforectomizadas.



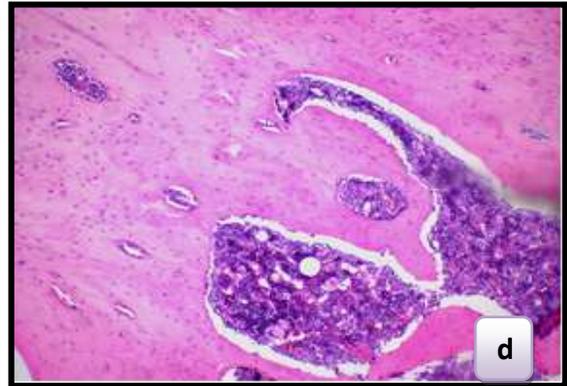
a) Metlin®



b) Achicoria



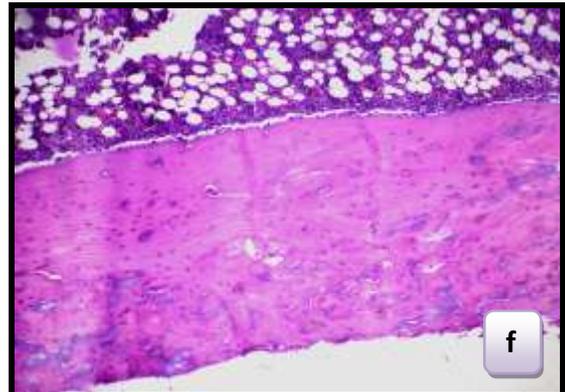
c) Isoflavonas



d) Metlin®+Isoflavonas



e) Achicoria+Isoflavonas



f) Ooforectomizada

9.8 Análisis de varianza univariado de la DMO en la vértebra.

Origen	Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	F	Sig. (0.05)
Tratamiento	.004	6	.001	6.343	.001
Error	.006	56	.000		

9.9 Análisis de varianza univariado de la DMO en el fémur.

Origen	Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	F	Sig. (0.05)
Tratamiento	.002	6	.000	4.821	.001
Error	.003	56	5.885E-5		

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Consenso Mexicano de Osteoporosis. Rev Metab Oseo Min. 2003; 1: 1, 1-24.
2. Clark P, Carlos F, Vázquez MJ. Epidemiología, costos y carga de la osteoporosis en México. Rev Metab Óseo y Min 2010;8: 5, 152-161.
3. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner. 1991; 15(3): 175-91.
4. Mendoza RMA, Escalante PJM, Martínez ZR, Ramírez AMC. Osteoporosis en mexicanas mayores de 40 años. Determinación por densitometría periférica. Rev Med IMSS 2003; 41: 3, 193-202.
5. Mendoza S, Noa M, Más R, Fernández L, Ilnait J. Manejo de la osteoporosis: enfoque nutricional y farmacológico. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 36, No. 1, 2005.
6. Zeni NS. Alimentos funcionales y metabolismo óseo. Actualización de Osteología 2007; 3:2, 85-89.
7. Roberfroid M. Inulin-Type Fructans. Functional Food Ingredients. CRC Press, New York 2005.
8. Roberfroid M, Cumps J, Devogelaer JP. Dietary Chicory Inulin Increases Whole-Body Bone Mineral Density in Growing Male Rats. J. Nutr. 2002; 132: 3599–3602.
9. Olagnero G, Abad A, Bendersky S, Genevois C, Granzella L, Montonati M. Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. Diaeta (B.Aires) 2007;25 (121):20-33.
10. Brem JJ, Trulls HE, Ortíz de Rus LM, Picot JA, Brem JC. Minerales en sangre y tejido óseo de ratas ovariectomizadas tratadas con Alendronato. Universidad del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006.
11. Brem JJ, Trulls HE, Lanari AE, Ortíz de Rus LM, Pochón DO, Picot JA, et al. Osteoporosis experimental en ratas ovariectomizadas: densitometría ósea y concentración de minerales en sangre y cenizas de hueso. Rev. Vet 2004; 15: 2, 56–61.
12. Organización Mundial de Gastroenterología Guías prácticas: Probióticos y Prebióticos. Mayo de 2008.
13. La inulina enriquecida con oligofruktosa BENETM Synergy1 ayuda a proteger contra la osteoporosis. Fhoemo 2005.
14. Roberfroid BM. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. Am J Clin Nutr 2000;71(suppl):1682S–7S.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

