



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA, CAMPUS UNAM-UAQ
JURIQUILLA, QUERÉTARO, QRO. MÉXICO**

Generación de un modelo de desnutrición para evaluar la biodisponibilidad de calcio procedente de nopal (*Opuntia ficus indica*) en el hueso de ratas de la cepa Wistar, mediante el estudio de la densidad mineral ósea utilizando transmisión de rayos-X.

T E S I S:

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A:

M. EN C. MARGARITA ISABEL HERNÁNDEZ URBIOLA

Juriquilla Querétaro, Qro. México 2012



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.

Universidad Nacional Autónoma de México

Doctorado en Ciencias Biomédicas



Tesis

Presenta: M. en C. Margarita Isabel Hernández Urbiola

Dr. Mario Enrique Rodríguez García

Investigador titular B, PRIDE D, C-FATA UNAM

Director de tesis

Dedicatorias

A los seres que siempre están conmigo, dándome su apoyo y amor incondicional:

Mi esposo Edgar Fernando, mi hijo Fernando Francisco y mi bebé que estar por llegar pero que ya es tan importante para mí como lo son mi esposo y mi Fer.

A mis padres que aparte de darme la vida, han sabido guiarme en el transcurso de mi vida y han sido mi ejemplo en valores, amor, fortaleza y firmeza:

Sara Urbiola y Francisco Hernández

Agradecimientos

A Dios: ante todas las cosas, porque ha sido, es y será mi guía. Por ser mi creador, el motor de mi vida, por no haber dejado que me rinda en ningún momento e iluminarme para salir adelante, porque todo lo que tengo, lo que puedo y lo que recibo es regalo que él me ha dado.

A MIS PADRES, Porque no existen palabras que puedan expresar su amor incondicional, seres únicos, con todo el aprecio del mundo, esto es para ustedes:

A mi madre: Por su cariño, su apoyo, su dedicación y empeño por ayudarme a ser una persona mejor cada día. Por tanto esfuerzo invertido para que yo alcanzara este triunfo.

A mi padre: Por haberme dejado un legado de valores que son y seguirán siendo mi bandera, por sus palabras de aliento y su aire despreocupado que me tranquilizaba siempre; te recuerdo con todo el amor y el respeto del mundo, donde quiera que estés, te amo!!!.

A ese ser tan amado, mi esposo Edgar; quien siempre me ha otorgado su amor, su apoyo y sus palabras de aliento; además de aguantarme en los peores momentos y darme la oportunidad de compartir con él una nueva fase de mi vida: el ser madre y esposa.

A mis hijos: Porque a pesar de ser tan pequeños, son mi motor y mi mejor motivo para salir adelante; porque los amo tanto, que quiero crecer a la par con ustedes como persona, profesionista y como madre, para darles lo mejor siempre.

A mis segundos padres: A la Dra. Isela Rojas, a la Dra. Rocío Arellano, al Dr. Ramón Álar Martínez Peniche, al Dr. Mario Enrique Rodríguez García; quienes que me han guiado a lo largo de mi formación académica y personal, y **que no tengo palabras para agradecer tanta paciencia, sabiduría, confianza y cariño.** Ahora soy el fruto de cada consejo, cada sugerencia, cada enseñanza y cada regaño que ustedes me brindaron para ser mejor como persona y como profesionista, su influencia en mí ha dejado una marca y valores muy importantes y que junto con la formación que me han dado mis padres, serán mi bandera a lo largo de mi vida, el cariño que me han brindado siempre será correspondido, mil gracias!!!!.

A la UNAM, por darme la oportunidad de seguir superándome académicamente y tener el orgullo de pertenecer a tan honorable casa de estudios.

A CONACYT: porque sin su apoyo económico hubiera sido imposible para mí cursar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Mario Enrique Rodríguez García: Hay tantas cosas que le tengo que agradecer, pero entre todas esas cosas lo que lo más me ha marcado, es el haber confiado en mí; el haberme impulsado, para sacar adelante tanto trabajo; su entusiasmo y despreocupación ante los momentos más difíciles; por su apoyo en todos los aspectos; por haberme hecho crecer como profesional, pero sobre todo, como persona. Gracias a usted, me siento fuerte para lograr lo que me proponga. Gracias infinitas mi querido profesor!!!.

A la Dra. Victoria Chagoya y al Dr. José Pedraza: Sin sus palabras de aliento, sus sabios consejos, su calidad humana, su comprensión, su sabiduría y su apoyo en los momentos difíciles, para mí hubiera sido muy difícil escalar esta montaña. Gracias por tanta paciencia, experiencia, sabiduría y afecto que me mostraron cada vez que nos veíamos. Me queda claro que la sencillez es una cualidad de los grandes!!!.

A mi compañera de trabajo y amiga, la Dra. Esther Pérez: Por todo el tiempo compartido a lo largo de este trabajo, por su comprensión, paciencia y cariño para superar tantos momentos difíciles y, que a pesar de ellos, hemos salido adelante con nuestro trabajo.

Al Doctor Marco Alonso Gallegos Corona: Por su disponibilidad para colaborar en este proyecto pero ante todo por su calidad humana y por vernos siempre como amigos.

Miembros del jurado: Quienes sin dudar aceptaron gustosamente ser mí jurado evaluador de esta investigación, dándome consejos y sugerencias para mejorar este trabajo.

A mis Compañeros: no quiero excluir a nadie, a Daniel Jiménez, Astrid Lorena, Carolina Muñoz, la maestra Carmen Vázquez, el Dr. Erik Rivera Muñoz, el Dr. Jesús Pérez Bueno, a la Dra. Marcela Millán, a Luisita a Guillermo (de computo), a Rubén, Diego y todos los que de alguna u otra manera me ayudaron, me impulsaron e hicieron más fácil cargar con este paquete, gracias a todos ellos.

Reconocimiento

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro de Neurobiología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada Campus UNAM/UAQ Juriquilla Querétaro, México y en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro; bajo la dirección del Dr. Mario Enrique Rodríguez García. Con el patrocinio de CONACyT (Becario No. 101444) y proyecto CONACyT 14059.

Resumen

La nutrición es un factor importante para el buen funcionamiento de los organismos. Es bien conocido el efecto que puede tener la alimentación, cuando esta se presenta en exceso o cuando existen carencias de la misma, desarrollándose enfermedades crónicas degenerativas como enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, hipertensión y osteoporosis. Ésta última es multifactorial, pero uno de los factores que se consideran importantes es precisamente la alimentación. Existen alimentos que además de cumplir con su función nutrimental, cumplen una función nutracéutica. Uno de esos alimentos que forma parte importante de la dieta de los mexicanos es el nopal (*Opuntia ficus indica*); el cual, se ha visto durante el desarrollo de este trabajo, que es una fuente importante de fibra, pero sobre todo de minerales; siendo las pencas adultas (550 g) consideradas como viejas, las que contiene mayor cantidad. Para comprobar el beneficio de los minerales contenidos en la harina de nopal sobre la salud ósea, se hizo necesario realizar estudios biológicos experimentales que incluyeran la obtención por primera vez de curvas basales de peso, talla, longitud y peso de fémur, pruebas mecánicas, cristalización de la Hidroxiapatita y contenido de calcio y P en hueso; para posteriormente usarlas como patrones de referencia para esta investigación; además de desarrollar una metodología alternativa que resultara económica y sencilla para determinar la densidad mineral ósea, en los estudios biológicos experimentales. Con esta metodología, también se obtuvo por primera vez la curva basal de densidad mineral ósea en ratas de la cepa Wistar de ambos géneros. En base a esta curva basal, se desarrolló una metodología de desnutrición pluricarencial que afectó negativamente la densidad mineral ósea, la cual posteriormente y en base al contenido nutrimental del polvo de nopal, fue recuperada durante el periodo de estudio con una dieta complementada con esta verdura. En base a los resultados obtenidos, se concluye que el nopal es una fuente importante de calcio, el cual es bioaccesible. Este trabajo fue orientado a ver el efecto que tiene la dieta sobre el organismo, específicamente el efecto que tiene una dieta complementada con nopal sobre la densidad mineral ósea de animales desnutridos.

Palabras Clave: Nopal, Densidad mineral ósea, osteoporosis, rayos X, curvas basales.

ABSTRACT

Nutrition is an important factor for the functioning of organisms. The effect of nutrition is well known, if presented in excess or when it is not sufficient, chronic degenerative diseases such as cardiovascular disease, diabetes, obesity, hypertension and osteoporosis could be developed. This latter is multifactorial, but one of the major factors considered is just food. There are also foods that have a nutritional as well as a nutraceutical role. One of them is the Nopal (*Opuntia ficus indica*), which has been seen during the course of this work; It is an important source of fiber, but primarily a source of minerals, being the mature stalks (550 g), which contain more of this mineral. To verify the benefits on bone health produced by the minerals found in nopal, it became necessary to carry out biological studies including normal curves of weight, height, length and weight of femur, mechanical testing, hydroxyapatite crystallization, calcium and phosphorus content in bone. This will later be used as references standards for this research, in addition to develop an alternative methodology that result both cheap and simple to determine bone mineral density in experimental biological studies. With this methodology, the bone mineral density normal curve in Wistar strain rats of both genders were obtained. Based on this curve, a pluricarencial malnutrition methodology was developed which affected negatively bone mineral density, which subsequently and based on nutritional content of cactus, was recovered during the study period with a diet supplemented with this vegetable. Based on the results, is concluded that the prickly pear is an important source of calcium, which is bio-access. This work was aimed to see the effect that the diet had on the body, specifically the effect of a supplemented diet with cactus on bone minerals density in malnourished animals.

Keywords: cactus, bone mineral density, osteoporosis, X-rays, basal curves.

Índice

| | |
|---|--------------------|
| Dedicatorias | <i>i</i> |
| Agradecimientos | <i>ii</i> |
| Reconocimiento | <i>iv</i> |
| Resumen | <i>v</i> |
| Abstract | <i>vi</i> |
| Índice | <i>vii</i> |
| Índice de tablas | <i>xiii</i> |
| Índice de figuras | <i>xv</i> |
| I. Introducción | 1 |
| 1.1 Justificación | 2 |
| II. Antecedentes | 3 |
| 2.1 Nutrición y salud ósea | 3 |
| 2.1.1 Efectos de la dieta sobre la formación y el estado del hueso (Dossier, 2011) | 4 |
| 2.1.1.1 Minerales | 4 |
| 2.1.1.2 Vitaminas | 7 |
| 2.1.1.3 Macronutrientes | 9 |
| 2.1.1.4 Alimentos y constituyentes de los alimentos | 10 |
| 2.1.2 Efecto de factores asociados al estilo de vida sobre el estado del hueso | 12 |
| 2.1.2.1 Edad | 12 |
| 2.1.2.2 Tamaño corporal, composición corporal y obesidad | 13 |
| 2.1.2.3 Actividad física | 13 |
| 2.1.2.4 Tabaco | 13 |
| 2.1.2.5 Trastornos del comportamiento alimentario | 13 |
| 2.1.2.6 Síndromes de malabsorción | 14 |
| 2.1.3 Nutrición y salud ósea en las diferentes etapas de la vida (Dossier, 2011) | 14 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.1.3.1 | Embarazo y lactancia | 15 |
| 2.1.3.2 | Infancia y adolescencia | 15 |
| 2.1.3.3 | Nutrición y salud ósea en la madurez | 16 |
| 2.1.3.4 | La senectud | 16 |
| 2.2 | Hueso | 17 |
| 2.2.1 | Tipos de huesos | 17 |
| 2.2.2 | Forma y arquitectura del hueso | 19 |
| 2.2.3 | Desarrollo y crecimiento | 22 |
| 2.3 | Fisiología del hueso | 26 |
| 2.3.1 | Células óseas | 28 |
| 2.3.2 | Fisiología de los osteoblastos. Comunicación osteoblasto-osteoclasto | 34 |
| 2.3.3 | Matriz orgánica | 36 |
| 2.3.4 | Colágeno óseo | 37 |
| 2.3.5 | Proteínas no colágenas de la matriz osteoide | 37 |
| 2.3.6 | Mineral óseo. | 40 |
| 2.3.7 | Fluido óseo. | 40 |
| 2.3.8 | Mineralización de la matriz osteoide | 41 |
| 2.3.9 | Osificación y desarrollo óseo. | 43 |
| 2.3.10 | Remodelado óseo | 45 |
| 2.3.11 | Factores que regulan el remodelado óseo | 49 |
| 2.3.12 | Hormonas, citoquinas y factores de crecimiento en el remodelado óseo. | 50 |
| 2.4 | Osteoporosis | 54 |
| 2.4.1 | Principales causas | 57 |
| 2.5 | Hidroxiapatita | 59 |
| 2.6 | Rayos-X | 60 |
| 2.6.1 | Difracción de rayos X | 60 |
| 2.6.2 | Transmisión de rayos-X | 61 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.7 | Pruebas mecánicas _____ | 63 |
| 2.8 | Dieta AIN-93 _____ | 64 |
| 2.9 | Nopal (<i>Opuntia ficus indica</i>) _____ | 67 |
| 2.9.1 | Descripción botánica de la especie <i>Opuntia spp</i> _____ | 67 |
| 2.9.2 | Origen y distribución geográfica _____ | 68 |
| 2.9.3 | Composición química del nopal _____ | 68 |
| 2.9.4 | Propiedades nutraceuticas del nopal (<i>Opuntia spp</i>) _____ | 68 |
| 2.10 | Factores antinutrimientales o factores inhibidores de la eficacia nutrimental _____ | 70 |
| 2.10.1 | Ácido fítico _____ | 70 |
| 2.10.2 | Ácido oxálico _____ | 72 |
| 2.10.3 | Taninos _____ | 72 |
| 2.11 | Experimento con Nopal _____ | 73 |
| III. | Hipótesis _____ | 76 |
| IV. | Objetivos _____ | 77 |
| 4.1 | Objetivo General _____ | 77 |
| 4.2 | Objetivos Específicos _____ | 77 |
| V. | Metodología _____ | 78 |
| 5.1 | Localización del sitio experimental _____ | 78 |
| 5.2 | Material biológico _____ | 78 |
| 5.2.1 | Nopales (<i>Opuntia ficus indica</i>) _____ | 78 |
| 5.2.2 | Animales de experimentación _____ | 78 |
| 5.2.3 | Identificación de animales _____ | 79 |
| 5.3 | Análisis Químico Proximal en Harinas de Nopal _____ | 80 |
| 5.3.1 | Determinación de humedad (934.01) _____ | 80 |
| 5.3.2 | Determinación de cenizas (942.05) _____ | 80 |
| 5.3.3 | Determinación de fibra cruda (962.09) _____ | 81 |
| 5.3.4 | Determinación de proteína cruda (2001.11) _____ | 82 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 5.3.5 | Determinación de extracto etéreo (920.39) | 83 |
| 5.3.6 | Determinación de extracto libre de nitrógeno (ELN) [JAOAC 69, 777 (1986)] | 83 |
| 5.3.7 | Determinación del contenido de Taninos (Jean, 1998) | 84 |
| 5.3.8 | Determinación del contenido de Oxalatos por absorción atómica | 86 |
| 5.3.9 | Determinación del contenido de minerales en el polvo de nopal | 86 |
| 5.3.9.1 | Espectrofotometría de Absorción Atómica. | 86 |
| 5.3.9.2 | Determinación de fósforo por Espectrofotometría de UV-VIS. | 88 |
| 5.3.9.3 | Espectrofotometría de plasma acoplado a masas. | 89 |
| 5.4 | Elaboración de las curvas normales de crecimiento, pruebas mecánicas, cristalización de Hap y contenido de minerales en hueso. | 89 |
| 5.4.1 | Crecimiento (Peso y talla) | 90 |
| 5.4.2 | Longitud y peso del fémur | 91 |
| 5.4.3 | Resistencia a la fractura del fémur (Pruebas mecánicas) | 91 |
| 5.4.4 | Espectroscopía de Rayos-X (Difracción de rayos-X) | 92 |
| 5.4.5 | Determinación de minerales en hueso: Absorción atómica | 93 |
| 5.5 | Generación de un método alternativo para la determinación de la densidad mineral ósea mediante rayos-X. | 94 |
| 5.5.1 | Transmisión de rayos-X | 94 |
| 5.6 | Elaboración de las dietas experimentales | 102 |
| 5.6.1 | Dieta para la generación del modelo de desnutrición | 102 |
| 5.6.2 | Dieta de restitución para evaluar el efecto del consumo de Ca procedente de nopal sobre la formación de hueso | 102 |
| 5.7 | Generación del modelo de desnutrición | 106 |
| 5.8 | Evaluación del efecto del consumo de Ca procedente de nopal sobre la formación de hueso a través del modelo de desnutrición desarrollado. | 106 |
| 5.9 | Análisis estadísticos | 106 |
| 5.9.1 | Análisis químico proximal y contenido mineral del polvo de nopal | 106 |
| 5.9.2 | Elaboración de las curvas normales de crecimiento, pruebas mecánicas, cristalización de Hap y contenido de minerales en hueso. | 107 |

| | | |
|------------|---|------------|
| VI. | Resultados | 108 |
| 6.1 | Evaluación de la composición química de la penca de nopal | 108 |
| 6.1.1 | Análisis Químico Proximal en Harinas de Nopal | 108 |
| 6.1.2 | Determinación del contenido de Taninos (Jean, 1998) | 109 |
| 6.1.3 | Determinación del contenido de oxalatos en el polvo de nopal | 110 |
| 6.1.4 | Determinación del contenido de minerales en el polvo de nopal | 111 |
| 6.2 | Elaboración de las curvas basales de crecimiento, pruebas mecánicas, cristalización de Hap, densidad mineral ósea y contenido de minerales en hueso. | 113 |
| 6.2.1 | Determinación de la curva de crecimiento (peso y talla) para ratas de la cepa Wistar de diferentes edades y ambos géneros. | 113 |
| 6.2.2 | Determinación de la curva de longitud y peso de fémur para ratas de la cepa Wistar de diferentes edades y ambos géneros. | 115 |
| 6.2.3 | Determinación de la curva normal de pruebas mecánicas para los fémures de ratas de la cepa Wistar de diferentes edades y ambos géneros. | 117 |
| 6.2.4 | Identificación de Hap por difracción de rayos X | 119 |
| 6.2.5 | Determinación de minerales en los huesos de ratas de la cepa Wistar. | 121 |
| 6.3 | Generación de un método alternativo de determinación de la densidad mineral ósea, mediante la detección digital de rayos X, para realizar las evaluaciones de la densidad mineral ósea en ratas de la Cepa Wistar in vivo. | 123 |
| 6.3.1 | Calibración del equipo de rayos-X para la determinación de la densidad mineral ósea por un método alternativo de transmisión de rayos X. | 124 |
| 6.3.2 | Determinación de la curva basal de rayos-X en ratas de la cepa Wistar bajo condiciones normales: Cuello de fémur. | 127 |
| 6.4 | Formulación de las dietas para la generación del modelo de desnutrición y para la restitución de nutrimentos. | 131 |
| 6.4.1 | Formulación de la dieta deficiente para generar el modelo de desnutrición y generar una disminución en la densidad mineral ósea en ratas hembras de la cepa Wistar | 131 |
| 6.4.2 | Formulación de la dieta de restitución de nutrimentos para evaluar el efecto del consumo de Ca procedente de nopal sobre la formación de hueso | 132 |
| 6.5 | Generación del modelo de desnutrición a partir de las curvas desarrolladas de densidad mineral ósea, a través de dietas deficientes en el contenido de Ca para posteriormente evaluar el efecto de una dieta a base de nopal. | 133 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 6.6 | Evaluación del efecto del consumo de Ca procedente de nopal sobre la formación de hueso a través del modelo de desnutrición desarrollado. | 134 |
| VII. | Discusión | 136 |
| VIII. | Conclusiones | 138 |
| IX. | Bibliografía | 140 |

Índice de tablas

| Tabla | | Página |
|--------------|---|---------------|
| 2.1 | Componentes del cartílago y el hueso | 20 |
| 2.2 | Proteínas de la matriz osteoide | 36 |
| 2.3 | Función fisiológica de las proteínas no colágenas de la matriz osteoide | 38 |
| 2.4 | Resumen de las definiciones de la OMS sobre osteoporosis, según niveles de densidad ósea | 55 |
| 2.5 | Contenido nutrimental de la dieta AIN-93G formulada para roedores en las etapas de crecimiento, preñez y lactancia | 65 |
| 2.6 | Contenido nutrimental de la dieta AIN-93M formulada para mantenimiento de roedores adultos | 65 |
| 2.7 | Contribución de elementos minerales de la dieta AIN-93G y AIN-93M | 66 |
| 2.8 | Composición química de harina de nopal de dos diferentes estados de maduración (g/100g base seca) | 74 |
| 2.9 | Formulación de las dietas (g/100 grs ^{a,b}) | 74 |
| 5.1. | Programa de digestión utilizado en la preparación de las muestras de harina de nopal y huesos para la determinación de Ca | 87 |
| 5.2 | Preparación de muestras de harina de nopal y huesos, para digestión en microondas | 87 |
| 5.3 | Concentración de los elementos certificados por el NIST en la muestra de hueso seco, y valores experimentales obtenidos utilizando el método AAS. *Los valores de fósforo fueron obtenidos por UV-VIS, método oficial de la AOAC 985.35 | 93 |
| 5.4 | Tiempo de exposición predeterminado en la fuente de rayos X | 97 |
| 5.5 | Niveles de gris de cada pixel de la RDI seleccionada en la imagen | 100 |
| 5.6 | Histograma de la RDI | 100 |
| 5.7 | Contribución de elementos | 103 |

| | | |
|------|---|-----|
| | minerales de la dieta AIN-93G (mg/kg) | |
| 5.8 | Contenido de minerales de la harina de nopal de 400 g ó 100 días de maduración (mg/g) | 104 |
| 5.9 | Contenido nutrimental de la dieta armada de restitución (Reeves <i>et al</i> , 1993) | 104 |
| 5.10 | Dieta de restitución complementada con Ca de harina de nopal (g/kg) | 105 |
| 6.1. | Composición química del polvo de nopal (<i>Opuntia ficus indica</i> , g/100 g base seca) | 108 |
| 6.2. | Composición mineral de harinas de pencas de nopal a diferentes estados de maduración (días) | 112 |
| 6.3 | Composición mineral traza de harina de pencas de nopal a diferente estado de maduración (días) | 113 |
| 6.4 | Composición de la dieta pluricarenal para la generación del modelo de desnutrición | 132 |
| 6.5 | Cálculo de los componentes de la dieta para preparar la dieta con polvo de nopal en base a la dieta AIN-93G | 132 |
| 6.6 | Cálculo de los minerales a agregar en la dieta experimental de restitución de nutrimentos (mg/kg dieta AIN-936) | 133 |

Índice de figuras

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 2.1 | Esquema de un hueso largo y su riego sanguíneo. El dibujo del recuadro muestra las laminillas de hueso compacto dispuestas en unidades llamadas osteonas | 21 |
| 2.2 | Desarrollo de un hueso largo | 23 |
| 2.3 | Radiografías de feto y de lactante | 25 |
| 2.4 | Representación esquemática de una osteona | 28 |
| 2.5 | Representación esquemática de un hueso trabecular | 28 |
| 2.6 | Representación esquemática de las interacciones entre osteoblastos y hematopoyesis. Abreviatura: MO, médula ósea | 31 |
| 2.7 | Destino de los osteoblastos | 32 |
| 2.8 | Esquema de un osteoclasto activado | 34 |
| 2.9 | Comunicación entre osteoblasto y osteoclasto | 36 |
| 2.10 | Representación esquemática del comienzo de la mineralización en el seno de vesículas extracelulares | 42 |
| 2.11 | Etapas de remodelado óseo | 46 |
| 2.12 | Hormonas, citoquinas y remodelado óseo | 52 |
| 2.13 | Curva de almacenamiento de Ca | 59 |
| 2.14 | A) Equipo de rayos-X dental (Satelec X-mind AC®), B) radiografías de hueso, mostrando diferencias de imagen entre un hueso de rata de 3 semanas y un hueso de rata de 16 semanas | 62 |
| 2.15 | Interacciones fitato-minerales, fitato-aminoácidos | 71 |
| 2.16 | Complejo tanino-metal, señalando la afinidad de un metal por los grupos oxidrilo en el anillo – B del flavonoide | 73 |
| 5.1 | Identificación permanente en los ratones y ratas por muesqueo en las orejas | 79 |

| | | |
|------|--|-----|
| 5.2 | Registro de peso y talla en las ratas de la cepa Wistar | 90 |
| 5.3 | Registro de pruebas mecánicas en hueso de la cepa Wistar | 92 |
| 5.4 | Toma de radiografías en animales "in vivo", con el equipo de rayos X dental y el sensor de imagen (detector) | 94 |
| 5.5 | Fuente de rayos X dental | 97 |
| 5.6 | Sensor de imagen de rayos X | 97 |
| 5.7 | Diagrama del sistema de rayos X | 98 |
| 5.8 | Toma radiográfica de fémur de ratas del grupo control | 99 |
| 5.9 | Ratas del grupo control | 99 |
| 5.10 | Imagen digitalizada de la radiografía de fémur de rata in vivo, Macho de tres semanas de edad | 101 |
| 6.1 | Contenido de taninos en el polvo de nopal (g/100 g en base seca) | 110 |
| 6.2 | Contenido de oxalatos en el polvo de nopal | 111 |
| 6.3 | Ganancia de peso de ratas de la cepa Wistar en función de la edad | 114 |
| 6.4 | Ganancia de talla de ratas de la cepa Wistar en función de la edad | 115 |
| 6.5 | Longitud del fémur de rata de la cepa Wistar en función de la edad | 116 |
| 6.6 | Peso del fémur de las ratas de la cepa Wistar en función de la edad | 117 |
| 6.7 | Pruebas mecánicas de los fémur de las ratas de la cepa Wistar en función de la edad | 118 |
| 6.8 | Patrón de difracción de la Hap sintética comercial | 119 |
| 6.9 | Difractogramas de los huesos de las ratas de la cepa Wistar en función de la edad a las 3, 7, 11 y 16 semanas, de hembras y machos | 120 |
| 6.10 | Contenido de Ca y P presente en los huesos de las ratas de la cepa Wistar en función de la edad | 123 |
| 6.11 | Las fotos muestran: A) Pruebas con fémures diseccionados y B) Radiografía de fémur de rata in vivo (Macho de tres semanas de | 124 |

| | edad) | |
|-------|--|-----|
| 6.12 | Comportamiento del sensor a diferentes distancias | 125 |
| 6.13 | Comportamiento del sensor a diferentes tiempos | 126 |
| 6.14 | Gráfica de densidad mineral ósea en g/cm ² calculada con la ecuación 5 y la DMO medida por el método gravimétrico | 127 |
| 6.15 | Selección de la región de interés del fémur (cello de fémur) | 127 |
| 6.16. | Densidad mineral ósea de las ratas de la cepa Wistar en función de la edad | 128 |
| 6.17 | Correspondencia de la edad humana con la edad de la rata | 131 |
| 6.18 | Disminución de densidad mineral ósea con la dieta de desnutrición | 134 |
| 6.19 | Evaluación del efecto del consumo de Ca procedente de nopal sobre la formación de hueso a través del modelo de desnutrición desarrollado | 135 |

Generación de un modelo de desnutrición para evaluar la biodisponibilidad de calcio procedente de nopal (*Opuntia ficus indica*) en el hueso de ratas de la cepa Wistar, mediante el estudio de la densidad mineral ósea utilizando transmisión de rayos-X.

I. Introducción

La dieta y la nutrición son muy importantes para promover y mantener la buena salud a lo largo de toda la vida. Está bien establecida su función como factores determinantes de enfermedades no transmisibles crónicas, y eso los convierte en componentes fundamentales de las actividades de prevención (OMS, 2003).

Con respecto a la salud ósea, la nutrición es un factor fundamental no solo para el crecimiento de los huesos, sino también para su mineralización. Ambos fenómenos, el aumento de tamaño y la oposición de nutrientes (crecimiento y desarrollo) son paralelos, aunque regulados por factores diferentes, y evidencian períodos críticos con una cronología no obligatoriamente coincidente. La adquisición de una adecuada mineralización durante la infancia ha demostrado ser un hecho clave en la prevención de la osteoporosis del adulto, de ahí que en la actualidad se demande al pediatra su responsabilidad en la prevención de este grave problema de salud pública (Franch *et al*, 2010).

El calcio (Ca) es un mineral indispensable para el crecimiento y desarrollo del esqueleto en el humano ya que es uno de los constituyentes mayoritarios del tejido óseo (Méndez y Wyatt, 2000). Sin embargo, cuando las fuentes dietéticas son insuficientes, el cuerpo extrae del tejido óseo el Ca que necesita para los procesos fisiológicos vitales, ocasionando que se desmineralice progresivamente (Harrison, 2002), hecho que se asocia, entre otros con anomalías en la estructura ósea, osteomalacia y raquitismo (Harrison, 2002).

La pérdida ósea que se inicia en la vida adulta y continúa hasta la vejez, ahora se reconoce como una enfermedad llamada osteoporosis, que es un trastorno esquelético generalizado caracterizado por una masa ósea disminuida y deterioro de la calidad del tejido óseo, con un aumento subsecuente en la fragilidad del hueso y mayor riesgo de fractura” (AMMOM, 2000). La densitometría ósea permite detectar en forma muy temprana y sensible cambios morfológicos del hueso ya sea por sí sola o combinada con algunos indicadores bioquímicos relacionados a su actividad metabólica (Brem *et al*, 2004). Entre los hábitos de vida más importantes para desarrollar una masa ósea óptima y disminuir los factores de riesgo para la aparición de la osteoporosis se encuentra la

alimentación con un aporte suficiente de Ca durante la niñez, adolescencia y adultez temprana (Mota *et al*, 1999).

Sin embargo, en México, productos como la leche y sus derivados, así como la tortilla, contienen un alto contenido de Ca, pero el consumo de productos lácteos es limitado debido al elevado costo de los mismos y como un factor muy preponderante, la intolerancia a la lactosa. Por otra parte, la fuente principal de Ca en México en todos los sustratos socio-económicos por milenios ha sido la tortilla tradicional, que contiene alrededor de 0.3 a 0.36 % de Ca; en el caso de las harinas industrializadas de maíz, la cantidad de Ca se reduce considerablemente a un tercio del valor encontrado en el nixtamal tradicional (Rojas *et al*, 2006).

1.1 Justificación

Tomando en cuenta los aspectos anteriores relacionados con la ingesta de Ca y el aumento de los índices de osteopenia en México, es imperante, encontrar alternativas para suplir las necesidades de Ca en la dieta. En nuestro país, por años el nopal ha sido una alternativa alimentaria para animales y humanos como follaje y verdura respectivamente, ya que se encuentra en el campo de manera silvestre. Recientemente nuestro grupo (Rodríguez *et al*, 2007) realizaron una caracterización fisicoquímica del nopal en función de la madures y encontraron que sus propiedades fisicoquímicas tienen fuerte dependencia en la edad, pero el hallazgo más importante fue que el contenido de Ca en el Nopal aumenta con la edad y, que en comparación con la tortilla que es la fuente principal de este elemento en la dieta mexicana, los valores son más elevados.

Por otro lado, se tiene reportes de que la ingesta de nopal ayuda en la reducción de peso corporal, colesterol y glucosa (Fрати-Munari *et al*, 1988). Por lo anterior la pregunta que se pretende responder durante el desarrollo de este proyecto es la siguiente:

¿El Ca que contiene nopal sirve para prevenir la osteoporosis?

Por lo tanto, la pregunta anterior conlleva a una serie de interrogantes en relación al desarrollo de un modelo que permita estudiar la biodisponibilidad del Ca proveniente del Nopal. El problema radica básicamente en que los modelos clínicos son costosos, de tiempos de ensayo muy prolongados, caracterizados por deserción de paciente y muy importante es la poca homogeneidad de los grupos de estudio.

En este estudio se propone un método alternativo basado en un modelo biológico para poder determinar la biodisponibilidad de Ca de nopal, mediante la evaluación de parámetros físicos y químicos en ratas Wistar hembras y machos en función de la edad,

para emular y obtener curvas basales, que permitan desarrollar y evaluar un modelo de osteopenia.

II. Antecedentes

2.1 Nutrición y salud ósea

La dieta y la nutrición son muy importantes para promover y mantener la buena salud a lo largo de toda la vida. Está bien establecida su función como factores determinantes de enfermedades no transmisibles crónicas, y eso los convierte en componentes fundamentales de las actividades de prevención (OMS, 2003).

Las enfermedades crónicas son en gran medida enfermedades prevenibles. Si bien pueden ser necesarias más investigaciones básicas sobre algunos aspectos de los mecanismos que relacionan la dieta y la salud, los datos científicos actualmente disponibles proporcionan una base suficientemente sólida y verosímil para justificar la adopción de medidas en este momento. Además del tratamiento médico apropiado para los ya afectados, se considera que el enfoque de salud pública de la prevención primaria es la acción más económica, asequible y sostenible para hacer frente a la epidemia de enfermedades crónicas en todo el mundo. La adopción de un enfoque basado en los factores de riesgo comunes para prevenir las enfermedades crónicas representa un avance importante de las ideas favorables a una política sanitaria integrada. A veces las enfermedades crónicas son consideradas transmisibles a nivel de los factores de riesgo. Los hábitos alimentarios y el nivel de actividad física modernos son comportamientos de riesgo que se difunden por los países y pasan de una población a otra como una enfermedad infecciosa, con incidencia en los perfiles de morbilidad a nivel mundial.

Mientras que la edad, el sexo y la vulnerabilidad genética son elementos no modificables, gran parte de los riesgos asociados a la edad y el sexo pueden ser aminorados. Tales riesgos incluyen factores conductuales (régimen alimentario, inactividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol), factores biológicos (dislipidemia, hipertensión, sobrepeso e hiperinsulinemia) y, por último, factores sociales, que abarcan una compleja combinación de parámetros socioeconómicos, culturales y otros elementos del entorno que interactúan entre sí. (OMS, 2003).

Con respecto a la salud ósea, la nutrición es un factor fundamental no solo para el crecimiento de los huesos, sino también para su mineralización. Ambos fenómenos, el aumento de tamaño y la oposición de nutrientes (crecimiento y desarrollo) son paralelos, aunque regulados por factores diferentes, y evidencian períodos críticos con una cronología no obligatoriamente coincidente. La adquisición de una adecuada mineralización durante la infancia ha demostrado ser un hecho clave en la prevención de

la osteoporosis del adulto, de ahí que en la actualidad se demande al pediatra su responsabilidad en la prevención de este grave problema de salud pública (Franch et al,2009).

2.1.1 Efectos de la dieta sobre la formación y el estado del hueso (Dossier, 2011)

El hueso es una estructura viva y activa, que continuamente se está remodelando mediante la formación de nuevo tejido y eliminación del antiguo. Esta remodelación puede verse afectada por las deficiencias y excesos nutricionales, pudiendo dar lugar a la aparición de alteraciones como la osteoporosis, el raquitismo o la osteomalacia que afectan a un alto porcentaje de la población en todo el mundo.

Actualmente, cerca de 30 millones de norteamericanos se encuentran afectados por la osteoporosis, y se espera que dicho número se incremente de un modo dramático en las próximas décadas. El tratamiento de la osteoporosis y el de las fracturas asociadas representa uno de los mayores costes sanitarios en los países occidentales.

La gran cantidad de datos existentes sobre Ca, vitamina D y hueso han permitido intervenir con éxito para prevenir las pérdidas de tejido óseo. No obstante, actualmente se ha mostrado un gran interés sobre los efectos de un amplio grupo de nutrientes y alimentos sobre el estatus del hueso. Entre éstos se incluyen macronutrientes como la proteína, ácidos grasos y azúcares; minerales como el Mg, K, cobre, cinc, silicio y Na; y vitaminas C, A, K y B12.

Además, alimentos y componentes de los alimentos como la leche, frutas y vegetales, productos de la soja, bebidas carbonatadas, agua mineral, alcohol y fibra también se les ha prestado gran atención recientemente. Estos nutrientes y alimentos pueden afectar a la salud del hueso por diferentes vías, fundamentalmente actuando sobre la absorción del Ca y/o sobre su metabolismo.

2.1.1.1 Minerales

1. Calcio

El Ca es el principal mineral que forma parte del hueso (el 99% del Ca corporal se encuentra en el hueso) y el tejido óseo es el principal reservorio de Ca en el organismo; por tanto, un apropiado suministro de dicho elemento es esencial para mantener la homeostasis o equilibrio del hueso en todas las etapas de la vida. El control de la concentración de Ca en la sangre se logra al regular la velocidad de resorción de los huesos y paso a la sangre y, a su vez, de la transferencia de Ca sanguíneo a los huesos.

Durante la niñez se requieren altas ingestas de Ca que permitan una correcta acumulación y conduzcan a un alto pico de masa ósea. En las personas adultas, son necesarias unas ingestas adecuadas para mantener el hueso y protegerlo de las pérdidas durante las edades avanzadas. Existe una amplia literatura en la que se relacionan positivamente la ingesta de Ca con efectos protectores, como una reducción de las pérdidas óseas o el riesgo de fractura.

El control hormonal del metabolismo del Ca se debe a la acción conjunta y equilibrada de varias hormonas sistémicas, como la parathormona, la calcitonina y la vitamina D.

Posiblemente el factor más importante en la regulación del intercambio de Ca entre sangre y huesos es la parathormona (PTH). El descenso de los niveles plasmáticos de Ca estimula la secreción de la PTH, que a su vez incrementa el número y actividad de los osteoclastos (las células encargadas de eliminar el tejido óseo no deseado), lo que acelera la resorción ósea con la liberación de Ca de los huesos al plasma sanguíneo y normalización de su concentración.

Cuando los niveles plasmáticos de Ca son mayores de lo normal, las células parafoliculares de la glándula tiroides secretan calcitonina, hormona que inhibe la actividad de los osteoclastos, acelera la captación de Ca sanguíneo y acelera su depósito en los huesos. El resultado final es que esta hormona acelera la formación de hueso y disminuye los niveles en sangre; por ello, la calcitonina es necesaria para que el Ca se fije lo mejor y más rápido posible.

Esta hormona comienza a disminuir a partir de los 50 años, incluso antes, debido a diferentes alteraciones metabólicas y/o hormonales a que es sometido el organismo.

Estudios observaron una disminución del riesgo de fractura del 50% en mujeres premenopáusicas, en el momento de la menopausia y en los hombres y mujeres con masa ósea disminuida u osteoporosis, cuando se combinaba calcitonina con suplementos de Ca.

2. Fósforo

Junto con el Ca, el P es un elemento esencial para la mineralización del hueso, por lo que se requiere un suministro adecuado de este elemento a lo largo de la vida. Una depleción (o pérdida de mineral) en el P sérico altera la mineralización del hueso y compromete la función de los osteoblastos.

Pero cuando la dieta es alta en P y baja en Ca, se estimula la secreción de la hormona PTH, la cual incrementa la resorción ósea para recuperar los niveles en suero sanguíneo del P. Por ello es fundamental un adecuado equilibrio en la relación Ca/P.

Los estudios epidemiológicos han mostrado que el alto consumo de P junto al bajo de Ca, disminuyen la densidad de masa ósea en mujeres post y peri menopáusicas y hombres de edad avanzada. Además, se ha indicado que los patrones dietéticos basados en el uso de alimentos altamente refinados y ricos en P, muy frecuentes entre los jóvenes, podrían ser desfavorables para el mantenimiento del hueso.

3. Flúor

El papel del flúor sobre la salud del hueso se encuentra en discusión; sin embargo, este papel en la prevención de la caries dental no se discute. Aunque las altas dosis de flúor incrementan la DMO (densidad mineral ósea) al estimular la actividad de los osteoblastos y prevenir la disolución de los cristales óseos, actualmente existen pocas evidencias de que dicho elemento reduzca las fracturas.

4. Magnesio

Una adecuada ingesta de Mg es esencial para un apropiado metabolismo del Ca. El Mg participa en el equilibrio del hueso, favoreciendo el crecimiento de los cristales y su estabilización.

El Mg es uno de los nutrientes presentes en frutas y verduras que contribuye a alcalinizar el medio y, por tanto, puede mejorar la salud del hueso.

5. Potasio

El potasio (K) se asocia significativamente con la DMO tanto en hombres como en mujeres, y su ingesta muestra un efecto protector. La administración de bicarbonato potásico en cantidad suficiente para neutralizar la carga ácida producida por las dietas normales, mejora el balance de Ca y los niveles séricos de osteocalcina.

La dieta occidental actual es deficiente en K y en precursores de bicarbonato; por ello, se ha sugerido que un mayor consumo de frutas y verduras ayudaría a corregir esta situación.

6. Cobre y cinc

Cobre y cinc son dos cofactores esenciales para la síntesis de diferentes componentes de la matriz ósea, cuya ingesta es deficitaria en un gran porcentaje de la población.

7. Silicio

El tejido conectivo y el hueso contienen silicio y este mineral también interviene en la formación del hueso. Además, el silicio es el mayor elemento de nuestra dieta; la ingesta media diaria es de alrededor de 30 mg/día, siendo menor en la mujer que en el hombre. Probablemente es como ácido ortosilícico la forma presente en la que afecta al hueso y al cartílago. Se piensa que las poblaciones con bajos consumos de cereales y cerveza presenten bajas ingestas de silicio.

8. Sodio

Las elevadas ingestas de sodio (Na) incrementan la calciuria (presencia de Ca en la orina) y los marcadores del remodelado óseo. Sin embargo, existen pocos estudios que hayan examinado la relación entre la ingesta de sal y el hueso. Una revisión reciente concluye que aunque una relación entre altas ingestas de sal y las pérdidas óseas son biológicamente plausibles, sugieren que sólo un alto consumo de sal podría constituir un factor de riesgo para la osteoporosis.

Se ha comprobado que el K puede atenuar los efectos negativos de la alta ingesta de Na, esta circunstancia apoya la idea de que las fuentes dietéticas de K, como las frutas y los vegetales, pueden ayudar a paliar los efectos sobre el hueso del consumo de sal.

2.1.1.2 Vitaminas

1. Vitamina D

La vitamina D tiene un papel muy bien definido sobre la salud del hueso, debido a que aumenta la absorción intestinal de Ca, moviliza el Ca y P del hueso e incrementa la reabsorción renal de Ca y fosfato.

Existen tres tipos de deficiencia de vitamina D (sólo la primera puede ser completamente tratada con una suplementación): primaria debida a bajas ingestas o exposiciones solares, la ocasionada por un descenso de la producción renal y la resistencia a la acción de ésta en los tejidos diana.

La deficiencia primaria de vitamina D es la causa más común de raquitismo. El mantenimiento de unos niveles suficientes de vitamina D requiere la exposición al sol, ya que las dietas normales generalmente son deficientes en esta vitamina. Por tanto, la deficiencia es muy común en los extremos de la vida: en los niños que no andan y en los mayores que no pueden salir (deficiencia asociada a un mayor riesgo de fractura de cadera), aunque ésta puede aparecer en cualquier edad si no existe una exposición solar suficiente.

La leche materna contiene niveles bajos de vitamina D o de sus metabolitos, por tanto, los niveles de vitamina D en niños exclusivamente alimentados con leche materna correlaciona con su exposición al sol, siendo esta última de gran importancia para evitar la presencia de raquitismo en estos niños.

Se ha demostrado que la suplementación con vitamina D reduce la pérdida de hueso y que combinada con Ca reduce significativamente la incidencia de fractura ósea. Un meta análisis reciente basado en 25 ensayos clínicos concluye que la vitamina D reduce la incidencia de fracturas vertebrales y muestra una tendencia a reducir la incidencia de las fracturas no vertebrales.

2. Vitamina K

La vitamina K juega un papel muy importante en las proteínas denominadas vitamina K dependientes. Entre éstas, las más conocidas son las que participan en la coagulación, pero también se han descrito tres en el hueso; una de ellas, la más conocida, es la osteocalcina, que se encuentra en el tejido mineralizado y es sintetizada por las células formadoras de tejido óseo. Se ha sugerido que esta vitamina (osteocalcina) podría participar en el control de la resorción ósea. Esto se podría traducir, según diferentes estudios, en que existe una relación inversa entre la ingesta de vitamina K y la prevalencia de fractura de cadera y de pérdida de densidad mineral ósea.

3. Vitamina C

El ácido ascórbico es un cofactor que interviene en la hidroxilación de la lisina y la leptina, dos aminoácidos que son los mayores constitutivos del colágeno (principal ingrediente de la matriz ósea); la hidroxilación es importante para la formación de enlaces entre las fibras de colágeno y la formación de colágeno maduro. Por ello se deduce que la deficiencia experimental de vitamina C causa alteraciones en el hueso, cartílago y tejido conectivo. No obstante, se requieren muchos trabajos para clarificar el efecto de la ingesta de vitamina C sobre el hueso y el riesgo de fractura.

