



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA - INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS "JOSÉ
MATAIX"

Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos (B14.56.1)

Tesis Doctoral:

***Early programming: efecto de la
suplementación con prebióticos de
la dieta materna durante la
gestación y lactancia sobre el
metabolismo óseo de la madre y de
su descendencia***

M^a Pilar Bueno Vargas

2017



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: María Pilar Bueno Vargas

ISBN: 978-84-9163-289-4

URI: <http://hdl.handle.net/10481/47369>



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA - INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS "JOSÉ
MATAIX"**

Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos (B14.56.1)

Tesis Doctoral:

***Early programming: efecto de la
suplementación con prebióticos de
la dieta materna durante la
gestación y lactancia sobre el
metabolismo óseo de la madre y de
su descendencia***

M^a Pilar Bueno Vargas

2017

Estudio financiado por



D^a M^a Inmaculada López Aliaga. Catedrática de Fisiología de la Universidad de Granada.

D José M^a López Pedrosa. Manager University Site, Strategic R&D Abbott Nutrition, Granada.

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: “EARLY PROGRAMMING: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON PREBIÓTICOS DE LA DIETA MATERNA DURANTE LA GESTACIÓN Y LACTANCIA SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO DE LA MADRE Y DE SU DESCENDENCIA”, han sido realizados bajo nuestra dirección por el Licenciada D^a. M^a Pilar Bueno Vargas y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a 31 de marzo de 2017.



UNIVERSIDAD DE GRANADA

MEMORIA DE LA TESIS DOCTORAL "EARLY PROGRAMMING: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON PREBIÓTICOS DE LA DIETA MATERNA DURANTE LA GESTACIÓN Y LACTANCIA SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO DE LA MADRE Y DE SU DESCENDENCIA"

QUE PRESENTA LA LDA. Dña. M^a PILAR BUENO VARGAS PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

ESTA MEMORIA DE TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Prof. Dra.Dª Mª Inmaculada López Aliaga

Catedrática de Fisiología

Universidad de Granada

Dr.D. José Mª López Pedrosa

StrategicR&DAbbottNutrition,

Granada

POR LA DOCTORANDA:

Lda. Dª Mª Pilar Bueno Vargas

La doctoranda D^ªM^ª PILAR BUENO VARGAS, y los directores de la tesis: Dra. D^ª M^ª Inmaculada López Aliaga y Dr. D. José M^ª López Pedrosa

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 30 de marzo de 2017



Fdo.: Dra. D^ª M^ª Inmaculada López Aliaga

Directora de la Tesis



Fdo.: Dr. D. José M^ª López Pedrosa.

Director de la Tesis



Fdo.: D^ªM^ª Pilar Bueno Vargas.

Doctoranda

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a hacer posible, de una manera u otra, el desarrollo de esta Tesis, en especial:

A mis directores de tesis. Mi directora Inmaculada López Aliaga por su apoyo, su paciencia y su ánimo. Gracias por haberme dado la gran oportunidad de trabajar contigo. Y por supuesto, a mi director y jefe José M^a López Pedrosa. Gracias por tu apoyo y guía no solo en la realización de esta tesis, sino a la hora de definirme como investigadora.

A Ricardo Rueda, director del Departamento de Investigación de Abbott Nutrición Granada, por ser un referente, por motivarnos a trabajar siempre con una sonrisa y permitirme presentar este trabajo desarrollado en Abbott.

Al profesor Javier Díaz Castro, porque eres único como profesional y como amigo, has sabido animarme y ayudarme en este trabajo que has visto y sentido como tuyo. ¡Eres un solete!

A Manuel Manzano, gracias por tus consejos profesionales, por tu ayuda incalculable en el trabajo, por tus ánimos y por tu paciencia. *Grazie Mille!*

A M^a Luisa Jiménez, por tu profesionalidad, tu fuerza, tu energía y tu alegría. Eres una persona inigualable que haces que todo parezca más fácil. Sin tu trabajo, esta tesis no estaría hecha.