15. Valluru R, Van den Ende W. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany* 200; 59: 11, 2905 - 2916.
16. Madrigal L, Sangronis E. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2007; Vol. 57(4): 387-396.
17. García HE, Méndez GS, Talavera MD. El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición* 2010, Edición Especial No. 5.
18. Abrams S. Active Food Scientific Monitor. *An Orafti Newsletter* 2005, No. 13.
19. Narváez ZJA, Sánchez TLF. Agaves as a Raw Material: Recent Technologies and Applications. *Recent Patents on Biotechnology* 2009, 3, 185-191.
20. Product Data Sheet Metlin 2007.
21. Fructan HK Assay Procedure. Megazyme International Ireland Limited 2012.
22. Coxam V. Current Data with Inulin-Type Fructans and Calcium, Targeting Bone Health in Adults. *J. Nutr.* 2007, 137: 2527S–2533S.
23. El calcio y la vitamina D: importantes a toda edad. *Institutos Nacionales de la Salud Centro Nacional de Información sobre la Osteoporosis y las Enfermedades Óseas*, junio 2009.
24. Riancho MJA, González MJ. *Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral*. Jarpyo Editores, S.A., Madrid 2004.
25. Roca RLJ, Caeiro RJR, González RY, Calvo CE, Gil GE, Mesa RM, et al. *Guía de práctica clínica. Osteoporosis*. GEIOS. Madrid, 2010.
26. Coxam V. Inulin-type fructans and bone health: state of the art and perspectives in the management of osteoporosis. *British Journal of Nutrition* 2005, 93, Suppl. 1, S111–S123.
27. Kolida S, Gibson GR. Prebiotic Capacity of Inulin-Type Fructans. *J. Nutr.* 2007, 137: 2503S–2506S.
28. Mayorga RL, Bustamante CP, Gutiérrez NA, Barranco FE, Azaola EA. Crecimiento, sobrevivencia y adaptación de *Bifidobacterium infantis* a condiciones ácidas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 2009, Vol. 8, No. 3, 259-264.
29. Barba EJ. Marcadores de remodelado óseo y osteoporosis. *Rev Mex Patol Clin* 2011, Vol. 58, Núm. 3, pp 113-137.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