4. Vitamina A

Numerosos estudios en animales e in vitro han establecido una relación entre la ingesta de retinol y el metabolismo del hueso. En diferentes especies animales, las altas ingestas de retinol incrementan la resorción y disminuyen la formación ósea al estimular la formación de osteoclastos. Se ha indicado que el retinol antagonizaría la acción de la vitamina D.

La asociación entre altas ingestas de retinol y fractura de cadera es máxima entre las mujeres postmenopáusicas que no usan estrógenos y con ingestas mayores a los 2.000 µg/día. Sin embargo, esta asociación no se ha encontrado entre las que usan estrógenos, insinuándose un papel protector de los estrógenos frente a las altas ingestas de retinol.

5. Vitamina B12

La vitamina B12 es un cofactor necesario para la síntesis de ADN. Se piensa que estimula la formación del hueso al estimular la actividad de los osteoblastos. Además, el tratamiento con esta vitamina a los pacientes con dicha anemia incrementa los marcadores de formación del hueso y mejora la DMO.

2.1.1.3 Macronutrientes

1. Proteína

Existe el acuerdo de que las dietas moderadas en proteínas (1-1,5 g proteína/día) se encuentran asociadas a un metabolismo normal del Ca y presumiblemente no alteran el equilibrio del esqueleto.

Un bajo consumo de proteína conduce a una reducción de la absorción intestinal de Ca, ocasionando un incremento de los niveles séricos de PTH y calcitriol (regulador del metabolismo del Ca). Las implicaciones de esta situación a largo plazo no son conocidas, pero los estudios epidemiológicos indican un incremento en las pérdidas de la masa ósea y fracturas de cadera en los individuos que consumen estas dietas.

A pesar de lo anterior, los potenciales efectos de las altas ingestas de proteína sobre el riñón exigen prudencia al recomendar ingestas superiores a las raciones dietéticas recomendadas.

2. Ácidos grasos

La información referente a estos nutrientes y el esqueleto es reducida. En el caso de los ácidos grasos poliinsaturados, se ha observado que el ácido linolénico podría ejercer una acción antiinflamatoria sobre el hueso. Con respecto a los monoinsaturados, un estudio ha demostrado una asociación positiva entre la ingesta de aceite de oliva y la densidad mineral del hueso.

3. Azúcares

Los azúcares pueden contribuir a incrementar las pérdidas urinarias de Ca. Estudios realizados sobre el efecto del consumo de bebidas carbonatadas sobre el hueso indican que la presencia de Ca observada no parece ser debida al contenido en ácido fosfórico.

Las observaciones epidemiológicas que asocian negativamente el consumo de estas bebidas con la densidad de la masa ósea se ha atribuido a los azúcares, junto al desplazamiento del consumo de bebidas más nutritivas, fundamentalmente la leche.

4. Fibra

Si bien la fibra de la dieta interfiere con la absorción de algunos minerales (por esta razón se creyó que la fibra podría tener un efecto negativo sobre la salud del hueso), estudios posteriores concluyen que la suplementación con fibra no afecta a la salud del hueso.

2.1.1.4 Alimentos y constituyentes de los alimentos

1. Leche

La leche constituye el mayor aporte de Ca en las dietas occidentales. Se conoce la importancia del consumo de leche durante la niñez y adolescencia para posteriormente disminuir el riesgo de fracturas.

Mientras que en algunos estudios sí se aprecia una relación significativa entre el consumo de leche durante la niñez y adolescencia con la DMO en los adultos y tras la menopausia, otros no encuentran esta asociación.

Por otro lado, se ha observado que el incremento del consumo de leche o derivados lácteos en poblaciones con bajas ingestas habituales, en general, mejora los marcadores de formación ósea, disminuye las pérdidas e incrementa la densidad mineral ósea.

Además, se ha indicado que el incremento de la ingesta diaria de Ca mediante el uso de alimentos ricos en este catión, como la leche, se asocia de un modo más consistente con las medidas óseas que cuando el incremento de la ingesta procede de suplementos.

2. Frutas y verduras

Los vegetales son alimentos que aportan a nuestra dieta altas cantidades de Mg, K, vitamina C y otros constituyentes que pueden contrarrestar la carga ácida generada por las altas ingestas proteicas.

Estudios han relacionado las ingestas de frutas y verduras con una mayor densidad mineral ósea: cada ración de fruta o verdura consumida por día se asoció a un incremento de un 1% en la DMO.

3. Soja

Actualmente existe un gran interés por los efectos protectores de la soja sobre el hueso, pero no hay acuerdo sobre quién o quiénes son los constituyentes de la soja responsables de la mejora sobre la salud del hueso que ocasiona este alimento.

Aunque gran número de autores ha asociado el efecto beneficioso (incremento de DMO y descenso de la resorción ósea) a las isoflavonas presentes en la soja, los resultados existentes sólo marcan una tendencia, requiriéndose más estudios que lo confirmen. Sin embargo, otros autores encuentran que los efectos beneficiosos sobre el esqueleto parecen deberse a la proteína de la soja. Asimismo, no se ha encontrado asociación entre la ingesta de fitoestrógenos y DMO en mujeres premenopáusicas.

4. Bebidas carbonatadas

En las últimas décadas se ha producido un fuerte incremento del consumo de las bebidas carbonatadas. Estas bebidas han desplazado a la leche y han introducido ácido fosfórico sin Ca y, cuando la dieta es alta en P y baja en Ca, se incrementa la resorción ósea para recuperar los niveles séricos de este mineral.

Existen estudios epidemiológicos en los que se asocia el consumo de bebidas carbonatadas a un mayor riesgo de fractura en niños, mujeres jóvenes y posmenopáusicas y mujeres con alta actividad física. Sin embargo, en otros no se ha podido relacionar el consumo de bebidas carbonatadas con la DMO en mujeres posmenopáusicas.

Trabajos recientes sí han podido establecer que sólo las que contenían cafeína, al margen del ácido fosfórico, son las que incrementaron el Ca urinario y las que sólo contenían fosfórico no produjeron calciuria. Estos autores concluyen que el mayor efecto de las bebidas carbonatadas se debe fundamentalmente al desplazamiento de la leche en la dieta.

5. Agua mineral

Diferentes estudios realizados en poblaciones que consumen aguas minerales con alto contenido en Ca ponen de manifiesto que en éstas poblaciones la ingesta del agua mineral se encuentra relacionada con una mayor DMO. Se ha calculado que por cada 100 mg/día de Ca procedente del agua, la DMO femoral incrementaba un 0,5%.

6. Alcohol

El efecto del consumo de bebidas alcohólicas sobre el hueso parece estar relacionado con la cantidad de alcohol ingerida. El uso abusivo incrementa el riesgo de fracturas, al

incrementar el riesgo de caídas o estar asociado a malnutrición y uso de tabaco. Los estudios realizados en estos pacientes muestran una reducción de la DMO y evidencias histológicas de osteoporosis.

Sin embargo, los estudios realizados en poblaciones que consumen cantidades moderadas (11-30 g/día o 1-2 unidades/día), muestran que incrementa la DMO y protege contra las pérdidas óseas. Se ha sugerido que este efecto beneficioso podría estar relacionado con su efecto sobre los niveles de andrógenos o estrógenos. También se ha indicado que el silicio presente en las bebidas alcohólicas, en particular la cerveza, podría contribuir al mencionado efecto positivo del alcohol sobre el hueso.

7. Cafeína

La cafeína a altas dosis incrementa las pérdidas urinarias de Ca y Mg. Los estudios que revisan el efecto de la ingesta de cafeína sobre el hueso concluyen que una ingesta moderada no tiene efectos negativos en las mujeres jóvenes y adultas, debido a que las pérdidas urinarias se compensan con una mayor absorción.

Sin embargo, las mujeres de edad avanzada no son capaces de compensar estas pérdidas. Por estas razones, los efectos de las altas ingestas de cafeína parecen quedar restringidos fundamentalmente a mujeres posmenopáusicas con una baja ingesta de Ca. Así, 2 o más tazas/día de café se ha asociado con un descenso de la DMO entre personas con bajo consumo de leche, pero no entre mujeres que tomen uno o más vasos de leche al día.

2.1.2 Efecto de factores asociados al estilo de vida sobre el estado del hueso

2.1.2.1 Edad

Durante los primeros años de la vida (hasta la adolescencia), la producción de hueso es superior a las pérdidas por remodelación. En los jóvenes la formación y resorción son semejantes; en la edad madura, como consecuencia de la caída de la concentración de esteroides, sobre todo en mujeres postmenopáusicas, se reduce la masa ósea al incrementar la resorción a la formación y en las edades avanzadas la pérdida de hueso por resorción ocurre con mayor rapidez. Al ser los huesos de las mujeres más pequeños los efectos del desgaste de masa ósea tiene mayor efecto en ellas.

Durante el envejecimiento se reduce la masa de los huesos y los hace más frágiles. La disminución del volumen se debe a la pérdida de Ca y otros minerales de la matriz ósea (desmineralización). Este proceso se inicia sobre los 30 años en las mujeres y se pierde aproximadamente un 8% de masa ósea cada 10 años. En los varones el proceso se inicia a la misma edad y se pierde un 3% por década.

La fragilidad se debe a la disminución de la síntesis de proteínas, en particular de colágeno, que confieren a los huesos la resistencia a la tensión. En consecuencia, los minerales están cada vez en mayor proporción y la pérdida de resistencia a la tensión hace que los huesos se vuelvan frágiles y propensos a las fracturas.

2.1.2.2 Tamaño corporal, composición corporal y obesidad

El peso corporal y la altura son los mayores determinantes de la DMO. Los esqueletos pequeños presentan un mayor riesgo de osteoporosis, mientras que los individuos altos son más propensos a la fractura de cadera.

En los jóvenes y en los hombres una alta relación masa magra/masa grasa se ha relacionado con una mayor masa mineral ósea, mientras que en las mujeres posmenopáusicas, es la obesidad (una baja relación masa magra/masa grasa) la que se asocia positivamente a la masa mineral ósea. Esta dicotomía se podría explicar por el efecto osteogénico del músculo en los jóvenes, y en las personas de edad avanzada la capacidad del tejido adiposo para amortiguar golpes y producir endógenos.

2.1.2.3 Actividad física

La actividad física es un importante modulador de la masa ósea en todas las fases de la vida. La inmovilización completa puede dar lugar a una pérdida de masa ósea de alrededor del 40%. Aunque tanto en niños como en adultos, la actividad física asociada a la rutina normal tiene poco efecto sobre la masa ósea, en mujeres posmenopáusicas la práctica frecuente de ejercicio físico puede prevenir o revertir la pérdida de masa ósea en casi un 1% al año.

Los efectos osteogénicos del ejercicio consisten en un incremento en la producción de colágeno, depósito de sales minerales y secreción de calcitonina, que inhibe la resorción ósea. Estos efectos se ejercen fundamentalmente sobre los lugares anatómicos donde se realiza el esfuerzo. Las actividades que conllevan apoyo de peso, como caminar o levantamiento de pesas moderado, ayudan a conservar y aumentar la masa ósea.

2.1.2.4 Tabaco

El uso del tabaco se ha asociado a una pequeña pero significativa reducción en la DMO, particularmente en los hombres pero también entre las mujeres. Los mecanismos por los que fumar reduce la densidad ósea no están claros.

2.1.2.5 Trastornos del comportamiento alimentario

La anorexia y bulimia constituyen uno de los mayores problemas alimentarios entre adolescentes y jóvenes en los países desarrollados. La primera parece conducir a mayores trastornos sobre el hueso; en la mayoría de los casos se han detectado pérdidas óseas y

en un 50% de los pacientes la densidad ósea alcanza valores inferiores a las 2DS de controles de la misma edad.

El déficit de estrógenos asociados a la amenorrea, probablemente juegue un papel más importante en la pérdida de masa ósea. Otros factores que influyen son la malnutrición y posiblemente exceso de ejercicio.

2.1.2.6 Síndromes de malabsorción

Los síndromes de malabsorción como la fibrosis quística y la enfermedad celíaca se asocian con un incremento en el riesgo de osteoporosis como consecuencia de la situación de malnutrición que generan y la malabsorción de Ca y vitamina D.

La enfermedad inflamatoria intestinal también se asocia a un incremento de osteoporosis, con aproximadamente un 50% de los pacientes sufriendo osteopenia. Esta situación parece estar relacionada con la desnutrición, falta de ejercicio y uso de corticoesteroides.

La intolerancia a la lactosa se asocia a una menor ingesta de Ca, por tener que evitar los derivados lácteos y de este modo se piensa que incrementa el riesgo de osteoporosis. Sin embargo los resultados de los estudios sólo muestran una ligera tendencia a incrementar el riesgo en algunos casos.

2.1.3 Nutrición y salud ósea en las diferentes etapas de la vida (Dossier, 2011)

El desarrollo y crecimiento óseo es un proceso que tiene lugar desde el vientre materno hasta los últimos días de la vida del individuo. Toda una vida para que el hueso pueda fortalecerse o, por el contrario, para que no alcance su óptimo desarrollo y se vaya debilitando paulatinamente.

En este complejo proceso, el tejido óseo tendrá una serie de necesidades nutritivas que se tendrán que cubrir merced a los alimentos que el individuo ingerirá. Desde este punto de vista, la farmacología o la suplementación son poco importantes ya que, de ser necesarias, únicamente lo serán durante cortos periodos de tiempo y, desde luego, nunca podrá sustituir lo que los alimentos deberían haber aportado desde el nacimiento del individuo o, incluso, desde antes.

Es sabido que organizar adecuadamente la alimentación desde la más temprana infancia reporta grandes beneficios en términos de salud, incluida la ósea, y de calidad de vida. Por ello, es necesario insistir siempre en la importancia de la educación alimentaria.

2.1.3.1 Embarazo y lactancia

Durante el embarazo y lactancia se producen una serie de condicionamientos fisiológicos y ambientales que hacen necesario adecuar los aportes alimentarios y otros estilos de vida a esta situación de especial repercusión sobre la madre y el niño.

El cambio en las necesidades nutricionales y, en concreto, las modificaciones en el balance fosfo-cálcico, se deben en buena medida a los cambios hormonales que sirven de sustrato a todos los procesos de síntesis y adaptación materno-fetal que se desarrollan a lo largo del embarazo, maduración fetal y durante la lactancia para la alimentación del niño, siempre con la prioridad de cubrir las necesidades del feto o del lactante.

Como consecuencia de los cambios que tienen lugar antes de la mineralización del esqueleto fetal, se favorece la retención progresiva de Ca para satisfacer la creciente y progresiva demanda del esqueleto fetal para su mineralización.

La mayor parte de los trabajos consultados indican que durante la lactancia se pierde masa ósea; estudios evidencian que en los primeros meses de lactancia se reduce la densidad ósea de la madre entre un 3 y un 5%, sobre todo en la columna y la cadera, que se recupera al cesar la lactancia.

En esta etapa se aconseja el consumo de leche y derivados lácteos para asegurar unos aportes dietéticos de Ca adecuados (3-4 raciones/día, preferiblemente semidesnatados o adecuado contenido grasa). Los productos lácteos son una buena vía de incorporación de cantidades nutricionales de vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados, especialmente en mujeres con perfiles alimentarios incompletos.

No es necesaria la suplementación farmacológica de vitamina D, ya que una dieta habitual equilibrada y la exposición solar permiten una adecuada síntesis de esta vitamina. Tampoco es recomendable la suplementación con vitamina A, ni la ingesta de cantidades suplementarias de alimentos especialmente ricos en ella, como el hígado, aceite de hígado de bacalao, etc.; las recomendaciones para la vitamina A pueden cubrirse a través del consumo de lácteos, huevos y alimentos vegetales ricos en provitamina A. Además, es fundamental tomar diariamente cinco raciones de frutas o verduras de temporada.

2.1.3.2 Infancia y adolescencia

Durante la infancia y la adolescencia se produce el crecimiento del organismo con la formación de hueso a partir de cartílago de crecimiento y osificación posterior, fortaleciéndolo. Para adquirir un desarrollo óptimo, es necesario mantener un estado nutricional adecuado. Con la prevención en la edad pediátrica se pretende alcanzar un mayor grado de masa ósea y garantizar un hueso mejor osificado durante la etapa de la

vejez. La pubertad es el periodo en que más aumenta la densidad ósea; y es en este periodo en el que se consigue el denominado “pico de masa ósea”, cuya calidad resulta fundamental para evitar riesgos posteriores.

La densidad mineral ósea puede ser modificable con la dieta y el ejercicio físico hasta un 20%. Cobra gran importancia un aporte equilibrado de proteínas (tanto el exceso como el defecto en este sentido pueden contribuir a una resorción ósea), el aporte de vitaminas a través de la fruta y verduras abundante, así como la ingesta de minerales como el Ca, el P y el Mg. El Ca de la dieta debe obtenerse principalmente de los alimentos lácteos, así como los fortificados.

El ejercicio físico continuado constituye uno de los factores más importantes que intervienen en la regulación de la masa ósea; éste va a mejorar la fuerza y resistencia del hueso, que se somete continuamente a microtraumatismos. También favorece la síntesis orgánica en el hueso, el depósito de minerales y una arquitectura ósea más resistente.

2.1.3.3 Nutrición y salud ósea en la madurez

Se considera que una dieta es sana cuando consigue un aporte de nutrientes en cantidad suficiente para satisfacer las necesidades del organismo. En la actualidad, además, se requiere que ésta sirva para promocionar la salud, mejorar el bienestar y reducir el riesgo de enfermedades; las de tipo crónico, como las cardiovasculares, cáncer y osteoporosis son las que se benefician más de una dieta adecuada. Una dieta rica en lácteos y ajustada en proteínas y sal puede mejorar la salud del hueso y evitar el desarrollo de osteoporosis en el futuro.

Especial atención merece en este capítulo la menopausia en la mujer, proceso cuyos cambios hormonales requiere una especial suplementación de Ca y vitamina D, así como hábitos de vida saludables y la práctica de ejercicio físico para mantener el equilibrio del esqueleto.

2.1.3.4 La senectud

La edad es el determinante más importante en la densidad ósea y se conoce que con ella se produce una disminución global de la cantidad de hueso, originando la denominada “osteopenia fisiológica” ligada a la edad. La pérdida acumulada a la edad de 80-90 años es del 30% en el hombre y del 40-50% en la mujer.

A la disminución de la formación ósea, en parte relacionada con el envejecimiento general del osteoblasto (la célula encargada de la formación de tejido óseo), se suma la disminución de la absorción de Ca. Esta malabsorción podría estar relacionada con la deficiencia de vitamina D, ya que la transformación de ésta se produce en el riñón y con la

edad la capacidad de función renal se deteriora. La actividad física, que disminuye considerablemente con el envejecimiento, es un importante factor en la formación ósea.

Existen varios trabajos que manifiestan el papel del Ca, de la vitamina D y de las proteínas en la prevención de las fracturas óseas.

2.2 Hueso

El esqueleto consta de huesos y cartílagos. El término *huesos* se refiere a estructuras compuestas de varios tejidos, entre los cuales predomina un tejido conectivo especializado conocido como *tejido óseo*. Los huesos constituyen un armazón formado por palancas, protegen órganos como el encéfalo y el corazón, su médula forma ciertas células sanguíneas y su sustancia dura sirve para el almacenamiento e intercambio de iones Ca y fosfato.

El cartílago es un tejido conectivo resistente y elástico compuesto de células y fibras incluidas en una matriz intercelular gelatinosa de consistencia firme. Este tejido es parte integrante de muchos huesos, y algunos elementos esqueléticos son cartilagosos por completo (O'Rahilly et al, 1989).

2.2.1 Tipos de huesos

Según su forma, los huesos se clasifican en largos, cortos, planos e irregulares.

Huesos largos: Son aquellos en que la longitud predomina sobre la anchura y el grosor. Entre ellos se incluyen clavícula, húmero, cúbito y radio en el miembro superior, y fémur, tibia y peroné en el inferior. También se incluyen los metacarpianos, los metatarsianos y las falanges.

Cada hueso largo presenta un cuerpo y dos extremidades, que por lo general son articulares. El cuerpo recibe el nombre técnico de *diáfisis*, y las extremidades, que suelen ser más voluminosas, es de *epífisis*. Las epífisis de un hueso en crecimiento pueden ser cartilagosas por completo o, si se ha iniciado su osificación, estar separadas de la diáfisis por *discos epifisarios* cartilagosos. Clínicamente el término epífisis suele referirse a la epífisis ósea. La parte de la diáfisis adyacente al disco epifisario suele ser más ancha que el resto de ella. Esta parte, que contiene la zona de crecimiento y el hueso recién formado, se llama *metáfisis*. En el adulto hay continuidad entre el tejido óseo de la metáfisis y la epífisis.

La diáfisis de un hueso largo es un tubo de *hueso compacto*, cuya cavidad se conoce como *cavidad o conducto medular*. Esta cavidad contiene médula roja, amarilla, o ambas combinadas. Las epífisis y metáfisis están formadas por columnas o trabéculas irregulares

que se entrecruzan para formar lo que se conoce como *hueso esponjoso o trabecular*. Los espacios entre las trabéculas están ocupados por médula. La parte superficial de las epífisis y las metafisis está formada por una delgada capa de hueso compacto, que en las superficies articulares de las epífisis está cubierto por cartílago, por lo general hialino.

La diáfisis de los huesos largos está rodeada por una vaina de tejido conectivo, el *periostio*, que está formado por una capa externa, fibrosa y resistente, que actúa como membrana limitante, y otra interna, más celular, llamada capa osteógena. La superficie interior del hueso compacto está revestida por una delgada capa celular, el *endostio*. En las extremidades del hueso, el periostio se continúa con la cápsula articular, pero no cubre al cartílago articular. El periostio también sirve para la inserción de músculos y tendones. Los haces de fibras colágenas de los tendones se abren en abanico al llegar al periostio; algunas continúan y penetran en el hueso. Con mucha frecuencia. La zona de inserción del tendón no es ósea ni cartilaginosa. A veces, donde los tendones entran en contacto con el hueso para insertarse, el periostio es fibrocartilaginoso.

Huesos cortos: Son aquellos en que las tres dimensiones son más o menos iguales. Se encuentran en manos y pies y están formados por hueso esponjoso y médula ósea rodeados por una delgada capa de hueso compacto. Están cubiertos por periostio, excepto en sus superficies articulares.

Huesos sesamoideos: Son una variedad de huesos cortos que se encuentran sobre todo en manos y pies, en el espesor de tendones o cápsulas articulares. Varían en tamaño y número. Algunos sirven claramente para modificar el ángulo de tracción de un tendón, pero otros son tan pequeños que tienen escasa importancia funcional.

Huesos accesorios: Estos huesos, también llamados supernumerarios, son aquellos que por lo regular no existen. Suelen ser del tipo corto o plano y se presentan sobre todo en manos y pies. Entre ellos se incluyen algunos sesamoideos y ciertas epífisis que no se han unido en el adulto. Tienen importancia médico legal porque, cuando se ven en radiografías, se pueden confundir con fracturas, sólo que no hay callo, los huesos tienen contorno uniforme y con frecuencia son bilaterales.

Huesos planos: Estos huesos incluyen las costillas, el esternón, la escápula y varios huesos del cráneo. Son delgados y suelen ser más bien curvos. Están formados por dos capas de hueso compacto y, entre ellas, otra de hueso esponjoso y médula ósea, que en los huesos de la bóveda craneal recibe el nombre de *diploë* y contiene muchos conductos venosos. Algunos huesos, como el hueso lagrimal y ciertas partes de la escápula, son tan delgados que sólo están formados por una delgada capa de hueso compacto.

Las superficies articulares de los huesos planos están cubiertas de cartílago o, como en el caso de ciertos huesos del cráneo, de tejido fibroso.

Huesos irregulares: Son aquellos a los que no es fácil incluir en los otros tipos. Incluyen muchos de los huesos del cráneo, las vértebras y el sacro. Están formados en su mayor parte por hueso esponjoso envuelto por una delgada capa de tejido compacto. Las partes de estos huesos que son muy delgadas pueden estar formadas sólo por hueso compacto. Los *huesos neumáticos* contienen cavidades o senos llenos de aire (O'Rahilly et al, 1989).

2.2.2 Forma y arquitectura del hueso

Los huesos son rígidos y elásticos. Resisten fuerzas de tensión y compresión con la misma eficacia, y pueden soportar cargas estáticas y dinámicas de hasta muchas veces el peso del cuerpo. La naturaleza obviamente mecánica del esqueleto ha determinado que se hagan muchos intentos para interpretar la arquitectura externa e interna del hueso desde un punto de vista mecánico. Los huesos tienen una admirable construcción que combina resistencia, elasticidad y poco peso, propiedades que se pueden modificar bajo diversas condiciones mecánicas.

La arquitectura del hueso esponjoso se ha interpretado con más frecuencia según la teoría de las trayectorias. Según ella, las trabéculas óseas siguen líneas (trayectorias) de los máximos esfuerzos internos en el hueso, y por tanto están adaptadas para resistir los esfuerzos y tensiones a las que está sometido el hueso. Algunas de las trabéculas son resistentes a las tensiones, en tanto que otras lo son a las fuerzas compresivas.

La teoría de las trayectorias ha recibido críticas severas en varios terrenos, y ahora sólo se acepta con reservas. Los seguidores de la teoría creían que las fuerzas de tensión eran la causa principal del crecimiento del hueso, y que la compresión producía atrofia. Otros investigadores sobre el tema sostienen el punto de vista opuesto. No obstante, bajo las condiciones adecuadas, cada uno de los tipos de fuerzas, o ambos, pueden estimular el crecimiento óseo. Después del nacimiento, la función es el factor principal que estimula el crecimiento del hueso y determina su arquitectura, sin importar la fuerza mecánica que participe. Se sabe poco sobre la influencia posnatal, si es que la hay, de las funciones bioquímica, hemopoyética y otras no mecánicas del hueso sobre su forma externa y su arquitectura interna. Hay que recalcar que la forma puede depender tanto de estas funciones como de las fuerzas mecánicas (O'Rahilly et al, 1989).

Estructura microscópica del hueso

El hueso es un tejido conectivo especializado en constante cambio que está formado por células, una sustancia intercelular densa y numerosos vasos sanguíneos. En algunos aspectos se asemeja al cartílago, pero en otros es diferente de él. La estructura del hueso se resume en la tabla 2.1.

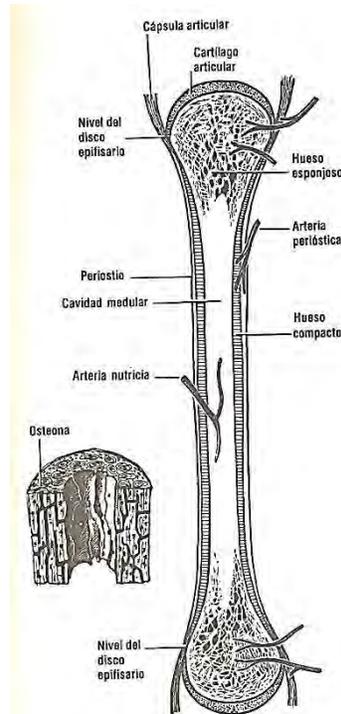
| Componentes | Cartílago hialino | Hueso |
|------------------------------------|---|---|
| a) Células | Condrocitos en lagunas | Osteocitos en lagunas |
| b) Sustancia (matriz) intercelular | a) Fibras colágenas ocultas. b) Sustancia fundamental que contiene mucopolisacáridos (condroitinsulfato y ácido hialurónico) y proteínas | 1. Matriz orgánica: a) Fibras colágenas ocultas (oseína). b) Sustancia fundamental que contiene mucopolisacáridos (condroitinsulfato y ácido hialurónico) y proteínas. 2. Matriz inorgánica: cristales de apatita en la sustancia fundamental. |
| c) Adicionales | (Desprovisto de vasos y nervios) | Vasos sanguíneos y nervios (Linfáticos en el periostio). |

(O'Rahilly et al, 1989).

Tabla 2.1 Componentes del cartílago y el hueso

El hueso maduro se dispone en capas y por tanto se le conoce como hueso laminar. En el hueso compacto, estas capas o laminillas se disponen para formar *osteonas o sistemas de Havers*, cada una de las cuales consta de *laminillas* concéntricas, como tubos dentro de tubos (figura 2.1). El más interno de ellos contiene un núcleo de tejido que suele contener un solo vaso sanguíneo pequeño. Las osteonas pueden medir hasta varios milímetros de

longitud, y siguen una dirección longitudinal u oblicua en la diáfisis de los huesos largos. Las laminillas de las trabéculas del hueso esponjoso no se disponen como osteonas, sino como hojas planas o ligeramente curvas.



(O´Rahilly et al, 1989).

Figura 2.1 Esquema de un hueso largo y su riego sanguíneo. El dibujo del recuadro muestra las laminillas de hueso compacto dispuestas en unidades llamadas osteonas.

Las laminillas contienen espacios llamados *lagunas* que están ocupadas por osteocitos. De cada laguna parten conductillos en forma radiada que participan en la difusión de sustancias nutritivas que proceden de los capilares. La vida del hueso depende de sus células y, si una de ellas muere, el hueso adyacente se desintegra.

La dureza del hueso es resultado del depósito, en la matriz orgánica, de una sustancia mineral compleja; sobre todo complejos de fosfato de Ca que pertenecen al grupo de minerales de la apatita. La sustancia mineral constituye alrededor de los dos tercios del peso del hueso. Cuando se calcina el hueso (cuando se consumen el agua y el material orgánico) se desintegra. Cuando se descalcifica se torna flexible. Por su gran contenido de minerales, los huesos son opacos a los rayos-X (O´Rahilly et al, 1989).

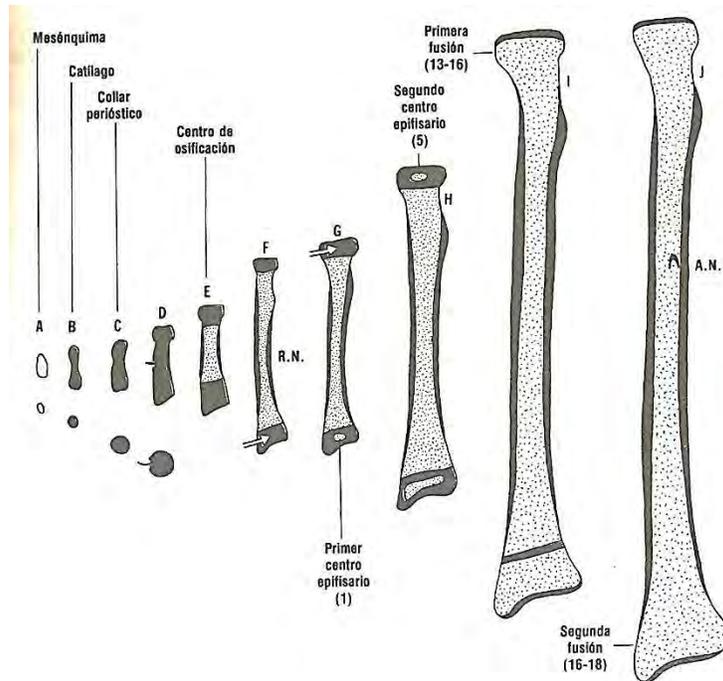
2.2.3 Desarrollo y crecimiento

Todos los huesos se inician como proliferaciones del mesénquima que aparecen en las primeras fases del periostio embrionario. También aumenta el número de fibras del tejido conectivo. En el caso de los huesos *membranosos* (que también se llaman *dérmicos* o de *revestimiento* y comprenden la clavícula, el maxilar inferior y algunos huesos del cráneo), las células se diferencian en osteoblastos que secretan una matriz orgánica llamada osteoide, en la que luego se depositan las sales del hueso. Algunos osteoblastos quedan atrapados en la matriz y se transforman en osteocitos. Otros continúan su división y forman más osteoblastos en la superficie del hueso. El hueso crece por aposición, por el depósito del hueso nuevo sobre las superficies libres.

Sin embargo, la mayor parte de los huesos se desarrollan como huesos cartilagosos. Las proliferaciones del mesénquima se condrifican a medida que las células secretan matriz cartilaginosa y forman cartílagos hialinos que tienen la forma de los futuros huesos. Estos cartílagos son sustituidos después por hueso, como se ilustra para un hueso largo en la figura 2.2 (O'Rahilly et al, 1989).

Maduración del esqueleto

En el desarrollo del esqueleto participan tres factores relacionados entre sí, pero que pueden separarse: aumento de tamaño (crecimiento), aumento de madurez y envejecimiento. La maduración del esqueleto es “la metamorfosis del esqueleto cartilaginoso y membranoso del feto hasta los huesos totalmente osificados del adulto”. Sin embargo, el estado del esqueleto no corresponde por fuerza con la estatura, el peso o la edad. De hecho, los cambios de maduración del esqueleto guardan íntima relación con los del aparato reproductor. Estos a su vez son agentes causales directos de la mayor parte de los cambios externos aparentes en los que suele basarse la estimación de la madurez del cuerpo en general. El esqueleto del niño sano se desarrolla como una unidad, y los diversos huesos tienden a ir al mismo paso. De aquí que algunos investigadores creen que basta el examen radiográfico de una porción limitada del cuerpo para hacer una estimación de todo el esqueleto. La mano es la porción que se examina con más frecuencia, y a veces se afirma que “como crece la mano crece todo el esqueleto”.



(O'Rahilly et al, 1989).

Figura 2.2 Desarrollo de un hueso largo, como el radio A, Precursor mesenquimatoso. B, Modelo cartilaginoso. C, Collar perióstico del hueso. D, Invasión del collar óseo y el cartílago por vasos. E, Osificación endocondral. F, Una epífisis cartilaginosa (la distal en este caso) empieza a vascularizarse (flecha). G, Aparece un centro de osificación epifisario en una de las epífisis (la distal). H, Aparece un centro de osificación en la otra epífisis (la proximal). I, La osificación ha progresado, se ve un disco epifisario en la parte distal y la epífisis proximal se ha fusionado ya con la diáfisis. J, Se ha llegado al estado adulto. A. N., Agujero nutricio. R.N, Recién nacido. Los números entre paréntesis son edades aproximadas del radio en años.

La valoración de la madurez del esqueleto es importante para saber si un niño en particular presenta adelanto o retraso en lo que al esqueleto se refiere y, por tanto, para diagnosticar trastornos endocrinos y nutricionales. Es frecuente que el estado del esqueleto se exprese en términos de "edad esquelética". Esto incluye la comparación de radiografías de determinadas áreas con imágenes estándar para esas áreas; la edad esquelética que se asigna es la del estándar que corresponda con más exactitud. Se han publicado estándares detallados para el desarrollo posnatal normal de mano, rodilla y pie (O'Rahilly et al, 1989).

Periodos de maduración del esqueleto.

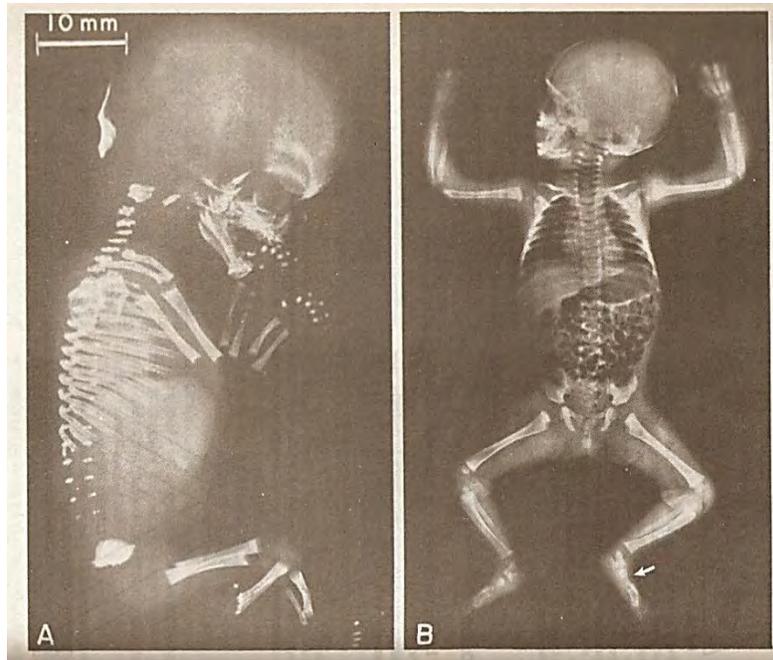
Los siguientes periodos arbitrarios son convenientes para considerar el progreso de la maduración del esqueleto.

1.- Periodo embrionario propiamente dicho. Comprende las primeras ocho semanas del desarrollo posteriores a la ovulación. Durante las dos últimas semanas de este periodo comienzan a osificarse la clavícula, los maxilares superior e inferior, el húmero, el radio, el cúbito, el fémur y la tibia.

2.- Periodo fetal. Empieza a las ocho semanas después de la ovulación, cuando la longitud cráneo-rabadilla alcanza unos 30 mm. Los siguientes elementos empiezan a osificarse al principio del periodo fetal, o a veces al final del periodo embrionario: escápula, ilion, peroné, falanges distales de la mano y algunos huesos del cráneo, como el frontal.

Los siguientes empiezan a osificarse durante la primera mitad de la vida intrauterina (figura 2.3): la mayor parte de los huesos del cráneo y de las epífisis (de costillas, metacarpianos, metatarsianos y falanges), calcáneo a veces isquion, pubis, algunos segmentos del esternón, arcos neurales y los centros de las vértebras C-1 a S-5.

Los siguientes comienzan a osificarse poco antes del nacimiento: calcáneo, astrágalo, cuboides, generalmente la epífisis distal del fémur y la proximal de la tibia; a veces la apófisis coracoides, la cabeza del húmero y los huesos grande y ganchudo; raras veces la cabeza del fémur y el cuneiforme lateral.



(O'Rahilly et al, 1989).

Figura 2.3 Radiografías de feto y de lactante. A, radiografía lateral de un feto de 11 semanas de edad después de la ovulación (69 mm C.R). Se ha aumentado la radiopacidad por el uso de plata. En la cabeza y el cuello se pueden identificar porciones de los huesos occipital, parietal, frontal, nasal, maxilar superior, cigomático, esfenoides, temporal y maxilar inferior, así como los arcos de las vértebras cervicales. Es evidente la red de trabéculas de los huesos, parietal, frontal y porción escamosa del temporal. Los exoccipitales se superponen entre sí y están situados inmediatamente por encima de las vértebras cervicales; el basioccipital queda en posición oblicua entre los exoccipitales y el maxilar inferior, cubierto en parte por el anillo timpánico de cada lado. En cada miembro superior, obsérvense la escápula, la clavícula y las diáfisis de húmero, cúbito, radio, huesos metacarpianos y la mayor parte de las falanges. En cada miembro inferior obsérvense el hueso iliaco y las diáfisis de fémur, tibia, peroné y huesos metatarsianos. Se puede ver la falange distal de un dedo gordo en la esquina inferior derecha. No son visibles los huesos del carpo y el tarso. En este caso hay 13 costillas en cada lado, pero es difícil distinguir las costillas cervicales en esta proyección. Los arcos neurales se extienden de la vértebra C-1 a la L-5, y los centros vertebrales de C-7 a S-2.

B, Radiografía de una niña lactante viva de dos meses de edad. En la cabeza, obsérvense la fontanela anterior y la parte superior de la sutura coronal, la oreja, la cavidad timpánica y los dientes (se pueden ver zonas calcificadas en las coronas de los molares deciduos inferiores). En cada miembro superior, además de las diáfisis de los huesos largos, obsérvense la epífisis de la cabeza del húmero y los huesos grande y ganchudo. En cada miembro inferior, obsérvense las epífisis inferiores del fémur y superior de la tibia, así como el astrágalo, el calcáneo y el cuboides. La flecha señala el centro de osificación del tercer cuneiforme. Aún no es visible la cabeza del fémur. En el tórax, obsérvense las costillas, las vértebras, el corazón globular y la posición del diafragma. En el abdomen, adviértase la radiopacidad de hígado y el aspecto radiolúcido

tabicado del gas en el intestino. En la pelvis son observables el ilion, el isquion y el pubis de ambos lados, así como las vértebras sacras en la parte media. La pelvis es relativamente pequeña en la niñez. Obsérvese la amplia separación entre las partes osificadas de ambos pubis. A es el doble del tamaño natural, y B es aproximadamente la cuarta parte del mismo.

3.- Niñez. Es el periodo que va del nacimiento a la pubertad e incluye la infancia (esto es, los primeros uno o dos años de la vida posnatal). Durante la niñez empiezan a osificarse la mayor parte de las epífisis de los miembros, junto con los huesos del carpo, los del tarso y los sesamoideos. Es importante tener presente que, por lo general, los centros de osificación aparecen uno o dos años antes en las niñas que en los niños.

Además, las epífisis que aparecen primero en un elemento esquelético suelen ser las últimas en unirse a la diáfisis. Estas se localizan en los llamados extremos de crecimiento (hombro, muñeca y rodilla).

4.- Adolescencia. Esta incluye la pubertad y el periodo que va de ésta a la edad adulta. La pubertad suele presentarse a los 13 ± 2 años de edad en las niñas, y dos años después en los niños. Durante la adolescencia empiezan a osificarse la mayor parte de los centros secundarios de vértebras, costillas, clavícula, escápula y hueso coxal. La fusión entre los centros epifisarios y las diáfisis suele ocurrir durante la segunda y la tercera décadas de la vida. Esta fusión suele tener lugar uno o dos años antes en las mujeres que en los varones. El cierre de las líneas epifisarias se efectúa bajo control hormonal.

5.- Edad adulta. El húmero sirve como referencia en el esqueleto para valorar la transición de la niñez a la adolescencia y la de ésta a la edad adulta, pues es el primero de los huesos largos en que se une la epífisis distal, y el último en que se une la proximal (a los 19 años o más). El centro para la cresta iliaca se fusiona en los principios de la edad adulta (de los 21 a los 23 años). Las suturas de la bóveda craneal comienzan a cerrarse más o menos al mismo tiempo (a partir de los 22 años) (O'Rahilly et al, 1989).