A Lola Palenzuela, Javier Gómez y Cristina Camarero, por vuestro esfuerzo, las horas cuidando de los animalitos y haciendo análisis mano a mano, porque vuestro trabajo es importantísimo.

A mis compañeros de Abbott, y espero que no me falte ninguno: Elena, Alejandro, Ángela, Enrique, Cristina, María, M^a Dolores, Dani, Oliver, Miriam, Chus... por estar ahí

siempre, porque con vosotros y de vosotros he aprendido mucho y porque hacéis los días de trabajo más amenos. ¡Es un placer trabajar con vosotros!

A Jesús, por apoyarme, cuidarme, animarme...por todo.

A mis padres, porque sois mi ejemplo a seguir, porque gracias a vosotros soy quien soy. Porque me escucháis y me ayudáis a resolver mi vida. Gracias.

A mis hermanos, en especial a mi hermano Javier. ¿Qué haría yo sin tus empujones? Me ayudas con tu tesón y tus ánimos. Sin ti no estaría aquí.

ÍNDICE

1. OBJETO	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	5
2.1. EL HUESO: FISIOLÓGIA Y METABOLISMO	7
2.1.1. FUNCIÓN ENDOCRINA DEL HUESO	16
2.1.2. OSTEOLASTOS.....	18
2.1.2.1. Osteocitos	20
2.1.2.2. Células de Revestimiento.....	21
2.1.3. OSTEOLASTOS.....	22
2.1.4. MARCADORES DEL REMODELADO ÓSEO	25
2.1.4.1. Marcadores De Formación Ósea.....	27
2.1.4.1.i. Fosfatasa Alcalina y Fosfatasa Alcalina Ósea.....	27
2.1.4.1.ii. Osteocalcina.....	28
2.1.4.1.iii. Propéptidos Amino- Y Carboxi- Terminales Del Procolágeno Tipo I (PINP, PICP).....	29
2.1.4.2. Marcadores De Resorción Ósea.....	29
2.1.4.2.i. Hidroxiprolina e Hidroxilisina.....	29
2.1.4.2.ii. Interrelaciones entre la Piridinio: Piridinolina (PYD) y Desoxipiridinolina (DPD).....	29
2.1.4.2.iii. TELOPÉPTIDOS AMINO Y CARBOXI-TERMINALES DEL PROCOLÁGENO TIPO I (CTX, NTX).....	31
2.1.4.2.iv. Fosfatasa Ácida Tartrato Resistente (TRAP)	31
2.1.5. FACTORES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO.....	32
2.1.6. HORMONAS Y PRECURSORES HORMONALES	33
2.1.6.1. Hormona Paratiroidea (PTH).....	33
2.1.6.2. Calcitriol o 1,25(OH) ₂ Vitamina D3	34
2.1.6.3. Hormonas Sexuales.....	36
2.1.6.4. Hormona de Crecimiento (GH)	37
2.1.6.5. Factores Reguladores Locales.....	37
2.2. LA NUTRICIÓN Y LA SALUD ÓSEA	39
2.2.1. EL CALCIO.....	39
2.2.2. ABSORCIÓN INTESTINAL DEL CALCIO.....	44
2.2.3. BIODISPONIBILIDAD DEL CALCIO.	47
2.2.3.1. Las Proteínas.....	47
2.2.3.2. Fósforo.....	48
2.2.3.3. Magnesio	49
2.2.3.4. Sodio y Sal.....	50
2.2.3.5. Grasas.....	50
2.2.3.6. Hidratos de Carbono.....	50
2.2.3.7. Fibra.....	51
2.2.4. LOS PREBIÓTICOS Y EL HUESO.....	52
2.3. EL CALCIO DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA	58