30. Coutado MA, Bello GA, Román VD. Osteoporosis. Abordaje desde Atención Primaria. *Cad Aten Primaria* 2007; 14: 51-57.
31. Giner RB, Sanfélix GJ. Osteoporosis. Hospital Universitario La Fe. Valencia, 2004.
32. Clark P. Osteoporosis in Mexico "The challenge". *Salud pública de México* 2009; 51: 1, S2-S3.
33. González AL, Vásquez G, Molina JF. Epidemiología de la osteoporosis. *Revista Colombiana de Reumatología* 2009, VOL. 16 No. 1, pp. 61-75.
34. Muñoz TM, Varsavsky M, Avilés P. Osteoporosis. Definición. *Epidemiología. Osteoporos Metab Miner* 2010; 2: 3, S5-S7.
35. Lago AA, Parada TM, Somera IJ. Prevalencia de osteoporosis en población abierta de la Ciudad de México. *Ginecol Obstet Mex.* 2008; 76 (5): 261-6.
36. Ulloa RE, Bermúdez P. Osteoporosis: Generalidades y Tratamiento. Centro Nacional de Información de Medicamentos, Costa Rica 2003.
37. Mendoza H, Clasificación de la osteoporosis: Factores de riesgo. Clínica y diagnóstico diferencial. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2003; 26: 3, 29-52.
38. González MJ, Olmos MJM. Fisiopatología de la osteoporosis y mecanismo de acción de la PTH. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2010; 2 : 2, S5-S17.
39. Fernández TH, Alobera GMA, Canto PM, Blanco JL. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11 : E47-51.
40. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: S131 – S139, 2008.
41. Cummings SR, Bates D, Black DM. Clinical use of bone densitometry: scientific review. *JAMA* 2002, 288(15):1889-97.
42. Pérez LF, Cano A, Calaf J, Vázquez F, Barriendos JF. Optimización del manejo de la mujer osteoporótica en la consulta de ginecología. *Prog Obstet Ginecol.* 2009; 52 (4): 227-37.
43. Programa Sistemático de Actualización en Medicina y Protocolos de Práctica Clínica. Número Extraordinario Osteoporosis. Ediciones Doyma, Madrid 2006.
44. Mathey J, Lamothe V, Bennetau_Pelissero C, Davicco MJ, Tondu F, et al. Improvement of Bone- Sparing Effect of Soy Isoflavones by Pre- and Probiotics in Postmenopausal women. *Clinical Medicine: Women's Health*, 2008; 1 (15-23).
45. Beltrán ME, Interés terapéutico de los fitoestrógenos en ginecología: una revisión de las evidencias. *Revista Fitoterapia*, Vol. 4, No. 1 2004.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

46. Johnson CD, Lucas EA, Hooshmand S, Campbell S, Akhter MP, Arjmandi B. Addition of Fructooligosaccharides and Dried Plum to Soy-Based Diets Reverses Bone Loss in the Ovariectomized Rat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2008, Volumen 2011.
47. Bonilla CA. Isoflavonas en ginecología, terapia no convencional. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, Vol. 55, No. 3, 2004 pp. 209 – 217.
48. Gracia I.; Gómez A.; Tinoco M. Nuevo Bioterio en el conjunto “E” de la Facultad de Química, UNAM. *Animales de Experimentación* 1996; 2: 24-25.
49. Flecknell P, *Laboratory Animal Anaesthesia*, Third edition, Academic Press, United States of America 2009.
50. Guevara MR, González BM, Virgilio I. Tratamiento quirúrgico de la menopausia, un modelo experimental. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2010; 70(3):178 – 189.
51. Nuñez OL, Bouda J. *Patología clínica veterinaria*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México D. F. 2007.
52. Borai HI, Wafay HA, Rahman A, Ghaffar A, Oraby FS, El-Daly SM. The Protective Effect of Nondigestible Oligosaccharides from Chicory Roots and Phyto Soya Extract on Osteoporosis in Rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3 (2): 970 – 976, 2009.
53. Moore MD. *Laboratory Animal Medicine and Science Rats and Mice: Biology. Health Science for Educational Resources*, Washington 2000.
54. Zafar TA, Weaver CM, Jones K, Moore DR, Barnes S. Inulin Effects on Bioavailability of Soy Isoflavones and Their Calcium Absorption Enhancing Ability. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 2827-2831.
55. Suarez CG, Macri VE, Rodriguez PN, Ponce G, Zeni SN, Friedman SM. Patrones alimentarios de riesgo durante el crecimiento: Modelo experimental en ratas. *ACTUALIZACIÓN EN NUTRICIÓN* 2008; 9: 2, 105-116.
56. Jiang MY, Sacco MS, Ward WE. Ovariectomy-Induced Hyperphagia Does Not Modulate Bone Mineral Density or Bone Strength in Rats. *J. Nutr.* 2008; 138:2106–2110.
57. Kruger CM, Brown EK, Collett G, Layton L, Schollu ML. The Effect of Fructooligosaccharides with Various Degrees of Polymerization on Calcium Bioavailability in the Growing Rat. *Exp Biol Med* 2003; 228:683–688, 2003