2.3 Fisiología del hueso

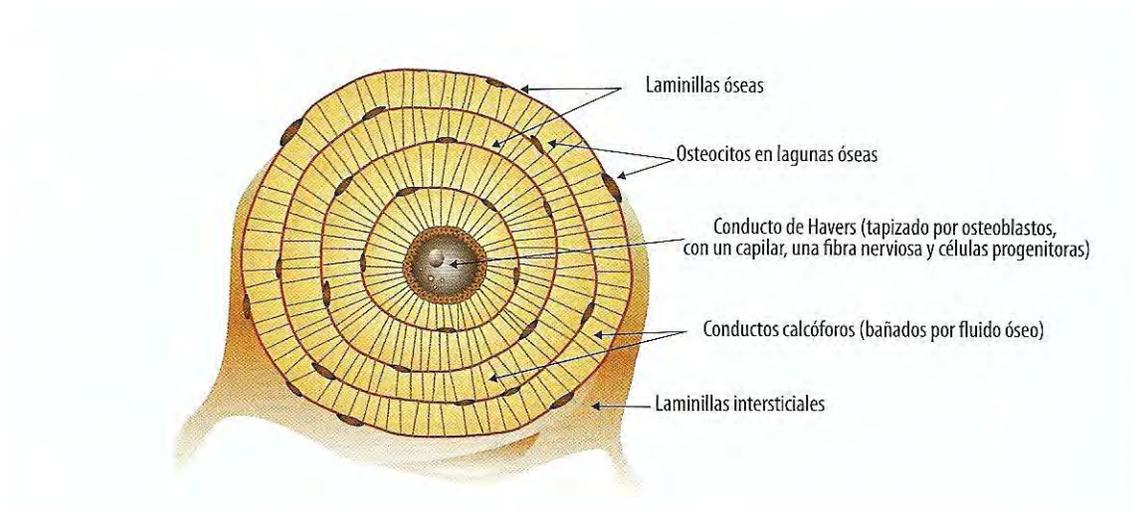
El hueso es un tejido dinámico, profusamente vascularizado e innervado y sometido a continuos procesos de remodelado, reconstrucción y reparación de su arquitectura de lo largo de toda la vida. El esqueleto, al facilitar por un lado palancas, articulaciones y puntos de inserción para los músculos, proporciona soporte estructural para el movimiento; y por otro lado, además de proteger el encéfalo, la médula espinal y el contenido del tórax y la pelvis, la médula ósea constituye el soporte y la matriz de la hematopoyesis. Aunado a lo anterior; este tejido contiene 99% del Ca, 85% del fosfato, 60% del Mg y 35% del Na de la economía en el ser humano (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Desde el punto de vista estructural, es un tejido conjuntivo mineralizado que adopta dos variedades morfológicas: a) cortical, o compacto, y b) trabecular o esponjoso. El hueso cortical (presente en la diáfisis de los huesos largos, láminas externa e interna de los planos y periferia de los cortos) visto al microscopio posee una estructura con conductos o canales que discurren en paralelo a lo largo del mismo. Estos conductos (Havers), tienen un diámetro de 10 a 350 μm . En el interior de los más finos discurren un capilar y una vénula, y en los de mayor diámetro se hallan varios vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas. Las laminillas óseas se disponen de manera concéntrica a cada conducto, adoptando una morfología característica denominada osteona (figura 2.4). Los conductos de Havers se comunican entre sí con el periostio y con la superficie de la cavidad medular merced a un sistema de conductos transversales (de Volkman) que representan la conexión entre la red vascular del periostio y los vasos sanguíneos de la cortical y la médula ósea (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

En cuanto al hueso trabecular (parte central de los huesos cortos, epífisis y metafisis de los largos y diploe de los planos), carece de conductos de Havers, posee cavidades irregulares ocupadas por la médula ósea y sus laminillas se disponen alrededor de esas cavidades (figura 2.5) (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

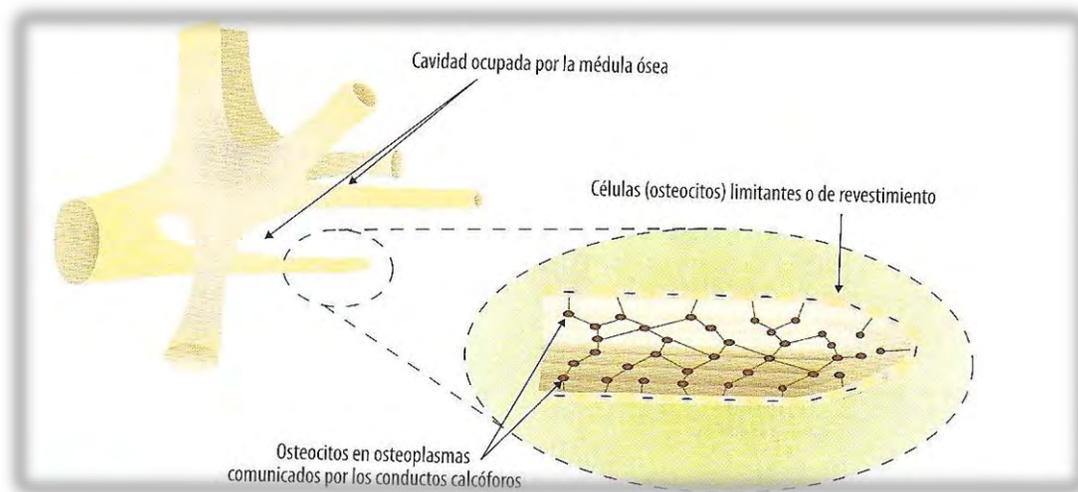
El hueso está recubierto en sus caras externa e interna por periostio y endostio, esenciales para su nutrición, crecimiento y reparación. La capa superficial del periostio contiene fibras de colágeno y fibroblastos, vasos sanguíneos y fibras nerviosas; y su capa profunda, células precursoras de osteoblastos. El endostio, a su vez, está formado por células precursoras de osteoblastos y osteoclastos dispuestas en forma de capa que recubre el espacio medular y los conductos de Havers y de Volkman (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Tanto el hueso cortical como el trabecular se componen de células óseas, matriz orgánica (o sustancia osteoide) y mineral óseo (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).



(Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Figura 2.4 Representación esquemática de una osteona.



(Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Figura 2.5 Representación esquemática de un hueso trabecular.

2.3.1 Células óseas

El esqueleto contiene tres tipos específicos de células: condrocitos en los cartílagos, y osteoblastos y osteoclastos en el hueso. A su vez, en el estroma de la cavidad medular de los huesos se halla un tejido conjuntivo en el que se asientan diversas estirpes celulares esenciales tanto para la hematopoyesis como para la fisiología ósea. Así en la médula ósea se encuentran células progenitoras hematopoyéticas, adipocitos, macrófagos, mastocitos,

células precursoras mesenquimales y células óseas como osteoblastos, osteoclastos y sus células precursoras respectivas (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Condrocitos

Los condrocitos son las primeras células específicas del esqueleto que aparecen durante el desarrollo embrionario y son responsables de la formación de los tres tipos de cartílago presentes en nuestro organismo: hialino (el más abundante y base del futuro tejido óseo), elástico y fibroso. Como los osteoblastos, los condrocitos proceden de células progenitoras mesenquimales multipotenciales. Una vez que estas células se agrupan para formar condensaciones mesenquimales en cada futuro elemento del esqueleto, adquieren las características genéticas de condrocitos *no hipertróficos*. Debido al *factor de crecimiento semejante a la insulina* (IGF-1), proteínas inductoras de vías de transmisión de señales al núcleo activando la transcripción de genes (como las Wnt) y factores de transcripción Sox9, Runx2 y Runx3, éstas células proliferan y se diferencian en *condrocitos hipertróficos*, que sintetizan colágeno α_1 (II) y *agrecano* (proteoglucanos unidos de manera no covalente a ácido hialurónico) básicos para la formación del cartílago (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Estos condrocitos diferenciados pueden seguir dos caminos: a) permanecer como condrocitos formadores de cartílago articular, o b) madurar a condrocitos hipertróficos, sintetizadores de un molde para los huesos largos durante la osificación endocondral, proceso en el cual son sustituidos por osteoblastos y osteoclastos (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Familia del osteoblasto

Vistos en el microscopio óptico, los osteoblastos maduros son células grandes cuboides, de 20 a 30 μm de diámetro mayor, con citoplasma azulado (basófilo por su abundante ARN) y núcleo ovalado en el que se distinguen de dos a cuatro nucléolos. Con el microscopio electrónico muestran notable retículo endoplásmico rugoso, propio de las células que desarrollan una intensa síntesis proteica (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

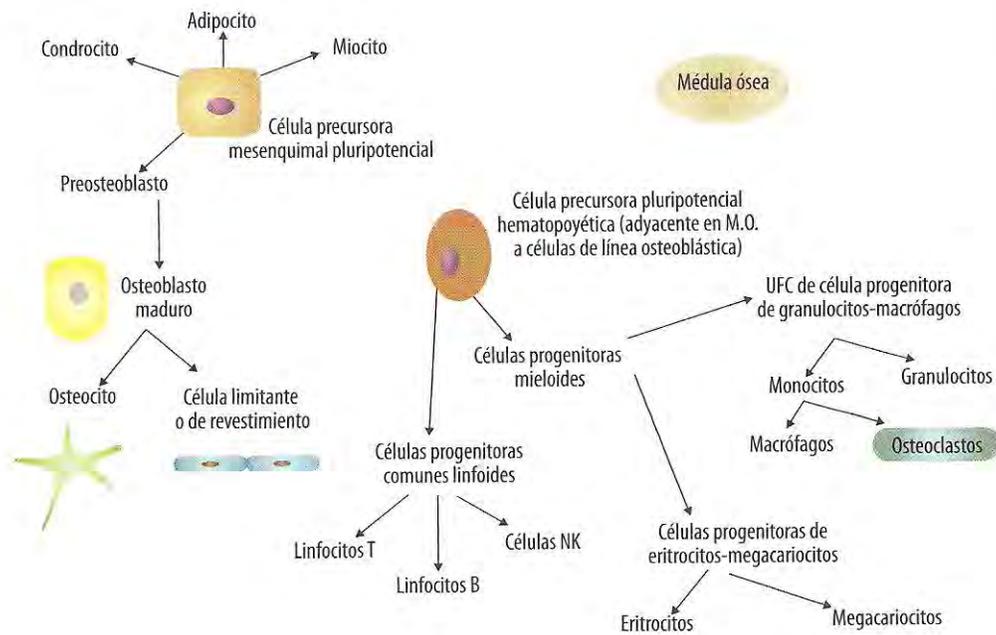
Desde el punto de vista embriológico, derivan de células progenitoras mesenquimales multipotenciales, que también pueden diferenciarse en células del estroma medular, fibroblastos, condrocitos, miocitos y adipocitos (figura 2.6). Aunque sólo en parte conocidas, las señales que regulan el destino de esas células progenitoras hacia osteoblastos, reprimiendo su diferenciación a otras estirpes celulares, son sustancias paracrinas y factores autónomos de transcripción que intervienen en la expresión de genes en distintos momentos de la diferenciación. Entre ellos apuntarse: a) *Runx2* (factor

de transcripción con una región con ADN y miembro de la familia del *Cbfa1*, *core binding factor- α* , esencial en la diferenciación a osteoblastos); b) osterix (factor de transcripción que actúa “aguas abajo” del Runx2); c) proteínas de la familia *Hh* (así llamadas por hallarse su gen homólogo en el erizo, *Hedgehog*, y derivar del desdoblamiento del gen *Ihh*, director de la polaridad segmentaria en la *Drosophila*) y sus receptores; d) las *proteínas morfogenéticas óseas* (*bone morphogenetic proteins*, BMP) y sus receptores, esenciales para el desarrollo, reparación y morfología del hueso, y e) proteínas *Wnt* (glucoproteínas ya presentes en celentéreos como la hidra y reguladoras de la diferenciación de las células mesenquimales y preosteoblastos; toman su nombre de *wingless*, gen hallado en la *Drosophila*, mosca en la que codifica el desarrollo de las alas) que actúa “aguas abajo” de las BMP (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Los osteoblastos, además de sintetizar las proteínas de la matriz orgánica del hueso, sintetizan y liberan factores de crecimiento como: 1) TGF- β (*factor transformante de crecimiento β*), esencial para la formación de osteoblastos y osteoclastos); 2) L-RANK (ligando del RANK: *receptor activador del factor de transcripción NF κ B*), necesario para la formación y acción de los osteoclastos; 3) IGF-I (producido sobre todo en el hígado), mediador de la acción de la hormona del crecimiento y estimulador de la formación y el remodelado óseo, y 4) las BMP, miembros de la superfamilia del TGF- β y factores de crecimiento multifuncionales necesarios para el desarrollo del cartílago y hueso (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Estas BMP se concentran en la matriz osteoide, para liberarse tras la fractura o durante la reabsorción ósea. Actúan a través de receptores con actividad de serina/treonina quinasas y estimulan la expresión del gen *cbfa1*, que controla la diferenciación de las células mesenquimales pluripotenciales en osteoblastos (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Además, los osteoblastos poseen receptores para PTH, PTHrP y calcitriol, hormonas básicas en el metabolismo del Ca y fosfato y la fisiología del hueso (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

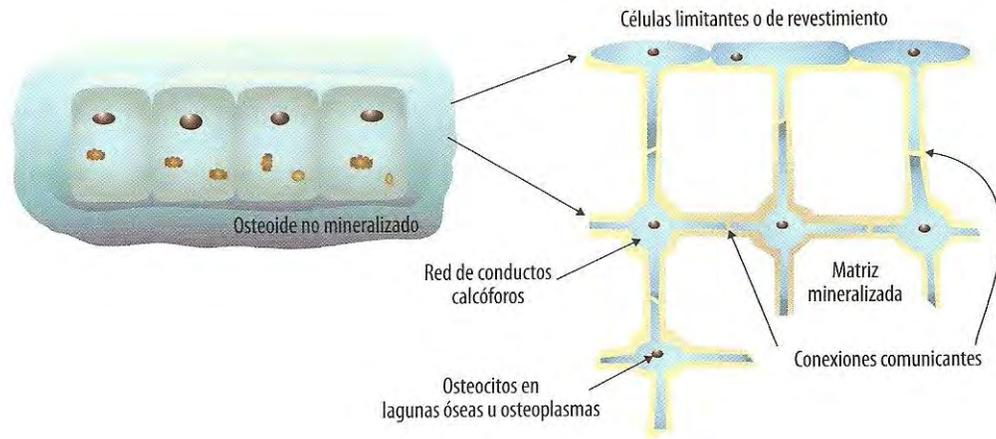


(Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Figura 2.6 Representación esquemática de las interacciones entre osteoblastos y hematopoyesis. Abreviatura: MO, médula ósea.

Por otra parte, funcionalmente son células polarizadas dispuestas en forma de empalizada sobre la matriz orgánica que sintetizan de manera coordinada. Esta coordinación se funda en su adhesión mediante proteínas como cadherina y β -catenina, y en la transmisión de señales a través de conexiones comunicantes (o *gap junctions*) que permiten el paso entre ellas de mensajeros como Ca^{2+} , citoquinas y prostaglandinas (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

La liberación de las proteínas de la matriz orgánica no se limita a su polo basal, sino que gran parte de los osteoblastos quedan envueltos en osteoide que se mineraliza por influencia de la fosfatasa alcalina ósea que ellos mismos producen. Se convierten entonces en *osteocitos* incluidos en lagunas que se forman en el osteoide antes de su mineralización; o bien, en *osteocitos de superficie*, conocidos también como *células limitantes o de revestimiento* (figura 2.7) (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).



(Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Figura 2.7 Destino de los osteoblastos.

Los osteocitos son las células óseas más abundantes. Poseen receptores para PTH y expresan *in vivo* factores de transcripción de proteínas necesarias para la formación y reabsorción ósea (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

En el seno de la matriz mineralizada tienen forma estrellada con varias y finas prolongaciones denominadas procesos dendríticos (*dendra*, gr. “árbol”, “rama”) y se hallan incluidos en lagunas u osteoplasmas comunicadas por una red de *canaliculos* de 130 a 390 nm de diámetro (conductos calcóforos) que permiten su interconexión así como con las células superficiales. Tanto los osteoplasmas como los conductos calcóforos están bañados por el *fluido óseo*, esencial en la fisiología de este tejido (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Los osteocitos son células dinámicas cuyo cuerpo puede deformarse, así como extender o retraer sus extensiones dendríticas. Actúan como sensores de las fuerzas mecánicas que soporta el hueso y que se transmiten a través del fluido óseo. En función de ellas envían a osteoblastos y osteoclastos señales reguladoras del remodelado óseo (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Por otra parte, los osteocitos producen el *factor de crecimiento fibroblástico 23* (FGF23) (que con su cofactor *Klotho* posee acción fosfatúrica e inhibidora de la 1 α -hidroxilasa de la 25-OH-vitamina D) y *esclerostina*, proteína que regula la señal de Wnt en células de estirpe osteoblástica. Finalmente, cuando los osteoclastos producen la reabsorción ósea,

los osteocitos emergen de las lagunas y existen como células superficiales (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Osteoclastos

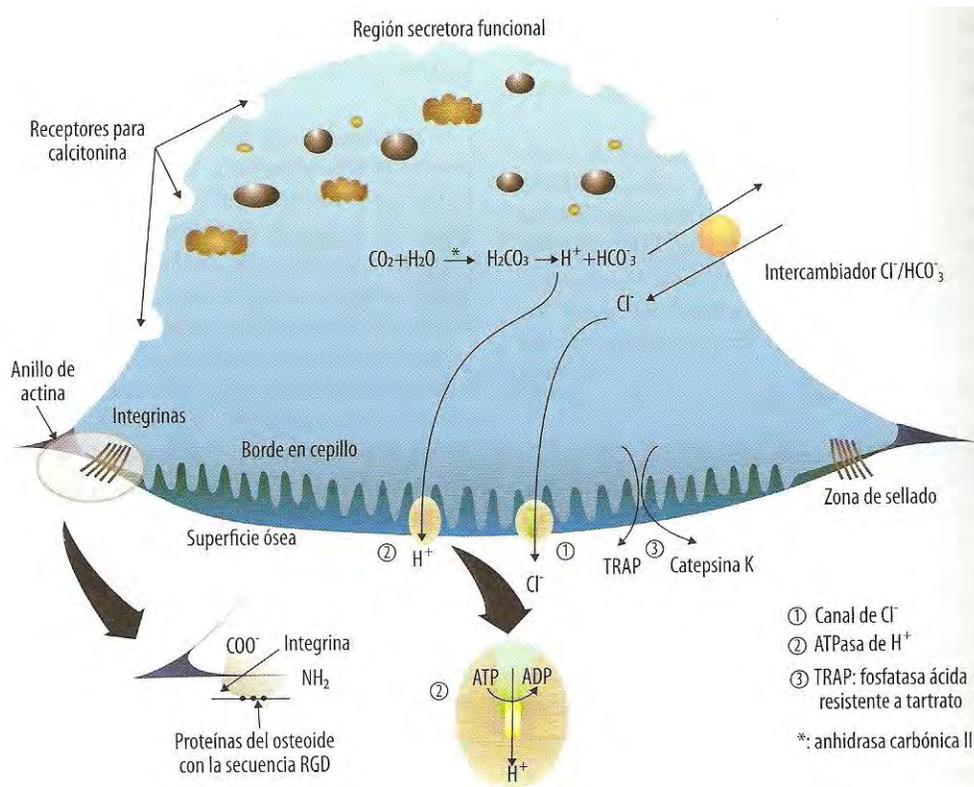
Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas formadas por la fusión de células precursoras mononucleares hematopoyéticas. Derivan de células denominadas “unidades formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos”, más conocidas por su acrónimo inglés GM-CFU (*granulocyte-macrophage colony-forming units*), bajo la influencia de L-RANK, M-CSF y TGF- β (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Aunque los osteoclastos comparten muchas características con los macrófagos y expresan ciertos antígenos comunes en su superficie, también poseen diferencias significativas. Así, los preosteoclastos en médula ósea y sangre periférica expresan CD-11b, CD-14 y RANK, mientras que los osteoclastos maduros no expresan los dos primeros (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

El L-RANK, miembro de la superfamilia del TNF- α , es producido tanto por osteoblastos como por células del estroma, y con el M-CSF forma el par fundamental de factores osteoclasto génicos. La diferenciación de los precursores de osteoclastos así como la activación de estas células maduras, es estimulada por citoquinas como las interleuquinas 1, 6 y 11 y el TNF- α (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Bajo la perspectiva morfológica, los osteoclastos son células gigantes (de 10 a 100 μm de diámetro), multinucleadas, ricas en vacuolas y mitocondrias y, como los osteoblastos, polarizadas, ya que sus acciones fisiológicas se localizan en regiones concretas de su superficie. Así, cuando proceden a la reabsorción ósea, con el microscopio electrónico se observa que en una de sus caras se forma un sinfín de finos entrantes y salientes (*borde en cepillo*) a través de los cuales se desarrolla tal reabsorción. En el citoplasma próximo a dicho borde se encuentra la denominada *área clara* que, si bien carece de organelos, es rica en proteínas y microfilamentos del citoesqueleto y desde la cual se proyectan integrinas que atraviesan el plasmalema, alcanzan el espacio extracelular y se fijan a la superficie mineralizada (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Ricos en receptores para calcitonina, la propiedad funcional característica de los osteoclastos es su capacidad de disolver el mineral óseo y degradar la matriz orgánica del hueso mediante la síntesis de las enzimas necesarias: un intercambiador bicarbonato/cloro, anhidrasa carbónica tipo II, una ATPasa o bomba de protones, fosfatasa ácida resistente a ácido tartárico y catepsina K (figura 2.8) (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).



(Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Figura 2.8 Esquema de un osteoclasto activado.

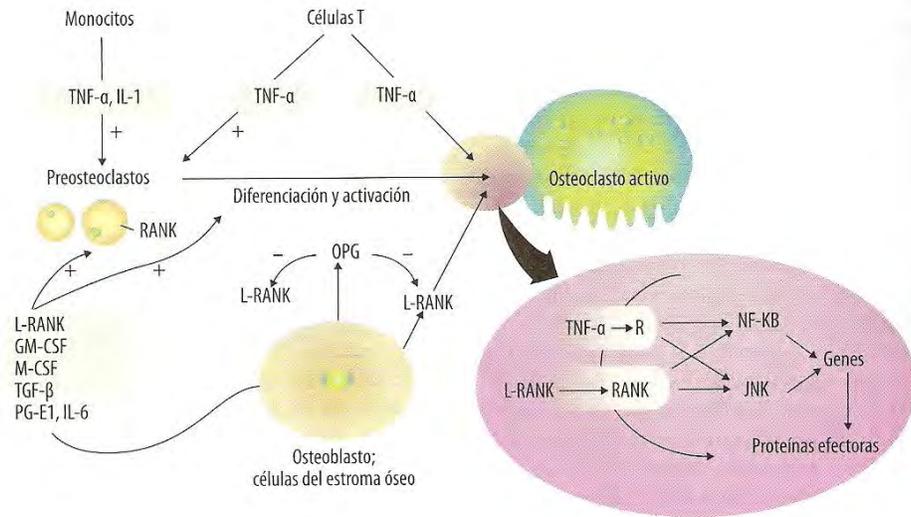
2.3.2 Fisiología de los osteoblastos. Comunicación osteoblasto-osteoclasto

Los osteoblastos son esenciales tanto para la formación como para la reabsorción ósea. Así, por ejemplo, a) sintetizan casi todas las proteínas que constituyen la matriz orgánica del hueso; b) dirigen la organización y disposición armónica de esa matriz en forma de fibrillas y fibras que una vez mineralizadas otorgan al hueso gran resistencia en relación con su peso y simultáneamente cierta elasticidad; c) regulan la mineralización de esa matriz, un proceso en el que son esenciales la fosfatasa alcalina y otras proteínas también producidas por ellos; d) controlan la reparación y recuperación de la morfología y arquitectura del hueso cuando se produce una fractura; e) median los efectos que las hormonas y los factores estimuladores de la reabsorción ósea poseen sobre los osteoclastos, y f) controlan, a través de un preciso sistema de mediadores, la reabsorción ósea que efectúan los osteoclastos (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Osteoblastos y osteoclastos se asocian de manera estrecha en tiempo y espacio, comunicándose por dos vías fundamentales. En primer lugar, por contacto directo, al permitir la interacción de ligandos y receptores presentes en las respectivas membranas, lo cual facilita la formación de conexiones comunicantes que permiten el paso de pequeñas moléculas, como iones y metabolitos solubles en agua, entre ambas células; esta comunicación directa es de particular importancia, ya que el esqueleto debe detectar gran variedad de señales generadas de manera local y sistémica, por ejemplo, cargas físicas, que han de ser transformadas en señales biológicas y transmitidas a las células en los puntos donde sea necesario el remodelado del hueso. Y, en segundo lugar, la comunicación puede realizarse a través de factores paracrinos difusibles, como factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas segregadas por una u otra célula (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Preosteoblastos y osteoblastos expresan en su superficie L-RANK, cuyo receptor RANK en la membrana de preosteoclastos y osteoclastos está próximo al receptor del TNF- α , un activador del factor de transcripción nuclear NF κ B. La señal del RANK activa una cascada de factores de transcripción como el NF κ B, AP-1/c-Fos y NFATc1 (*factor nuclear c1 de células T activadas*) que favorecen la maduración de preosteoclastos y la acción de los osteoclastos maduros. (Los ratones que carecen del L-RANK tampoco tienen osteoclastos y basta inyectarles una forma soluble del mismo para inducir en ellos la formación de osteoclastos y reabsorción ósea) (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Los osteoblastos, en un aparente efecto contradictorio con lo anterior, también expresan y liberan *osteoprotegerina*, proteína soluble que actúa en combinación con el L-RANK (presente en su propia membrana o circulante en plasma), bloqueándolo e inhibiendo así la vía del RANK y la reabsorción ósea por los osteoclastos (figura 2.9). En suma, los osteoblastos forman hueso y pueden estimular o inhibir su reabsorción (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).



(Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Figura 2.9 Comunicación entre osteoblasto y osteoclasto.

2.3.3 Matriz orgánica

La matriz orgánica del hueso, sustancia osteoide o, sencillamente, osteoide. Producida por los osteoblastos, compuesta por colágeno tipo 1 y otras proteínas no fibrilares, representa 35% del peso del hueso (tabla 2.2). Esta matriz hoy se considera un sistema dinámico que: a) cobija factores de crecimiento en su seno; b) transmite señales a las células óseas que afectan su diferenciación, proliferación, adhesión y desplazamiento, y c) actúa como un regulador de su propia mineralización (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

| | |
|---|---|
| 1. Colágeno tipo I (90%) | |
| 2. Proteínas no colágenas (10%) - Glucoproteínas: | Fosfatasa alcalina ósea Glucoproteínas con secuencia RGD (osteonectina, fibronectina, trombospondina y vitronectina) |
| 3. Proteoglicanos | |
| 4. Proteínas con ácido γ -carboxiglutámico (osteocalcina y "proteína del osteoide con ácido γ -carboxiglutámico") | |
| 5. Sialoproteínas óseas (osteopontina y "sialoproteína ósea") | |

(Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Tabla 2.2 Proteínas de la matriz osteoide

2.3.4 Colágeno óseo

Un 90% de las proteínas de la matriz osteoide corresponde a colágeno tipo I, uno de los catorce tipos de colágeno presentes en el organismo humano. Como todos ellos, el tipo I es una proteína fibrilar no soluble, cuya estructura primaria posee una secuencia del triplete de aminoácidos Gli-X-Y repetida, en la que Y y X son prolina, hidroxiprolina o hidroxilisina. Debe destacarse que esta proteína es una de las pocas que en la naturaleza contiene esos dos últimos aminoácidos. Además, en su molécula se encuentra la *secuencia RGD* (Arg-Gli-Asp), reconocida de forma específica por las integrinas de las células óseas y una de las vías por las que estas células se adhieren y actúan sobre la matriz extracelular (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

La molécula de colágeno I se compone de tres cadenas polipeptídicas (dos cadenas α_1 y una α_2) de unos 1000 aminoácidos cada una, enrolladas en una hélice de tres hebras de unos 300nm de longitud y 1.5 nm de diámetro. Las tres cadenas están estabilizadas por puentes de hidrógeno entre enlaces peptídicos en cadenas adyacentes (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Las moléculas de colágeno se disponen en forma escalonada, de manera que el extremo –NH, de una cadena se solapa con el extremo –COOH de la siguiente. Con el acoplamiento término-terminal y latero-lateral, y el *empaquetado* de múltiples unidades, se forman fibrillas que agrupadas en haces constituyen las fibras de colágeno de la matriz orgánica del hueso. Las fibrillas se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre cadenas y la formación de *puentes de piridinolina (o piridinio)* por acción de la lisil-oxidasa. (Ésta forma aldehídos de lisina e hidroxilisina en los extremos de las cadenas α y tales aldehídos, al reaccionar con hidroxilisinas de cadenas vecinas, forman enlaces intermoleculares de los puentes de piridinolina) (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

2.3.5 Proteínas no colágenas de la matriz osteoide

Si el colágeno I es la proteína estructural fundamental de la matriz orgánica del hueso, las proteínas no colágenas, no fibrilares, además de contribuir a tal estructura, son clave en su fisiología (tabla 2.3). Entre ellas destacan las que siguen.

1. En la mineralización:
 - Favorecen o inhiben el depósito de mineral en la propia matriz osteoide.
 - Favorecen o inhiben la maduración y el crecimiento del mineral.
 - Acción enzimática.

2. En la reabsorción:
 - Regulan la actividad de osteoblastos y osteoclastos.
 - Acción quimiotáctica.
 - Reconocimiento por integrinas.
3. En la estructura de la matriz osteoide:
 - Favorecen el anclaje de las células óseas en la matriz osteoide.
 - Contribuyen a la estructura de la propia matriz.
4. Otras:
 - Influyen en el transporte de iones, hormonas y metabolitos.
 - Estimulan o inhiben la actividad de enzimas.

(Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Tabla 2.3 Función fisiológica de las proteínas no colágenas de la matriz osteoide

Glucoproteínas

- a) **Fosfatasa alcalina.** También producida por los osteoblastos, es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos con un pH óptimo de 8.6. Merced a ello, por un lado incrementa la concentración de iones fosfato necesarios para la mineralización de la matriz orgánica; y, por otro, bloquea la acción inhibitoria que los ésteres fosfóricos poseen sobre la mineralización, lo cual la convierte en un elemento esencial para ese proceso.
- b) **Glucoproteínas que incluyen la secuencia RGD.** *Osteonectina, fibronectina, trombospondina y vitronectina* son sintetizadas por los osteoblastos y contienen repetida la secuencia Arg-Gli-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas de osteoblastos y osteoclastos. Constituye un sistema de reconocimiento que permite que las células óseas se adhieran a la matriz osteoide y su migración sobre ella, base de los procesos de mineralización, remodelado y reparación del hueso.
- c) **Proteoglucanos.** Constituidas por un núcleo proteico en el que se engarzan glucosaminoglucanos son macromoléculas sintetizadas y liberadas por los osteoblastos. Entre ellas destacan el *condroitín sulfato*, el proteoglucano de mayor tamaño, presente sobre todo en las áreas de formación de hueso, donde sirve para

reservar espacio para el hueso maduro, y el hialuronano, que interviene en la morfogénesis ósea.

- d) **Proteínas con ácido γ -carboxiglutámico.** El ácido γ -carboxiglutámico es un aminoácido modificado que se forma por carboxilación del glutamato por la γ -glutamil carboxilasa, cuya coenzima es la vitamina K. este ácido se combina con dos iones Ca^{2+} entre sus dos grupos carbonilo ($>\text{C}=\text{O}$) y se halla presente en la osteocalcina y la *proteína de la matriz osteoide con ácido γ -carboxiglutámico*. La osteocalcina, sintetizada por los osteoblastos, es necesaria para el aporte de Ca^{2+} en la mineralización del osteoide, y su concentración en plasma se considera un marcador de la formación de hueso. A su vez, la “proteína de la matriz osteoide con ácido γ -carboxiglutámico” es sintetizada por osteoblastos y condrocitos, y su función fisiológica es similar a la de la osteocalcina. El déficit de vitamina K reduce la síntesis de estas proteínas así como la formación y mineralización de matriz osteoide.
- e) **Sialoproteínas.** Las dos principales proteínas de la matriz osteoide con ácido siálico en su estructura son *osteopontina* y *sialoproteína ósea*, y ambas contienen la secuencia RGD. La osteopontina es producida por osteoblastos y sus precursores, osteocitos, osteoclastos, condrocitos y fibroblastos. El que su síntesis por los osteoblastos aumente justo después de una fractura, sugiere que está involucrada en el pronto reclutamiento de células óseas para repararla. A su vez, la “sialoproteína ósea” es producida sólo por osteoblastos y osteocitos, y actúa como inductora de la diferenciación de los precursores de osteoblastos, la proliferación de éstos y la formación de núcleos de mineralización.
- f) **Metaloproteasas de la matriz osteoide.** Estas enzimas proteolíticas, con n metal (habitualmente zinc) en su punto activo y conocidas por el acrónimo MMP, digieren la matriz orgánica del hueso. La *colagenasa*, o MMP-1, producida por los osteoblastos, predigiere el colágeno tipo I y está involucrada tanto en el inicio de la reabsorción ósea como en la reparación de las fracturas. A su vez, las *gelatinasas* son producidas por los osteoclastos e intervienen en la reabsorción ósea. Esto permite la liberación de factores de crecimiento embebidos en el osteoide y su acción sobre las células óseas. Por último, la *catepsina K*, producida por los osteoclastos, es la proteasa con mayor capacidad de fragmentación del colágeno y los proteoglucanos óseos, lo cual la convierte en la proteína clave de la reabsorción del hueso (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

2.3.6 Mineral óseo.

El componente mineral representa unas dos terceras partes del peso del hueso, cuya molécula principal es la Hap, la cual se denomina así por su similitud con la apatita, un fluoruro-fosfato de Ca que se halla en la Naturaleza cristalizado en el sistema hexagonal. El cristal de hidroxiapatita (Hap) $[(Ca_{10}(PO_4)_6OH_2)]$ se caracteriza por su pequeño tamaño (200-400 nm de longitud, 20-40 nm de anchura y 10-20 nm de grosor) y su gran asimetría física y electrostática. Tal tamaño y asimetría, por un lado, le confieren una gran superficie por unidad de peso y, por otro, una disposición que favorece el depósito de agua e iones en su superficie. Además de Ca^{2+} , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} , F^- , Na^+ y K^+ , en el cristal de Hap se adsorben iones hidroxilo, carbonato y citrato, junto con cationes menos abundantes como Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} . Del mismo modo, durante la formación de ese cristal algunos iones pueden ser sustituidos por otros de radio iónico parecido, lo cual produce cambios en su morfología que no incluyen sobre la estructura global del mineral óseo (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

2.3.7 Fluido óseo.

El tejido óseo posee un espacio vascular propio constituido por capilares y sinusoides que, junto con el espacio extravascular existente entre los vasos sanguíneos y los osteocitos limitantes, forma el espacio ocupado por el fluido extracelular sistémico del hueso. Además, en él se halla el *fluido óseo*, que impregna el mineral y las fibrillas de colágeno y baña las lagunas ocupadas por los osteocitos y la red de conductos calcóforos que las comunica. Esta subdivisión del líquido extracelular, específica del hueso, en el que las concentraciones de Ca^{2+} , $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ y Mg^{2+} son significativamente menores que en el plasma, se comporta como una membrana funcional la cual controla el paso de iones desde y hacia ese tejido (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Sólo se conoce en parte cómo está conectado el fluido óseo con el sistémico extracelular y por qué vía el Ca^{2+} es vertido desde él al plasma en contra de su gradiente de concentración. Así se ha apuntado que: 1) los osteocitos limitantes poseerían un sistema de transporte activo de K^+ hacia el fluido óseo, generando un gradiente electroquímico que facilitarían la salida de Ca^{2+} hacia el fluido extracelular sistémico; 2) la ATPasa de Ca^{2+} presente en el plasmalema de los osteocitos limitantes lo expulsaría a su través, y 3) esas células aportarían protones al fluido óseo, de forma que su acidificación facilitarían la solubilidad del Ca de la superficie ósea y, a través de las conexiones entre osteocitos, su salida al fluido extracelular sistémico.

Recordemos que la capa de osteocitos limitantes que recubre las superficies óseas representa una gran proporción de todas las células óseas. A partir de estudios con ^{45}Ca se ha observado que tales células captan iones Ca^{2+} aún en reposo, por lo que, para

conservar el equilibrio de este elemento, deben *dejar salir* una cantidad similar a la que captan. Precisamente, la regulación continua de la calcemia se produce mediante este paso de Ca^{2+} a través de los osteocitos limitantes en reposo, y representa de 2000 a 4000 mg (50-100 mmol) de Ca al día. Frente a esa cantidad (fruto de la solubilización del mineral por los osteocitos y su vertido al líquido extracelular sistémico) el proceso de remodelado óseo mediado por hormonas sólo *extraería* del hueso unos 200-400 mg diarios de Ca (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Por otra parte, este fluido es esencial para la percepción y adaptación del hueso a las cargas que soporta. Éstas generan tensiones pulsátiles en el fluido óseo que se transmiten a los osteocitos, células que por su distribución e interconexión son óptimas para percibir su intensidad y orquestar la respuesta global más adecuada. Así, se ha comprobado de forma experimental que la delección selectiva de los osteocitos (y con ello la pérdida de las proteínas que producen con acción de mensajeros para osteoblastos y osteoclastos) conlleva la pérdida de respuesta del hueso a las cargas.

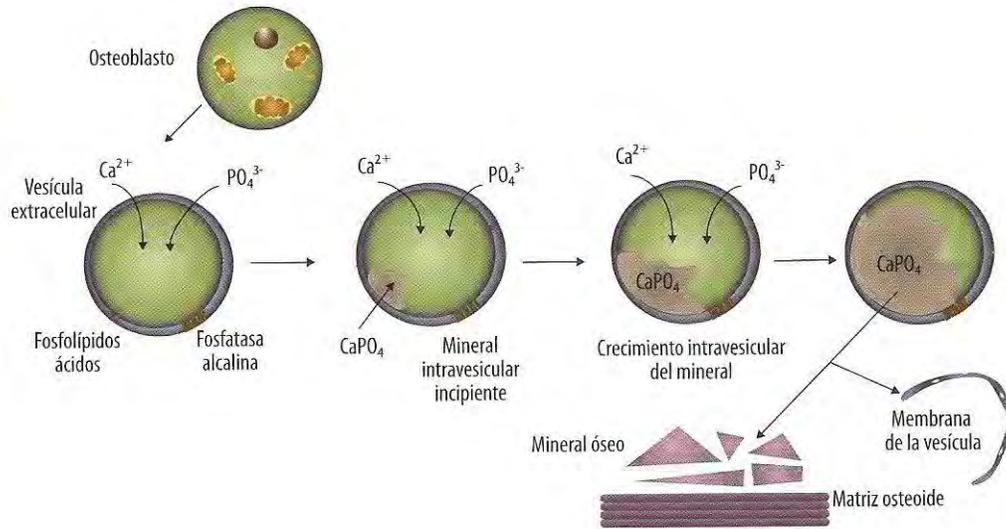
En ese mecanismo de transmisión de señales, la vía de las proteínas Wnt ocupa un lugar destacado. Merced a ciertos cofactores, estas glucoproteínas se combinan con receptores en la membrana de osteocitos, osteoblastos y osteoclastos, con lo cual incrementan la concentración de β -catenina en su citoplasma. Ésta es traslocada al núcleo, donde interactúan con factores de transcripción que regulan la expresión de genes codificadores de proteínas inductoras de la diferenciación, proliferación, actividad y apoptosis de esas células (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

2.3.8 Mineralización de la matriz osteoide

La mineralización de la matriz osteoide está dirigida por los osteoblastos mediante: a) el control de la concentración local de iones, y b) la regulación de la concentración local de proteínas y factores favorecedores o inhibidores de la mineralización (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Este proceso es similar en todos los tipos de hueso y se inicia con la formación de *vesículas de osteoide* por los osteoblastos. Estas vesículas tienen un diámetro de 100 a 200 nm, se agrupan en racimos y poseen una fina membrana rica en fosfatasa alcalina y fosfolípidos ácidos con afinidad por el Ca^{2+} . Precisamente, el primer mineral aparece en el seno de esas vesículas en contacto con la cara interna de su membrana. Su fosfatasa alcalina, al hidrolizar esteres fosfóricos libera grupos ortofosfato (PO_4^{3-}) necesarios para la formación del naciente mineral de fosfato cálcico (CaPO_4) (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Una vez formado ese mineral incipiente, sus cristales van acumulándose en las vesículas extracelulares y, al crecer, acaban por romper su membrana y salir al espacio extracelular (figura 2.10). Esos cristales se depositan entre las fibrillas de colágeno del osteoide y, ante concentraciones adecuadas de Ca y fósforo así como un pH apropiado en el fluido que impregna tales fibrillas, los cristales sirven de base para el depósito de nuevo mineral. Nace así un fosfato cálcico amorfo que, tras pasos intermedios, da lugar al cristal maduro de Hap (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).



(Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Figura 2.10 Representación esquemática del comienzo de la mineralización en el seno de vesículas extracelulares.

Esta fase de proliferación del mineral está dirigida por las concentraciones de Ca y fósforo, por proteínas no colágenas presentes en las vesículas de osteoide (osteocalcina, osteopontina, sialoproteínas) y por las propias características de la matriz osteoide. Por el contrario, el proteoglicano de elevado peso molecular inhibe la maduración de los fosfatos de Ca amorfos y su agregación y depósito en la matriz. El gran tamaño de esa molécula facilita espacios o volúmenes excluidos sobre el osteoide, dificultando físicamente el depósito de cristales de mineral. Asimismo, las moléculas de pirofosfato y de ATP, mediante sus enlaces P-O-P poseen la propiedad de unirse de manera enérgica a la superficie de los cristales de fosfato cálcico, dificultando la formación y proliferación de los cristales de Hap (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

En suma, en la mineralización de la matriz orgánica del hueso intervienen elementos estructurales y funcionales que, merced a su acción fisicoquímica positiva o negativa,

regulan la formación y el depósito de Hap. De la coordinación y equilibrio entre ellos dependerá la cantidad y calidad del tejido óseo (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

2.3.9 Osificación y desarrollo óseo.

La osificación puede ser de dos tipos: a) primaria, en la que el tejido conjuntivo embrionario es transformado directamente en hueso, como sucede, por ejemplo, en la bóveda craneal y en el tercio medio de la clavícula, y b) secundaria, en la que el hueso se forma a partir de una base cartilaginosa. En este caso (huesos de las extremidades, costillas, columna vertebral, etc.) durante el primer mes tras la concepción empiezan a condensarse células del blastema, así se forman condensaciones o nódulos cartilaginosos que, como un modelo reducido, son el primordio del futuro esqueleto. La forma y disposición de ese primordio determinará la forma y disposición que adoptarán los huesos.

El primer paso en la condrogénesis es el reclutamiento de células mesenquimales condroprogenitoras seguido del agrupamiento y diferenciación de células mesenquimales hacia células de la línea condrogénica. Los condrocitos diferenciados expresan, en un primer tiempo, moléculas específicas de la matriz extracelular como colágeno tipo IIb y agregano. En seguida, aumentan de tamaño y expresan colágeno tipo X, fosfatasa alcalina, osteopontina, metaloproteinasa 13, factor de transcripción Runx2 y *factor de crecimiento del endotelio vascular* (VEGF). Este último induce la atracción de vasos sanguíneos y de factores (IGF-1, Wnt, FGF, Runx2 y BMP) necesarios para sustituir cartílago por hueso a medida que los condrocitos sufren apoptosis y son reemplazados por osteoblastos y osteoclastos. No significa que el cartílago se transforme en hueso, sino que a partir de núcleos de osificación es sustituido de manera progresiva por hueso (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Los experimentos realizados en embriones de pollo y en ratones transgénicos, en los que se activan o bloquean etapas concretas de las vías de transmisión de señales, han permitido saber que los componentes de las vías Sox y Wnt son esenciales en la condrogénesis y desarrollo del cartílago (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Los únicos restos de tejido cartilaginoso que se conservan en el esqueleto adulto se hallan en las superficies articulares, si bien en el tejido conjuntivo del periostio se conservan células progenitoras capaces de diferenciarse a condroblastos y que, por ejemplo, en caso de fractura, sintetizan matriz cartilaginosa como una etapa previa a la formación de hueso.

El desarrollo del cartílago y su sustitución por tejido óseo, así como el ulterior desarrollo del hueso, están sometidos a la influencia de factores vasculares, nerviosos, mecánicos, hormonales y locales (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

La vascularización es básica para el desarrollo fisiológico del tejido óseo al aportar células sanguíneas, oxígeno, minerales, principios inmediatos, iones, hormonas sistémicas y factores de crecimiento. Todos los estudios sobre osteogénesis corroboran la formación simultánea y la estrecha proximidad de vasos sanguíneos en las áreas donde se está formando hueso.