2.3.1. GESTACIÓN	59
2.3.2. LACTACIÓN	62
2.4. LA NUTRICIÓN DURANTE EL DESARROLLO DEL NIÑO: EL EFECTO DE LA PROGRAMACIÓN TEMPRANA “PROGRAMMING”	66
2.4.1. DESARROLLO ÓSEO Y PICO DE MASA ÓSEA	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS	75
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	77
3.1.1. COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS	78
3.1.2. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	82
3.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS.	83
3.2.1.1. Osteocalcina	83
3.2.1.2. Hormona Paratiroidea Sérica (PTH)	83
3.2.1.3. Deoxipiridinolina (DPD).....	84
3.2.1.4. Piridinolina (PYD)	85
3.2.1.5. Fosfatasa Alcalina (ALP)	85
3.2.1.6. Creatinina (CRE).....	86
3.3. ANÁLISIS DEL PH EN EL CONTENIDO DEL CIEGO.....	86
3.4. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO EX-VIVO.....	87
3.5. MICRO-TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA (μCT).....	87
3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.	89
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	91
4.1. EFECTO DE LA DIETA MATERNA EN EL PESO DE LAS MADRES Y CRÍAS.....	93
4.2. EFECTO DE LA DIETA MATERNA EN EL HUESO DE LAS MADRES.	96
4.2.1. RESULTADOS DENSITOMÉTRICOS	96
4.2.2. RESULTADOS DE LA MICRO-ESTRUCTURA	99
4.2.3. RESULTADOS BIOQUÍMICOS	107
4.2.4. ANÁLISIS DEL pH DEL CONTENIDO CECAL.....	109
4.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS MADRES	109
4.4. EFECTO DE LA DIETA MATERNA EN LA SALUDO ÓSEA Y EN LOS BIOMARCADORES DE LA DESCENDENCIA.....	114
4.4.1. RESULTADOS EN LA DESCENDENCIA AL NACIMIENTO.....	114
4.4.2. RESULTADOS EN LA DESCENDENCIA AL DESTETE	117
4.4.3. RESULTADOS EN LA DESCENDENCIA AL FINAL DE LA ADOLESCENCIA. ...	122
4.5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS CRIAS.....	132
5. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	137
6. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	141
7. ÍNDICE DE FIGURAS.....	145
8. ÍNDICE DE TABLAS.....	151
9. BIBLIOGRAFÍA	155
10. ANEXO.....	177

1. OBJETO

OBJETO

El esqueleto es un conjunto total y organizado de piezas óseas o huesos que proporcionan una estructura firme al cuerpo. El sistema esquelético es uno de los órganos más grandes del organismo, es metabólicamente activo y se encuentra en constante remodelación. Está formado por una matriz orgánica, compuesta principalmente de colágeno tipo I, de un componente mineral, constituido por cristales no puros de hidroxiapatita, y por células activas especializadas en el intercambio de calcio y fosfato con el plasma (osteocitos, osteoblastos y osteoclastos). Entre sus principales funciones se encuentran la de soporte mecánico, dar protección a la médula y a diferentes órganos, el mantenimiento de la homeostasis del calcio, la hematopoyesis que se realiza en la médula ósea y su función como órgano endocrino secretando factores y proteínas con capacidad de regular la actividad biológica de otros órganos.

Los minerales del hueso son la principal reserva de calcio y fósforo del organismo, se encuentra en constante intercambio y remplazo junto a los componentes orgánicos en un proceso que se denomina remodelado óseo o “*turnover*”. Su homeostasis se encuentra regulada por mecanismos que controlan la formación y resorción del tejido óseo, procesos que se ven influenciados por factores genéticos, endocrinos y ambientales, entre los que se destaca la nutrición y el ejercicio, y que pueden dar lugar a composiciones anormales y a patologías óseas.

El efecto de la nutrición sobre el hueso se hace más patente en las etapas de la vida donde existe un mayor metabolismo óseo como el embarazo y la lactancia, durante el crecimiento del niño y tras la menopausia. Es decir, una carencia o una suplementación pueden ejercer su mayor efecto en periodos donde el hueso está más activo y por lo tanto tiene un mayor requerimiento de nutrientes.