Del mismo modo, adyacentes al periostio, a la lámina de crecimiento epifisario y en puntos de alta actividad osteogénica, se hallan fibras nerviosas sensoriales del mismo modo que hay fibras nerviosas simpáticas en el propio hueso y médula ósea, y axones amielínicos en la médula yuxtapuestos a las trabéculas. Tales fibras, mediante la liberación de neurotransmisores, intervienen en el desarrollo esquelético (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Por su proximidad al hueso, los músculos son las estructuras extrínsecas con mayor influencia en su formación, estructura y remodelado. La propia actividad muscular del embrión y la transmisión de la actividad física de la madre, proporcionan un conjunto de fuerzas que afectan la formación de primordio cartilaginosa y, por ello, del hueso. Antes y después del nacimiento es preciso que tanto los cartílagos de crecimiento como los articulares estén sometidos a una cierta presión intermitente para la correcta fisiología de sus células. De tal manera, la anulación de esa presión intermitente conlleva la osificación precoz del cartílago de crecimiento y la degeneración y osificación del cartílago articular. Por el contrario, la aplicación prolongada de presiones continuas o excesivas, causa la degeneración y osificación precoz del cartílago de crecimiento y el adelgazamiento del cartílago articular (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

A su vez, las alteraciones en la intensidad o distribución de las presiones musculares o gravitacionales que se aplican a los cartílagos pueden modificar la forma y el tamaño finales de los huesos, al haberse comprobado que la orientación y mayor grosor de las trabéculas sigue la dirección de las máximas fuerzas de compresión a que son sometidos (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Cuando un hueso se enfrenta a cargas sostenidas superiores a las que soporta de forma habitual, la tensión generada de manera local conduce a una mayor formación de tejido. Esto se explica porque a medida que la carga tiende a deformarlo se generan cambios pulsátiles en el fluido óseo, estímulos que se transmiten a los osteocitos y a los que éstos responden liberando señales reguladoras que activan factores de transcripción en

osteoblastos y osteoclastos que se traducen en el remodelado. Por el contrario, la inmovilización prolongada o las situaciones de microgravedad, como en los vuelos espaciales, inhiben la actividad de los osteoblastos, con la consiguiente menor formación de matriz osteoide, retraso en la mineralización y una desmedida reabsorción ósea traducida en adelgazamiento y fragilidad de las trabéculas (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

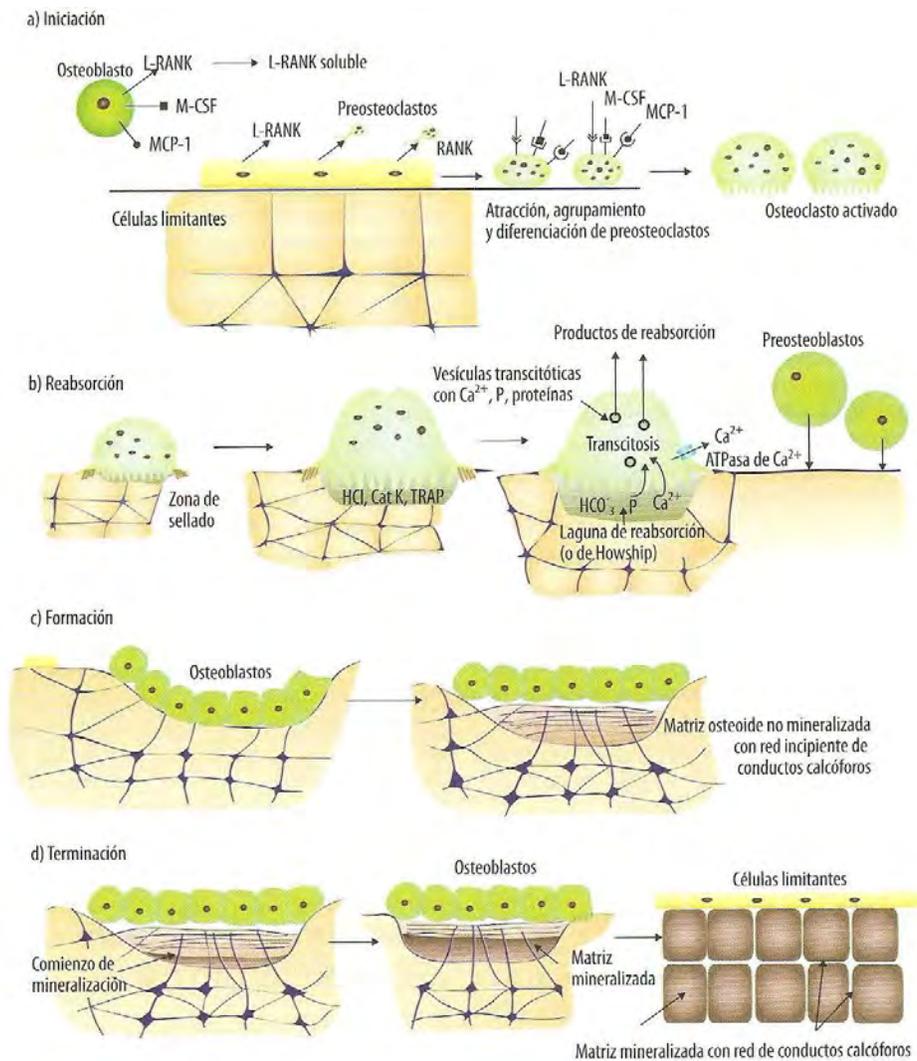
2.3.10 Remodelado óseo

El tejido óseo experimenta a lo largo de la vida un proceso continuo de remodelado; un proceso ordenado y secuencial de reabsorción y formación en respuesta a estímulos tan variados como la necesidad de generar hueso tras microfracturas, la disminución o anulación de cargas mecánicas sobre el esqueleto, alteraciones hormonales o hipocalcemia. Así, en un adulto se renueva cada año alrededor de 3% del hueso cortical y 25% del trabecular (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Es preciso considerar que unas tres cuartas partes del esqueleto adulto corresponden a hueso cortical y un cuarto a trabecular, pero que en éste la proporción entre superficie y volumen es muy superior. Y, como el remodelado óseo es un proceso ligado a la superficie, la actividad metabólica del hueso trabecular es casi 10 veces mayor que la del cortical (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

En esencia, la reabsorción efectuada por los osteoclastos es seguida de la formación equivalente de hueso por parte de los osteoblastos, de manera que los espacios reabsorbidos son rellenados y devueltos a su nivel original por estas células (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Este proceso se basa en la denominada “unidad básica multicelular” (células limitantes, preosteoclastos/osteoclastos y preosteoblastos/osteoblastos) y se compone de cuatro fases: iniciación, reabsorción, formación y finalización. Las dos primeras se basan en la comunicación entre células de estirpe osteoblástica y las precursoras de osteoclastos; y las dos últimas, en la transmisión de señales entre osteoclastos y las células precursoras de osteoblastos (figura 2.11) (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).



(Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Figura 2.11 Etapas de remodelado óseo.

a) **Iniciación:** Esta fase comienza con la atracción y agrupamiento de células precursoras de osteoclastos en puntos concretos del hueso, seguida de su diferenciación en osteoclastos y la activación de éstos. La comunicación entre células se produce entre las “unidades básicas multicelulares”, puntos de remodelado originados en forma asincrónica en distintas áreas del esqueleto, y que dependen de la interacción entre células de la familia del osteoblasto y preosteoclastos. De esta manera, las células limitantes producen L-RANK, estimulador del RANK en preosteoclastos. Por su parte, los osteoblastos, además de L-RANK, expresan M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos), necesario para la supervivencia de las células de la línea macrófago-osteoclasto, y

la *proteína 1 quimiotáctica de monocitos* (MCP-1), con acción reclutadora de preosteoclastos. Éstos, a su vez, expresan receptores para MCP-1 en presencia de L-RANK.

La interacción entre el L-RANK de las células limitantes y osteoblastos y el RANK de los preosteoclastos, activa en éstos una cascada de factores de transcripción, entre ellos el NF κ B, esenciales para la osteoclastogénesis. Además, se ha observado que varios factores circulantes como la parathormona (PTH), y el péptido relacionado con la PTH (PTHrP), las hormonas tiroideas, la 1,25(OH) $_2$ -vitamina D, el TNF- α , la IL-1 y la PG-E2, activan esa vía de formación y activación de osteoclastos (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

b) **Fase de reabsorción:** Justo antes de que los osteoclastos inicien la reabsorción ósea, los osteoblastos y las células limitantes “preparan el terreno” mediante colagenasa, que predigiere el colágeno óseo. A continuación, los osteoclastos activados expresan integrinas y filamentos de actina en los márgenes del borde en cepillo que permiten la formación del denominado “anillo de actina”, barrera limitadora de la “zona sellada”, por dentro de la cual se forma el borde en cepillo y en seguida se produce la reabsorción. Esta zona se origina debido a moléculas de integrina $\alpha\beta 3$ enlazadas con el citoesqueleto que permiten la adhesión de los osteoclastos a la superficie ósea mediante su unión con receptores con la secuencia de aminoácidos RGD presente en proteínas como osteonectina, fibronectina, vitronectina y osteopontina de la matriz (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Las propias características del osteoide influyen en la actividad de los osteoclastos, de hecho, se ha observado *in vitro* que la reabsorción es muy superior en hueso viejo en comparación con hueso nuevo.

Los osteoclastos expresan anhidrasa carbónica II, mediante la que sintetizan H $_2$ CO $_3$ que se disocia en HCO $_3^-$ y H $^+$. Una ATPasa-H $^+$ presente en su borde en cepillo y un intercambiador HCO $_3^-$ /Cl $^-$ en su cara basolateral, permiten el vertido de HCl a través del borde en cepillo sobre la superficie a reabsorber. Esa bomba de protones es requisito absoluto para la reabsorción. De esta manera se acidifica el espacio extracelular y la Hap es hidrolizada. Por su parte, la fosfatasa ácida resistente a tartrato actúa sobre otros sustratos como osteopontina, osteonectina y sialoproteína ósea.

La disolución del mineral es el factor limitante en la reabsorción, ya que el colágeno sólo puede ser degradado una vez que se ha producido la disolución del mineral. La lisis del colágeno y otras proteínas del osteoide por la catepsina K, enzima proteolítica esencial en este proceso y también producida por el osteoclasto, se completa con el transporte y

eliminación de las moléculas reabsorbidas mediante transcitosis (figura 2.11) (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Esta etapa de la reabsorción posee morfología diferente según el tipo de hueso. Así, en las láminas del hueso trabecular se forman cubetas de unos 30µm de profundidad, denominadas “lagunas de reabsorción” o de Howship; mientras que en el cortical, los osteoclastos horadan túneles cilíndricos de hasta 2.5mm de longitud y unos 150 µm de diámetro (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Esta fase finaliza con la atracción de células precursoras de osteoblastos por parte de los osteoclastos antes de que éstos sufran apoptosis (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

- c) **Fase de formación:** Se ha observado que los últimos restos del osteoide son reabsorbidos por células mononucleares antes de que los osteoblastos empiecen a formar nueva matriz en el fondo de la laguna de Howship, un proceso que finalizará con el rellenado del área reabsorbida.

Finalizada la reabsorción se produce una breve transición (unos cuatro días en el hueso cortical y nueve en el trabecular) en la que los osteoclastos estimulan la diferenciación de las células precursoras de osteoblastos. Esa estimulación se produce a través del contacto entre células, debido a factores secretados por los osteoclastos (como la vía e las proteínas Wnt) o mediante factores liberados de la matriz al ser reabsorbida (TGF-β, BMP e IGF-I). A continuación, en la superficie del hueso trabecular los osteoclastos son recubiertos por una capa de células del estroma y células limitantes que expresan marcadores osteoblásticos (colágeno I, fosfatasa alcalina, osteoprotegerina, osteocalcina y L-RANK). Se forma así un *espacio de remodelado óseo* que asegura la interacción entre osteoclastos y osteoblastos (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

- d) **Terminación:** Si la etapa de reabsorción dura unas tres semanas, la etapa de formación es más lenta al transcurrir unos tres meses hasta que el área reabsorbida termina de rellenarse con nuevo osteoide. En ese momento los osteocitos producen esclerostina, proteína que inhibe la reabsorción ósea por los osteoclastos, y los osteoblastos liberan osteoprotegerina, supresora de la diferenciación de las células precursoras en osteoclastos (figura 2.11).

Tenga en mente que la fosfatasa alcalina y la osteocalcina producidas por los osteoblastos son esenciales para la formación, depósito y crecimiento de los cristales de Hap entre las fibras de colágeno. Este proceso comienza de abajo arriba unos 30 días después de iniciado el depósito de osteoide y finaliza con la completa sustitución del tejido reabsorbido por una cantidad semejante del hueso nuevo. El que la cantidad, calidad y

morfología del nuevo tejido sea similar al reabsorbido se debe a las BMP producidas por los osteoblastos.

En condiciones fisiológicas el remodelado se produce precisamente en áreas donde es necesario por microrroturas o envejecimiento, y no de una manera aleatoria (que sería incompatible con el desarrollo, la adecuada resistencia y la reconstrucción armónica del hueso). Del mismo modo, en esas condiciones la reabsorción y la formación se coordinan y detienen en puntos determinados de profundidad o longitud; las células que detectan con precisión esas alteraciones son los osteocitos inmersos en el tejido mineralizado y los limitantes en la superficie trabecular.

Este proceso ocurre a lo largo de toda la vida. El desarrollo mayor y el crecimiento más rápido del esqueleto acontecen en la primera infancia y al final de la adolescencia, con un balance positivo entre reabsorción y formación hasta la tercera década. De tal forma, tanto el volumen global del esqueleto como el grosor de las trabéculas aumentan paulatinamente hasta alcanzar un máximo hacia los 30 años (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

2.3.11 Factores que regulan el remodelado óseo

El capital de hueso que se posee en cada momento es el resultado del balance entre su reabsorción y su formación. Un balance que está regulado por factores genéticos, alimentarios, mecánicos, hormonales y locales. En condiciones fisiológicas, la interrelación de esos factores hace que la masa ósea máxima se mantenga con pequeñas variaciones entre los 30 y los 50 años aproximadamente, edad a partir de la cual, con mayor o menor rapidez, empieza a declinar.

Factores genéticos.

Los individuos de raza negra poseen desde la infancia una masa y densidad (masa/volumen) ósea superior a los de la raza blanca, y en éstos, a su vez, aquéllas son mayores que, por ejemplo, en individuos de origen japonés. Del mismo modo, la densidad del hueso de las madres se correlaciona de manera significativa con la de sus hijas, y entre gemelos homocigóticos ese parámetro guarda mejor correlación que entre dicigóticos. Ello obedece a ciertos genes, como los que codifican el *receptor de estrógenos tipo I* (ERS-1), el *receptor de vitamina D* (RVD), la *osteoproteína morfogenética 2* (BMP-2), la *osteoprotegerina* (OPG) o los genes de la familia de *proteínas Wnt* (y sus cofactores, las *proteínas 4 y 6 receptoras de LDL*). Los polimorfismos en determinados nucleótidos de esos genes se traducen en mayor o menos densidad del hueso.

Factores alimentarios.

Para el desarrollo correcto del esqueleto es necesaria una dieta completa y equilibrada. Junto con el adecuado aporte cuantitativo y cualitativo de principios inmediatos, el Ca es el *nutriente umbral*, de forma que una cantidad inferior a las necesidades mínimas diarias limitará su depósito en el hueso. En condiciones fisiológicas, esa cantidad varía con la edad: hasta los 25 años es de unos 1200 mg/día aproximadamente, no inferior al gramo diario hasta los 50 años, y unos 1500 mg/día a partir de entonces.

Factores mecánicos.

La actividad física desempeña una función primordial en la formación, desarrollo y remodelado del hueso. La actividad muscular, con las variaciones en las cargas de presión y torsión derivadas del movimiento, transmite al hueso una tensión que produce cambios en su estructura e incluso en sus dimensiones. Esas variaciones son detectadas directamente por las células superficiales de las trabéculas y los osteocitos inmersos en sus lagunas e interconectados por sus prolongaciones dendríticas bañados por el fluido óseo en la red de conductos calcóforos. Los osteocitos son auténticas células mecanosensibles, o mecanotransductoras, especializadas, y ante las cargas aplicadas responden transmitiendo señales a células del estroma, precursoras de osteoblastos, osteoblastos y osteoclastos, que se traducen en reabsorción y formación de hueso. Por el contrario, las situaciones de desuso (como la inmovilidad o microgravedad) reducen su actividad metabólica e, incluso, conducen a la muerte de los osteocitos, lo que se convierte en un estímulo para la reabsorción ósea (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

2.3.12 Hormonas, citoquinas y factores de crecimiento en el remodelado óseo.

- a) **Hormonas.** El desarrollo fisiológico del tejido óseo precisa la normalidad del sistema endócrino. Hipotálamo, hipófisis, tiroides, paratiroides, páncreas, suprarrenales y gónadas intervienen, directa o indirectamente, en el remodelado óseo.

El hipotálamo, además de regular la producción de hormonas hipofisiarias, está involucrado en la fisiología ósea a través de los receptores para leptina en las neuronas de su núcleo ventromedial. Esta hormona producida por los adipocitos, junto con su papel inhibitor del apetito merced a esos receptores hipotalámicos, inhibe la formación ósea en un efecto mediado por el sistema nervioso simpático y los receptores adrenérgicos β_2 presentes en osteoblastos; es decir, además de ser una hormona anorexígena, poseería una acción antiosteogénica. En esta línea se ha observado cómo la inyección de leptina en

los ventrículos laterales de un ratón ocasiona una reducción en su masa ósea, y que la neutralización de la leptina circulante mediante un receptor circulante en plasma, produce el efecto contrario.

Las **hormonas tiroideas** son esenciales para la formación del esqueleto. Así, la expresión de los receptores de tiroxina está finamente regulada durante su desarrollo. El déficit de hormona tiroidea causa cretinismo que, además de conllevar alteraciones neurológicas, se caracteriza por baja estatura. La tiroxina desempeña un importante papel en el metabolismo del hueso: en un ratón se ha observado cómo el bloqueo de su receptor impide la osificación y que en humanos tanto el híper como el hipotiroidismo causan una menor densidad ósea. La tiroxina estimula la producción de L-RANK e IL-6 por parte de los osteoblastos y con ello la osteoclastogénesis. Así mismo, facilita la expresión del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGF-1) tanto en osteoblastos como en osteoclastos, lo cual estimula la proliferación de ambos tipos celulares.

La **parathormona** (PTH) no sólo estimula la absorción de Ca en el túbulo distal y la síntesis renal de calcitriol, facilitando la absorción intestinal de Ca y fósforo. A través de receptores en osteoblastos, también estimula su producción de L-RANK e IL-6, vía por la cual facilita la maduración de preosteoclastos y la activación de los osteoclastos maduros. Por tal motivo el exceso mantenido de PTH se acompaña de una excesiva reabsorción y una menor masa ósea.

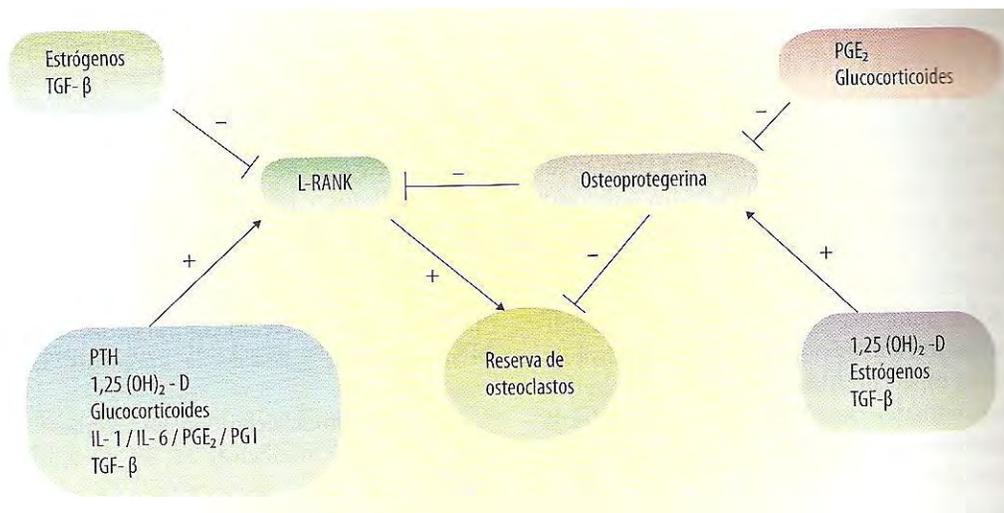
Es curioso que cuando la PTH se administra en forma de “pulsos” induce el efecto contrario: facilita la maduración de preosteoblastos y retrasa la apoptosis de los osteoblastos maduros.

La **calcitonina**, debido a sus receptores en la membrana del osteoclasto, inhibe su acción de reabsorción ósea. Sin embargo, este efecto es transitorio y, su trascendencia fisiológica es cuestionada.

La secreción de la **hormona del crecimiento** (**somatotropina**, GH, del inglés *growth hormone*) se produce a lo largo de toda la vida, pero es mayor en la infancia y alcanza su pico en la pubertad. Hormona anabolizante por excelencia, induce el crecimiento de numerosos tejidos, incluidos músculo, hígado y riñón; su efecto más apreciable es la estimulación del crecimiento del cartílago y hueso. Así, la GH estimula la diferenciación y proliferación de los condrocitos del cartílago epifisario, una acción que es sinérgica con los esteroides gonadales. En el niño, el déficit de GH depara baja estatura y el exceso, gigantismo. En el adulto, su déficit causa menor masa ósea y el exceso, acromegalia.

La GH estimula de manera directa la diferenciación y proliferación de preosteoblastos al activar su producción de colágeno y fosfatasa alcalina. No obstante, muchos de sus efectos están mediados por IGF-1, como se ha observado en experimentos *in vitro* al desaparecer la acción anabolizante de la GH si el IGF-1 es inmunoprecipitado con su antisuero.

Los **estrógenos**, a través de receptores en hueso diferentes de los presentes en mama y aparato genital, poseen un efecto anabolizante óseo directo, al activar la acción de los osteoblastos, e indirecto. De este modo, inhiben la producción por los osteoblastos de IL-6, citoquina estimuladora de la osteoclastogénesis y la actividad de los osteoclastos. Del mismo modo, inhiben la producción de TNF- α (estimulador de la producción de IL-1 e IL-6 y activador de los osteoclastos) por las células T activadas. Por último, los estrógenos inducen la apoptosis de osteoclastos (figura 2.12) (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).



(Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Figura 2.12 Hormonas, citoquinas y remodelado óseo

La **progesterona** tiene un efecto anabolizante directo sobre el hueso a través de receptores en osteoblastos, un efecto compartido por los **andrógenos**, merced a sus receptores en osteoblastos. Además, al combinarse tras su aromatización a estrógenos con receptores estrogénicos α , incrementan la formación perióstica y el grosor óseo (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

El **calcitriol** es necesario para la absorción intestinal del Ca y fósforo constituyentes del mineral óseo y tiene un doble papel en el remodelado: en osteoblastos estimula por un

lado la producción del L-RANK (y con ello la osteoclastogénesis) y, por otro, la secreción de osteoprotegerina, bloqueante del L-RANK, e inhibidora de la reabsorción ósea (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Por último, a su acción anabolizante general la **insulina** añade un importante efecto modulador en el desarrollo óseo al estimular directamente la síntesis de matriz osteoide por osteoblastos e, indirectamente, al favorecer la síntesis hepática del IGF-1 (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

b) Citoquinas y factores de crecimiento en el remodelado óseo.

En las citoquinas se incluyen las interleuquinas, interferones, linfoquinas, prostaglandinas y otros polipéptidos involucrados en la homeostasis y la inmunidad. Al igual que los factores de crecimiento, influyen sobre el crecimiento y fisiología celular y procesos como la embriogénesis, morfogénesis y reparación tisular.

Las **interleuquinas** son citoquinas proinflamatorias que también influyen en la reabsorción y remodelado óseo. Tanto la IL-1 como la IL-6 activan la maduración de los preosteoclastos y estimulan la reabsorción por los osteoclastos maduros. Del mismo modo, las **prostaglandinas** PGE₂ Y PGI₂, por un mecanismo autocrino y paracrino, estimulan la osteoclastogénesis, la activación de los osteoclastos y la reabsorción ósea.

La principal función fisiológica de los **factores de crecimiento** es regular el crecimiento y la función celular. Es preciso tener presente que los genes que los codifican en mamíferos son consecuencia de ciclos sucesivos de duplicación de genes a lo largo de la evolución. En este apartado se mencionan las proteínas del factor transformante de crecimiento β (TGF- β) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

El **TGF- β** es un punto de referencia en la genómica comparada. Constituye una vía primigenia de transducción esencial y versátil en el desarrollo, organogénesis, control de células progenitoras e inmunidad en el mundo animal, sin olvidar su función en la patogenia de ciertos cánceres. El *supergén* de la familia del TGF- β codifica diferentes proteínas, entre las cuales los TGF- β 2 y β 3 son fundamentales en la condrogénesis y el TGF- β 1 en la fisiología del hueso. Así, el TGF- β 1 actúa como factor quimiotáctico de células osteoprogenitoras, a la vez que estimulan la diferenciación y proliferación osteoblástica y la producción de colágeno y proteínas no colágenas por los osteoblastos. De la misma manera, induce la producción por éstos de citoquinas que favorecen la génesis y activación de osteoclastos, punto de partida del remodelado; y, junto a ello, induce la transcripción del mRNA del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFG), fundamental en el desarrollo de la vascularización ósea.

Dentro de la familia del TGF- β , las osteoproteínas morfogenéticas (**BMP**) constituyen una subfamilia de proteínas hidrosolubles activadoras de la diferenciación de células osteoprogenitoras, la proliferación celular y la formación de hueso. A ello debe añadirse, en el caso de las BMP-2 y 7, su acción aceleradora de la formación de hueso nuevo con morfología similar al reabsorbido tras el remodelado fisiológico, o en la reparación de fracturas.

Por último, el factor de crecimiento del endotelio vascular (**VEGF**), al estimular la quimiotaxis de células progenitoras endoteliales y la mitogénesis, es un promotor de la angiogénesis. En el hueso, el osteoblasto produce VEGF, a la vez que expresa receptores para este factor con acción osteogénica. El VEGF, además, potencia el efecto osteogénico de las BMP y, a través de receptores en osteoclastos, favorece el agrupamiento de estas células en las áreas de remodelado.

En suma, en cada momento, la morfología, cantidad y calidad del tejido óseo son consecuencia de factores externos, sistémicos y locales que actúan al unísono sobre diferentes células capaces de conjugar conceptos aparentemente opuestos como autonomía y dependencia. El conocimiento de tal conjugación, así como el proceso de diferenciación de las células óseas mediado por sistemas de transmisión de señales a su núcleo y los factores de transcripción involucrados en la expresión de genes codificadores de proteínas efectoras, constituyen campos de gran interés. Campos no terminados de escribir, pero mejor conocidos cada día (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

2.4 Osteoporosis

Como se explicará más adelante, en este estudio se pretende desarrollar un modelo de osteopenia para evaluar la biodisponibilidad del Ca del nopal en ratas que presenten niveles por abajo del normal en algunos parámetros físicos y fisicoquímicos como puede ser la densidad mineral ósea. Por esta razón el propósito final es establecer si el Ca del nopal es biodisponible y, es necesario entonces, ponernos en el contexto de la osteoporosis y sus causas.

La osteoporosis es un problema mundial de salud que se incrementará de manera significativa a medida que las personas vivan más y que la población mundial continúe incrementándose. La composición de la dieta es un factor determinante en la densidad mineral del hueso en el periodo de crecimiento, y de la magnitud de la pérdida mineral del hueso relacionada a la edad, en particular en las entre las mujeres pos menopáusicas (Cashman, 2002). La parte fundamental de la dieta que interviene en la formación de huesos es principalmente el contenido de Ca y de P que son los elementos principales o primordiales para la formación de Hap en el hueso.

La osteoporosis es definida como una enfermedad sistémica del esqueleto caracterizado por una masa ósea disminuida y deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, con un consecuente incremento de la fragilidad del hueso y mayor susceptibilidad a la fractura. La osteopenia se define en ocasiones como la zona limítrofe de baja densidad, pero menor a la observada en la osteoporosis. Sus criterios de diagnóstico se basan en el contenido mineral del hueso (BMC por sus siglas en inglés Bone mineral density) en base a la definición de la OMS que se muestra en el tabla 2.4.

Normal: DMO comprendida entre DE +1 y -1 respecto de la media del adulto joven.

Osteopenia (baja masa ósea): DMO comprendida entre DE -1 y -2,5 por debajo de la media del adulto joven.

Osteoporosis: DMO igual o mayor a DE -2,5 respecto de la media del adulto joven.

Osteoporosis severa (establecida): DMO superior a DE -2,5, y se han producido una o más fracturas por osteoporosis.

*según mediciones DXA en cadera o columna

Tabla 2.4 Resumen de las definiciones de la OMS sobre osteoporosis, según niveles de densidad ósea*:

Como su nombre lo indica, osteoporosis significa "hueso poroso". El trastorno principal es la disminución de la cantidad de Ca en los huesos por la acción de unas células llamadas osteoclastos, lo cual incrementa su fragilidad y su susceptibilidad a las fracturas.

Las fracturas de la cadera pueden limitar la movilidad del individuo y conducir, por lo tanto, a la paulatina pérdida de independencia personal. Por otra parte, aunque actualmente la cirugía requerida para corregir estas fracturas de cadera está muy avanzada, las complicaciones que pueden presentarse en ocasiones llevan a la muerte (SSA, 2001).

Pese a que las mujeres desarrollan la enfermedad con una frecuencia cuatro veces mayor que los hombres, también se presenta en éstos. Es importante saber que el hueso es un tejido vivo, en continuo crecimiento o modificación, y no una masa rígida de mineral, como la mayoría de la población lo considera. A lo largo de nuestra vida el hueso se renueva constantemente a través de un proceso en el que el "hueso viejo" es removido y reemplazado por el "hueso nuevo".

En etapas tempranas de la vida se forma más "hueso nuevo" que el que es removido, alcanzándose la mayor densidad y fuerza ósea entre los 25 y 35 años, edad a partir de la cual el cuerpo remueve el "hueso viejo" con una velocidad mayor que con la que puede reemplazarlo con "hueso nuevo", conduciendo a una pérdida de la densidad ósea, es decir del contenido mineral del hueso. Cabe señalar que alrededor de 95% de la masa ósea total de un adulto se logra hacia los 20 años en los hombres y los 18 en las mujeres, y el 5% restante se logra hasta los 28 años de edad.

Con la menopausia, la mujer experimenta un incremento en la pérdida de hueso debido a que los ovarios producen menos estrógenos, la hormona característicamente femenina, que tiene un papel fundamental para mantener la adecuada densidad de los huesos.

Cuando la pérdida de densidad ósea es excesiva, los huesos se hacen cada vez más frágiles y susceptibles de sufrir fracturas. Se puede decir que, en términos generales, una vez que el hueso se ha perdido, el cuerpo no es capaz de reemplazarlo.

Este punto es importante porque en el desarrollo de un modelo normal, es necesario conocer la resistencia mecánica de los huesos de las ratas en función de la edad, para constituir la curva normal de comportamiento del hueso ante pruebas mecánicas y, posteriormente en base a este comportamiento normal, evaluar las consecuencias de una dieta deficiente en Ca sobre las propiedades mecánicas del hueso (fémur).

La osteoporosis es una enfermedad que se produce con el transcurso de la vida, y así mismo su prevención es un proceso largo, que debe comenzar desde temprana edad. Es por esto, que en el modelo que se pretende desarrollar, se deberá establecer la edad de la rata para iniciar el proceso de malnutrición que conlleve a una pérdida paulatina del contenido de Ca y permita definir que las ratas están en un intervalo bajo de contenido de Ca similar al de osteopenia en la curva normal de DEXA para humanos.

La osteoporosis es la causa más importante de fracturas en el mundo. Con esta enfermedad, la probabilidad de fracturas de cadera aumenta considerablemente en personas mayores de 65 años. El deterioro óseo provocado por la osteoporosis afecta a una de cada cinco mujeres de más de 45 años y a cuatro de cada diez mayores de 75. Se calcula que 90 por ciento de las mujeres mayores de 90 años padecen osteoporosis y 80 por ciento del total de las víctimas de esta enfermedad en el mundo son mujeres.

Se estima que 20 por ciento de las fracturas provocadas por la osteoporosis generan complicaciones colaterales en los pacientes. Asimismo, las investigaciones revelan que 25

por ciento de las personas que sobreviven a la osteoporosis presentan un alto grado de dependencia a la ayuda de familiares y amigos.

Muchas personas no son conscientes de que el estado de sus huesos en edades avanzadas es afectado por la ingestión de Ca a lo largo de su vida. Los huesos del ser humano, que desprenden y renuevan el Ca a lo largo de la vida, acumulan densidad durante la infancia y la adolescencia. Durante el principio de la edad adulta, el Ca es depositado y liberado, de tal forma que cuando una persona llega a los 35 años, comienza a liberar más Ca del que se acumula, un proceso que, en el caso de la mujer, se acelera con el declive de la producción de estrógenos en la menopausia.

Consumir suficiente Ca a edades tempranas es determinante para crear huesos fuertes, puesto que los efectos de la pérdida de masa ósea serán menos dramáticos.

Los productos lácteos ofrecen una cantidad importante de Ca. Este mineral se encuentra también en las sardinas, la soya y algunas verduras, como brócoli, espinacas y lechuga.

Otras medidas que ayudan a prevenir la osteoporosis incluyen la terapia de sustitución de hormonas durante la menopausia, que tal vez sea el método más efectivo de prevenir la pérdida de masa ósea en mujeres adultas; ejercicio regular con pesas; caminar, puesto que caminar, a diferencia de correr, no deteriora los huesos ni los ligamentos; evitar fumar, debido a que fumar reduce los niveles de estrógenos, contribuyendo a la pérdida de masa ósea; y evitar el abuso en el consumo de bebidas alcohólicas (SSA, 2001).

2.4.1 Principales causas

Los huesos están sometidos a un remodelado continuo mediante procesos de formación y reabsorción, y también sirven como reserva de Ca del organismo.

A partir de los 35 años se inicia la pérdida de pequeñas cantidades de hueso. Múltiples enfermedades o hábitos de vida pueden incrementar la pérdida de hueso ocasionando osteoporosis. Algunas mujeres están, también, predispuestas a la osteoporosis por una baja masa ósea.

Entre las mujeres, la menopausia es la principal causa de osteoporosis, debido a la disminución de los niveles de estrógenos. La pérdida de estrógenos por la menopausia fisiológica o por la extirpación quirúrgica de los ovarios, ocasiona una rápida pérdida de hueso. Las mujeres, especialmente las caucásicas y asiáticas, tienen una masa ósea menor

que los hombres. La pérdida de hueso ocasiona una menor resistencia del mismo, que conduce fácilmente a fracturas de la muñeca, columna y la cadera.

Existen varios factores que pueden incrementar la probabilidad de que una persona desarrolle osteoporosis, entre los que destacan:

1. Herencia caucásica (gente blanca) o asiática.
2. Constitución delgada, con huesos pequeños.
3. Antecedentes de fracturas o alteraciones posturales en familiares de edad avanzada, especialmente si son mujeres.
4. Deficiencia de estrógenos en mujeres que experimentan una menopausia antes de los 45 años, ya sea naturalmente o como resultado de extirpación quirúrgica de ovarios.
5. Deficiencia de estrógenos como resultado de amenorrea, es decir, ausencia anormal de la menstruación, no relacionado con la menopausia.
6. Edad avanzada.
7. Dieta baja en Ca.
8. Estilo de vida sedentario, con poco o nada de ejercicio
9. Tabaquismo
10. Consumo excesivo del alcohol
11. Uso prolongado de algún medicamento, incluyendo hormonas tiroideas (muchas pastillas o cápsulas para bajar de peso las contienen); glucocorticoides (derivados de la cortisona) usados para tratar condiciones como el asma, artritis y algunos cánceres; y ciertos medicamentos anticonvulsivos.

Si bien es cierto que los efectos de la osteoporosis se ven más frecuentemente en etapas tardías de la vida, es recomendable saber acerca de esta enfermedad, a fin de prevenirla. Una alimentación adecuada y ejercicio a lo largo de la vida pueden disminuir considerablemente el riesgo personal de padecer osteoporosis (SSA, 2001).

La medición de la densidad mineral ósea en humanos y en la investigación animal se realiza mediante el uso de la densitometría dual por rayos-X (DEXA) y ha tenido un importante avance en los últimos años. La densitometría ósea permite detectar en forma muy temprana y sensible cambios morfológicos del hueso ya sea por sí sola o combinada con algunos indicadores bioquímicos relacionados a su actividad metabólica (Brem *et al*, 2004). A continuación se muestra la curva de almacenamiento de Ca para humanos en la figura 2.13.



Figura 2.13 Curva de almacenamiento de Ca

La absorciometría de rayos-X de doble energía realizada mediante un software especial para pequeños animales es una excelente técnica para medir la densidad mineral ósea en ratas. Sin embargo, en esta investigación, se propone un método alternativo más económico y práctico para poder determinar la densidad en los animales de experimentación, mediante un equipo dental de difracción y el acople de un sensor digital (rayos-X). Es importante mencionar que en la bibliografía no se tiene una curva similar a la que se tiene para humanos y, sobre la cual se pueda hacer un diagnóstico de la densidad mineral ósea de los animales de experimentación, por lo cual es fundamental para esta investigación, poder obtener esta curva para poder llevar a cabo ensayos relacionados con densidad mineral ósea y nutrición.

2.5 Hidroxiapatita

El hueso es el tejido especializado que caracteriza a los animales vertebrados. Los huesos y los dientes tejidos vivos compuestos de sustancias minerales; estos tejidos consisten de células, sustancias grasas, polímeros naturales (como polisacáridos, colágeno y polifosfatos) y otras sustancias. Si bien las propiedades del tejido óseo, así como las proporciones de las sustancias que los forman, varían de acuerdo con las diferentes partes del esqueleto, se puede considerar que contienen alrededor de dos terceras partes de material inorgánico y una tercera parte de material orgánico en promedio. El tejido óseo está compuesto por una fase mineral que ocupa un 69% de su peso total, un 9% de agua y

un 22% de una matriz orgánica, la cual a su vez se compone básicamente de colágeno (90-96%).

La fase mineral está compuesta principalmente de cristales microscópicos de fosfatos de Ca, dentro de los cuales la Hap, cuya formulación química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es la más importante. Otras fases minerales presentes en el hueso son el fosfato dicálcico ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), el fosfato de Ca dibásico (CaHPO_4) y, algunas fases amorfas de fosfatos de Ca. Existen además iones como el citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{4-}$), el carbonato (CO_3^{2-}), fluoruro (F^-) y también iones hidroxilo (OH^-), los cuales pueden dar lugar a sutiles diferencias microestructurales en el tejido óseo. También se encuentran algunas impurezas tales como Mg y Na, con trazas de cloro y hierro.

La Hap y el fosfato de Ca dibásico son las únicas fases de fosfato de Ca que son químicamente estables a la temperatura y pH del cuerpo humano (37°C y alrededor de 7, respectivamente).

El término “apatita” se aplica a un grupo de compuestos (no sólo a los fosfatos de Ca) cuya fórmula general es de la forma $\text{M}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Z}_2$; donde M^{2+} es un metal y las especies XO_4^{3-} y Z^- son aniones. El nombre particular de cada apatita depende de los elementos o radicales M, X y Z. En estos términos, la Hap representa la estructura molecular apatítica, donde M es el calcio (Ca^{2+}), X es el fósforo (P^{5+}) y Z es el radical hidroxilo (OH). A ésta se le conoce como Hap estequiométrica y su relación atómica Ca/P es de 1.67. Su formulación química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, con 39% en peso de Ca, 18.5% de P y 3.38 de OH.

La parte mineral de hueso soporta casi la totalidad de las cargas mecánicas y la parte orgánica (colágeno) sirve como un material de enlace, que además amortigua impactos, proporcionando flexibilidad a los huesos (Rivera, 1997).

2.6 Rayos-X

2.6.1 Difracción de rayos X

Los rayos-X, son radiaciones cuya longitud de onda oscila entre 0.02 Å a 100 Å siendo emitidos por los átomos debido a profundas perturbaciones en sus estructuras electrónicas. El fenómeno es de carácter electromagnético y de la misma naturaleza de la luz visible.

La ecuación establecida por Bragg que permite establecer la relación existente entre la longitud de onda de los rayos-X y los espacios interplanares de los cristales es la siguiente:

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

Dónde:

n = es un número entero, número de orden de reflexión

λ = es la longitud de onda de los rayos-X.

d = es la distancia interplanar del cristal.

θ = ángulo de Bragg o ángulo de incidencia.

El valor λ es una constante del tubo de rayos-X, utilizado, que es más definido con el empleo de filtros o monocromadores y es equivalente a 1.5406 Anstrons.

El valor d es calculado en función de los otros valores.

La difracción de los rayos-X es una herramienta útil durante el desarrollo de la caracterización de materiales y permite la identificación de especies minerales cristalinas.

Toda sustancia cristalina dispersa los rayos-X en su propio patrón de difracción único, produciendo una "huella" de su estructura atómica y molecular. La intensidad de cada reflexión constituye la información básica requerida en el análisis de la estructura del cristal. Debido a que átomos diferentes tienen diversos números de electrones, su dispersión relativa varía. Como consecuencia, la estructura del cristal determina la intensidad y posición del haz difractado. Aun cuando dos cristales tengan redes idénticas, el tipo de átomos que los forman puede ser diferente. Por lo tanto, cada especie de cristal difracta los rayos-X en una forma característica distinta.

La difracción de rayos-X, presenta una característica única que es la de que los componentes se identifican como compuestos específicos a partir de sus diagramas de difracción y constituye lo que probablemente sea la aplicación más amplia de este método (Duarte y Preckwinkel, 2001).

En este trabajo de tesis, la difracción de rayos-X fue utilizada principalmente para la identificación y caracterización de Hap en los huesos de rata en función de la edad y establecer los cambios producidos por los efectos de una mala nutrición.

2.6.2 Transmisión de rayos-X

La transmisión de rayos-X, es la herramienta principal del sistema de densitometría ósea DEXA y está basado básicamente en la ley de Beer. Esta ley establece que la cantidad de rayos-X que sale de una muestra es disminuida por los siguientes fenómenos físicos.

1.- El tipo de material absorbente en su trayectoria (Coeficiente de absorción).

2.- La distancia que los rayos-X debe atravesar en la muestra (Grosor de la muestra), Ecuación 1.

$$I = I_0 \exp(-\beta \cdot x) \quad (1)$$

Donde I es la intensidad saliente de la muestra medida por el detector, I_0 es la intensidad entrante, x es el grosor de la muestra y β es su coeficiente de absorción a la longitud de onda establecida (rayos-X). Esto implica que la absorción es de manera exponencial decreciente. Este criterio se usó para estudiar la densidad mineral ósea de los huesos; si se tiene un hueso de un determinado grosor, es de esperarse que uno más grueso tenga mayor densidad mineral ósea. La figura 2.14 muestra la radiografía del fémur de dos ratas que se tomaron con el equipo dental que se instrumentó. En esta figura se puede observar que el hueso de la rata joven (3 semanas) es más claro a los rayos-X, mientras que el de la rata adulta (16 semanas) es más opaco a esta misma radiación. Este efecto nos permitirá hacer una relación entre la intensidad medida en pixeles y la densidad real de los huesos en función de la edad (curva normal).

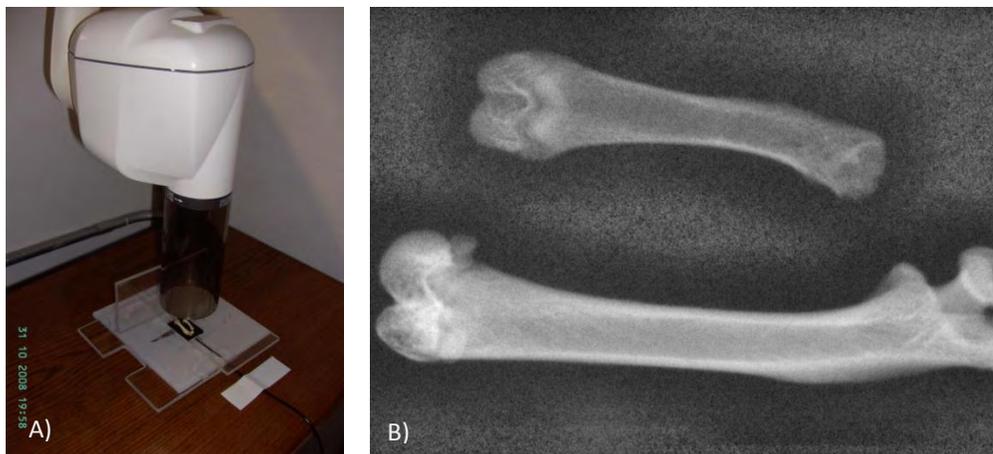


Figura 2.14 A) Equipo de rayos-X dental (Satelec X-mind AC®), B) radiografías de hueso, mostrando diferencias de imagen entre un hueso de rata de 3 semanas y un hueso de rata de 16 semanas.

Actualmente en la bibliografía no se cuenta con estas curvas de comportamiento normal de la densidad mineral ósea de huesos en ratas Wistar en función de la edad, de ahí la importancia de poder contar con esta información, ya que a partir de ella, se podrá determinar el comportamiento de la misma en animales de experimentación nutricional. Como se mencionó anteriormente, mediante el uso de un equipo dental de rayos-X y el acople de un sensor digital, se puede mediante calibración con hueso plano de res, establecer curvas de calibración para obtener la densidad mineral ósea de huesos de rata en función de la edad, equivalente a la obtenida por DEXA en humanos, así como para

estudiar los procesos de calcificación o descalcificación producidos en los ensayos con diferentes dietas.

Posterior al establecimiento de la curva normal de densidad mineral ósea utilizando el sistema radiológico, se estudió, la densidad mineral en animales de experimentación con dietas de desnutrición y restitución de nutrimentos.

2.7 Pruebas mecánicas

La producción y uso de los materiales depende, en gran parte de sus propiedades mecánicas, tales como resistencia, dureza y ductilidad. Es posible obtener valores numéricos que describan estas propiedades mediante el uso de pruebas patrón de tracción, dureza, impacto, fluidez y fatiga (Hayden et al, 1982).

En los metales y los materiales no metálicos, el comportamiento mecánico depende principalmente de la estructura macroscópica y microscópica que, a su vez, es función de la composición química, las materias primas y el método de fabricación.

Para describir las propiedades mecánicas del hueso es importante definir la prueba de dureza; la cual mide la resistencia de un material a la penetración de un punzón o una cuchilla. El penetrador es generalmente una esfera, pirámide o cono, hecho de un material mucho más duro que el que se ensaya (como por ejemplo, acero endurecido, carburo de tungsteno sintetizado o diamante). En la mayoría de las pruebas patrón, la carga se aplica al oprimir lentamente el penetrador, perpendicularmente a la superficie ensayada, por un periodo determinado, de los resultados se puede calcular un valor empírico de dureza, conociendo la carga aplicada y el área de la sección transversal o la profundidad de la impresión.