Durante el embarazo y la lactancia, los minerales del esqueleto materno, entre los que destaca el calcio, se movilizan para poder cubrir las necesidades creadas para la mineralización del esqueleto fetal y, posteriormente, para la generación de la leche materna que debe aportar los requerimientos de calcio del neonato durante la lactación. Esto genera una descalcificación del esqueleto materno durante estas etapas que, en condiciones de malnutrición o deficiencia de ciertos nutrientes, como la vitamina D o el calcio, puede provocar

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

un incremento de la fragilidad del hueso e incluso producir roturas. Por este motivo, la nutrición juega un papel muy importante en la conservación de la masa ósea materna durante estos periodos.

Además, la nutrición materna no sólo afecta a la madre, también ejerce un efecto sobre el desarrollo fetal y en el neonato durante la lactancia, donde la madre es la fuente más importante de nutrientes. En este periodo, donde se produce una ganancia muy rápida de minerales por el crecimiento fetal y neonatal, y donde existe una gran plasticidad del esqueleto en formación, se producen intensas interacciones entre el genoma y la nutrición, que afectan al desarrollo y mantenimiento del hueso durante toda la vida postnatal (efecto *early programming*). De esta manera, tanto el feto como posteriormente el neonato, responde de una manera plástica a las influencias de su medioambiente, recibidas en forma de señales hormonales y nutricionales a través de su madre. Estas señales provocan una adaptación fisiológica o morfológica del niño que afectaran a su desarrollo durante toda su vida⁽¹⁾. Esta fase plástica de adaptación al entorno se extiende desde el momento de la concepción, e incluso antes de la misma, hasta el destete⁽²⁾ del neonato.

Actualmente existen un abanico de nutrientes y alimentos funcionales que están siendo estudiados por su efecto beneficioso en el hueso. Entre estos nutrientes podemos destacar los prebióticos, que han demostrado tener un efecto beneficioso sobre el hueso en el crecimiento o frente a la osteoporosis que se produce tras la menopausia. Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado su efecto durante la gestación y la lactancia en el esqueleto materno ni tampoco su efecto *programming* en el hueso de la descendencia.

Así, partiendo de la premisa planteada, se plantea el objetivo de esta tesis doctoral:

Estudiar el efecto beneficioso que la suplementación de la dieta materna con el prebiótico, inulina enriquecida con oligofructosa, durante la gestación y la lactancia, puede generar no sólo en la salud ósea de la madre sino también en la formación y desarrollo del esqueleto de la cría a lo largo de su vida, desde su nacimiento hasta el final de la adolescencia, a través de un estudio preclínico en ratas.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. EL HUESO: FISIOLÓGIA Y METABOLISMO.

El hueso es un órgano altamente especializado compuesto por una matriz orgánica mineralizada en la que se incluyen diferentes tipos de células, y que se caracteriza por su rigidez, dureza y su capacidad de reparación y regeneración.

El mayor constituyente del mineral óseo son nanocristales de hidroxiapatita $[(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)]$ que se localizan dentro y entre las fibrillas de colágeno que forman la matriz orgánica. El colágeno tipo I constituye aproximadamente el 98% de la matriz orgánica, el 2% restante son proteínas no colagénicas, entre las que se encuentran la osteocalcina, osteopontina, osteonectina y sialoproteínas. Las fibras colágenas le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión. Además, el hueso tiene en su composición células especializadas en su formación y de soporte, los osteoblastos y los osteocitos, y células encargadas del remodelado, los osteoclastos.

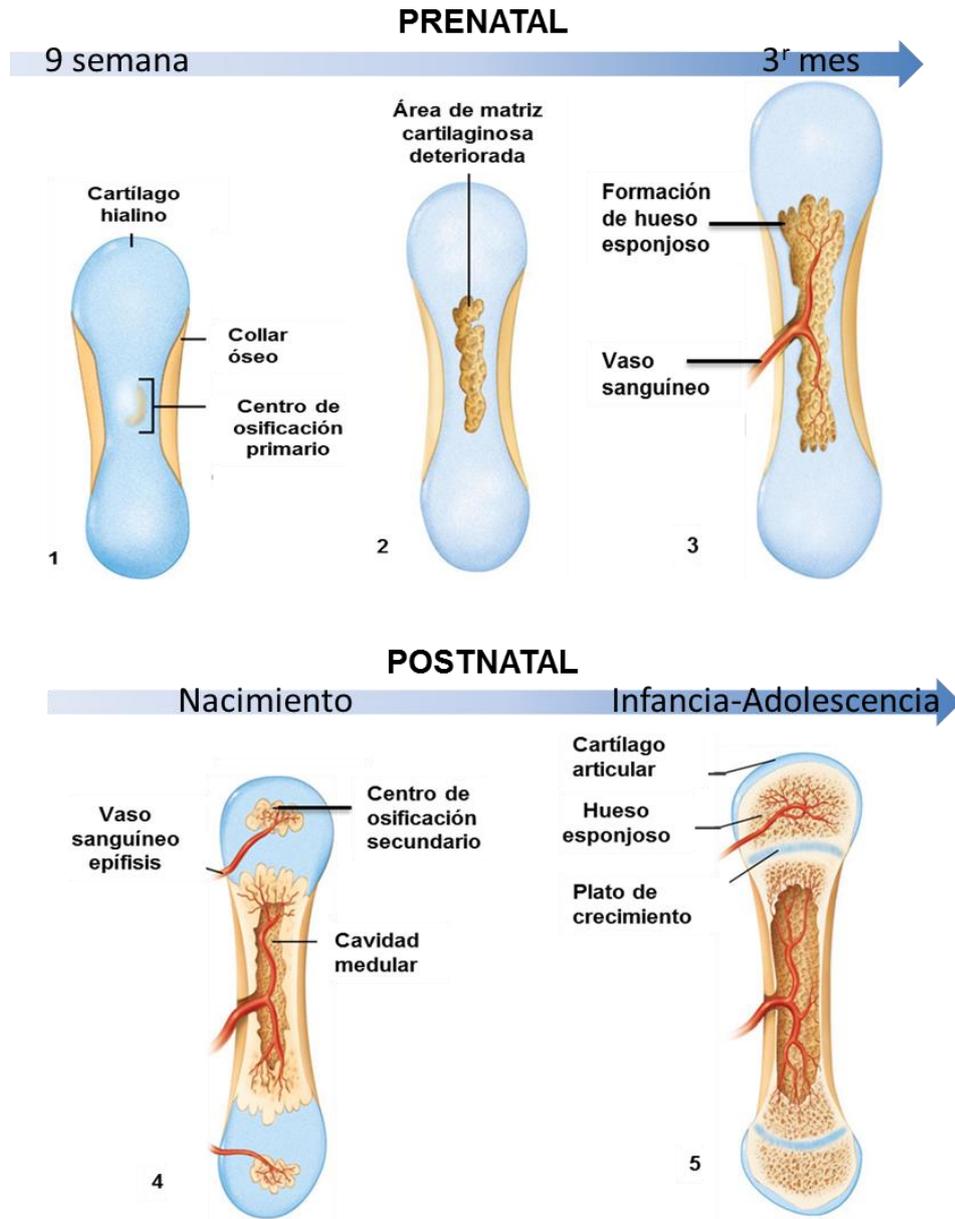
El hueso es un órgano vivo que sufre transformaciones constantes a lo largo de la vida, lo que lo convierte en un tejido dinámico. Estas transformaciones vienen definidas por cuatro procesos principales: desarrollo, modelado, remodelado y reparación ósea.

La formación y desarrollo del tejido óseo se conoce como osteogénesis, y ocurre por dos procesos diferenciados: la osificación endocondral y la intramembranosa. El primer hueso que se forma es el primario, que será resorbido y sustituido por el hueso secundario, que continuará resorbiéndose durante toda la vida aunque a un ritmo más lento⁽³⁾. Durante la embriogénesis, los huesos largos se forman inicialmente como cartílago que gradualmente se reemplaza por hueso, a este proceso se le conoce como osificación endocondral (Figura 1).