La mayoría de las pruebas de dureza producen deformación plástica en el material, y todas las variables que influyen en la deformación plástica la afectan. La prueba de dureza puede hacerse muy fácilmente y la información obtenida se evalúa inmediatamente (Hayden et al, 1982).

La apatita (Hap) es uno de los principales componentes del hueso y otros tejidos mineralizados de los vertebrados. Su presencia, la cual es aproximadamente el 65% del peso total del hueso, provee la rigidez y fuerza del hueso. Con el incremento del depósito de apatita durante la maduración y envejecimiento (crecimiento) del hueso, las propiedades mecánicas se incrementan enormemente, una afirmación confirmada por la medida del módulo de elasticidad y el crecimiento de la microdureza en el hueso humano (Su et al, 2003).

Tomando en cuenta la composición de la Hap, es importante estudiar sus propiedades mecánicas. Se ha reportado que la resistencia a la flexión de la Hap es del orden de 110 MPa. La estequiometría de la Hap juega un papel importante en las propiedades mecánicas del hueso, obteniéndose mejores resultados cuando la relación Ca/P se encuentra entre 1.60 y 1.67 (Rivera, 1997).

Al igual que ocurre con la curva de almacenamiento de Ca y la formación de Hap, en la bibliografía no se cuenta con una curva de comportamiento normal de pruebas mecánicas en hueso de ratas Wistar, por lo que se hace indispensable para este estudio, poder contar con un patrón de referencia con el cual comparar los resultados obtenidos con las dietas de experimentación. Además de que se aportará en el conocimiento con una herramienta útil en la valoración de la resistencia a la fractura de huesos para aquellos estudios relacionados con los mismos.

2.8 Dieta AIN-93

La dieta AIN-93, es una actualización de la dieta AIN-76^a, propuesta por The American Institute of Nutrition (AIN), realizada por The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), Forrest Nielsen y Philip Reeves. La meta de esta dieta es establecer una guía que pueda ayudar a los científicos que trabajan con nutrición experimental. Este intento de estandarizar una dieta prueba para animales de laboratorio, tiene como objetivo reducir la variación en los resultados y facilitar la interpretación de los mismos entre experimentos y laboratorios. Las nuevas dietas fueron formuladas para el crecimiento, preñez, lactancia y mantenimiento de ratas y ratones. Las formulaciones fueron hechas bajo los siguientes criterios: pueden ser elaboradas con ingredientes purificados; con las formulaciones se puede conformar dietas normales o excedidas en algún nutrimento; pueden ser elaboradas fácilmente con ingredientes disponibles y a bajo costo, la composición de las mismas es consistente y reproducible.

La dieta AIN-93 está recomendada para animales en crecimiento, preñez y lactancia (tabla 2.5); en tanto que la dieta AIN-93M está recomendada para el mantenimiento de animales adultos (tabla 2.6). Esta última es más baja en el contenido de proteína y grasa. La tabla 2.7 muestra el contenido de minerales en base al requerimiento (Reeves *et al*, 1993).

A continuación se muestra las formulaciones de las dietas:

| Ingredientes | g/kg de dieta |
|------------------------|----------------------|
| Almidón | 397.486 |
| Caseína | 200.000 |
| Almidón dextrinizado | 132.000 |
| Sucrosa | 100.000 |
| Aceite de soya | 70.000 |
| Fibra (alphacel) | 50.000 |
| Mezcla de minerales | 35.000 |
| Mezcla de vitaminas | 10.000 |
| L. cistina | 3.000 |
| Bitartrato de colina | 2.500 |
| Tert-butylhydroquinona | 0.014 |

Tabla 2.5 Contenido nutrimental de la dieta AIN-93G formulada para roedores en las etapas de crecimiento, preñez y lactancia (Reeves *et al*, 1993)

| Ingredientes | g/kg de dieta |
|------------------------|----------------------|
| Almidón | 465.692 |
| Caseína | 140.000 |
| Almidón dextrinizado | 155.000 |
| Sucrosa | 100.000 |
| Aceite de soya | 40.000 |
| Fibra (alphacel) | 50.000 |
| Mezcla de minerales | 35.000 |
| Mezcla de vitaminas | 10.000 |
| L. cistina | 1.800 |
| Bitartrato de colina | 2.500 |
| Tert-butylhydroquinona | 0.008 |

Tabla 2.6 Contenido nutrimental de la dieta AIN-93M formulada para mantenimiento de roedores adultos.

| Elemento mineral | mg/kg de dieta | |
|-------------------------|-----------------------|----------------|
| | AIN-93G | AIN-93M |
| Calcio | 5000.0 | 5000.0 |
| Fósforo | 1561.0 | 1992.0 |
| Potasio | 3600.0 | 3600.0 |
| Azufre | 300.0 | 300.0 |

| | | |
|------------------------------|--------|--------|
| Sodio | 1019.0 | 1019.0 |
| Cloro | 1571.0 | 1571.0 |
| Magnesio | 507.0 | 507.0 |
| Hierro | 35.0 | 35.0 |
| Zinc | 30.0 | 30.0 |
| Manganeso | 10.0 | 10.0 |
| Cobre | 6.0 | 6.0 |
| Yodo | 0.2 | 0.2 |
| Molibdeno | 0.15 | 0.15 |
| Selenio | 0.15 | 0.15 |
| Potencial beneficioso | | |
| Silicón | 5.0 | 5.0 |
| Cromo | 1.0 | 1.0 |
| Flúor | 1.0 | 1.0 |
| Níquel | 0.5 | 0.5 |
| Boro | 0.5 | 0.5 |
| Litio | 0.1 | 0.1 |
| Vanadio | 0.1 | 0.1 |

Un total de 3000 mg P/kg de dieta es recomendado para cada dieta, la diferencia entre la contribución de la mezcla y la cantidad dietaria recomendada es hecha por la contribución de P por parte de la caseína.

Tabla 2.7 Contribución de elementos minerales de la dieta AIN-93G y AIN-93M (Reeves *et al*, 1993)

Al emplear estas dietas en estudios de tipo nutrimental que requieren la alteración de uno o más de sus ingredientes; se tiene que tener en cuenta el contenido de las mismas y realizar los ajustes necesarios para adecuar las cantidades de nutrimentos (Reeves *et al*, 1993).

Es bien sabido que en humanos, la dieta influye en el bienestar del organismo. Cuando hay carencia o exceso de algunos nutrimentos, sobrevienen enfermedades. Específicamente, hablando del Ca, su carencia o limitación en la dieta, afecta la densidad mineral ósea. En el caso de las ratas, existen modelos de osteopenia después de haber tenido una oforectomía, pero hay que tomar en cuenta que en humanos la desnutrición y por ende la carencia de algún nutrimento, va acompañado de una carencia pluricarenal. Es por eso que se propuso una dieta pluricarenal que indujera una desnutrición generalizada (incluida la carencia de Ca) para generar osteopenia. A partir del modelo de osteopenia desarrollado, se probó la biodisponibilidad del Ca procedente de nopal.

2.9 Nopal (*Opuntia ficus indica*)

2.9.1 Descripción botánica de la especie *Opuntia spp*

En la república mexicana se reconoce como nopales a un gran número de especies del género *Opuntia* de la familia botánica *Cactaceae*. Las especies de *Opuntia* son arbustos suculentos de más de tres metros de alto, tronco manifiesto, cilíndrico y suberoso. Tienen tallos aplanados fotosintetizantes o cladodios, generalmente lisos, a veces ligeramente prominentes en las areolas, verde glaucos, de formas variables, aovadas, espatuladas, angostadas de la base, elípticos u oblongos, de 1.5 a 3.5 cm de espesor.

Poseen areolas pequeñas, elípticas, con presencia de gloquídeos. Uno a dos aguijones pequeños en las variedades con espinas, ausentes en las inermes aunque a veces se manifiestan en algunas areolas. También poseen flores hermafroditas solitarias, amarillas, vistosas. El fruto es una baya polispérmica ovoide de alrededor de 9 cm de largo, color variable, verde amarillento o rojizo, carnoso y jugoso el cual es comestible. Presenta numerosas semillas incluidas en la pulpa, pequeñas y lenticulares. De un total aproximado de 104 especies de *Opuntia* y 10 de *Nopalea* en nuestro país, se utilizan 24 especies para consumos diversos, quince de ellas como nopal para forraje, seis para tuna, y tres para nopal verdura, siendo las últimas especies: *Opuntia ficus indica*, *Opuntia robusta* y *la Nopalea cochellinifera*; mismas que con sus diversas variedades existen en las principales zonas de producción de nuestro país (Bravo, 1987).

Acorde a la descripción botánica del género *Opuntia*, el nopal se alberga en el subgénero *Opuntia (PlatyOpuntia Engelmann)*, familia: cactácea. Son especies con tallos aplanados, los cuales se conocen popularmente como pencas o raquetas. Se calcula que esta especie fue de las primeras que se llevaron a Europa en la época de la conquista, logrando aclimatarse y adaptarse en el litoral del mediterráneo.

En la mayoría de las regiones del territorio nacional están presentes las poblaciones silvestres del nopal, la temperatura para su buen desarrollo oscila entre un rango óptimo de 16 a 28°C, sin sufrir afecciones graves. Las temperaturas mínimas van de 10°C y afectan fuertemente al cultivo, pudiendo incluso causar su muerte en el caso de las heladas por debajo de las temperaturas mencionadas. El rango de precipitación varía desde los 150 hasta 800 mm de precipitación media anual. Si la humedad relativa del ambiente aumenta, la planta se afecta en su crecimiento y desarrollo, así como si está expuesta a los ataques de plagas y enfermedades.

El nopal se cultiva a una altura de los 800 a 2,400 metros sobre el nivel del mar (msn), aun cuando se encuentra hasta los 3,000 msn. El tipo de suelo en que se desarrolla es el volcánico y calcáreo de textura franca, con un pH de 6.5 a 8.5 (Bravo, 1987).

2.9.2 Origen y distribución geográfica

Se considera como centro de este género el área del Golfo de México y el Caribe, debido a la gran variabilidad genética que se encuentra en dicha zona. En el siglo XVI con la conquista española, se difundió en toda América; también tuvo gran difusión en los países del Mediterráneo, y de ahí al resto del mundo. En la República Mexicana posee una amplia distribución como especie cultivada, limitada fundamentalmente por las bajas temperaturas. Las plantaciones y producciones más importantes, se registran en las regiones áridas y semiáridas cálidas, encontrándose en menor escala en zonas con mayores precipitaciones y de menores temperaturas. La mayoría de las plantaciones se encuentran asociadas a la vivienda rural o urbana rural, en general poseen entre 5 a 50 plantas. En menor escala, se encuentran plantaciones destinadas a la explotación comercial, cuyas superficies oscilan entre las 3 y 20 ha. Dado la facilidad de su multiplicación vegetativa

2.9.3 Composición química del nopal

De acuerdo con la más reciente recopilación bibliográfica disponible sobre las especies de (*Opuntia spp*), posees bajos contenidos de proteína (4 a 6%) y lípidos (0.5 a 2%); es rica en carbohidratos (~ 6%) con una digestibilidad que varía según las variedades alrededor del 60% en los cladodios nuevos, disminuyendo en los más viejos. Es de destacar su alto contenido de agua (~ 90%), vitaminas (fundamentalmente A y C), minerales (Ca, P, Na y K), mucílagos, celulosa y pectinas, estos últimos dos componentes forman parte de la fibra dietética (Leung, 1978; Hernández et al., 1980; Matter, 1986). Sus frutos contienen gran cantidad de vitamina C (60mg ácido Cítrico/100 g de fruto), proteínas (~ 0.8%), grasas (~0.7%), pectinas (~0.19%), fibra (~0.1%) y minerales.

El porcentaje de semilla oscila entre un 2 y 3%, constituida por proteínas (5%), fibra (56%); almidón (23%) y 5% de aceite (Cheftel, 1992, Casanueva y Bourges, 1995).

2.9.4 Propiedades nutraceuticas del nopal (*Opuntia spp*)

Actualmente, existe una tendencia hacia una nutrición saludable y los avances en la ciencia sugieren una relación cercana entre el consumo de ciertos alimentos o sustancias y la disminución del riesgo de contraer enfermedades crónicas como osteoporosis o enfermedades del corazón. Estos alimentos se denominan funcionales o nutraceuticos, los cuales brindan un valor agregado al alimento, más allá del valor nutritivo original aportan beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano (Alvídrez-Morales et al,

2002). Existen diversos factores que afectan directamente el consumo de los llamados alimentos nutraceuticos, entre los que se pueden señalar las ratificaciones de salud “health claims” o de estructura y función, las cuales proporcionan una mayor información relacionada con la investigación científica que avala los mensajes de ciertos alimentos o suplementos, con respecto a beneficios en la salud de dicho producto, como es el caso concreto de las especies *Opuntia*, tal como se señala a continuación.

El nopal es una cactácea que contiene una elevada cantidad de fibra. Se ha utilizado como alimento y remedio desde tiempos prehispánicos en México. Muchas de sus propiedades hipoglucémicas e hipocolesterolémicas se le atribuyen a los componentes de su fibra dietética. En México, los géneros preferidos para este fin son *Opuntia* y *Lophocereus*. Las diversas recetas para disminuir los síntomas diabéticos incluyen desde tomar los tallos crudos de estas especies machacados en agua, hasta beber sus jugos o extractos. Actualmente una forma práctica de usar este remedio es mediante la preparación de licuados de las pencas tiernas del nopal. Sin importar la forma en que se prepara el remedio, debe usarse diariamente hasta que los síntomas desaparezcan (Fрати *et al.*, 1988; Frати *et al.*, 1990; Basurto *et al.*, 2006).

La fibra actúa como una barrera física y acelera los movimientos intestinales ocasionando una reducción en la absorción de colesterol. También puede ligar al colesterol propiciando una mayor excreción fecal. La excreción del colesterol y sus metabolitos se incrementa después del consumo de alimentos ricos en fibra dietética. Además, ha sido postulado que las fibras dietéticas pueden ejercer su influencia en los lípidos del plasma a través de una reducción en los niveles de glucosa e insulina post-prandial. Se ha reportado que la insulina incrementa la biosíntesis del colesterol y de las lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL. Una disminución en la concentración de insulina puede reducir la síntesis de lípidos del plasma (Rosado, 1990; Rosado, 1995).

Las enfermedades asociadas a una deficiencia de Ca en el organismo son la osteoporosis, la osteomalacia y el raquitismo. La osteoporosis es un trastorno metabólico en el que la densidad mineral ósea se reduce sin cambios en la composición. Así mismo no puede mantenerse la fuerza esquelética y ocurren fracturas con la más mínima tensión. Existen numerosos factores de riesgo, incluyendo la deficiente captación de Ca. La osteomalacia, algunas veces denominada como “raquitismo en el adulto”, suele relacionarse con una carencia de vitamina D y un desequilibrio coincidente en la captación de Ca (Cooper *et al.*, 1988; Matkovic *et al.*, 1999; Holbrook *et al.*, 1998). Los padecimientos anteriormente señalados pueden prevenirse a través de una dieta adecuada en donde se ingieran las cantidades de Ca recomendadas. Desde el punto de vista nutrimental, el nopal podría

considerarse como un alimento nutraceutico en virtud de su contenido de minerales, especialmente el Ca (Rodríguez et al., 2007)

2.10 Factores antinutrimientales o factores inhibidores de la eficacia nutrimental

Existen diversas sustancias naturales de diversa índole que inhiben, de una u otra forma, la utilización digestiva o metabólica, mientras que otras tienen la propiedad de degradar o destruir los nutrientes por vía química o enzimática. El conjunto de estas sustancias naturales se denominan factores antinutrimientales. Estos factores pueden ser de dos tipos: los que destruyen los nutrientes y los que inhiben la eficacia nutricional o su absorción por parte del organismo. Dentro de la primera categoría entran: productos de la oxidación lipídica, sulfitos, tiaminasas, etc. Por otra parte los factores antinutrimientales que inhiben la eficacia nutrimental son: las antiproteasas, las antiamilasas, avidina, el ácido fítico, el ácido oxálico y los taninos. Estos elementos se encuentran en una gran variedad de sustancias naturales que obstaculizan la eficacia de los nutrientes sin destruirlos.

Los factores antinutrimientales que se encuentran en alimentos de origen vegetal son los que se mencionan a continuación:

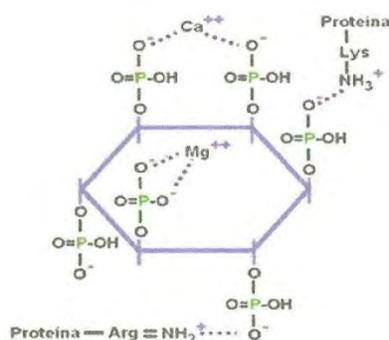
2.10.1 Ácido fítico

En las fuentes de origen vegetal el P se encuentra principalmente en forma de fitatos y ácido fítico, el cual representa aproximadamente entre 50 y 80% del P total del vegetal (Oberleas, 1971; Ogawa et al., 1975). El ácido fítico es un compuesto con actividad antinutricional, debido a su capacidad de formar complejos insolubles con minerales y proteínas convirtiéndolos en compuestos no asimilables por el organismo, bajo determinadas condiciones fisiológicas (Zhou y Erdman, 1995; Sugiera et al., 1999). Estas condiciones fisiológicas son las del pH del tracto gastrointestinal, la acidez prevalente misma que permite la formación de complejos fitato-metal insolubles, lo que hace al metal no disponible para la absorción en el tracto intestinal (Maga, 1982). La afinidad de los fitatos por los cationes es variable, no obstante se tiene la siguiente relación: $Fe < Ca < Mn < Co < Cu < Zn$. Adicionalmente, se ha reportado que una molécula de ácido fítico puede unir de 3 a 6 moles de Ca, formando fitatos insolubles a pH intestinal, haciendo no disponibles al P y al Ca (Erdman, 1979). Los fitatos también reducen la digestibilidad de las proteínas, almidón y lípidos, debido a que forman complejos con las proteínas, haciéndolas menos solubles, es decir, más resistentes a la proteólisis (Dvorakova, 1998).

Los polifenoles y el ácido fítico pueden afectar la digestibilidad del almidón a través de la interacción con las enzimas amilasas (Thompson y Yoon, 1984). El grado de interacción

entre el ácido fítico y las proteínas es dependiente de la carga eléctrica neta de la proteína, de su conformación y de las interacciones con minerales a un pH dado. A pH bajo, por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas, éstas se encuentran cargadas positivamente y el ácido fítico negativamente. En estas condiciones, se produce una fuerte interacción electrostática entre los grupos amino terminal de las proteínas y los ésteres fosfatos aniónicos del ácido fítico, formándose en complejo binario.

A pH intermedio, por encima del punto isoeléctrico de las proteínas, dado que a carga de las proteínas al igual que la del ácido fítico es negativa, su interacción sería imposible; sin embargo, si puede realizarse a través de la formación de un complejo ternario con cationes divalentes como el Ca o el Mg. Esta unión se realiza a través de los grupos carboxilos ionizados y el grupo imidazol desprotonado de la histidina, siendo necesaria una concentración mínima de estos cationes para mantener estos complejos. A pH intermedio también pueden existir algunos complejos binarios, ya que a dicho pH los residuos lisil y arginil de las proteínas están aún cargados positivamente. A pH elevado la interacción entre las proteínas y el ácido fítico disminuye, los grupos lisil y arginil pierden su carga y por tanto, su capacidad de formar complejos binarios. Los complejos ternarios se desestabilizan ya que la fuerza iónica aumenta a pH elevado. Un incremento en la concentración del ión Na hace que la reacción de equilibrio del complejo ternario se desplace hacia la derecha liberándose fitato cálcico insoluble y proteína-Na soluble. Así, la formación de complejos entre ácido fítico y proteínas no solo afecta la solubilidad y propiedades funcionales de las mismas, sino que también tiene una gran influencia en la biodisponibilidad mineral. Además, el ácido fítico puede unirse también al almidón, bien directamente a través de puentes de hidrógeno o indirectamente mediante las proteínas a las que se asocia (Figura 2.15).



(Coulibaly et al, 2011)

Figura 2.15 Interacciones fitato-minerales, fitato-aminoácidos

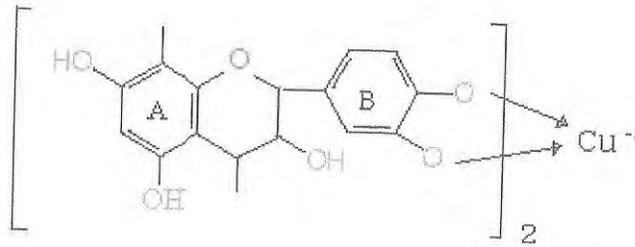
2.10.2 Ácido oxálico

Este diácido con fórmula: $\text{HO}_2\text{CCO}_2\text{H}$; está presente en las hojas poligonáceas, forma con los metales alcalinotérreos como son el Berilio (Be), Magnesio (Mg), Calcio (Ca), Estroncio (Sr), Bario (Ba) y Radio (Ra), sales insolubles no dissociables durante la digestión y por consiguiente, desprovistas de valor nutritivo. El ácido oxálico posee propiedades desmineralizantes comparables al ácido fítico. Además si se encuentra en el tubo digestivo en forma de oxalatos alcalinos solubles, la fracción absorbida resulta tóxica para los riñones. Los productos ricos de este ácido son las espinacas, el riubarbo y el cacao.

2.10.3 Taninos

Estos elementos se derivan de los ácidos polihidroxibenzoicos. El ácido galotánico se encuentra en las agallas vegetales y el zumaque es un derivado de pirogalol. Otros materiales parecen contener derivados de catecol llamados flavotaninos (Jamos, 1968). El ácido tánico es probablemente un glucósido formado a partir de D-glucosa y ácido m-digálico. Todos los taninos son sólidos amorfos, bastantes solubles en agua y alcohol, prácticamente son insolubles en éter donde producen precipitados con alcaloides, gelatinas y con las sales de muchos metales pesados del grupo de los alcalino-térreos como Be, Mg, Ca, Sr, Ba y Ra. Se sabe que estas sustancias tienen actividad antinutricional principalmente con las proteínas, aunque su modo de acción no es bien conocido. Se considera que tienen un papel de inhibición enzimática, debido a que forman complejos con la proteína y en los humanos dificultan la asimilación de este macronutriente (Jean, 1998). Los taninos tienen poca relevancia en la alimentación humana y se encuentran principalmente en el café, el té y algunas frutas (Cervera, 2001).

Existen dos categorías de taninos clasificados en base a su vía de biosíntesis y sus propiedades químicas: los taninos condensados y los taninos hidrolizables. Los taninos condensados (a veces también llamados proantocianidinas) son polímeros de un flavonoide llamado antocianidina. Es común encontrarlos en la madera de las plantas leñosas. Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos, en particular ácido gálico y azúcares simples. Estos son más pequeños que los taninos condensados y son hidrolizados con más facilidad, sólo basta ácido diluido para lograrlo. La mayoría tiene una masa molecular entre 600 y 3000 D (figura 2.16).



(Jean, 1998).

Figura 2.16 Complejo tanino-metal, señalando la afinidad de un metal por los grupos oxidrilo en el anillo – B del flavonoide.

Debido a las condiciones de acidez que prevalecen en el tracto gastrointestinal, los taninos forman complejos tanino-metal, que se establecen a través de los grupos hidroxilos que enlazan en el anillo.-B del flavonoide. Este proceso químico no permite que los minerales sean aprovechados por el organismo humano. También se ha encontrado que los taninos se combinan con proteínas exógenas y endógenas, inclusive las del tracto digestivo, formando complejos taninos-proteínas (T-P) que afectan la digestibilidad de las proteínas entre un 3 a un 15%, especialmente cuando se encuentran en una concentración superior al 5% (5 g/ Kg de MS) (Jean, 1998).

Cabe mencionar que para que se produzca el complejo tanino-proteína deben prevalecer condiciones de un rango de pH entre 5 y 7.5 en el estómago, sin embargo si el pH es bajo <3.5, la proteína es liberada.

Los aminoácidos más susceptibles de ser atrapados por los taninos son: la valina, la leucina, la arginina y la lisina debido a su estructura química. Estos aminoácidos poseen en los grupos R una carga positiva neta a pH=7, además de que cuentan con seis átomos de carbono. Sin embargo, a un pH=6, más del 50% de las moléculas de la histidina, poseen un grupo R cargado positivamente, pero a pH=7, menos del 10% de las moléculas poseen carga positiva. Estas cargas son las que condicionan la posibilidad de unirse a los grupos hidroxilo y formar complejos insolubles con las proteínas en el tracto intestinal de los animales.

2.11 Experimento con Nopal

Se realizó un estudio piloto donde se estudiaron las propiedades fisicoquímicas de fémur de ratas Wistar alimentadas con dietas elaboradas con harina de nopal a diferentes estadios de maduración. Se elaboraron tres dietas, una dieta control (AIN-93) y, dos dietas a las cuales se les adicionó harina de nopal de diferentes estadios de maduración (20 y 50 días), el Ca y el P de estas dietas procedió de harina de nopal (60 g y 200 g

respectivamente). La relación Ca/P se mantuvo de acuerdo a la relación correspondiente en los diferentes estados de maduración; ambas dietas se realizaron en base a la dieta AIN-93.

En la tabla 2.8 se muestra la composición química del polvo de nopal a diferentes estados de maduración, así como la formulación de las dietas (tabla 2.9).

| | Nop60 | Nop200 |
|--------------------------|------------|------------|
| Proteína | 14.22±1.23 | 11.39±1.24 |
| Grasa | 2.87±0.03 | 1.96±0.02 |
| Fibra soluble | 25.22±1.26 | 14.91±1.09 |
| Fibra insoluble | 29.87±1.35 | 41.65±1.32 |
| Humedad (%) | 4.06±0.02 | 7.31±0.03 |
| Ceniza | 18.41±1.64 | 23.24±1.17 |
| Calcio | 1.67 ±0.04 | 3.67±0.08 |
| Fósforo | 0.35±0.01 | 0.32±0.02 |
| Oxalato de calcio (mg/g) | 7.95±0.82 | 3.94±0.26 |
| Ca/P | 4.71 | 11.35 |

Tabla 2.8 Composición química de harina de nopal de dos diferentes estados de maduración (g/100g base seca).

| | Dieta control | Nop60 | Nop200 |
|--|---------------|-------|--------|
| Nopal | NA | 20.00 | 15.70 |
| Caseína | 20.00 | 17.40 | 18.05 |
| Vitaminas ^c | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Calcio libre de minerales ^d | 3.50 | NA | NA |
| Carbonato de calcio | NA | NA | NA |
| Almidón | 39.75 | 39.07 | 42.20 |
| Dextrosa | 10.00 | 13.0 | 13.00 |
| Ca/P** | 1.52 | 4.71 | 11.35 |
| Fibra | 5.00 | 3.11 | 3.36 |
| Aceite de maíz | 7.00 | 6.42 | 6.69 |

NA: No Adicionada, toda la fuente de calcio fue provista por la harina de nopal

a Todas las dietas contenían 20% proteínas, 7% grasa, and 5% fibra.

b Dieta Control, AIN-93G; relación Ca/P 1.3, Biomédica.

c Mezcla de vitaminas (AIN-93G VX)

d. Calcio sin oxalatos

** medidos en la dieta total

Tabla 2.9 Formulación de las dietas (g/100 grs^{a,b})

Entre los resultados que se obtuvieron, no hubo diferencias significativas en la ganancia de peso en las ratas alimentadas con las diferentes dietas. El peso del fémur fue menor en el grupo alimentado con la dieta de nopal de 60 g. La fuerza necesaria para romper los fémures, fue mayor en las ratas alimentadas con la dieta de nopal de 200 g. Los resultados sugieren que el Ca presente en el nopal de 200 g es más biodisponible que el Ca contenido en el nopal de 60 g. Este hecho es muy importante desde el punto de vista nutricional, y sugiere que el nopal es una adecuada fuente de Ca dietario para ser incluido en la dieta.

III. Hipótesis

El Ca proveniente del polvo de nopal, sirve como coadyuvante en la mineralización y formación del hueso, debido a su alto contenido de Ca.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar la biodisponibilidad del Ca procedente del nopal y su efecto en la formación de huesos en ratas de la cepa Wistar alimentadas con nopal (Opuntia ficus indica), para conocer su potencial en la mineralización del hueso.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Evaluar la composición química de la penca de nopal en forma de polvo mediante las técnicas de la AOAC del 2000 para determinar la composición nutrimental en función de la maduración.

4.2.2 Elaborar las curvas basales de crecimiento, pruebas mecánicas, cristalización de Hap, y contenido de minerales en hueso, para conocer el comportamiento normal de estos factores en ratas de la cepa Wistar de ambos géneros como función de la edad.

4.2.3 Generar un método alternativo de determinación de la densidad mineral ósea, mediante la detección digital de rayos-X, para realizar las evaluaciones de la densidad mineral ósea en ratas de la Cepa Wistar in vivo.

4.2.4 Formular las dietas: a) para la generación del modelo de desnutrición y generación de la disminución en la densidad mineral ósea en ratas hembras de la cepa Wistar y b) la dieta de restitución de nutrimentos.

4.2.5 Generar un modelo de desnutrición a partir de las curvas desarrolladas de densidad mineral ósea, a través de dietas deficientes en el contenido de Ca para posteriormente evaluar el efecto de una dieta a base de nopal.

4.2.6 Evaluar el efecto del consumo de Ca procedente de nopal, sobre la formación de hueso a través del modelo de desnutrición desarrollado, determinando la biodisponibilidad del Ca de este vegetal in vivo a través de la determinación de la densidad mineral, mediante la detección digital de rayos-X.

V. Metodología

5.1 Localización del sitio experimental

El presente estudio se realizó en las instalaciones del centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla; en la Facultad de Ciencias naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Juriquilla y en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.2 Material biológico

5.2.1 Nopales (*Opuntia ficus indica*)

El material biológico para realizar la harina de nopal fue recolectado del centro experimental de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en el rancho Los Lores, en Silao Guanajuato, México; en el periodo de julio a agosto del 2007.

Fueron recolectados 24 kg de cada muestra, los nopales fueron provenientes de diversas plantas ubicadas en la misma área, a diferentes estados de maduración (100 g a 550 g). Las muestras fueron transportadas al laboratorio, donde fueron clasificadas, y separadas en 10 grupos diferentes acorde al peso (100 g, 150 g, 200 g, 250 g, 300 g, 350 g, 400 g, 450 g, 500 g y 550 g respectivamente). Para conocer la edad de los cladodios, los brotes jóvenes fueron marcados y registrados por un lapso de 135 días. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

5.2.2 Animales de experimentación

Para realizar el estudio biológico experimental, se tomaron 156 ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar de ambos géneros las cuales fueron proporcionadas por el bioterio del Centro de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla del Estado de Querétaro. Los animales fueron mantenidos en condiciones de bioterio, siguiendo los lineamiento para el manejo de animales de la National Research Council (2003), ciclo de Luz/Oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 07:00 h), humedad aproximada de 45-55% y temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$, evitando factores de alteración como ruidos, manejo excesivo y lesiones. Los animales fueron alimentados con el pellet LabDiet (5001 rodent diet). Este pellet es similar a la dieta AIN-93 G para gestación y crecimiento (Reeves *et al*, 1993).

5.2.3 Identificación de animales

Los animales pueden ser identificados de las siguientes maneras:

Permanentes:

Tatuaje: Con fórceps en números 3/16" X ¼" en las orejas.

Muesqueo: por cortes pequeños en las orejas. Este método de identificación es muy sencillo y fácil de realizar. Es utilizado en ratones, ratas y Hamster (figura 5.1).

Temporales:

Tintas indelebles de colores, azul de metileno, violeta de genciana etc. (De la puente, 1981)

Los animales fueron muesqueados como se muestra en la figura 5.1

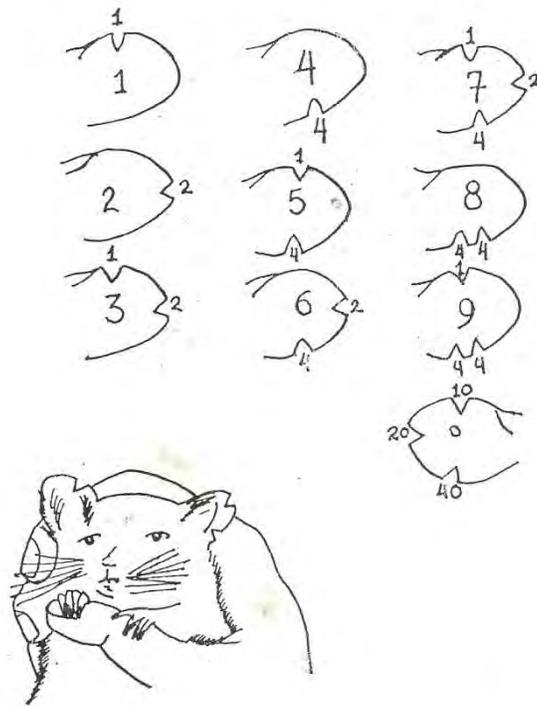


Figura 5.1 Identificación permanente en los ratones y ratas por muesqueo en las orejas.

5.3 Análisis Químico Proximal en Harinas de Nopal

Una vez clasificados los cladodios en base a su peso, éstos fueron lavados y desinfectados con una solución de hipoclorito de Na al 10% durante 10 minutos, para eliminar la presencia de microorganismos; posterior al secado de las pencas, las espinas fueron eliminadas y las pencas fueron peleteadas, para obtener cortes finos, esto para facilitar el proceso de secado. Las muestras fueron secadas en una estufa a 45°C durante 12 horas a 10⁻² Torr, para evitar el daño de proteínas y carbohidratos; posteriormente fueron molidas para obtener las harinas finas, usando un molino (PULVEX 200, México) y finalmente fueron almacenadas para su posterior análisis.

Para el estudio proximal se siguieron las metodologías descritas en la AOAC (2000), cuyas claves se consignan entre paréntesis, y las cuales se describen a continuación.

5.3.1 Determinación de humedad (934.01)

El método se basa en una determinación gravimétrica en la que se calcula la diferencia de pesos obtenidos en una muestra antes y después de secarla a una temperatura constante.

Se pesan entre 5.0 y 5.5 g de muestra en un recipiente de metal o en una cápsula de porcelana que previamente se puso a peso constante; las muestras se colocan en un horno a 110° C durante cuatro horas. Al término de ese tiempo, las muestras se transfieren a un desecador hasta enfriarlos. Posteriormente se registran los pesos en una balanza analítica.

Para el cálculo de la humedad se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de peso seco} = \frac{(\text{Peso del recipiente} + \text{muestra seca}) - \text{Peso del recipiente} \times 100}{(\text{Peso del recipiente} + \text{muestra húmeda}) - \text{Peso del recipiente}}$$

$$\text{Porcentaje de humedad} = 100 - \% \text{ Peso seco}$$

5.3.2 Determinación de cenizas (942.05)

Las muestras de nopal secas se incineran con el objeto de consumir todo el material orgánico. El material inorgánico que no se destruye a esa temperatura constituye la ceniza.

Sobre los crisoles secos se pesan entre 1.5 a 2.0 g de muestra, los cuales se colocan sobre una parrilla para su incineración. Una vez mineralizadas, las muestras se colocan en una mufla a 550° C durante cinco horas para su calcinación.

Al término de este tiempo, las muestras se inspeccionan para verificar si la materia orgánica ha sido consumida. Una vez que esto ocurre, las muestras se transfirieren a un desecador hasta que se enfrían. Se registra su peso y los resultados se expresan como porcentaje en base seca.

$$\text{Ceniza (g/g)} = \frac{(\text{Peso del crisol} + \text{ceniza}) - \text{Peso del crisol a peso constante} \times 100}{(\text{Peso del crisol} + \text{muestra seca}) - \text{Peso del crisol vacío}}$$

5.3.3 Determinación de fibra cruda (962.09)

Una muestra exenta de grasa se trata con ácido sulfúrico en ebullición y después con hidróxido sódico en ebullición. El residuo menos las cenizas se considera la fibra.

Pesar una bolsa filtrante, registrar el peso y tarar la balanza (W1). Las bolsas tienen un contenido de humedad despreciable y no necesitan ser presecadas a menos que hayan sido guardadas sin desecante en un ambiente muy húmedo.

Pesar 1.0 g (± 0.5 g) de una muestra previamente secada al aire y molida a través de una malla de 1 mm, directamente dentro de la bolsa filtrante (W2). Pesar una bolsa vacía para que funcione como blanco para determinar la corrección de la bolsa vacía (C1). Sellar la bolsa dejando 0.5 cm de la apertura de la bolsa utilizando un sellador de calor. Extender la muestra uniformemente dentro de la bolsa filtrante. Esto debe ser hecho agitando o golpeando suavemente para eliminar los sólidos.

Nota: En el caso de que las muestras a trabajar contengan altas cantidades de grasas, extraerla previamente, colocándolas en una botella de 500 mL con su tapón. Poner suficiente acetona en la botella para cubrir las bolsas y cerrar la botella. Agitar el contenedor 10 veces y permitir que las bolsas reposen por 10 min. Repetir este procedimiento con acetona; quitar la acetona y colocar las bolsas en una campana extractora para secar con el aire (aprox. 5 minutos); o bien colocar las bolsas en cartuchos de extracción de grasa y seguir el procedimiento.

Poner las bolsas (máximo 24) en la canastilla (compuesta por nueve repisas), colocando tres bolsas por repisa. Estibar las repisas centradas con cada nivel rotado 120°. La novena repisa se queda vacía y actúa como tapa de la octava repisa. El contrapeso de la canastilla es puesto arriba de la novena repisa para mantenerla sumergida.

Agregar 1900 – 2000 mL de solución de ácido sulfúrico a temperatura ambiente (0.255 N) dentro del contenedor del digestor de fibra. Sumergir la canastilla con las bolsas, calibrar el cronómetro para 45 minutos, activar el interruptor de “agitación” y “calor” e iniciar la digestión. Después de confirmar que la canastilla con las bolsas se está agitando, cerrar bien. La temperatura se controlará automáticamente a 100°C.

Cálculo:

Peso (g) de la bolsa a peso cte. = W1

Peso (g) de la muestra = W2

Peso (g) de la bolsa y muestra insoluble = W3

Entonces: **Contenido de fibra (%)** = $[(W3-W1) / W2] \times 100$

Notas:

1.- Si la muestra contiene más de 1 % de grasa, extraer con petróleo de la forma siguiente:

Añadir 20 mL de éter de petróleo.

Agitar la muestra y dejarla sedimentar.

Decantar el éter de petróleo.

Repetir este proceso dos veces más y dejar secar la muestra al aire.

2.- Si la muestra no filtra en 10 min., repetir la determinación utilizando menor cantidad de material.

5.3.4 Determinación de proteína cruda (2001.11)

La determinación de proteína se realizó por el método de Kjeldhal, el cual consiste en convertir el Nitrógeno proteínico en Nitrógeno amoniacal, y por medio de una titulación conocer el porcentaje de Nitrógeno liberado.

Se pesa 1 g de muestra homogeneizada. Esta muestra es agregada al digestor junto con 5 g de catalizador, el cual consiste en una mezcla de 3.5 g de sulfato de Na y 0.4 g de sulfato cúprico. Después se agrega a esto 10 mL de ácido sulfúrico.

Los tubos se calientan hasta que adquieran un color verdoso, se dejan enfriar y se transfieren al destilador "rapid Still" II de Labconco. En el destilador se colocan aproximadamente 50 mL de una solución de hidróxido de Na a 40 %.

En los matraces de recolección se colocan 25 mL de ácido bórico con indicador de verde de bromocresol y rojo de metilo, en los cuales se colecta el destilado. Éste se titula con una solución de HCl 0.1 N. Posteriormente se realiza el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{\text{mL HCl (Normalidad de HCl) } 0.014 \times 100}{\text{Peso de la muestra}} \times 6.25$$

5.3.5 Determinación de extracto etéreo (920.39)

a) Preparación de la muestra: Se toman tres muestras del polvo de nopal y se manejan de manera independiente, la muestra se homogeneiza y se seca durante 2 h a 110° C, guardándose en bolsas de polietileno dentro de un desecador.

Los matraces de fondo plano se colocan a peso constante, en la estufa durante 1 h a 110° C, después de lo cual se transfieren al desecador.

Se pesa el matraz y se registra como peso uno (W_1).

Se pesan 2 g de muestra y se coloca en un cartucho de papel filtro de 15 cm de diámetro. Se coloca el cartucho en el contenedor del aparato Soxhlet para extracción de grasa.

Se coloca el éter etílico en el matraz teniendo cuidado de no tocar el matraz con las manos, ya que tienen grasa y podría alterarse el peso.

Se ensambla el equipo Soxhlet completo y se verifica que el agua fluya a través del refrigerante.

Se enciende la parrilla y se calienta hasta que el goteo sea de cuatro a cinco gotas por segundo. Una vez que se consiga el goteo deseado, se evita que el éter alcance el punto de ebullición de manera violenta, ya que esta reacción podría ser peligrosa, por lo tanto, se cuida que la temperatura no sea muy alta. Se toma el tiempo y se espera un lapso de cuatro horas.

Después de transcurridas las cuatro horas, se recupera el éter y se apaga la parrilla. Se elimina el éter restante en el matraz con el calor que queda en la parrilla y se deja enfriar.

Se coloca el matraz en el desecador por unos 10 min. Posteriormente, se pesa el matraz y se registra como peso dos (W_2). Posteriormente se realizan los cálculos siguientes:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{W_2 - W_1}{W \text{ muestra}} \times 100$$

5.3.6 Determinación de extracto libre de nitrógeno (ELN) [JAOAC 69, 777 (1986)]

El extracto libre de nitrógeno se calcula por diferencia de los demás componentes en la muestra de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{ELN} = 100 - (\% \text{ Proteína} + \% \text{ grasa} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ fibra cruda} + \% \text{ humedad})$$

5.3.7 Determinación del contenido de Taninos (Jean, 1998)

El contenido de taninos en el nopal se realizó colorimétricamente utilizando vainillina como reactivo cromóforo y catequina como tanino patrón.

Se trabajó con una muestra molida y seca. Se pesaron 0.500 g de muestra en tubos de ensaye y se le añadieron 5 ml de ácido clorhídrico al 1% en metanol y se agitó durante 20 minutos. Los tubos se decantaron y se tomó una alícuota de 1 mL, a la que se agregaron 5 mL de vainillina al 2% en ácido clorhídrico: metanol 1:25. Se dejó desarrollar el color durante un periodo de 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 500 nm, empleando como blanco una solución preparada con la mezcla de 1 mL de la muestra y 5 mL de ácido clorhídrico: metanol 1:25. El contenido en taninos se obtuvo a través de una curva de calibración utilizando catequina como estándar. El análisis se realizó por duplicado.

Curva de calibración de catequina

Se pesó 10 mg de catequina en la oscuridad; se llevó a 50 mL en un matraz aforado con metanol. Estas diluciones se prepararon a partir de la fórmula (señalada en cálculos), para determinar las concentraciones de las soluciones. De la solución preparada se tomaron 25 mL y se aforaron nuevamente a 50 mL. Se repitió el procedimiento 9 veces más, considerando que en cada solución es necesario hacer una limpieza de metanol por lo menos 3 veces. Se dispone del número de tubos necesarios para elaborar la curva incluyendo 2 blancos y factores de corrección. Es importante considerar que los tubos deben ser del mismo tamaño y recordar el orden de menor a mayor concentración, pues los tubos no se deben marcar. De acuerdo a las soluciones hechas se toma 1 mL (como son 3 tubos de M1, M2 y factor de corrección serán 3 mL). Además de que exclusivamente a las muestras se les adicionó 5 mL de la solución compuesta por el reactivo de vainillina y HCl al 8%.

El blanco está constituido por una mezcla de metanol (1 mL) y 5 mL de reactivo de vainillina. Otro blanco consistió en una solución de HCl al 4%.

Los tubos se ordenaron conforme a lo establecido, y se colocaron en un baño con agua durante 30 minutos a 30°C. Se consideran 5 minutos para alcanzar la temperatura y 25 minutos para que se desarrolle el complejo colorido.

Encender el espectro antes de iniciar la técnica y calibrarlo a 500 nm. La celda debe lavarse con metanol y agua, enseguida se seca con papel absorbente. La técnica se inicia

calibrando el equipo con el blanco de metanol, enseguida se miden las muestras. Deben llevarse a cabo dos repeticiones para cada concentración de catequina correspondiente a la curva de calibración. Se concluye con el blanco de factor de corrección y se calibra.

Procedimiento para la determinación de taninos

A fin de obtener resultados reproducibles, esta técnica debe efectuarse en total oscuridad, acorde con el procedimiento que se describe a continuación:

Pesar 500 mg de muestra de nopal en polvo y colocarla en tubos falcón. Agregar 10 mL de metanol y cerrar el tubo herméticamente. Colocar los tubos en el Vortex a 8 rpm durante 10 minutos. Anotar la hora en que finalizó la agitación de los tubos en el Vortex. Colocar los tubos en una gradilla y se almacenan en oscuridad durante 24 hrs. Sacar los tubos y colocarlos en una centrifuga a 5 rpm durante 5 minutos. Los tubos deben quedar ordenados nuevamente en la gradilla, evitando que se mezcle el nopal con el metanol. En otra gradilla, ordenar una fila de dos tubos, para las muestras de nopal con metanol, se llevan a cabo dos repeticiones; en esta fila se coloca 1mL de la muestra incluyendo 20 mL de vainillina y 20 mL de HCl al 8%. Una vez realizada esta operación para cada tubo, debe mezclarse por un espacio de un minuto en el Vortex. Contiguo a esta fila de dos tubos, se colocará el factor de corrección, uno para cada muestra, en donde se colocarán 1mL de metanol, 5 mL de reactivo de vainillina y 5 mL de HCl al 4%. De la misma manera, debe colocarse un blanco para las muestras de nopal, y otro para los factores de corrección. Estos últimos deben contener 5 mL de HCl al 4%. Las muestras de tubos preparados deben colocarse en un baño a una temperatura de 30°C durante 25 minutos. Pasado el tiempo se dejan enfriar durante 25 minutos. Se lee en el espectrofotómetro a 500 nm; primero se lee el blanco de las muestras y posteriormente, se comienza a leer las dos muestras problema registrando las absorbancias 1 y 2. Al finalizar se lee el blanco del factor de corrección y se comienzan a leer estos factores, a fin de obtener su respectiva absorbancia. Realizar los cálculos de acuerdo a la fórmula.

Con los datos analizados sobre la relación de catequina y su absorbancia determinada por el método Uv-vis, debe establecerse a través del análisis estadístico el valor de R. para que este valor sea confiable, deberá obtenerse en la gráfica una línea recta de acuerdo a la ecuación, en consecuencia el valor R deberá acercarse a 1. Un valor cercano a 1 determinará que los datos son confiables.

Cálculo:

Para la determinación de concentración de catequina $C_1V_1=C_2V_2$

Dónde:

C_1 =Catequina (mg)

V_1 = es metanol (volumen = 5 mL)

V_2 = metanol de aforo (volumen = 10 mL)

La determinación de taninos se realiza con la siguiente ecuación:

$$y = mx + b^*$$

5.3.8 Determinación del contenido de Oxalatos por absorción atómica

Se determinó el oxalato de Ca contenido en las muestras de polvo de nopal a diferentes estados de maduración. El contenido de oxalato de Ca fue determinado acorde al método oficial AOAC (2000) 974.24. La concentración de oxalato de Ca fue determinado con un espectrofotómetro de absorción atómica (Analyst 300 Perkin Elmer, USA) de doble haz, equipado con una lámpara de deuterio, corrector de fondo y una lámpara de cátodo cóncavo, bajo las siguientes condiciones de operación: aire (12 psi), acetileno (70 psi), flama (422.7 nm), lámpara en boga 10 mA y 0.7 nm de ancho de corte. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

5.3.9 Determinación del contenido de minerales en el polvo de nopal

5.3.9.1 Espectrofotometría de Absorción Atómica.

Técnica espectroscópica con fines analíticos de forma destructiva que determina cuantitativamente la presencia de elementos en una muestra determinada.

Para determinar un analito en una muestra, es necesario proporcionarle energía a los átomos y subir el nivel a los electrones, lo que se lleva a cabo en el equipo utilizando una lámpara de cátodo hueco que debe de ser del analito que se desea analizar, por ejemplo, en este caso Ca. En este nivel, los electrones están en un estado excitado con muy poca estabilidad, tratando de regresar a su nivel original.

Los electrones de un átomo en estado basal absorben un cuanto de energía, es decir, tienen una transición de un nivel de baja energía, a uno de alta energía; cuando el

electrón regresa al estado base hay emisión de luz. Se genera una serie de líneas a longitudes de onda bien determinada, a la cual se le conoce como espectro, que es detectado por un espectrofotómetro y que es específica para cada uno de los elementos. La absorción de energía y la concentración del analito están cuantitativamente relacionadas con la ley de Lambert-Beer (Amezquita 2000, Skoog y Learly 1994).

Para el análisis cuantitativo del Ca presente en las harinas de nopal y los huesos, se siguió la metodología descrita por la AOAC (2000) 968.08 y 944.24 respectivamente. Los componentes orgánicos de las muestras fueron eliminados previamente a 550°C por 24 horas. Las muestras fueron digeridas en un digestor de microondas de alta productividad en vasos de teflón (Mars Xpress Marca CEM) siguiendo el programa de tiempo y potencia que se describe en la tabla 5.1. La preparación de las muestras consistió en pesar 0.2 g de muestra (OHAUS 700 SERIES) en cada uno de los vasos y posteriormente añadir HNO₃, grado INSTRA (JTBACKER), la cantidad de muestra y de reactivo para cada una de las variables se describe en la tabla 5.2. Una vez digeridas las muestras, estas se aforaron a 100 mL.

| Rampa | % | Tiempo (min) | Temp. (°C) | Tiempo (min) |
|-------|-----|--------------|------------|--------------|
| 1 | 100 | 10 | 60 | 10 |
| 2 | 100 | 10 | 100 | 10 |
| 3 | 100 | 10 | 100 | 10 |
| 3 | 100 | 10 | 200 | 15 |

Tabla 5.1. Programa de digestión utilizado en la preparación de las muestras de harina de nopal y huesos para la determinación de Ca.

| Tipo de muestra | Muestra (g) | HNO ₃ (ml) |
|-----------------|-------------|-----------------------|
| Harina de nopal | 2 | 10 |
| Huesos | .1 | 6 |

Tabla 5.2 Preparación de muestras de harina de nopal y huesos, para digestión en microondas.

Al término de la digestión, se determinó Ca endógeno exclusivamente en las harinas de nopal utilizando un espectrofotómetro de doble onda (Analyst 300 Perkin-Elmer, USA) equipado con una lámpara de deuterio, fondo corrector y una lámpara con cátodo cóncavo, bajo las siguientes condiciones: aire (12psi), acetileno (70psi), flama 422.7nm,

lámpara en boga 10mA y 0.7 nm ancho de corte. En dicho equipo se introduce el nebulizador a la muestra previamente aforada y se hace incidir la luz en una lámpara de cátodo hueco a través de una muestra vaporizada por una flama, en la que los átomos en estado basal absorben luz, disminuyendo su intensidad. Se eligió la longitud de onda de 422.7 nm para el Ca, 202.6 nm para el Mg, 769.9 nm para el K, 330.2 nm para el Na, 248.3 nm para el Fe y 213.9 nm para el Zn. El porcentaje de absorción registrado por el detector es una medida de la concentración del elemento de la muestra. Para estas muestras la determinación de P se describe posteriormente.

5.3.9.2 Determinación de fósforo por Espectrofotometría de UV-VIS.

En la región visible y ultravioleta se estudian también principalmente con fines analíticos, los espectros moleculares de fluorescencia y de fosforescencia.

La radiación visible y ultravioleta excita a los electrones más externos o electrones de valencia, de los átomos y de las moléculas.

Estos electrones en general tienen energías del orden de 1-20 electronvolt (ev), por lo que según la transición electrónica de que se trate la radiación absorbida correspondiente puede pertenecer a la zona ultravioleta o a la zona visible del espectro (Ley de Lambert-Beer) (Amezquita 2000; Skoog y Learly 1994).

La excitación de los electrones de valencia puede ser provocada por un choque electrónico, por absorción de radiación de la frecuencia apropiada o por temperaturas elevadas.

Es evidente que la longitud de onda de la radiación absorbida es inversamente proporcional a la energía de excitación. Los grupos más fácilmente activados absorben a longitudes de onda mayores (de menor energía). Las configuraciones moleculares que poseen la propiedad de absorber radiación son coloreadas en la luz visible o aparecerían coloreadas en la luz ultravioleta si el ojo humano fuera sensible a esta radiación (Brown y Sallee 1977).

Se determinó P en harinas de nopal en un espectrofotómetro UV-VIS (Termo Cientific Evolution 300), empleando celdas de 15 mm a una longitud de onda de 400 nm. Siguiendo la metodología descrita por la AOAC, 2000 (965.17) donde inicialmente se determinaron cenizas a las muestras siguiendo la metodología descrita anteriormente Cenizas (942.05).

Una vez obtenidas las cenizas, se colocaron en vasos de precipitados, se les agregó 40 mL de ácido clorhídrico (HCl 1+3) y 10 mL de ácido nítrico HNO₃, se taparon con vidrios de reloj y se calentaron las muestras en una parrilla hasta punto de ebullición, manteniéndose de 10 a 15 minutos. Transcurrido este tiempo se dejaron enfriar, se transfirieron a un matraz de 100 mL y se aforaron con agua destilada (filtrándose con

papel Whatman No. 541-110 mm). Posteriormente se tomaron 10 mL del filtrado obtenido añadiendo 10 mL de reactivo de Molibdovanadato (ver anexo 1) y se aforaron a 100 mL. Se preparó la curva de calibración (ver Anexo 2) y por último se analizaron las muestras.

5.3.9.3 Espectrofotometría de plasma acoplado a masas.

El término espectroscopia se ha utilizado además para designar otros diferentes campos, en los que se estudian espectros de diversos tipos de partículas, cuya separación se consigue por su distinta energía, su masa u otra propiedad.

En la espectroscopia de masas, se obtienen espectros de iones atómicos o de fragmentos moleculares, de acuerdo con la relación de carga o masa de cada elemento (Morzillo and Orza 1972).

En las muestras de hueso, se determinaron algunos minerales importantes que intervienen en el metabolismo del Ca, por medio de un espectrómetro de emisión de plasma acoplado inductivamente en un equipo Termo Jarrel Ash, Modelo IRIS/AP (Termo Jarrel Ash Corp., Franklin, MA., E.U.A) utilizando un valor de $317.933 = \lambda$, orden = 83 para huesos. Y para harina de nopal la lectura se realizó en un equipo de espectroscopia de absorción atómica de doble onda (Analyst 300 Perkin Elmer, USA) cuyas características se mencionaron anteriormente

5.4 Elaboración de las curvas normales de crecimiento, pruebas mecánicas, cristalización de Hap y contenido de minerales en hueso.

Los parámetros a evaluar para realizar las curvas basales fueron crecimiento, pruebas mecánicas, calidad de cristalización de Hap (difracción de rayos-X) y contenido de minerales en hueso (absorción atómica y Uv-vis AOAC, 2000); se tomaron 156 ratas de la raza Wistar de ambos géneros, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio del centro de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla del Estado de Querétaro. Estos animales fueron alimentados con el pellet LabDiet (5001 rodent diet). Este pellet es similar a la dieta AIN-93 G para gestación y crecimiento (Reeves *et al*, 1993).

Se obtuvieron animales de diferentes edades, empezando por el destete (3 semanas de edad) y se sacrificaron hasta la edad de 4 meses (16 semanas de edad). El sacrificio de los animales fue por aspiración de gas (bióxido de carbono) y posteriormente se realizó la disección para extraer los dos fémures de cada animal; éstos fueron congelados inmediatamente en solución fisiológica, hasta su posterior procesamiento.

Los huesos fueron fijados con paraformaldehído y limpiados de tejido. A continuación se secaron en una estufa por 12 hrs. a 90°C (Griffith and Farris, 1942). Una vez secos se pesaron y se guardaron en bolsas de polietileno selladas hasta su posterior utilización para realizar las evaluaciones necesarias.

5.4.1 Crecimiento (Peso y talla)

El desarrollo físico de las ratas está relacionado a los cambios en el esqueleto y el músculo, los cuales dependen dramáticamente de cuatro factores: genética, condiciones de alimentación, ejercicio mecánico y hormonal (Fernández-Tresguerres et al., 2010). Sin embargo los cambios que pudieran darse en alguno de estos parámetros tienen importantes efectos en el desarrollo y el mantenimiento del hueso.

Para registrar el crecimiento, se realizaron medidas de peso y talla semanalmente (figura 5.2), empezando en la 3ª semana de edad hasta la 16ª semana de edad. Los animales fueron mantenidos en condiciones de bioterio, siguiendo los lineamientos para el manejo de animales de la National Research Council (2003), ciclo de Luz/Oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 07:00 h), humedad aproximada de 45-55% y temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$, evitando factores de alteración como ruidos, manejo excesivo y lesiones. Los animales fueron alimentados con el pellet LabDiet (5001 rodent diet). Este pellet es similar a la dieta AIN-93 G para gestación y crecimiento (Reeves et al, 1993).



Figura 5.2 Registro de peso y talla en las ratas de la cepa Wistar

5.4.2 Longitud y peso del fémur

Se determinó también la longitud de fémur de las ratas de la cepa Wistar de diferentes edades y ambos géneros. Para lo anterior, se diseccionaron los fémures y posteriormente fueron introducidos en una solución de paraformaldehído al 4%, para eliminar el tejido muscular. Posteriormente, los fémures fueron introducidos en una solución buffer para eliminar el exceso de paraformaldehído, y finalmente se introdujeron en agua destilada para eliminar el buffer residual. Enseguida, los fémures fueron secados a 90°C por 12 horas (Griffith y Farris, 1942). La longitud y peso de los fémur secos, fueron determinados de acuerdo a la metodología de Gómez-Aldapa y col. (1999).

5.4.3 Resistencia a la fractura del fémur (Pruebas mecánicas)

La fuerza requerida para romper los huesos está relacionada con la cantidad de minerales retenidos en el tejido óseo de las ratas (Serna-Saldivar *et al*, 1991), lo cual se puede relacionar directamente con la biodisponibilidad del Ca presente en los alimentos.

La fuerza al corte fue medida usando un equipo Texture Analyzer (TA), modelo TA-XT2 (Texture Technologies Corp.), equipo diseñado para determinar la fuerza a la tensión y a la compresión. El cual tiene una celda de carga (sensor de fuerza) de 245 N de capacidad con una sensibilidad de 0.00098 N, operado con la ayuda de un software. Como resultado se obtuvieron gráficos de fuerza-distancia-tiempo en unidades de Kgf o N.

La prueba se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Gómez-Aldapa y col. (1999), usando una cuchilla TA-90 de 3 mm de grueso y 6.93 mm de ancho, la cual se conecta al brazo sensor del texturómetro. Consecutivamente fueron colocados cada uno de los huesos sobre un soporte con un orificio localizado en el centro del mismo, ocasionando que el hueso colocado en esta ranura se fracture bajo la presión de la cuchilla. La compresión fue aplicada transversalmente a una velocidad constante de 2 mm/s y a una distancia de 10mm (figura 5.3). La fuerza máxima requerida para el rompimiento del hueso fue reportada en g-f.

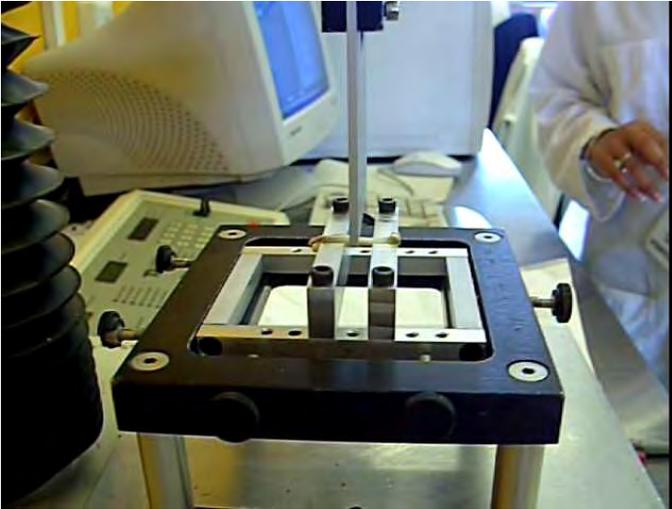


Figura 5.3 Registro de pruebas mecánicas en hueso de la cepa Wistar

5.4.4 Espectroscopía de Rayos-X (Difracción de rayos-X)

La difracción de rayos-X permite estudiar las estructuras cristalinas presentes en el hueso (Godet 1994).

La calidad cristalina de los huesos secos fue medida usando el método descrito por Rodríguez y col. (1995) usando difracción de rayos-X para identificar la fase cristalina y la contribución amorfa sobre el total del espectro. Los huesos se secaron a 40 °C durante 8 h, posteriormente fueron triturados hasta obtener un polvo fino, posteriormente se incineraron a 600°C por 24 hrs, las cenizas fueron molidas hasta un polvo fino que pasa a través de una malla de 150 micras. Las muestras de polvo fueron densamente empaquetadas en un marco de aluminio. De rayos-X patrones de difracción de las muestras se llevaron a cabo mediante el uso de un difractómetro (Siemens D5000) que opera a 35 kV y 15 mA, radiación de Cu $K\alpha$. Los datos fueron recogidos desde 4 hasta 30 ° en la escala de 2θ con un tamaño de paso de 0,05 °.

La difracción de rayos-X se realizó usando un difractómetro Siemens D5000 a 35 Kv y 15 mA, con una radiación de Cu $K\alpha$ y una longitud de onda $\lambda= 1.5406 \text{ \AA}$. Se colocó el polvo de hueso en el portamuestra. Posteriormente se corrió la medición por un tiempo de 70 minutos. Los datos fueron colectados de 4 a 30° sobre una escala de 2θ con un aumento de 0.05°.

5.4.5 Determinación de minerales en hueso: Absorción atómica

La técnica para la determinación de minerales en hueso se detalla en el punto 4.3.8.

El contenido de Ca, Na, K, y Mg en los fémures de rata, se determinó de acuerdo con el procedimiento AOAC 968.08 (1998), utilizando cloruro de lantano. La concentración se midió con un espectrómetro de absorción atómica de doble haz (Analista de 300 Perkin Elmer, EE.UU.) equipado con una lámpara de deuterio, un corrector de fondo y una lámpara de cátodo hueco. El equipo fue operado con 12 psi de aire seco, 70 psi de acetileno, una llama 422.7 nm, una corriente de la lámpara 10 mA. y un ancho de la ranura 0,7 nm.

Con el fin de tener una determinación precisa del contenido de minerales en los huesos de las ratas en función de la edad, se utilizó un certificado de cenizas de hueso como estándar de calibración. El nivel de cenizas de huesos utilizados en este experimento fue certificado por el National Institute of Standards & Technology (NIST), con el material de referencia estándar 1400. Este material de referencia estándar (SRM) está diseñado para uso en la evaluación de métodos analíticos, para la determinación de algunos elementos principales, menores y traza en los huesos y en el material de una matriz similar. Las concentraciones de certificación de los elementos constitutivos se muestran en la tabla 5.3. Estas concentraciones se basan en los resultados de un método analítico definitivo o en base al acuerdo (coincidencia) de los resultados de por lo menos dos métodos analíticos dependientes. En esta tabla, se incluyó el contenido de minerales obtenidos de la misma muestra con AAS en nuestro laboratorio. Nuestros resultados corresponden con lo reportado por el NIST.

| Elemento | Concentración (porcentaje) | Concentración AAS (porcentaje) |
|-----------|----------------------------|--------------------------------|
| Calcio | 38.18±0.13 | 37.70±0.11 |
| Fósforo | 17.91±0.19 | 18.02±1.29* |
| Magnesio | 0.684±0.013 | 0.638±0.021 |
| Hierro | 0.066±0.003 | N/A |
| Potasio | 0.0186±0.001 | 0.0195±0.002 |
| Estroncio | 0.0249±0.001 | N/A |

Tabla 5.3 Concentración de los elementos certificados por el NIST en la muestra de hueso seco, y valores experimentales obtenidos utilizando el método AAS. *Los valores de P fueron obtenidos por UV-VIS, método oficial de la AOAC 985.35.

5.5 Generación de un método alternativo para la determinación de la densidad mineral ósea mediante rayos-X.

5.5.1 Transmisión de rayos-X

Se generó un método alternativo para la determinación de la densidad mineral ósea (DMO), mediante la transmisión de rayos-X (figura 5.4), esto para determinar la densidad mineral ósea de los animales alimentados con las dietas experimentales. Fue necesario buscar una metodología alternativa, debido a que no se contaba con el equipo (densitómetro óseo) para medir la DMO en especies pequeñas. El evaluar el estado mineral de los huesos de los animales experimentales por otros medios, implica un elevado costo, demasiado tiempo, son técnicas en donde se tienen que sacrificar los animales y los resultados que estos animales pudieran arrojar, serían semi-cuantitativos con respecto al resto de los animales del grupo experimental. Por lo que el equipo de trabajo se planteó la siguiente pregunta: ¿Se puede determinar la densidad mineral ósea mediante radiografía digital?



Figura 5.4 Toma de radiografías en animales “*in vivo*”, con el equipo de rayos-X dental y el sensor de imagen (detector).

Como se explicó anteriormente, para determinar la densidad mineral ósea se construyó un sistema de transmisión de rayos-X basado en un equipo dental, al que se le incorporó un detector digital de imagen que permite obtener las radiografías. Este sistema tiene ventajas sobre la radiografía convencional porque no tiene influencia los procesos de revelado, además, la radiografía se obtiene en menos de 5 segundos. Para el registro de la densidad mineral ósea, se partió del cálculo de la densidad óptica por medio de la transmisión de rayos-X está basado en la ley de Beer

Ley de Beer

Cuando los rayos-x interaccionan con la materia, ocurren los fenómenos de dispersión, difracción y absorción. Para estudiar la densidad mineral ósea tal y como se hace en el DEXA, es necesario analizar el fenómeno de absorción, el cual está expresado por la ley de Beer (Maikala R. V., 2009). Esta ley establece la relación exponencial entre la intensidad de entrada, la intensidad de salida medida, el coeficiente de absorción de la muestra y el grosor de la misma, Ecuación 1.

$$I = I_0 \cdot \exp(-\beta_1 \cdot x) \quad (1)$$

Donde I es la intensidad de salida medida por el detector, I_0 es la intensidad de entrada, x es el grosor de la muestra y β es su coeficiente de absorción a la longitud de onda establecida (rayos-X).

El sensor de rayos-x tiene en su interior una placa delgada llamada escintilador el cual se encarga de convertir la energía de los rayos-X en luz visible. El escintilador al igual que la muestra tiene un coeficiente de absorción (β_2) que es considerado en la ecuación 2 de la ley de Beer modificada.

$$\frac{I}{I_0} = \exp[-(\beta_1 \cdot x + \beta_2 \cdot l)] \quad (2)$$

Donde l representa el grosor del escintilador, el valor de $\beta_2 \cdot l$ es una constante del detector (sensor) si el sensor está en la región de trabajo.

La densidad por unidad de volumen es $\rho = m/V$ en g/cm^3 .

Si el volumen se expresa como el producto del área por el grosor ($A \cdot x$), entonces, la ecuación de densidad es:

$$\rho = \frac{m}{A \cdot x} \quad (3)$$

Si sustituimos la relación masa por unidad de área (m/A) por el símbolo σ , la nueva expresión es:

$$\rho = \frac{\sigma}{x} \quad (4)$$

Después de un proceso matemático usando la ecuación 4 y sustituyéndolos en la ecuación 2, la nueva expresión es:

$$-\frac{\rho}{\beta_1} \left[\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) + \beta_2 l \right] = \sigma \quad (5)$$

Donde ρ es la densidad de la muestra en g/cm³, β_1 es coeficiente de absorción de la muestra, $\beta_2 \cdot l$ es una constante del escintilador del sensor y los valores I e I_0 son la densidad óptica de salida y entrada respectivamente.

Esta ecuación 5 se usó para estudiar la densidad mineral ósea de los huesos; si se tiene un hueso de un determinado grosor, es de esperarse que uno más grueso tenga mayor densidad mineral ósea. La figura 2.14 muestra la radiografía del fémur de dos ratas que se tomaron con el equipo dental que se instrumentó. En esta figura se puede observar que el hueso de la rata joven (3 semanas) es más claro a los rayos-X, mientras que el de la rata adulta (16 semanas) es más opaco a esta misma radiación. Este efecto nos permitirá hacer una relación entre la intensidad medida en pixeles y la densidad real de los huesos en función de la edad (curva normal).

Para obtener la curva de densidad mineral ósea basal, se utilizaron grupos de hembras (n=15) y de machos (n=15), mantenidas con agua y alimento (pellet LabDiet, 5001 rodent diet) *ad libitum*. El estudio se llevó a cabo en un lapso de seis meses y tres semanas.

El equipo que se utilizó, consta de una fuente de rayos-X de tipo dental de la marca Satelec X-mind AC (figura 5.5), el sensor de rayos-X (figura 5.6) y el software de captura desarrollado en C++ Builder. La figura 5.7, muestra el diagrama del equipo. La calibración del conjunto fuente de rayos-X y sensor se hizo tomando en cuenta distancia y tiempo de exposición, las cuales se corrieron en una misma prueba. La primera de ellas se enfoca en determinar la distancia óptima para la toma de la radiografía y la segunda es para analizar el tiempo de exposición (tabla 5.4) adecuado para que el sensor no se sature (la radiografía no se vea muy oscura o muy clara). Esta prueba se realizó usando hueso de res.



Figura 5.5 Fuente de rayos-X dental.



Figura 5.6 Sensor de imagen de rayos-X

| Tiempo de exposición (Segundos) | |
|---------------------------------|-------|
| T1 | 0.800 |
| T2 | 0.100 |
| T3 | 0.125 |
| T4 | 0.160 |
| T5 | 0.200 |

Tabla 5.4 Tiempos de exposición predeterminados en la fuente de rayos-X

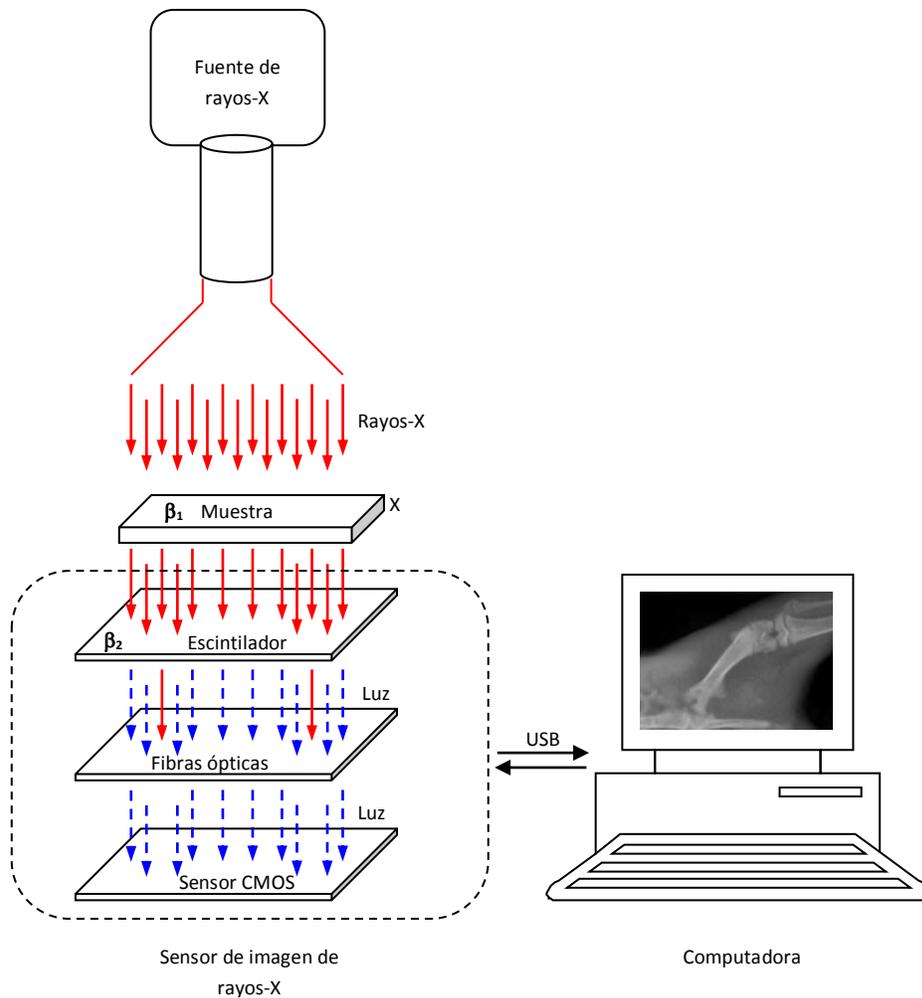


Figura 5.7 Diagrama del sistema de rayos-X

Obtención de la distancia y tiempo de exposición óptimo

La muestra analizada en esta prueba es de hueso de res limpio de tejido, al cual se le tomaron radiografías bajo el siguiente procedimiento.

- 1.- Se ajustó el cilindro colimador de la fuente de rayos-X frente al sensor dejando una distancia entre ellos de 2.5, 4 y 8 cm.
- 2.- Se tomaron radiografías con cada tiempo de exposición en cada una de las distancias descritas anteriormente.
- 3.- Se procesaron las radiográficas en computadora tomando una región de interés (RDI) de 0.25cm^2 que equivale a un pequeño cuadrado de 83×83 píxeles, posteriormente se

analizaron sus histogramas con el objetivo de cuantificar el nivel de gris y la cantidad de píxeles en la RDI.

4.- Se graficaron los datos obtenidos tomando en cuenta la media \pm SE

Una vez establecidos la distancia y tiempo de exposición a utilizar, se procedió a tomar las radiografías (figura 5.8) del grupo control que consta de 15 ratas hembras y 15 ratas machos, ambos de la cepa Wistar (figura 5.9).



Figura 5.8 Toma radiográfica de fémur de ratas del grupo control.



Figura 5.9 Ratas del grupo control.

Calculo de densidad mineral ósea mediante el análisis de imágenes radiográficas (determinación de la curva basal de densidad mineral ósea en ratas de la cepa Wistar bajo condiciones normales)

Densidad óptica.

Es la relación de intensidades en un área determinada en píxeles y el área de esa sección expresada en cm^2 . Para calcular la densidad óptica, veamos un ejemplo:

Necesitamos seleccionar una RDI de la imagen de interés. Los niveles de gris de la RDI en cada píxel se ilustran a continuación (Tabla 5.5).

| | | |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 1 |
| 1 | 2 | 3 |
| 2 | 4 | 0 |

Tabla 5.5. Niveles de gris de cada píxel de la RDI seleccionada en la imagen.

Se necesita obtener el histograma (H) de la RDI (Tabla 5.6); el histograma es una tabla que muestra la cantidad de píxeles que tienen el mismo nivel de gris en la imagen.

| | | | | | | | |
|---------------|---|---|---|---|---|-----|-----|
| Píxeles | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | ... | N |
| Nivel de gris | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | ... | 255 |

Tabla 5.6 Histograma de la RDI

Ahora bien, se obtiene el histograma acumulado (H_A) de la RDI, que es la sumatoria de cada nivel de gris en el histograma, multiplicado por la cantidad de píxeles encontrados con ese nivel de gris, y éstos a su vez se van acumulando hasta recorrer todos los niveles (0-255, Negro a blanco respectivamente).

$$\text{Suma total de intensidad en RDI} = \sum \text{Nivel de gris} * \text{Píxeles} = 0*1+1*3+2*3+3*1+4*1=16$$

El área en píxeles de la RDI es: 3x3 Píxeles, suponiendo que un lado de la RDI mide 0.1cm, el área total sería de 0.01cm^2 .

La densidad óptica es:

$D.O = \text{Suma total de intensidades en RDI (Histograma acumulado)} / \text{Área en cm}^2 \text{ de RDI.}$

$D.O = 16 \text{ Píxeles} / 0.01 \text{ cm}^2 = 1600 \text{ Píxeles/cm}^2.$

Siguiendo el mismo procedimiento, se calculan las densidades ópticas de cada RDI en las radiografías; la RDI es un cuadro de 2 mm^2 , lo que equivale 67×67 Píxeles y se grafican en Origin 7.5.

Del análisis de los histogramas se toman los valores de intensidad en píxeles por unidad de aérea, estos valores se alimentan en la ecuación de la ley de Beer modificada (Ecuación 5) la cual relaciona los píxeles con la densidad mineral ósea.

Con esta ecuación, se obtiene una curva que relaciona la intensidad de los píxeles de la radiografía en la región de interés con la densidad mineral ósea de la misma. La gráfica de densidad mineral ósea calculada con la ecuación 5 para machos y hembras se muestra en la figura 6.16.

La figura 5.10 muestra una imagen digitalizada de la radiografía de fémur de rata de tres semanas de edad. Es importante recalcar que las pruebas de rayos-X se realizaron en el animal "*in vivo*" sobre ambos fémures.



Figura 5.10 Imagen digitalizada de la radiografía de fémur de rata "*in vivo*", macho de tres semanas de edad.

5.6 Elaboración de las dietas experimentales

5.6.1 Dieta para la generación del modelo de desnutrición

Las dietas experimentales para la generación del modelo de desnutrición, consistieron en una dieta control, se partió del pellet LabDiet (5001 rodent diet). Este pellet es similar a la dieta AIN-93G (gestación y crecimiento) y una dieta experimental pluricarencial con un aporte del 60% del requerimiento de todos los nutrimentos incluido el Ca (40% menos del requerimiento total de la rata). Ésta dieta fue elaborada en base a los requerimientos para la rata Wistar de la dieta AIN-93G. Se molieron los pellet para conseguir la harina y poder mezclarla con el alphascel; una vez ya mezclados los ingredientes, se hidrató la harina hasta un 40% y se extruyó en un equipo con las siguientes características: Es un extrusor de fabricación y diseño del CINVESTAV; Capacidad de 50KG/hora; Motor de 20 H. P. de la marca WEG de México e Inversor de la Marca HITACHI SJ300; 4 zonas de calentamiento con controladores de temperatura de la marca Omron E5CN; Cañón de 102.4 cm de largo y diámetro de 70 mm; el Tornillo utilizado es 1:1 con un rompimiento de flujo para mejor mezclado y generación de presión; y alimentador en forma de cono con un motor de 3/4 de H.P. y de la marca SM-CYCLO e inversor de la marca HITACHI L100. Al momento de extruir, la temperatura no pasó los 70°C.

Nota: El inversor es el controlador de las revoluciones por minuto (RPM);

5.6.2 Dieta de restitución para evaluar el efecto del consumo de Ca procedente de nopal sobre la formación de hueso

Las dietas de restitución de Ca fueron dos: una dieta control (pellet LabDiet 5001 rodent diet) al 100%; y una dieta elaborada a base de una dieta control (pellet LabDiet 5001 rodent diet) al 60% (las cual es similar a la dieta AIN-93G) y los nutrimentos por separado, ajustando el requerimiento de Ca (al 100%) con harina de nopal de acuerdo a la metodología de Reeves *et al*, 1993. Ésta dieta fue elaborada en base a los requerimientos totales de la rata Wistar. En las tablas 5.7, y 5.8 se muestra la contribución de minerales tanto de la dieta control AIN-93G y de la harina de nopal utilizada de 400 g, con las cuales se realizaron los ajustes para tener un aporte en Ca del 100% en base al requerimiento de la rata Wistar. Se molieron los pellets para obtener la harina de la dieta control (pellet LabDiet 5001 rodent diet) y poder mezclarla con la harina de nopal. Una vez realizados los cálculos, se mezclaron los ingredientes, se hidrató hasta un 50% y se extruyó en un equipo con las siguientes características: Es un extrusor de fabricación y diseño del CINVESTAV; Capacidad de 50KG/hora; Motor de 20 H. P. de la marca WEG de México e Inversor de la

Marca HITACHI SJ300; 4 zonas de calentamiento con controladores de temperatura de la marca Omron E5CN; Cañón de 102.4 cm de largo y diámetro de 70 mm; el Tornillo utilizado es 1:1 con un rompimiento de flujo para mejor mezclado y generación de presión; y alimentador en forma de cono con un motor de 3/4 de H.P. y de la marca SM-CYCLO e inversor de la marca HITACHI L100. Al momento de extruir, la temperatura no pasó de 32°C. En las tablas 5.9 y 5.10 se muestran las formulaciones de la dieta armada de restitución de Ca.

| Elemento mineral | mg/kg de dieta |
|------------------------------|-----------------------|
| Calcio | 5000.0 |
| Fósforo | 1561.0 |
| Potasio | 3600.0 |
| Azufre | 300.0 |
| Sodio | 1019.0 |
| Cloro | 1571.0 |
| Magnesio | 507.0 |
| Hierro | 35.0 |
| Zinc | 30.0 |
| Manganeso | 10.0 |
| Cobre | 6.0 |
| Yodo | 0.2 |
| Molibdeno | 0.15 |
| Selenio | 0.15 |
| Potencial beneficioso | |
| Silicón | 5.0 |
| Cromo | 1.0 |
| Flúor | 1.0 |
| Níquel | 0.5 |
| Boro | 0.5 |
| Litio | 0.1 |
| Vanadio | 0.1 |

Tabla 5.7 Contribución de elementos minerales de la dieta AIN-93G (mg/kg)

| Elemento mineral | g/100 g |
|------------------|-----------|
| Calcio | 2.92 |
| Fósforo | 3.77 |
| Potasio | 6.995 |
| Sodio | 0.20 |
| Magnesio | 11.0 |
| Hierro | 0.13 |
| Zinc | 0.06 |
| Manganeso | 0.05 |
| Selenio | 0.09 |
| Litio | 0.55 (mg) |
| Vanadio | 2.07 |

Tabla 5.8 Contenido de minerales de la harina de nopal de 400 g ó 100 días de maduración (g/100g)

Para 15 kg: 15 kg ---- 100

X ---- 60%

X= 9 kg de pellet (pellet LabDiet 5001 rodent diet) + 6 kg de dieta armada

| Nutrimento | g/kg | Cantidad para 6 kg (g) |
|------------------------|---------|------------------------|
| Almidón | 397.486 | 2384.91 |
| Caseína | 200.00 | 1200 |
| Almidón dextrinizado | 132.00 | 792 |
| Sucrosa | 100.00 | 600 |
| Aceite de soya | 70.00 | 420 |
| Fibra (alphacel) | 50.00 | 300 |
| Mezcla de minerales | 35.00 | 210 |
| Mezcla de vitaminas | 10.00 | 60 |
| L. cistina | 3.00 | 18 |
| Bitartrato de colina | 2.50 | 15 |
| Tert-butylhydroquinona | 0.014 | 0.084 |

Tabla 5.9 Contenido nutrimental de la dieta armada de restitución (Reeves *et al*, 1993)

Entonces:

2920 mg de Ca ----- 100 g de harina de nopal

5000 mg ----- X

X= 171.23 g de harina de nopal

Por lo tanto, se requieren 171.23 g de harina de nopal para tener los 5000 mg de Ca por kilo de dieta preparada.

Entonces: 828.77 g de dieta armada + 171.23 g de harina de nopal = 1000 g

Entonces para 6 kg:

828.77 X 6 = 4972.62 g de dieta armada

171.23 X 6 = 1027.38 g de harina de nopal

6000 g de dieta

Por lo tanto, el contenido nutrimental de la dieta de restitución con harina de nopal se detalla en el la tabla 5.10

| Nutrimento | 1 kg | 4.972 kg |
|------------------------|-------------|-----------------------|
| Almidón | 397.486 | 1976.30 |
| Caseína | 200.00 | 994.4 |
| Almidón dextrinizado | 132.00 | 656.30 |
| Sucrosa | 100.00 | 497.2 |
| Aceite de soya | 70.00 | 348.04 |
| Fibra (alphacel) | 50.00 | 248.6 |
| Mezcla de minerales | 35.00 | 174.02 (No se agregó) |
| Mezcla de vitaminas | 10.00 | 49.72 |
| L. cistina | 3.00 | 14.91 |
| Bitartrato de colina | 2.50 | 12.43 |
| Tert-butylhydroquinona | 0.014 | 0.069 |

Tabla 5.10 Dieta de restitución complementada con Ca de harina de nopal (g/kg)

5.7 Generación del modelo de desnutrición

Después de obtener la curva de almacenamiento de Ca en hueso a través de la determinación de minerales por AA, ICP y la determinación de la densidad mineral óptica; se procedió a realizar el ensayo biológico experimental para generar el modelo de osteopenia, utilizando ratas hembras de la raza Wistar. Los parámetros a evaluar fueron: peso y tamaño de cada animal, así como la densidad mineral ósea.

Se utilizaron 30 ratas hembras recién destetadas (25 días de nacidas) a las cuáles se les evaluó el estado de la densidad mineral inicial, peso y talla. Éstas ratas fueron alimentadas con la dieta pluricarencial (40 % menos en todo) durante 12 semanas, para provocar una disminución en la densidad mineral. Se evaluó la densidad mineral cada semana por rayos-X y se registró en peso y la talla de cada animal.

5.8 Evaluación del efecto del consumo de Ca proveniente de nopal sobre la formación de hueso a través del modelo de desnutrición desarrollado.

Una vez generado el modelo de desnutrición en las ratas hembras de la cepa Wistar (pasadas las nueve semanas de dieta pluricarencial), el grupo alimentado con la dieta pluricarencial se dividió en tres subgrupos, dos de ellos recibieron dietas completas en cuanto a contenido nutrimental: uno que fue alimentado con la dieta control (pellet LabDiet 5001 rodent diet), y el segundo subgrupo que fue alimentado con una dieta ajustada con polvo de nopal en base al contenido de nutrimentos y de Ca contenidos en el mismo. El tercer subgrupo continuó con la dieta pluricarencial hasta el final del estudio biológico experimental. Las dietas se proporcionaron por 12 semanas. Se registró semanalmente peso, talla; así como la densidad mineral ósea.

5.9 Análisis estadísticos

5.9.1 Análisis químico proximal y contenido mineral del polvo de nopal

El análisis estadístico de las muestras de polvo de nopal, se realizó por triplicado por un análisis de varianza. Se calculó la desviación estándar de cada nutrimento individual con respecto a la media de la etapa de maduración, y las variaciones entre las etapas de maduración, se evaluaron utilizando ANOVA y regresión lineal, con la finalidad de evaluar los cambios relacionados a la edad. El análisis post hoc fue realizado usando la prueba de Tukey con un nivel de probabilidad de 5% ($P=0.05$). Todos los datos estadísticos fueron calculados usando Stat Graphics Plus 5.1.

5.9.2 Elaboración de las curvas normales de crecimiento, pruebas mecánicas, cristalización de Hap y contenido de minerales en hueso.

Los datos del experimento biológico, fueron analizados con el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS), versión 17.0. Las diferencias de los parámetros evaluados (peso corporal, talla, densidad óptica) se compararon con un ANOVA de dos vías para muestras independientes durante los días de registro. Las comparaciones post hoc para días específicos del estudio fueron evaluados con la prueba de "t" de student. La probabilidad de $\leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

VI. Resultados

6.1 Evaluación de la composición química de la penca de nopal

Actualmente, existe una tendencia hacia una nutrición saludable y los avances en la ciencia sugieren una relación cercana entre el consumo de ciertos alimentos y la disminución del riesgo de contraer enfermedades crónicas como osteoporosis o enfermedades del corazón. Estos alimentos denominados funcionales o nutraceuticos, los cuales brindan un valor agregado al alimento, más allá del valor nutritivo original aportan beneficios a las funciones fisiológicas del organismo (Alvídrez-Morales *et al*, 2002). Desde el punto de vista nutrimental, el nopal es considerado como un alimento nutraceutico en virtud de su contenido de minerales, especialmente el Ca (Rodríguez *et al.*, 2007).

6.1.1 Análisis Químico Proximal en Harinas de Nopal

Los resultados de la caracterización química del polvo de nopal se presentan en la tabla 6.1. Se observa que las harinas de nopal presentan importante una disminución en la humedad en comparación con el nopal fresco, lo cual es debido al proceso de secado al vacío (Aguilar y Peña, 2006).

| Nopal edad de las pencas (días) | Nopal peso de las pencas (g) | Humedad (g) | Ceniza (g) | Grasa (g) | Fibra cruda (g) | Proteína (g) | Carbohidratos (g) |
|---------------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| 40 | 100 | 5.03 ^{cd} | 17.65 ^a | 2.16 ^e | 11.00 ^a | 7.07 ^b | 42.94 ^a |
| 50 | 150 | 8.81 ^e | 19.59 ^b | 2.37 ^f | 13.26 ^b | 8.99 ^e | 53.04 ^b |
| 60 | 200 | 5.43 ^d | 20.64 ^c | 2.38 ^f | 16.14 ^c | 8.39 ^d | 53.01 ^b |
| 70 | 250 | 4.85 ^{bcd} | 21.09 ^d | 1.62 ^{bc} | 19.03 ^d | 8.92 ^e | 55.53 ^d |
| 80 | 300 | 4.36 ^{ab} | 21.64 ^e | 1.53 ^{ab} | 18.73 ^d | 7.25 ^b | 53.53 ^{bc} |
| 90 | 350 | 4.81 ^{bc} | 21.92 ^f | 1.50 ^{ab} | 19.12 ^d | 7.78 ^c | 55.15 ^{cd} |
| 100 | 400 | 4.08 ^a | 22.80 ^g | 1.42 ^a | 20.11 ^{de} | 8.29 ^d | 56.73 ^d |
| 115 | 450 | 4.58 ^{abc} | 22.91 ^h | 1.72 ^c | 21.48 ^e | 8.48 ^d | 59.20 ^e |
| 125 | 500 | 4.35 ^{ab} | 20.91 ⁱ | 1.70 ^c | 19.85 ^d | 5.85 ^a | 52.67 ^b |
| 135 | 550 | 4.18 ^a | 24.30 ^j | 1.87 ^d | 23.33 ^f | 7.07 ^b | 60.77 ^e |

*Los resultados de cada componente en función de la edad seguido con la misma letra en la columna, no fueron diferentes significativamente (P<0.05)

Tabla 6.1 Composición química del polvo de nopal (*Opuntia ficus indica*, g/100 g base seca)

El contenido de grasa de los polvos disminuyó en función de la edad; sin embargo, no se observó ninguna relación directa con las etapas de madurez ($R^2 = 0.3319$) tabla 6.1. Las disminuciones observadas se debieron quizás a cambios fisiológicos o condiciones climáticas como precipitación o irrigación donde las plantas crecieron (Sáenz, 1997).

El contenido de carbohidratos en las pencas de nopal muestra un incremento significativo de 42.94 mg/g a la edad de 40 días, hasta 60.77 mg/g a la edad de 135 días. Por otra parte, también se observa una relación directa ($R^2 = .5446$) con respecto a la edad. Como en todos los vegetales, los carbohidratos son el componente principal de las pencas de nopal (Stintzing y Carle, 2005).

El contenido de cenizas, se incrementó en función a la edad de 17.65 (100 g) a 24.30 (550 g); mostrando diferencias significativas en función de la edad. Esto coincide con el incremento en el contenido de Ca. Por otro lado, el contenido de P se mantiene constante, lo que hace que la relación Ca/P se incremente en función de la edad. Sin embargo, la dieta mexicana tiene la ventaja de que es rica en granos como las leguminosas (frijoles), las cuales contienen una cantidad importante de P, lo cual podría complementar en un momento dado al polvo de nopal y mejorar con ello la relación Ca/P, haciendo que el Ca de nopal sea más aprovechable. El análisis de regresión lineal mostró una relación positiva ($R^2 = 0.7158$) con respecto a la edad de las pencas.

Se observa que el contenido de fibra también aumenta con respecto a la edad, mostrando diferencias significativas. Este nutrimento es importante, debido a las diversas funciones que tiene la fibra en el sistema digestivo y que impactan en el estado de salud y asimilación de los nutrimentos de quienes la consumen; tales como disminución de la glucemia y los lípidos en sangre, además de agilizar el tránsito intestinal. Razón por la cual podría proponerse como una fuente de fibra natural consumido en la presentación de polvo, y con ello se aprovecharían las pencas grandes (viejas) de los cultivos. Esto a futuro podría llegar a beneficiar económicamente a los productores de nopal, quienes desechan éstas pencas viejas por no tener un mercado para ellas, desperdiciándose así una fuente de fibra dietética.

6.1.2 Determinación del contenido de Taninos (Jean, 1998)

Se determinó la cantidad de taninos presentes en el polvo de nopal, los cuales se encontraron en muy poca cantidad (8.06 mg/100 g en base seca) Figura 6.1.

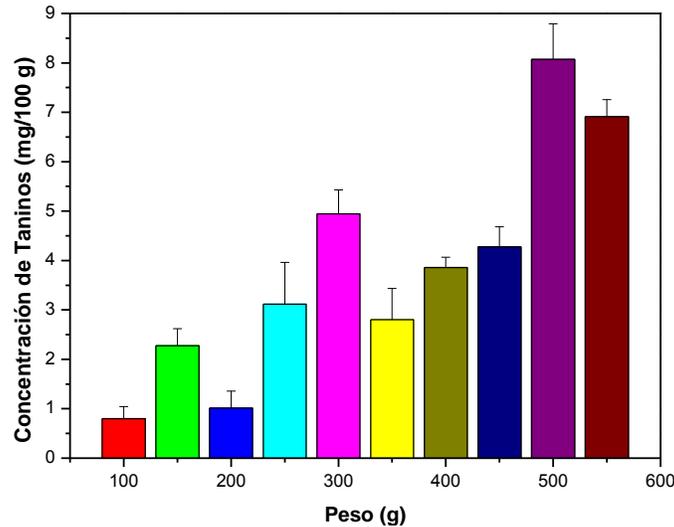


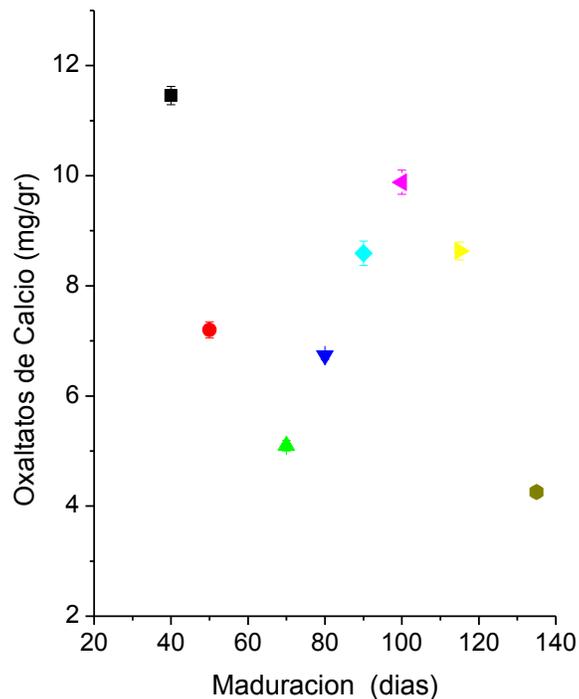
Figura 6.1 Contenido de taninos en el polvo de nopal (g/100 g en base seca)

El contenido de taninos en las pencas de nopal, se modificó en función de su estadio de maduración, como se observa en la figura 6.1, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las muestras analizadas. El comportamiento de ese factor antinutricional en las pencas de nopal permaneció indefinido, es decir, no mantuvo una relación con el estado de maduración de las pencas, como se observó para el caso de los minerales.

En términos generales se detectó un mayor contenido de taninos en las pencas con un peso de 500 y 550 g. A este respecto, se ha establecido que una concentración elevada de este componente antinutricional en los alimentos, puede conferirles un sabor astringente, coagular alcaloides y albúminas, además de ser un agente quelante o secuestrante de metales pesados (Otero e Hidalgo, 2004)

6.1.3 Determinación del contenido de oxalatos en el polvo de nopal

Se determinó el contenido de oxalatos en el polvo de nopal, los cuales se encontraron de la siguiente manera (mg/g) figura 6.2.



(Contreras-Padilla M, et al., 2011)

Figura 6.2 Contenido de oxalatos en el polvo de nopal

Al igual que el contenido de taninos, el contenido de oxalatos de Ca, no mostró un comportamiento definido en función de la edad. Los oxalatos son considerados como antinutrientes, debido a que atrapan el Ca formando complejos que impiden la absorción de éste mineral a nivel intestinal, por lo tanto disminuye su disponibilidad y aprovechamiento por el organismo. Se observa que las pencas de mayor edad, contienen menor cantidad de oxalatos, lo cual pudiera sugerir que el Ca presente en los nopales “viejos” pudiera estar “libre”, con lo cual se favorecería su absorción a aprovechamiento por el organismo.

6.1.4 Determinación del contenido de minerales en el polvo de nopal

El contenido mineral de Ca y Fe incrementó en las muestras de 40 días (100 g) a 135 días (550 g), mientras que P, Mn y Zn no presentaron cambios relacionados con la edad. Sin embargo, se sugiere que algunos elementos de la composición mineral de las cenizas

dependen de diferentes factores como el pH, disponibilidad de agua, textura y composición del suelo donde el nopal creció. Estudios anteriores informaron que los principales elementos de las cenizas son Ca y K, seguido por Mg, Na y pequeñas cantidades de Fe y Mn (tabla 6.2 y 6.3). Estos elementos están presentes en carbonatos, cloruros, sulfatos y fosfatos (Granados y Castañeda, 1997).

| Mineral | Estado de madurez (edad- días) (mg/g) | | | | | | | | | |
|------------------|---------------------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 115 | 125 | 135 |
| Fósforo | 2.59 ^a | 4.26 ^b | 4.48 ^b | 4.39 ^b | 4.06 ^b | 4.60 ^b | 3.77 _{abc} | 5.00 ^c | 3.15 ^a | 3.94 ^c |
| Manganeso | 0.29 ^a | 0.06 ^a | 0.07 ^a | 0.05 ^a | 0.08 ^a | 0.05 ^a | 0.05 ^a | 0.05 ^a | 0.03 ^a | 0.08 ^a |
| Hierro | 0.09 ^a | 0.09 ^a | 0.10 ^a | 0.12 ^b | 0.12 ^b | 0.134 _b | 0.132 _{bc} | 0.14 ^c | 0.16 | 0.22 |
| Zinc | 0.08 ^a | 0.06 | 0.04 | 0.08 | 0.03 | 0.04 | 0.06 | 0.05 | 0.04 | 0.06 |
| Magnesio | 8.80 ^a | 10.60 ^e | 11.20 ^f | 11.5 ^g | 10.2 ^d | 12.00 _h | 11.00 ^f | 11.95 _h | 8.95 ^b | 9.55 ^c |
| Calcio | 17.95 | 22.10 ^a | 24.00 ^a | 27.00 _b | 28.35 _{bc} | 28.65 _{bc} | 29.20 _{bc} | 29.15 ^c | 30.70 ^c | 34.40 |
| Potasio | 55.20 ^a | 64.75 _{bc} | 70.90 _d | 68.50 _{bcd} | 72.20 _d | 69.70 _{cd} | 69.95 _d | 71.45 _d | 51.80 ^a | 63.35 _b |
| Sodio | 0.30 | 0.40 | 0.30 | 0.35 | 0.55 | 0.35 | 0.20 | 0.50 | 0.20 | 0.30 |

Los resultados de cada mineral en función de la edad seguido con la misma letra en la línea, no fueron diferentes significativamente ($P < 0.05$)

Tabla 6.2. Composición mineral de harinas de pencas de nopal a diferentes estados de maduración (días).

Cuando se analiza el contenido de P, Li, V, Mn, Co, Zn, As, Cd, y Tl; no se observa ningún cambio relacionado con la edad del nopal, tablas 6.2 y 6.3. El contenido de esos minerales podría asociarse con factores ambientales tales como estrés hídrico, composición del suelo o cambios en las condiciones meteorológicas.

| Estado de madurez (edad- días) (mg/100 g) | | | | | | | | | | |
|---|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Mineral | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 115 | 125 | 135 |
| Litio | 0.80 | 0.23 | 1.0 | 1.4 | 0.99 | 0.07 | 0.55 | 0.18 | 0.19 | 0.29 |
| Vanadio | 0.33 ^a | 1.43 ^b | 1.61 ^b | 1.66 ^b | 2.27 ^b | 2.19 ^b | 2.07 ^{ab} | 0.68 ^a | 0.94 | 0.79 ^a |
| Cobalto | 0.16 ^a | 0.13 ^{ab} | 0.15 ^{abc} | 0.14 ^{bde} | 0.18 ^c | 0.12 ^d | 0.10 ^{de} | 0.15 ^{de} | 0.11 ^e | 0.21 |
| Arsénico | 0.14 | 0.05 | 0.04 | 0.00 | 0.007 | 0.00 | 0.04 | 0.002 | 0.00 | 0.00 |
| Selenio | 0.38 | 0.14 | 0.13 | 0.001 | 0.05 | 0.13 | 0.09 | 0.005 | 0.00 | 0.01 |
| Cadmio | 0.05 | 0.00 | 0.03 | 0.08 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.06 |
| Talio | 0.07 | 0.06 ^a | 0.06 ^a | 0.06 ^a | 0.06 ^a | 0.06 ^a | 0.06 ^a | 0.07 ^a | 0.82 | 0.06 |

Los resultados de cada mineral en función de la edad seguido con la misma letra en la línea, no fueron diferentes significativamente ($P < 0.05$).

Tabla 6.3 Composición mineral traza de harina de pencas de nopal a diferente estado de maduración (días).

6.2 Elaboración de las curvas basales de crecimiento, pruebas mecánicas, cristalización de Hap, densidad mineral ósea y contenido de minerales en hueso.

Los estudios biológicos experimentales, requieren de modelos basales en donde poder realizar comparaciones en de acuerdo a lo que se quiere conocer. El contar con curvas basales en ratas Wistar, servirán como base para desarrollar modelos nutrimentales relacionados con el tema.

Se sacrificaron 156 ratas, se registró el peso, talla y edad de cada animal. Los animales fueron sacrificados por guillotina, se diseccionó el fémur y se mantuvieron las muestras en solución fisiológica para su posterior estudio.

6.2.1 Determinación de la curva de crecimiento (peso y talla) para ratas de la cepa Wistar de diferentes edades y ambos géneros.

En las figuras 6.3 y 6.4, se observa el incremento en el peso y talla de las ratas de ambos géneros desde la 3^a semana hasta la 16^a semana, el incremento se acentúa en las primeras semanas que es cuando ocurre el crecimiento acelerado (Tamaki y Uchiyama, 1995). A partir de la 5^a semana se observa que en los machos se incrementa tanto el peso como la talla a mayor velocidad con respecto a las hembras y a la 3^a semana de edad debido al dimorfismo sexual (Ventura, 2004). De la quinta a la 10^a semana de edad, se observa otro punto crítico, en donde también se observa un incremento importante en peso y talla, durante esta etapa, es cuando se alcanza su madurez sexual. A partir de la 10^a semana,

tanto el peso como la talla continúan incrementándose de manera gradual pero a menor velocidad, con respecto a las primeras semanas de edad. Este comportamiento se observó tanto en machos como en hembras, sin embargo de manera general, en los machos a partir de la sexta y octava semana, ganaron más peso y talla respectivamente, en comparación con las hembras.

El patrón de crecimiento de las ratas, coincide con lo reportado por Friedman *et al*, 1999, que observó un incremento acelerado las primeras semanas y después la velocidad de crecimiento disminuyó.

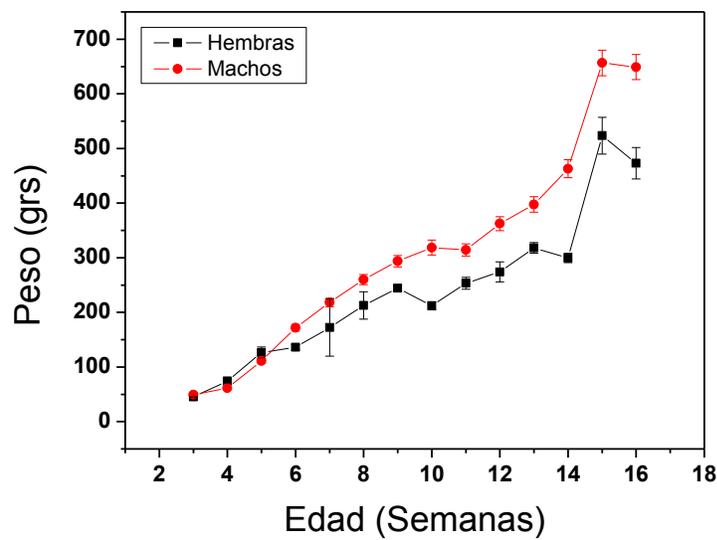


Figura 6.3 Ganancia de peso de ratas de la cepa Wistar en función de la edad. Media \pm EE del peso para ratas de ambos géneros.

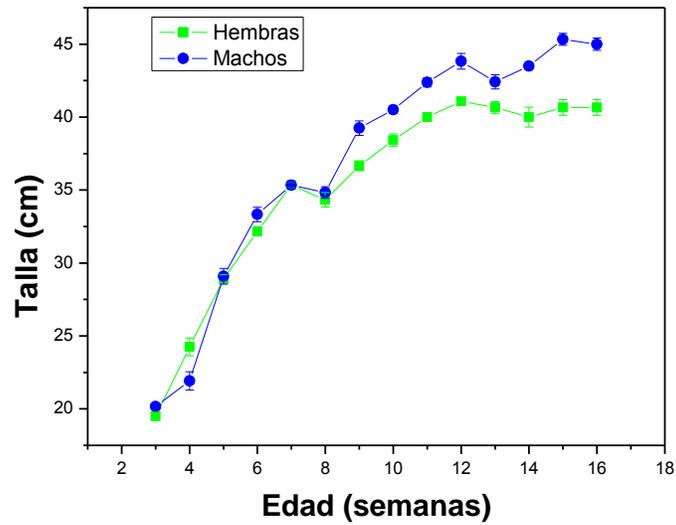


Figura 6.4 Ganancia de talla de ratas de la cepa Wistar en función de la edad. Media \pm EE de la talla para ratas de ambos géneros.

6.2.2 Determinación de la curva de longitud y peso de fémur para ratas de la cepa Wistar de diferentes edades y ambos géneros.

Los fémures de las ratas (Figura 6.5) crecieron de manera acelerada hasta la 10^a semana en los machos y la 8^a semana en las hembras. Después de estas edades, el incremento en longitud fue gradual pero a menor velocidad. Este incremento acelerado, coincide con la ganancia de peso y talla en ambos géneros y coincide con el crecimiento sigmoideo reportado por Tamaki y Uchiyama (1995).

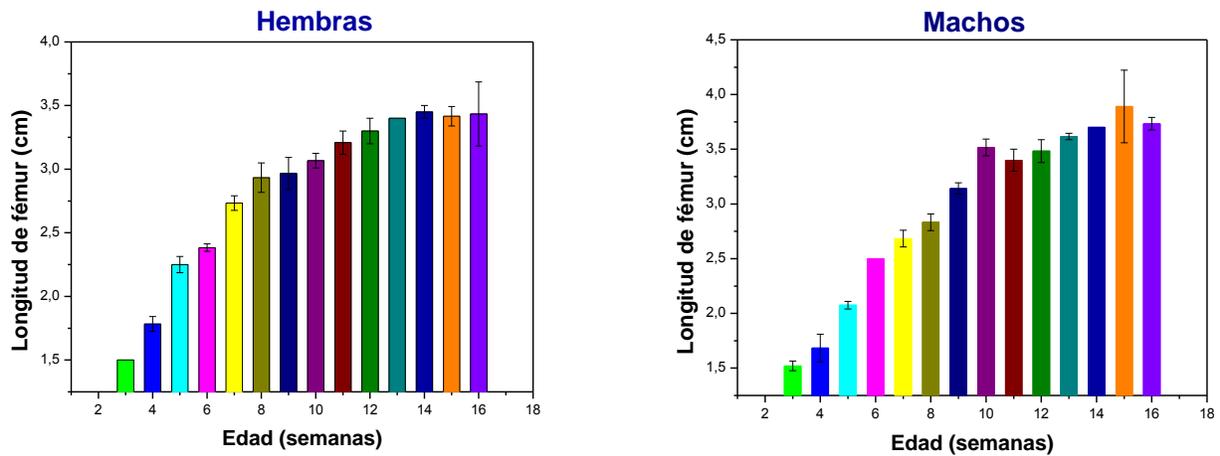


Figura 6.5 Longitud del fémur de rata de la cepa Wistar en función de la edad

La ganancia de peso y longitud del fémur, es gradual en las primeras semanas, acentuándose entre la 7ª y 9ª semana y entre la 13ª y 15ª semana, encontrado tanto en machos como en hembras, figura 6.6.

En términos generales, los cambios registrados en longitud y ancho del cuerpo, se reflejan en un incremento en el peso de los animales. El crecimiento de la longitud y ancho del cuerpo del animal, depende principalmente del crecimiento del sistema esquelético. Así, el crecimiento de varios tejidos y órganos depende del crecimiento del sistema esquelético (Tamaki y Uchiyama, 1995).

Es importante recordar que los parámetros de crecimiento, pueden cambiar dependiendo de las condiciones de vida y/o del medio ambiente donde los animales se desarrollan durante el crecimiento posnatal (Tamaki y Uchiyama, 1995).

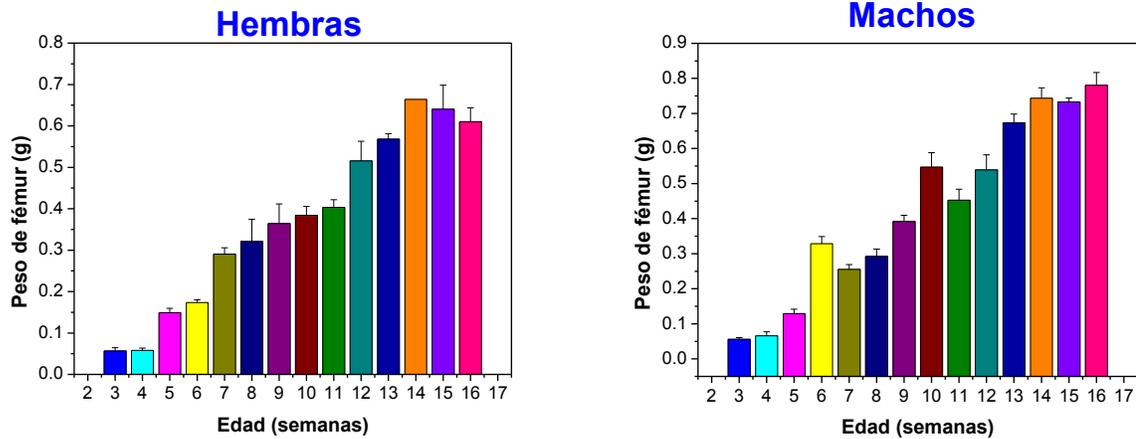


Figura 6.6 Peso del fémur de las ratas de la cepa Wistar en función de la edad

6.2.3 Determinación de la curva normal de pruebas mecánicas para los fémures de ratas de la cepa Wistar de diferentes edades y ambos géneros.

La fuerza requerida para romper los huesos está relacionada con la cantidad de minerales retenidos en el tejido óseo de las ratas (Serna-Saldivar y col. 1992), lo cual se puede relacionar directamente con la biodisponibilidad del Ca presente en los alimentos. En este trabajo se estudió la resistencia a la fractura en ratas de la cepa Wistar bajo condiciones normales, para obtener una curva basal, la cual sirviera como comparativo en estudios biológicos experimentales relacionados con el tema.

La figura 6.7, muestra la resistencia a la fractura de los fémures de ratas de la cepa Wistar en función de la edad. Los resultados muestran un comportamiento sigmoideo en las pruebas mecánicas, acorde con la ganancia de peso y por lo tanto con el desarrollo de los animales, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

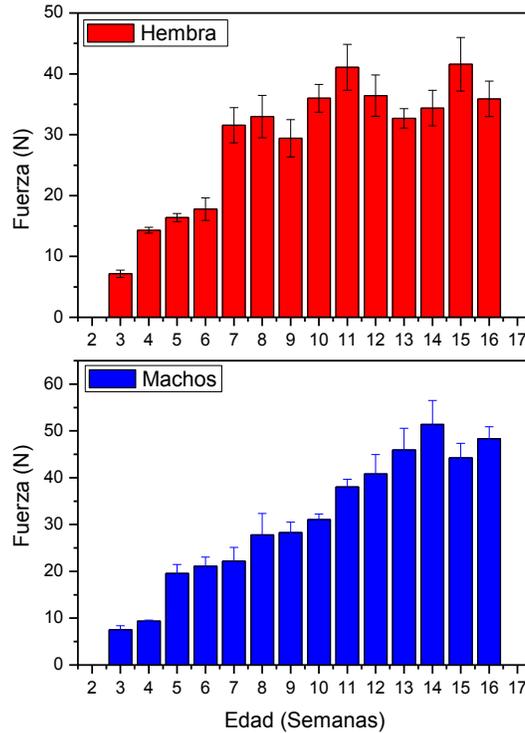


Figura 6.7. Pruebas mecánicas de los fémur de las ratas de la cepa Wistar en función de la edad

Los valores de resistencia a la fractura fueron menores en los machos entre la séptima y la décima semana con respecto a las hembras. A partir de la 5ª semana, se incrementó gradualmente la resistencia tanto en machos como en hembras, llegando a mostrar mayor resistencia a la fractura los machos especialmente a partir de la décimo primer semana; éstos resultados coinciden con los picos encontrados en las curvas anteriores, donde se gana peso por incremento de talla en éstas edades. Estos resultados como se verá masa adelante están directamente relacionados con los cambios en la composición química del hueso, así como a los cambios fisiológicos debidos a factores hormonales. Las características físicas del hueso, incluyendo las dimensiones y distribución de los cristales de Hap, afectan las propiedades mecánicas del hueso (Su *et al*, 2003). La dureza del hueso es resultado del depósito, en la matriz orgánica, de una sustancia mineral compleja; sobre todo complejos de fosfato de Ca que pertenecen al grupo de minerales de la apatita. La sustancia mineral constituye alrededor de los dos tercios del peso del hueso. Cuando se calcina el hueso (cuando se consumen el agua y el material orgánico) se desintegra.

Cuando se descalcifica se torna flexible. Por su gran contenido de minerales, los huesos son opacos a los rayos-X (O'Rahilly et al, 1989).

6.2.4 Identificación de Hap por difracción de rayos X

La difracción de los rayos-X es una herramienta útil durante el desarrollo de la caracterización de materiales y permite la identificación de especies minerales cristalinas (Duarte y Preckwinkel, 2001).

En este trabajo, la difracción de rayos-X fue utilizada principalmente para la identificación y caracterización de Hap en los huesos de rata en función de la edad y establecer los cambios producidos por los efectos de una mala nutrición.

En la figura 6.8, se observa el patrón completo de difracción de rayos X de la Hap sintética comercial, éste patrón de difracción sirve para identificar las difracciones permitidas que servirán para evaluar este mismo componente en las muestras de estudio obtenidos en las pruebas mecánicas de las ratas Wistar de ambos géneros.

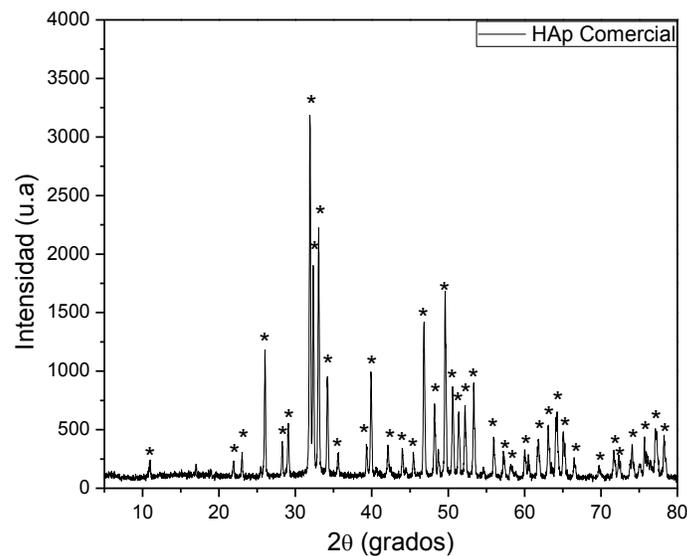


Figura 6.8. Patrón de difracción de la Hap sintética comercial.

La Figura 6.9, se muestran los patrones de difracción de rayos X obtenidos de las cenizas de los huesos de cuatro edades tanto en machos como en hembras, que son a las 3, 7, 11 y 16 semanas de edad, que corresponden al inicio, final y dos puntos intermedios de las edades tomadas en cuenta para este estudio. Las cenizas de los huesos que fueron

utilizados en este experimento son las que se manejaron para la determinación de minerales.

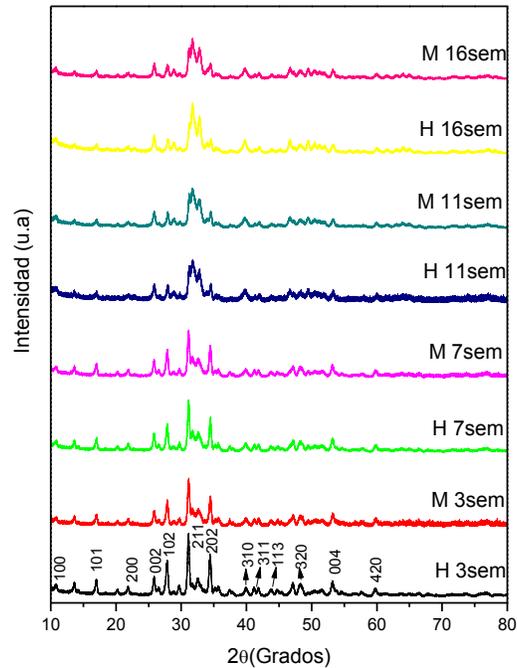


Figura 6.9 Difractogramas de los huesos de las ratas de la cepa Wistar en función de la edad a las 3, 7, 11 y 16 semanas, de hembras y machos.

Mediante la difracción de rayos-X se pudo establecer que existe Hap en las muestras, que es un material policristalino y se establecieron las direcciones cristalográficas presentes según (Powder Diffraction File) PDF#09-0432. En la **figura 6.9** se puede observar que los picos 200, 202 y 320 van desapareciendo a medida que aumenta la edad de la rata mientras que el pico 310 va aumentando con la edad de la rata. El pico de mayor intensidad (dirección 211) va disminuyendo a medida que aumenta la edad y se va traslapando con los picos adyacentes. Es claro que el difractograma del hueso de rata hembra en la tercera semana presenta un mayor ordenamiento cristalino teniendo en cuenta que los picos están más definidos en comparación con el difractograma de los huesos de rata de 16 semanas. Es importante recordar que el tamaño de los cristales así como su calidad cristalina, determinan la intensidad de los picos (Meneghini et al, 2003).

Meneghini y col. (2003), realizaron un estudio con fetos humanos, donde reportan que en los más jóvenes, la Hap se encuentra más pobremente cristalizada en comparación con

aquellos fetos más maduros, lo que sugiere que las partículas que difractan (cristales) en el hueso joven son más pequeños o más defectuosos que en aquellos presentes en los huesos adultos, presentando difractogramas menos definidos en los huesos más jóvenes y viceversa. En este estudio, hasta el momento encontramos lo contrario, observando que los difractogramas de los huesos más “jóvenes” están más definidos en comparación con aquellos difractogramas de los huesos más “viejos”. Este hallazgo es importante, ya que otros datos obtenidos en esta investigación como las pruebas mecánicas, sugieren que la Hap podría estar más cristalizada conforme avanza la edad de los animales, ya que este material es indispensable para la fortaleza del hueso ante la aplicación de una fuerza, y esta última en este estudio se incrementa conforme los animales envejecen.

Es importante tomar en cuenta que la mineralización de la matriz osteoide está dirigida por los osteoblastos mediante: a) el control de la concentración local de iones, y b) la regulación de la concentración local de proteínas y factores favorecedores o inhibidores de la mineralización (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Este proceso es similar en todos los tipos de hueso y se inicia con la formación de *vesículas de osteoide* por los osteoblastos. Estas vesículas, se agrupan en racimos y poseen una fina membrana rica en fosfatasa alcalina y fosfolípidos ácidos con afinidad por el Ca^{2+} . Precisamente, el primer mineral aparece en el seno de esas vesículas en contacto con la cara interna de su membrana. Su fosfatasa alcalina, al hidrolizar esterres fosfóricos libera grupos ortofosfato (PO_4^{3-}) necesarios para la formación del naciente mineral de fosfato cálcico (CaPO_4) (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Una vez formado ese mineral incipiente, sus cristales van acumulándose en las vesículas extracelulares y, al crecer, acaban por romper su membrana y salir al espacio extracelular (figura 2.10). Esos cristales se depositan entre las fibrillas de colágeno del osteoide y, ante concentraciones adecuadas de Ca y fosfato así como un pH apropiado en el fluido que impregna tales fibrillas, los cristales sirven de base para el depósito de nuevo mineral. Nace así un fosfato cálcico amorfo que, tras pasos intermedios, da lugar al cristal maduro de Hap (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

6.2.5 Determinación de minerales en los huesos de ratas de la cepa Wistar.

El contenido mineral y en específico el Ca, se ha reportado como el nutrimento más importante asociado con alcanzar el pico máximo de masa ósea, y quizá sea el único cuya evidencia epidemiológica lo relaciona a fracturas. Así mismo, las propiedades materiales del hueso se reflejan en las propiedades biomecánicas del mismo (Jiang *et al*, 1997). De ahí la importancia de determinar el contenido mineral de los huesos de las ratas de la

cepa Wistar, ya que este parámetro es importante para explicar los resultados aquí obtenidos.

En la figura 6.10 se presentan las gráficas de contenido de los minerales más significativos (Ca y P). En cuanto al Ca se observa que el contenido de este mineral tiende a incrementarse conforme se incrementa la edad de los animales de ambos géneros, los machos tienden a contener mayor contenido de este mineral en la décimo segunda semana. En lo que respecta al P, se observa que tiende a disminuir la cantidad de este mineral conforme se incrementa la edad de los animales de ambos géneros. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos anteriormente, en los patrones normales, ya que la conformación de la Hap es un factor importante para el incremento de la resistencia a la fractura y la osificación y, por lo tanto el desarrollo del hueso como tal. El decremento del contenido de P, hace que la HAp pierda su estequiometría, esto se refleja en la pérdida de calidad cristalina que se observa en los espectros de difracción de rayos x.

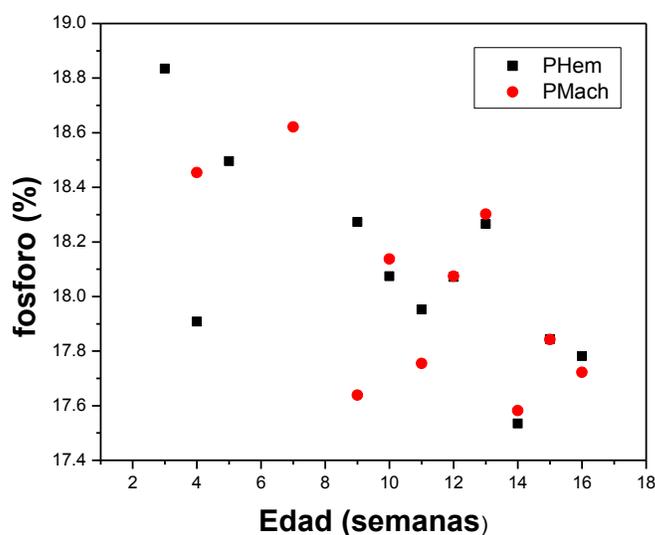
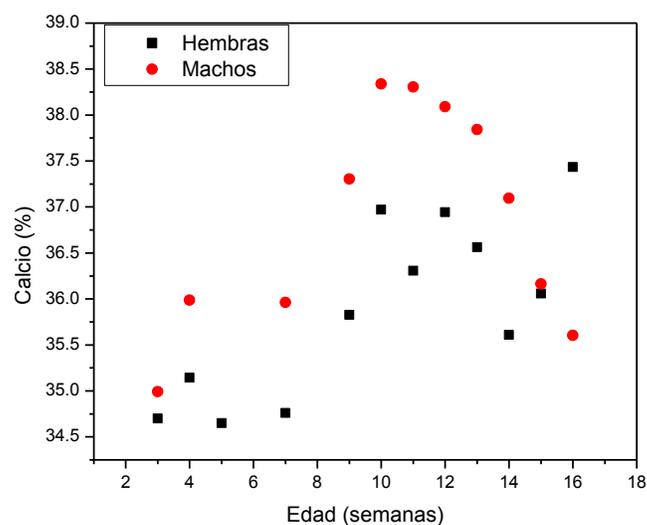


Figura 6.10 Contenido de Ca y P presente en los huesos de las ratas de la cepa Wistar en función de la edad.

6.3 Generación de un método alternativo de determinación de la densidad mineral ósea, mediante la detección digital de rayos X, para realizar las evaluaciones de la densidad mineral ósea en ratas de la Cepa Wistar in vivo.

La densitometría ósea permite detectar en forma muy temprana y sensible cambios morfológicos del hueso ya sea por sí sola o combinada con algunos indicadores bioquímicos relacionados a su actividad metabólica (Brem *et al*, 2004).

La absorciometría de rayos-X de doble energía realizada mediante un software especial para pequeños animales es una excelente técnica para medir la densidad mineral ósea en ratas. Sin embargo, en esta investigación, se propone un método alternativo más económico y práctico para poder determinar la densidad en los animales de experimentación, mediante un equipo dental de difracción y el acople de un sensor digital (rayos-X).

6.3.1 Calibración del equipo de rayos-X para la determinación de la densidad mineral ósea por un método alternativo de transmisión de rayos X.

En la figura 6.11, se observa la absorción de rayos-X por parte del hueso adulto, no así en el hueso pequeño (de rata en crecimiento), éste hueso en crecimiento tiene menor densidad mineral ósea, por lo que presenta mayor permeabilidad a los rayos-X (Junqueira y Carneiro, 2001), dando así una imagen más clara con respecto al hueso adulto. Esta metodología fue de gran utilidad al momento de desarrollar el modelo de desnutrición, dado que la concentración de Ca debe mantenerse constante en la sangre. La carencia alimentaria de este mineral provoca la descalcificación de los huesos, los cuales se hacen más transparentes a los rayos-X y más predispuestos a las fracturas (Junqueira y Carneiro, 2001). Tomando esto en cuenta, éste método sirvió también para evaluar la eficacia del Ca de la harina de nopal sobre el hueso de las ratas Wistar.

A)

B)



Figura 6.11 Las fotos muestran: A) Pruebas con fémures diseccionados y B) Radiografía de fémur de rata in vivo (Macho de tres semanas de edad).

La calibración del equipo, incluyó tres parámetros: distancia y tiempo de exposición, los cuales se describen a continuación.

Establecer la distancia óptima en la que el detector puede trabajar

Con respecto a la distancia que se estableció para el registro de los rayos-X, se determinó en base a las pruebas realizadas durante la calibración, en donde se empleó una muestra de hueso de res, y se trabajaron tres diferentes distancias para el registro. En la figura 6.12 se observa que en las pruebas, el equipo responde de forma lineal, a la distancia de 4 cm, en función del tiempo de exposición. Se observa que a las distancias de 2.5 cm y 8 cm, la respuesta no presenta un comportamiento lineal, por lo que la imagen radiográfica se vería muy oscura o muy clara respectivamente.

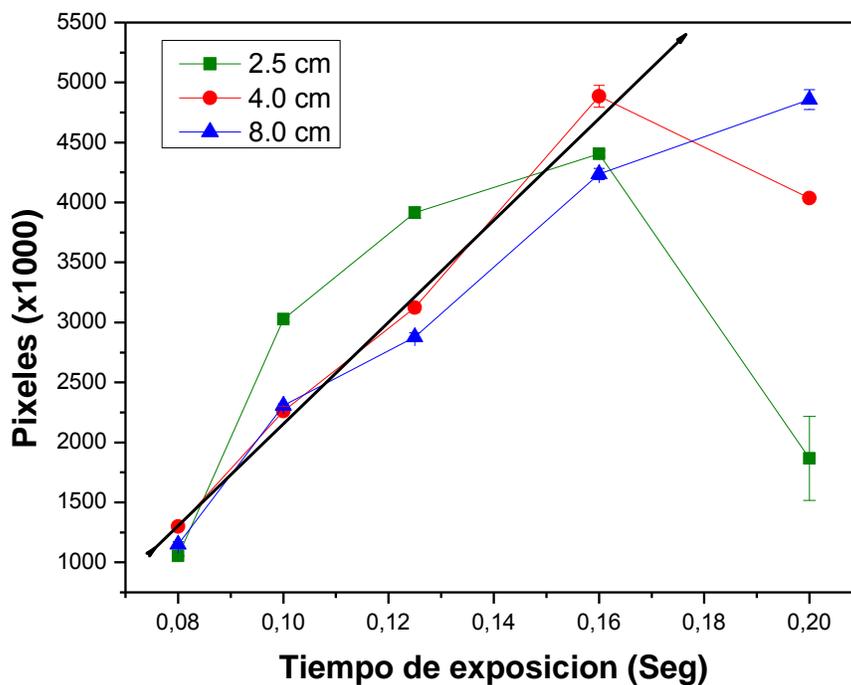


Figura 6.12 Comportamiento del sensor a diferentes distancias.

Establecer el tiempo óptimo en el que el detector puede trabajar.

En lo que se refiere al tiempo de exposición, se probaron cinco diferentes tiempos (0.08, 0.1, 0.125, 0.160 y 0.2 seg.), probando directamente sobre el sensor, ya que teníamos que ver la respuesta del sensor sin ningún medio absorbente sobre él. En base a lo anterior, se observa en la figura 6.13 que el sensor tiene una mejor respuesta con los tiempos de exposición entre 0.1 y 0.160 seg., presentando entre estos tiempos un comportamiento lineal. Por otro lado en los tiempos de 0.08 y 0.2, el sensor se satura pudiendo presentar

imágenes radiográficas muy claras o muy oscuras respectivamente. Por lo que se eligió el tiempo de exposición de 0.160 seg, en el cual el sensor registra una buena imagen tanto en los huesos de los animales jóvenes como en los de los adultos.

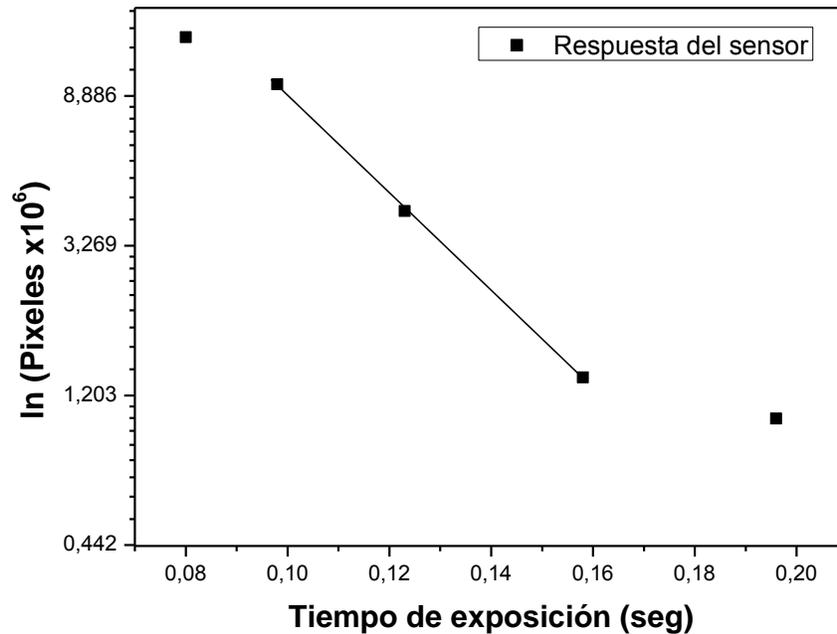


Figura 6.13 Comportamiento del sensor a diferentes tiempos

Después de seleccionar la distancia y el tiempo de exposición, se procedió a determinar la densidad mineral ósea de las muestras de hueso de res por gravimetría, que relaciona el peso y el volumen de la misma $\rho=m/v$. El valor de densidad encontrado es de 1.912 ± 0.03 g/cm³.

Para obtener una densidad mineral ósea en g/cm² se utilizó la ecuación 5, con los valores $\beta_1=2.173$ y $\beta_2 \cdot l=1.16$.

La figura 6.14 muestra la densidad en g/cm² para el hueso de res, los círculos son los valores de densidad mineral ósea que fueron medidas por el método de gravimetría multiplicada por el grosor. Los cuadros son los valores de densidad mineral ósea calculada con la ecuación 5 considerando $\beta_2 \cdot l=0$, la diferencia de estos valores arroja el valor de $\beta_2 \cdot l=1.16$. Con este valor el sistema queda calibrado, de tal forma que la densidad calculada y la densidad medida son iguales.

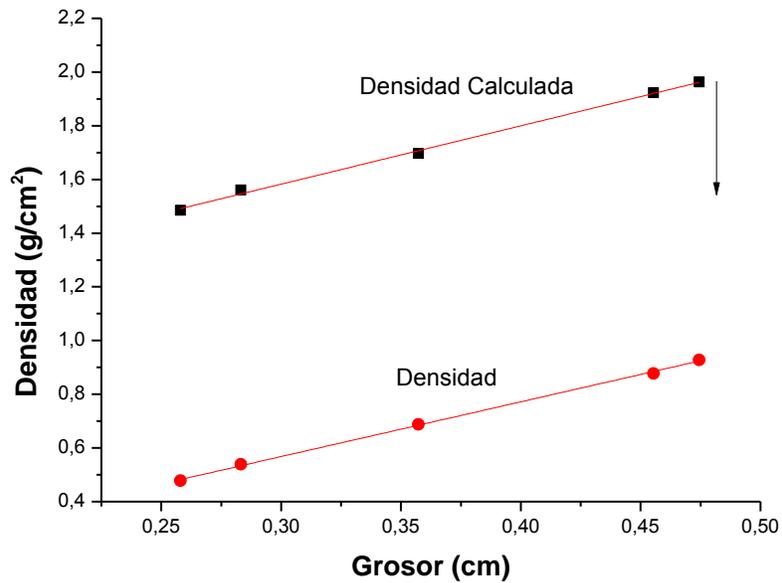


Figura 6.14 Gráfica de densidad mineral ósea en g/cm^2 calculada con la ecuación 5 y la DMO medida por el método gravimétrico.

6.3.2 Determinación de la curva basal de rayos-X en ratas de la cepa Wistar bajo condiciones normales: Cuello de fémur.

En el caso de densitometría ósea en humanos una de las partes claves para detectar cambios en la densidad mineral ósea del hueso es el cuello del fémur, por esta razón, los estudios radiográficos en ratas fueron enfocados a esta misma área (figura 6.15).



Figura 6.15 Selección de la región de interés del fémur (cuello de fémur)

Una vez calibrado el equipo, se procedió a la captura digital de rayos-X para desarrollar el modelo basal (normal) de densidad mineral ósea del cuello del fémur; empezando con

animales recién destetados (3 semanas de nacidos), obteniendo el registro de imágenes semanales hasta la décimo novena semana. Posteriormente se espació la frecuencia de registro, esto debido a que ya se había pasado el periodo de crecimiento rápido de los animales y ahora están en la “fase adulta” (Tamaki and Uchiyama, 1995). El registró se llevó a cabo hasta la 27ª semana (seis meses y tres semanas). Ésta constituyó la primera etapa de este trabajo.

La figura 6.16 muestra los valores de densidad mineral ósea para ratas hembras y machos en la región del cuello del fémur en función de la edad. Por otro lado, es claro que no existe una relación lineal entre los valores de densidad mineral ósea para hembras y machos con el tiempo.

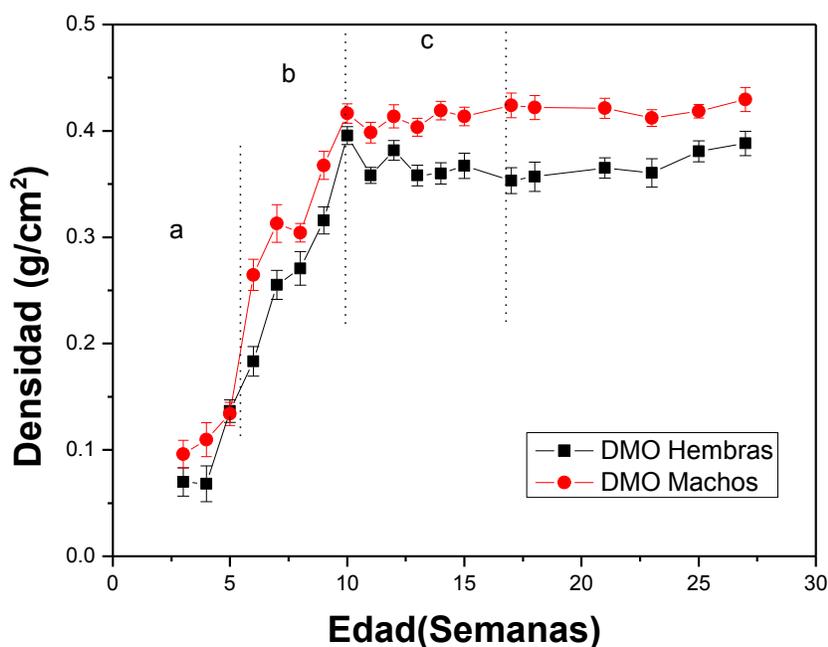


Figura 6.16. Densidad mineral ósea de las ratas de la cepa Wistar en función de la edad

De esta figura se puede observar que tanto para machos como para hembras existe en la región de estudio (3-27 semanas) cuatro regiones bien definidas:

De 3 a 6 semanas (a), en donde se observa que los huesos de rata tienen un incremento acelerado de la densidad mineral ósea en la sexta semana con respecto a la tercera semana. Esto coincide con lo que describen Tamaki y Uchiyama en 1995, donde mencionan que en esta etapa los animales están en la fase de crecimiento acelerado. Si se

compara con los resultados anteriores, este dato coincide con la primera fase de ganancia rápida en peso y talla, así como en un incremento importante en la longitud y peso del fémur, tanto en hembras como en machos. Al analizar las pruebas mecánicas, se observa, que esta ganancia en la densidad mineral ósea, también coincide con una mayor resistencia de los fémur entre la 4ª y 6ª semana. Al observar el contenido mineral, en esta etapa, también se observa un contenido importante de Ca en las muestras principalmente de los machos, así como de P y Mg, con respecto a las hembras.

De a (6 semanas) a b (10 semanas), al igual que en las primeras tres semanas, se observa que en esta etapa tienen una ganancia importante de densidad mineral ósea, coincidiendo una vez más con la ganancia en peso y talla durante estas semanas y con el crecimiento y peso del fémur. También coincide la ganancia en densidad mineral ósea con un incremento en la resistencia a la fractura en esta etapa tanto en machos como en hembras. Relacionando la densidad mineral ósea con el contenido de minerales, no se observa una relación clara; sin embargo, alrededor de la décimo semana se observan incrementos en el contenido de Ca y P en ambos géneros.

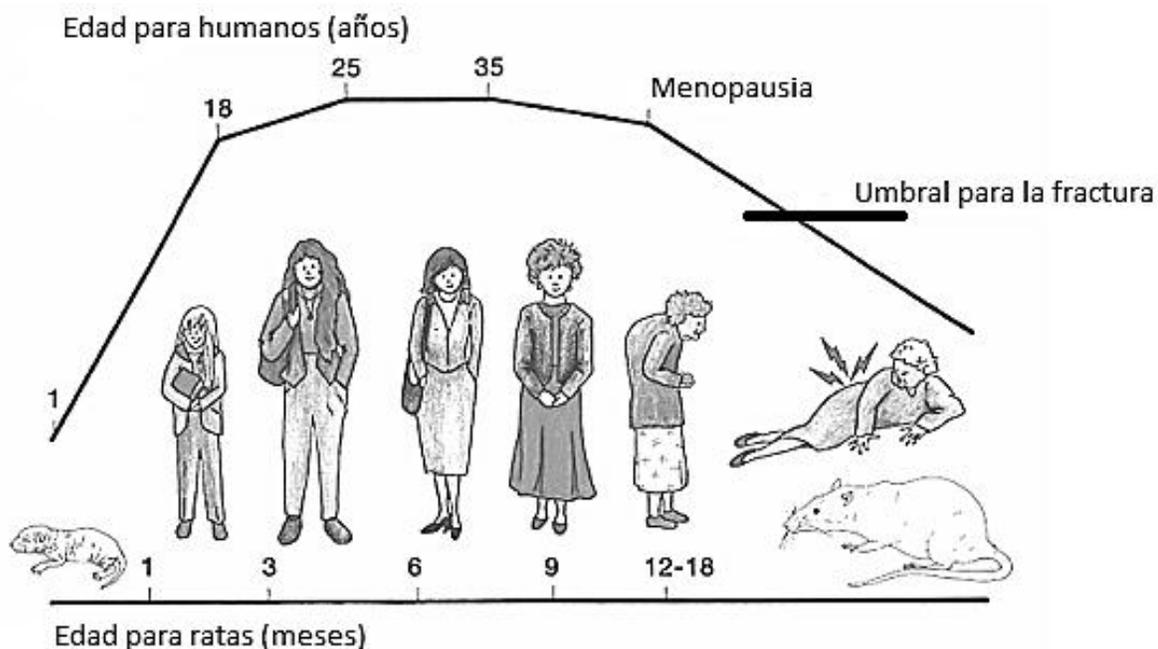
Hay que recordar hasta este punto, que durante la infancia y la adolescencia se produce el crecimiento del organismo con la formación de hueso a partir de cartílago de crecimiento y osificación posterior, fortaleciéndolo (Dossier, 2011). Es importante recordar también que durante las etapas de crecimiento acelerado (3 a 10 semanas), existen factores importantes que contribuyen a la explicación de éstos resultados, tales como dimorfismo sexual (Ventura, 2004), madurez sexual y diferencias en la velocidad de adsorción y resorción del hueso (Dossier, 2011).

De b (10 semanas) a c (16 semanas) se observa que la densidad mineral ósea ganada por los animales de ambos géneros, continua incrementándose pero a menor velocidad, lo cual coincide con la desaceleración del crecimiento en comparación con las primeras semanas en ambos géneros (Tamaki y Uchiyama, 1995). Durante esta etapa, donde los animales se consideran jóvenes, la formación y resorción de hueso son semejantes (Dossier, 2011). Se podría pensar que debido a la desaceleración en la ganancia de densidad mineral ósea, existieran pocas variaciones en la resistencia a la fractura, sin embargo, lo que se observa en éstas últimas es un incremento en las mismas principalmente en los machos alrededor de la 14ª semana; mientras que en las hembras se observa una disminución y posterior recuperación de la resistencia a la fractura alrededor de la 15ª semana. La relación de la densidad mineral ósea con respecto al contenido mineral, no se aprecia claramente, ya que éste último no muestra un patrón de comportamiento en función de la edad.

De 16 semanas en adelante, se observa que la densidad mineral ósea tiende a estabilizarse, teniendo ligeras variaciones. En esta etapa, los animales se encuentran en la fase adulta tal como lo mencionan Tamaki y Uchiyama en 1995.

El capital de hueso que se posee en cada momento es el resultado del balance entre su reabsorción y su formación. Un balance que está regulado por factores genéticos, alimentarios, mecánicos, hormonales y locales. En condiciones fisiológicas, la interrelación de esos factores hace que la masa ósea máxima se mantenga con pequeñas variaciones entre los 30 y los 50 años aproximadamente (de 6 a 12 meses en la rata aproximadamente), edad a partir de la cual, con mayor o menor rapidez, empieza a declinar (Fernández-Tresguerres *et al*, 2010).

Este comportamiento se asemeja con el patrón de densidad mineral ósea de los humanos, donde también se observa una ganancia acelerada en la densidad mineral ósea en los primeros años de vida en la fase de crecimiento acelerado y una estabilización en la fase adulta; y en donde los hombres tienden a presentar una densidad mineral ósea mayor en comparación con las mujeres. En la figura 6.17 se muestra la correspondencia de la edad humana en comparación con la edad de la rata, donde se observa que la edad de la rata de 4 meses (16 semanas) corresponde a la edad de 25 años aproximadamente, lo cual es en donde las mujeres alcanzan su pico máximo de densidad mineral ósea.



(H. Wayne, 2002)

Figura 6.17 Correspondencia de la edad humana con la edad de la rata

6.4 Formulación de las dietas para la generación del modelo de desnutrición y para la restitución de nutrimentos.

6.4.1 Formulación de la dieta deficiente para generar el modelo de desnutrición y generar una disminución en la densidad mineral ósea en ratas hembras de la cepa Wistar

Se realizó el cálculo para la elaboración de la dieta que se utilizó para originar la desnutrición y la descalcificación del hueso en las ratas Wistar. El cálculo se realizó haciendo una disminución del 40% menos del requerimiento en todo, para originar una desnutrición y descalcificación de los animales en crecimiento; pero al mismo tiempo evitando una carencia drástica de nutrimentos que pudiera poner en riesgo la adaptación y la vida de los animales experimentales. Para hacer esta dieta, se partió del pellet LabDiet (5001 rodent diet). Este pellet es similar a la dieta AIN-93 G (gestación y crecimiento) (Lab diet, 2010). La dieta se realizó agregando 60% del pellet de Lab Diet y 40% de alfahacel, para obtener una dieta con una reducción el 40% menos en todo. La dieta de desnutrición se proporcionó a los animales por 12 semanas (Wyatt *et al*, 2000; Peterson *et al*, 2008). En la tabla 6.4 se detalla la composición de la dieta de desnutrición.

| Dieta control (AIN-93G) | Alfacel |
|--------------------------------|----------------|
| 60% | 40% |

Tabla 6.4 Composición de la dieta pluricarenal para la generación del modelo de desnutrición.

6.4.2 Formulación de la dieta de restitución de nutrimentos para evaluar el efecto del consumo de Ca procedente de nopal sobre la formación de hueso

Para la dieta de restitución con polvo de nopal, se elaboró con 60% de pellet LabDiet y el 40% restante se elaboró con polvo de nopal, en base a la dieta AIN-93 G (Reeves *et al*, 1993) la fórmula de la dieta se muestra en la tabla 6.5.

| Componente | 1kg (g/kg) | 4.972 kg (g/kg) |
|------------------------|-------------------|------------------------|
| Almidón | 397.486 | 1976.30 |
| Caseína | 200.000 | 994.4 |
| Almidón dextrinizado | 132.000 | 656.30 |
| Sucrosa | 100.000 | 497.2 |
| Aceite de soya | 70.00 | 348.04 |
| Fibra | 50.00 | 248.6 |
| Mezcal de minerales | 35.00 | 174.02 (No se agrega) |
| Mezcla de vitaminas | 10.00 | 49.72 |
| L-cisteína | 3.00 | 14.91 |
| Bitartrato de colina | 2.50 | 12.43 |
| Tert-butylhydroquinona | 0.014 | 0.069 |

Tabla 6.5 Cálculo de los componentes de la dieta para preparar la dieta con polvo de nopal en base a la dieta AIN-93G.

En la tabla 6.6 se muestran los minerales a agregar a la dieta de restitución.

| Elemento | 100% | 40% |
|-----------------|-------------|------------|
| Calcio | 5000.0 | 3000.0 |
| Fósforo | 1561.0 | 1789.7 |
| Potasio | 3600.0 | 4127.5 |
| Sulfuro | 300.0 | 343.9 |
| Sodio | 1019.0 | 1168.3 |
| Cloruro | 1571.0 | 1801.2 |
| Magnesio | 507.0 | 581.2 |

| | | |
|-----------|------|-------|
| Hierro | 35.0 | 40.12 |
| Zinc | 30.0 | 34.39 |
| Manganeso | 10.0 | 11.46 |
| Cobre | 6.0 | 6.8 |
| Iodo | 0.2 | 0.22 |
| Molibdeno | 0.15 | 0.17 |
| Selenio | 0.15 | 0.17 |
| Silicón | 5.0 | 5.73 |
| Cromo | 1.0 | 1.14 |
| Flúor | 1.0 | 1.14 |
| Níquel | 0.5 | 0.57 |
| Boro | 0.5 | 0.57 |
| Litio | 0.1 | 0.11 |

(Reeves *et al*, 1993)

Tabla 6.6 Cálculo de los minerales a agregar en la dieta experimental de restitución de nutrientes (mg/kg dieta AIN-93G).

6.5 Generación del modelo de desnutrición a partir de las curvas desarrolladas de densidad mineral ósea, a través de dietas deficientes en el contenido de Ca para posteriormente evaluar el efecto de una dieta a base de nopal.

La dieta y la nutrición son muy importantes para promover y mantener la buena salud a lo largo de toda la vida. Está bien establecida su función como factores determinantes de enfermedades no transmisibles crónicas, y eso los convierte en componentes fundamentales de las actividades de prevención (OMS, 2003).

En la figura 6.17 se observan los efectos de la dieta pluricarencial sobre la densidad mineral de los animales de experimentación, con respecto a los animales control. Como se puede ver, existe un efecto importante sobre la disminución de la densidad mineral ósea ocasionada por la dieta pluricarencial, a partir de la 7ª semana de alimentación, y esta disminución continua a lo largo del periodo de administración de la dieta deficiente (semana 16). Es importante mencionar que para la obtención de la densidad mineral ósea se tomó el registro de los animales de experimentación semanalmente. La séptima semana fue escogida para iniciar la dieta pluricarencial porque como se observa claramente de la curva normal (Figura 6.16) en esta semana se tiene un incremento significativo de la densidad mineral ósea, y se observan cambios importantes tanto en talla como en peso.

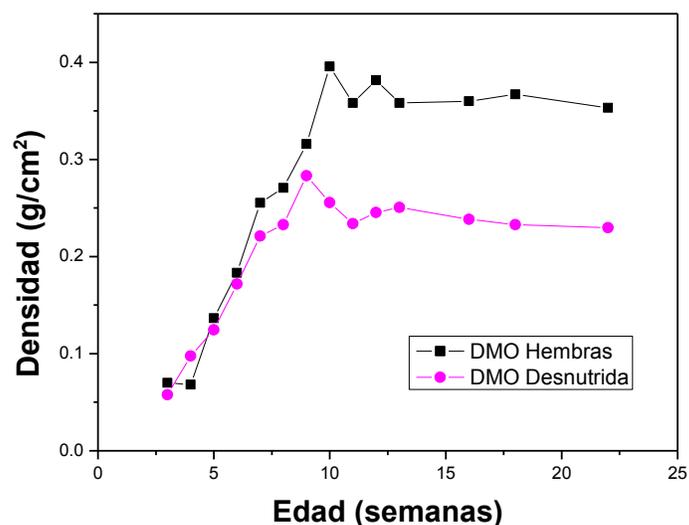


Figura 6.18 Disminución de densidad mineral ósea con la dieta de desnutrición

Con la figura anterior se comprueba que respecto a la salud ósea, la nutrición es un factor fundamental no solo para el crecimiento de los huesos, sino también para su mineralización. Ambos fenómenos, el aumento de tamaño y la oposición de nutrientes (crecimiento y desarrollo) son paralelos, aunque regulados por factores diferentes, y evidencian períodos críticos con una cronología no obligatoriamente coincidente. La adquisición de una adecuada mineralización durante la infancia ha demostrado ser un hecho clave en la prevención de la osteoporosis del adulto, de ahí que en la actualidad se demande al profesional de la salud su responsabilidad en la prevención de este grave problema de salud pública (Franch et al,2010).

6.6 Evaluación del efecto del consumo de Ca proveniente de nopal sobre la formación de hueso a través del modelo de desnutrición desarrollado.

Terminada la fase de desnutrición, se proporcionaron las dietas de recuperación, las cuales fueron dietas completas en cuanto a contenido nutrimental: un subgrupo fue alimentado con la dieta control (pellet LabDiet 5001 rodent diet), y el segundo subgrupo fue alimentado con una dieta ajustada con polvo de nopal en base al contenido de nutrimentos y de Ca contenidos en el mismo. El tercer subgrupo continuó con la dieta pluricarencial hasta el final del estudio biológico experimental. Las dietas se proporcionaron por 11 semanas. Se registró semanalmente peso, talla; así como la densidad mineral ósea; esto para observar si había recuperación de la densidad mineral ósea en las ratas descalcificadas. En la figura 6.18, se observa que en cuanto se

administraron las dietas de recuperación, la densidad mineral empezó a incrementarse, especialmente en los animales que recibieron la dieta con nopal y con el pellet. Llama la atención que los animales con la dieta ajustada con polvo de nopal, tuvieron una recuperación sin sobresaltos en comparación con el grupo alimentado con el pellet, el cual aparentemente tuvo una disminución durante las dos primeras semanas de alimentación con el pellet. Sin embargo, éstos dos grupos tuvieron una clara recuperación de la densidad mineral en comparación con el grupo que continuó con la dieta pluricarencial. Se puede observar que aunque las dietas de recuperación tuvieron un efecto importante sobre la densidad mineral ósea, durante el tiempo en el cual se les proporcionaron éstas dietas; no se alcanzó la densidad mineral ósea registrada para los animales control.

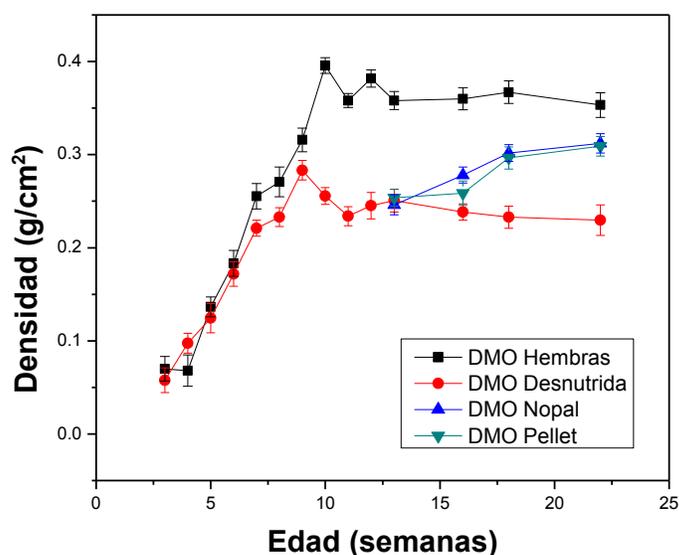


Figura 6.19 Evaluación del efecto del consumo de Ca proveniente de nopal sobre la formación de hueso a través del modelo de desnutrición desarrollado.

Observando la anterior figura, se ratifica que el hueso es una estructura viva y activa, que continuamente se está remodelando mediante la formación de nuevo tejido y eliminación del antiguo. Y también se comprueba que esta remodelación puede verse afectada por las deficiencias y excesos nutricionales, pudiendo dar lugar a la aparición de alteraciones en la densidad mineral ósea, como la osteoporosis, el raquitismo o la osteomalacia que afectan a un alto porcentaje de la población en todo el mundo (Dossier, 2011).

VII. Discusión

Para la evaluación de la biodisponibilidad de Ca de nopal, se hizo necesario realizar el estudio nutrimental del nopal (*Opuntia ficus indica*) a diferentes estados de maduración, la realización de las curvas basales del comportamiento normal del desarrollo de las ratas de la cepa Wistar en diferentes aspectos (peso, talla, cristalización de Hap, etc.), así como el desarrollo de un método alternativo para el registro de los cambios sobre la densidad mineral ósea. Con esto se obtuvieron por primera vez, curvas basales en función de la edad, principalmente de densidad mineral ósea, la cual sirvió para obtener la curva normal equivalente a la obtenida por DEXA en humanos (Bronner, 1994); y que posteriormente servirán para estudios posteriores relacionados con el tema.

Se hace necesario contar con un patrón de referencia que explique el comportamiento de las ratas en diferentes aspectos, el cual pueda ser utilizado como base para realizar comparaciones en estudios biológico experimentales.

Para la realización de las curvas basales (longitud de fémur, pruebas mecánicas, densidad mineral ósea), la comparación entre el fémur derecho e izquierdo no representó diferencias significativas, ya que se observó el mismo comportamiento en los resultados, por lo que se tomaron los datos del fémur izquierdo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto al peso y talla se obtuvieron las curvas de comportamiento normal de ratas de la cepa Wistar, las cuales coinciden con lo reportado por Tamaki y Uchiyama en 1995 y por Friedman en 1999.

A la 8a semana de edad es cuando las ratas alcanzan su madurez sexual (Gutiérrez, 2009). Se puede observar en las gráficas de peso y talla que a partir de la 10a semana disminuye el crecimiento acelerado para ir aumentando a menor velocidad lo que coincide con lo reportado por Tamaki y Uchiyama en 1995. Lo mismo sucede con otros parámetros como con la longitud y el peso del fémur; la resistencia a la fractura y la densidad mineral ósea.

En la densidad mineral ósea, los resultados muestran que las ratas alcanzan su pico máximo de densidad, en la etapa posterior a la maduración sexual (semana 10), manteniéndose ésta hasta la semana 27ª. Etapa en la cual las ratas se encuentran en la fase adulta y en donde la formación y resorción de hueso son semejantes (Dossier, 2011).

Los resultados aquí obtenidos, son de gran importancia para la investigación biológica experimental, ya que se obtuvieron patrones de referencia de las ratas desde el destete (3 semanas) hasta la edad en que se consideran adultas (16 semanas); además de que se obtuvo un hallazgo importante con respecto a un alimento aceptado culturalmente y que ha formado parte importante de la dieta de los mexicanos, el nopal (*Opuntia ficus indica*),

en cuanto a su composición química, y el efecto que puede tener una dieta complementada con este alimento. Estos hallazgos también nos ayuda a darle un uso a aquellas pencas de nopal consideradas viejas y que no son aprovechadas para el consumo humano, ya que como se vio en este trabajo, son precisamente las pencas viejas las que contienen la mayor cantidad de Ca; siendo así un cultivo sustentable, con poca inversión y que para aprovecharlo se requiere de una tecnología sencilla.

La nutrición es de vital importancia ya que es la base de la propia existencia. La alimentación y la nutrición representan los pilares de una vida sana. Todas las enfermedades tienen un componente metabólico, por lo que son susceptibles de modificaciones beneficiosas o perjudiciales por medio de manipulaciones alimentarias y nutricionales. Se recomienda la enseñanza de la ciencia de la alimentación y nutrición en toda su integridad dentro del proceso salud – enfermedad (Barreto, 2003).

El método de transmisión de rayos X será de gran importancia para desarrollar posteriormente nuevas metodologías para desnutrir (descalcificar) los huesos sin utilizar los métodos convencionales como lo es la ooforectomía; ya que tratándose de humanos, la desnutrición se presenta en personas de todas las edades incluyendo a las personas en edad reproductiva, y se necesita un modelo similar a lo que ocurre en los humanos, para comparar los resultados tanto de desnutrición como de recuperación especialmente en enfermedades silenciosas como lo es la osteoporosis y, que implican un alto costo principalmente económico, social y psicológico en los pacientes que la padecen (De Lago et al, 2008).

VIII. Conclusiones

Objetivo 1

- Composición química del polvo de nopal: el contenido de minerales se incrementó gradualmente en relación al peso; y con ello, el contenido de Ca probablemente biodisponible.
- El contenido de fibra también se incrementó en relación al peso, lo que podría ser utilizado como una fuente de fibra de presentación en polvo.

Objetivo 2

- El crecimiento y desarrollo de los animales, así como los resultados observados en otros aspectos como crecimiento, desarrollo de fémur, y densidad mineral ósea, presentan un comportamiento acelerado en las primeras semanas de vida (3-10 semanas), disminuyendo la aceleración (10- 15 semanas aprox.) tal como lo describen (Tamaki and Uchiyama, 1995), observándose una fase de crecimiento acelerado y una fase de estabilización (fase adulta).
- Las curva de comportamiento normal del fémur de ratas de la cepa Wistar, en lo que se refiere de las características físicas, biomecánicas y de cristalografía de la Hap; serán de gran importancia para establecer un patrón normal de referencia y un modelo experimental útil, en futuros estudios biológicos con ratas Wistar de tipo nutrimental.

Objetivo 3

El desarrollo de una nueva metodología para la determinación de la densidad mineral ósea, será de gran importancia por:

- Económica para estudios viables y sin requerir de tecnología de alto costo.
- Esto permitiría trazar nuevas metas y perspectivas dentro de la investigación clínica aplicada.
- En el estudio de rayos X para determinar la densidad mineral ósea, los resultados corresponden a lo esperado, donde la densidad se incrementa conforme se incrementa la edad de los animales tanto en machos como en hembras, presentando un comportamiento sigmoideo. En ambos géneros se observa una tendencia a estabilizarse a partir de la décima semana de edad aprox. (fase adulta) lo cual se asemeja en la correspondencia de edad al patrón de densidad mineral ósea de los humanos.

Objetivo 4

- La dieta pluricarenal que se realizó para generar el modelo de osteopenia, dio los resultados esperados, al disminuir la densidad mineral ósea de las ratas Wistar con el consumo de esta dieta; lo cual confirma la importancia del aporte nutrimental y el impacto que tiene éste sobre la composición y la densidad del hueso

Objetivo 5

- A este respecto, se observó una disminución de la densidad óptica en las hembras alimentadas con la dieta de desnutrición, la cual se proporcionó hasta la semana 12^a, a partir de ese momento se proporcionó la dieta de recuperación (objetivo 6). Un grupo continuó con la dieta de desnutrición y la DMO se mantuvo baja.

Objetivo 6

- La dieta de recuperación a base de nopal así como la dieta con el pellet LabDiet (5001 rodent diet), ayudaron a la recuperación de la DMO. Si bien los animales experimentales no alcanzaron los niveles de los animales control, se observa en los resultados que la recuperación si es considerable. Por lo que se podría decir que el Ca de nopal si es biodisponible.

IX. Bibliografía

Alvídrez-Morales Alicia, González-Martínez Blanca Edelia, Jiménez-Salas Zacarias. 2002. TENDENCIAS EN LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS: ALIMENTOS FUNCIONALES. Revista de salud pública y nutrición (RESPYN). Vol 3 No.3.

Amézquita LF. 2000. Fundamentos de Espectroscopía aplicada a la Instrumentación Química. Ed. UAG. Pp .13-140.

Asociación Mexicana de Metabolismo Óseo y mineral. 2000. Consenso mexicano de osteoporosis. 1-23 pp.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC): Official methods of analysis. 2000. 17th Ed. Gaithersburg, MD.

Bandyopadhyay-Ghosh, S. (2008). Bone as a collagen–hydroxiapatite composite and its repair. Trends in Biomaterials & artificial organs, Vol.22, No.2, (August 2008), pp. 116-124, ISSN 0971-1198

Basurto Santos Deni, Lorenzana-Jiménez Marte, Magos Guerrero Gil Alfonso. Julio-agosto 2006. Utilidad del nopal para el control de la glucosa en la diabetes mellitus tipo 2. Rev Fac Med UNAM Vol.49 No.4.

Bogden, J.D.; Kemp, F.W.; Huang, A.E.; Shapses, S.A.; Ambia-Sobhan, H.; Jagpal, S.; Brown, I.L. & Birkett, A.M. (2008). Bone mineral density and content during weight cycling in female rats: effects of dietary amylase-resistant starch. Nutrition & Metabolism, Vol.5, No.34, (November 2008), pp. 1-12, ISSN 1743-7075

Bravo, H. 1987. “Las cactáceas de México”. Cap. 1. En: Fisiología del nopal ed. UNAM. México. pp: 30-45.

Brown HG, Sallee ME. 1977. Química Cuantitativa. Barcelona Buenos Aires: Editorial Reverté S.A. 464-465p.

Brem JJ, Lanary Zubiaur AE, Trulls HE, Pochon DO, Picot JA, Brem JC. 2004. Densitometría dual de rayos-X para la determinación de densidad y contenido mineral óseo en ratas hembras. Rev. Vet. 15:1, 27-30.

Casanueva, E., Bourges, H. 1995. "Los nutrimentos". Cap. 3. En: Nutriología Médica. Ed. Panamericana. México. pp: 356-375.

Cashman K.D. 2002. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Brit. J. Nutr.* 87 (Suppl 2): 169-177.

Cervera, P. 2001. Alimentación y dietoterapia. Cap. 5. En: Antinutrientes. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. España 4ª edición. pp: 89-92

Cheftel, H. 1992. Frutas y legumbres. Cap. 7. En: Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Ed. Acribia. España. pp: 140-148

Comité Mexicano para la Prevención de Osteoporosis. 2007. Programa día Mundial de Osteoporosis. www.comop.org.mx.

Contreras-Padilla Margarita, Pérez-Torrero Esther, Hernández-Urbiola Margarita I. Gabriela Hernández-Quevedo, Alicia del Real, Eric M. Rivera-Muñoz, Mario E. Rodríguez-García. 2011. Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. redonda) at different maturity stages. *Journal of Food Composition and Analysis.* 24 (2011) 38–43.

Cooper, C., Barker, D. J., Wickham, C. 1998. Physical activity, muscle strength and calcium intake in fracture of the proximal femur in Britain. *Brit. Med. J.* 297. pp: 1443.

Coulibaly Abdoulaye, Kouakou Brou and Chen Jie. 2011. Phytic Acid in Cereal Grains: Structure, Healthy or Harmful Ways to Reduce Phytic Acid in Cereal Grains and Their Effects on Nutritional Quality. *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology.* 1(1): 1-22.

De la Puente, J. Exterior y manejo de los animales domésticos. 1981. Tercera edición. Ed. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la UNAM. México.

Dossier de Prensa. Nutrición y salud ósea. Ed. FHOEMO, Instituto Omega 3 de la Fundación Puleva. WEB: http://www.pulevasalud.com/ps/Zips/10385/dossier_nutricion_hueso.pdf

Duarte G. Carlos F. Preckwinkel Uwe. 2001. Taller de difracción de rayos X por polvos. Sociedad mexicana de cristalografía, A. C. pp. 1 - 33

Dvorakova, J. 1998. Phytase: Sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiol.* 43. pp: 1186-1189.

Erdman, J. W. 1979. Oilseed phytates: Nutritional implications. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 56. pp: 736-741.

Fernández-Tresguerres Jesús A., Ariznavarreta Ruiz Carmen, Cachofeiro Victoria, Cardinali Daniel P., Escrich Escriche Eduardo, Gil-Loyzaga Pablo E., Lahera Juliá Vicente, Mora Tervel Francisco, Romano Pardo Martha, Tamargo Menéndez J. 2010. Fisiología Humana. Cuarta edición. Ed. Mc Graw Hill. México. Pp. 1015-1029.

Farris, E.J. & Griffith, J.Q. 1949. The rat in laboratory investigation (2), J.B. Lippincott Company, ISBN 978-0028445502, England

Franch Alonso M., Redondo del río M.P., Suárez Cortina L. 2010. Nutrición infantil y salud ósea. *Anales de Pediatría.* 72(1):80.e1–80.e11

Frati-Munari AC, Gordillo BE, Altamirano P and Araiza CR. 1988. Hypoglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lemaire in NIDDM. *Diabetes Care.* 11:63-69

Frati-Munari, Cárdenas, A., Altamirano, B. E., Rodríguez- Bárcenas, N., Araiza-Andraca, R., López-Hegwood, D. A. 1990. Human health discoveries with *Opuntia spp* (prickly pears). *Hort Sci.* 25:1515-1516.

Frati MAC, Xilotl DN, Altamirano P, Ariza R, López LR. 1991. The effect of two sequential doses of *estreptacantha* upon glycemia. *Archiv Invest Méd (Mex)*; 22: 333-336.

Friedman S. M., Boyer P. M., Barrio M. E., Morasso M. C., Gamba C. A., Río M. E., 1999, Evaluación del crecimiento normal en ratas a través del puntaje Z, *Archivos Latinoamericanos de nutrición, Órgano Oficial de la Sociedad latinoamericana de nutrición*, Vol. 49 N° 2, 143-148p.

Gartner. HISTOLOGÍA, TEXTO Y ATLAS. Editorial McGraw Hill. México. 2001,pp. 1-3

Genneer, Finn. HISTOLOGÍA. Editorial Panamericana. 2ª Edición. México. 1989, pp. 46-72

Godet M. C. 1994. Mecanismos de formation des complexes amylaseacide gras. Tesis Doctoral. Universidad de Nantes . Francia.

Goldberg Gail. 2007. Fruits and vegetables: A Key to Osteoporosis prevention?. Nutrition & the M. D. Vol. 33 No. 1. pp. 1-6.

Gómez-Aldapa, C.A.; Martínez-Bustos, F.; Figueroa, C.J.D.; Ondorica F.C.A. (1999). A comparison of the quality of whole corn tortillas made from instant corn flours by traditional or extrusion processing. *International Journal of Food Science & Technology*, Vol.34, No.4, (August 1999), pp. 391–399, ISSN 1365-2621

Granados SD, Castañeda PAD. El nopal historia, fisiología, genética e importancia. México: Trillas 1997.

Griffith John Q., Farris Edmond J. The rat in laboratory investigations.

Harrison med. Int. 15 ed. Cd rom. 2002

Hernández, M. Chávez, A., Bourges, H. 1980. Tablas de composición de los alimentos. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. 10ª edición. pp: 15-25.

Holbrook, T. L., Barrett-Connor, E. and Wingard, D. L. 1998. Dietary calcium and risk of hip fracture: 14 years prospective population study. *Lancet*. 2:1046.

Jamos, A. 1968. Manual de industrias de los alimentos. Cap. 5. En: AQP. Edit. Acribia. Zaragoza, España.

Jean A. (1998). “Análisis nutrimental de los alimentos”. Edit. Acribia, Zaragoza España.

Jiang Yebin, Zhao Jenny, Genant Harry K, Dequeker Jan and Geusens Piet. 1997. Long-Term Changes in Bone Mineral and Biomechanical Properties of Vertebrae and Femur in Aging, Dietary Calcium Restricted, and/or Estrogen-Deprived/-Replaced Rats. *Journal of bone and mineral research*. 12(97):820-830.

Junqueira, L.C. HISTOLOGÍA BÁSICA. Editorial Salvat. 3ª Edición. México. 1988, pp. 3-6.

LabDiet: <http://www.testdiet.com/PDF/productguide.pdf>. Consultada en enero de 2010

Leung Woot- Tsuen Wu. 1978. Composición Química del nopal. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. 325. pp: 18-20.

Lynch MJ, Raphael SS, Mellor LD, Spare PD, Inwood MJH. Métodos de laboratorio. 1994. Ed. Interamericana. México, D.F. 2ª ed. Vol. 2. pp. 1153, 1171-1181.

Maga, J. A. 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance and methods of analysis. *J. agric. Food Chem*. 30. pp:1-9.

Maikala R. V., 2009, Modified Beer's Law: historical perspectives and relevance in near-infrared monitoring of optical properties of human tissue, *International Journal of Industrial Ergonomics* 40, Elsevier.

Martin, R.B. (2000). Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone*, Vol.26, No.1, (January 2000), pp. 1-6, ISSN 8756-3282

Matkovic, V. Burns, V. and Vilevsky, Y. 1999. Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. *Am J Clin Nutr.* 32 pp: 540

Matter, H. E.. 1986. The utilization of *Opuntia* for nutrition of livestock. *Animal Research and Development.* 23. Pp: 107-115.

McMillan, J.; Kinney, R.C.; Ranly, D.M.; Fatehi-Sedeh, S.; Schwartz, Z. & Boyan, B.D. (2007). Osteoinductivity of demineralized bone matrix in immunocompromised mice and rats is decreased by ovariectomy and restored by estrogen replacement. *Bone*, Vol.40, No.1, (January 2007), pp. 111-121, ISSN 8756-3282

Méndez E. Rosa Olivia y Wyatt C. Jane. 2000. Archivos latinoamericanos de nutrición. Contenido y absorción del calcio proveniente de la dieta del noroeste de México. Una retrospectiva bibliográfica. Vol. 50 No. 4 pp: 330-333

Meneghini C., Dalconi M. C., Nuzzo S., Mobilio S., Wenk R. H. 2003. Rietveld Refinement on X-Ray Diffraction Patterns of Bioapatite in Human Fetal Bones. *Biophysical Journal.* 84:2021-2029.

Morzillo RJ, Orza SJM. 1972. Espectroscopía, estructura y espectros atómicos. Madrid Barcelona: Editorial Alambra. 13-13p.

Mota Blancas E., Perales Caldera E. 1999. Gaceta Médica de México. Los mecanismos de absorción de calcio y los modificadores de absorción con base para la elaboración de una dieta de bajo costo para pacientes osteoporóticas, 00163813, may99, vol. 135, Issue 3 Source: gaceta médica de México, may. 99, vol. 135 Issue 3, p291, 14p

Oberleas, D. 1971. The determination of phytate and inositol phosphate. *Methods of biochemical analysis.* 20. pp:87-101.

Ogawa, M. Tanaka, M. Kasai, Z. 1975. Isolation of high phytin containing particles from rice grains using an aqueous polymer two phase sistem. *Agric. Chem.* 39. pp:695.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2003. Dieta, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas. Serie de informes técnicos 916. pp. 1- 152

O'Rahilly Ronan. 1989. Anatomía de Gardner. Ed. Interamericana McGraw Hill. 5ª edición. México. Pág. 10-12.

Otero María José e Hidalgo Liliana Graciela. 2004. Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales (una revisión). *Livestock Research for Rural Development Vol. 16, Art.#13*.

Periago MJ, Ros G, López G, Martínez MC, Rincón F. 1993. The dietary fiber components and their physiological effects. *Rev Esp Cienc Tecnol Aliment*; 33: 229-46.

Reeves. P.G., Nielsen, F. H., Fahey, Jr. G. C. 1993. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *Journal of Nutrition*, 123: 1939-1951.

Rivera Muñoz Eric Mauricio. Tesis de doctorado en ciencias (Ciencias de materiales). Desarrollo, descripción y análisis del método de crecimiento de hidroxiapatita (Hap) sobre geles monolíticos de sílice y procesamiento y caracterización de esferas de Hap con porosidad controlada para prótesis de globo ocular. 1997. UNAM. México, D. F. pp: 1 - 57

Rodríguez ME, Yañez JM, Alvarado JJ, Sanchez F, Figueroa CJD, Martínez-Bustos F, Martínez JL, González J, Miranda LCM, Vargas H. 1995. The influence of slaked lime content on the processing conditions of corn maize tortilla: changes of thermal, structural and rheological properties. *Lebensm. Unters Forsh*. 201:233-240.

Rodríguez, M.E.; Yañez, J.M.; Cruz-Orea, A.; Alvarado-Gil, J.J.; Zelaya-Angel, O.; Sánchez-Sinencio, F.; Vargas, H.; Figueroa, J.D.; Martínez-Bustos, F. & Martínez-Montes, J.L. (1995). The influence of slaked lime content on the processing conditions of cooked maize tortillas: changes of thermal, structural and rheological properties. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, Vol.201, No.3, (May 1995), pp. 233–240, ISSN 1431-4630

Rodríguez-García ME, De Lira C, Hernández-Becerra E, Cornejo-Villegas MA, Palacios-Fonseca AJ, Rojas-Molina I, Reynoso R, Quintero LC, Del real A, Zepeda TA. 2007. Physicochemical characterization of prickly pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum prickly pads powders as a function of the maturation. *Plant Food Hum Nutr* 62(3):107-112.

Rojas Molina I., Quintero LC., Hernández E., Reynoso R., Leal M., Gómez-Aldapa CA. Baños L. and Rodríguez ME. 2006. Study of calcium bioavailability in diets based on nopal (*Opuntia ficus indica*) with different maturation stages. En imprenta.

Rosado, J. L. 1990. Efecto de la ingestión de fibra dietética en el metabolismo de los lípidos. *Ateroma*. 2(7):73-78.

Rosado, J. L. 1995. Fibra dietética: Definición, propiedades físico-químicas, fisiológicas y sus implicaciones en la salud. *Revista de investigación clínica*. 4:67-78.

Ross, Michael. HISTOLOGÍA, TEXTO Y ATLAS COLOR. Editorial Panamericana. 2ª Edición. 1992, pp. 40-49

Secretaría de salud. 2001. Día mundial de la osteoporosis 20 de octubre de 2001. www.salud.gob.mx.

Serna-Saldivar, S. O. Rooney L.W. and Greene L. W. 1991. Effect of lime treatment on the availability of calcium in diets of tortillas and beans: rat growth and balance studies. *Cereal Chem*. 68. pp: 565-570.

Skoog, D.A., Learly, J.J. 1994. Análisis instrumental. 4º Ed. Ed. McGraw-Hill - Interamericana de España S. A.

Sobbota, Hammersen. HISTOLOGÍA, ATLAS EN COLOR DE ANATOMÍA MACROSCÓPICA. Editorial Salvat. 3ª Edición. México. 1988, pp. 1-5.

Su X, Sun K, Cui FZ, and Landis WJ. 2003. Organization of apatite crystals in human bone. *Bone*. 32:150-162.

Sugiera, S. H., Raboy, V., Young, K. A., Dong, F. M., Hardy, R. W. 1999. Availability of phosphorus and trace-elements in low-phytate varieties of barley and corn for rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 170:285-296.

Tamaki Tetsuro and Uchiyama Shuichi. 1995. Absolute and Relative Growth of rat Skeletal Muscle. *Physiology & Behavior*. 57(5):913-919.

Thompson, L. U., Yoon, J. H. 1984. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *J. food Sci*. 49:1228-1229.

Ventura J., 2004, Ratas de agua – *Arvicola sapidus*, Enciclopedia virtual de los vertebrados Españoles, Salvador, 1-17p.

Wayne S., 2002. Alcohol and other factors affecting Osteoporosis risk in women. *Alcohol Research & Health*. 26 (4): 292-298.

Wyatt C. J., Hernández L. M., Méndez R. O., Valencia M. E. 2000. Effect of different calcium and phosphorus content in Mexican diets on rat femur bone growth and composition. *Nutrition Research*. 20(3): 427-437

Zhou Jin R. and Erdman, Jr. John W. 1995. Phytic acid in health and disease. *Critical reviews in food science and nutrition*. 35(6):495-508.