Brevemente, en la zona dentro del embrión donde crecerá un hueso se forma un “molde” de cartílago hialino de dicho hueso, aproximadamente en la 8ª semana de gestación. Una vez que este molde alcanza el tamaño, se produce la vascularización de la membrana media de la diáfisis del cartílago, momento en el que las células condrogénicas se convierten en células osteoprogenitoras formadoras de osteoblastos. Los osteoblastos formados

comienzan a secretar matriz ósea generando un complejo formado por hueso calcificado y cartílago. Conforme se genera y engruesa el hueso, este crece desde la zona media de la diáfisis hacia la epífisis, momento en el cual los osteoclastos comienzan a reabsorber el complejo cartílago-hueso formado. De esta manera se reemplaza el cartílago por hueso en la diáfisis pero no en las placas epifisarias, que son las encargadas del crecimiento del hueso hasta los 18-20 años⁽³⁾ (aprox.).

Figura 1. Partes de la formación ósea por osificación endocondral



1. Durante la 9^a semana de gestación se forma el collar óseo alrededor del cartilago hialino.
2. El cartilago del centro de la diáfisis se calcifica y se comienzan a desarrollar cavidades.
3. En el 3^{er} mes de gestación se produce la invasión de las cavidades internas por el periostio y comienza la formación del hueso esponjoso.
4. Tras el nacimiento, la diáfisis se alarga, formándose la cavidad medular. Comienzan a aparecer centros de osificación secundarios.
5. Durante el crecimiento, de la infancia hasta la adolescencia, la epífisis se osifica. Sólo queda cartilago hialino en el plato de crecimiento y en los cartilagos de las articulaciones. (Modificada a partir de Gartner et al.⁽³⁾)

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

Otros huesos, como los huesos planos del cráneo, se forman directamente por condensación en la mesénquima, por un proceso que se denomina osificación intramembranosa. Durante este proceso, las células mesenquimatosas se diferencian en osteoblastos que secretan matriz ósea generando un entramado de trabéculas en el centro primario de osificación. Conforme se produce la osificación, los osteoblastos atrapados en el osteoide se transforman en osteocitos que finalmente se ven rodeados por el hueso en formación. Todo esto lleva a la generación de una red de trabéculas, cuya adición en la periferia aumenta el tamaño del hueso que se está formando. Por ejemplo, Las fontanelas de los recién nacidos, situadas en los huesos frontal y parietal, son centros de osificación no fusionados antes del nacimiento.

Los huesos largos continúan su crecimiento en longitud y anchura durante la infancia y la adolescencia. El aumento en longitud se debe a que continúa la formación de hueso por osificación endocondral en cada extremo de los huesos. Sin embargo, el incremento en la anchura del hueso o crecimiento por aposición, por ejemplo a nivel de la diáfisis, se consigue mediante la formación de hueso nuevo en la superficie exterior del hueso cortical por osificación intramembranosa.

Otro de los procesos principales es el modelado óseo (*bone modelling*). Durante el crecimiento, el hueso se transforma en forma y tamaño gracias al modelado óseo. En este proceso participan los osteoblastos⁽⁴⁾ sin que ocurra una resorción ósea previa en la misma superficie⁽⁵⁾. El modelado óseo puede ocurrir en el periostio, en la superficie endocortical y en la superficie trabecular, y genera un cambio en el diseño de la red trabecular o en la pared cortical. El resultado final del proceso de modelado óseo es un balance positivo de masa ósea, especialmente en niños y adolescentes, pero también en aquellas personas que mantienen una actividad física razonable, ya que el modelado óseo es bastante sensible a la estimulación mecánica que se produce durante la realización de ciertos deportes.

Durante el crecimiento también actúa otro de los procesos principales simultáneamente con el modelado óseo y que permite que la dinámica ósea continúe una vez que el crecimiento cesa: el remodelado óseo (*bone remodelling*). El remodelado óseo es un proceso esencial en la determinación de la calidad ósea puesto que de él dependen la

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

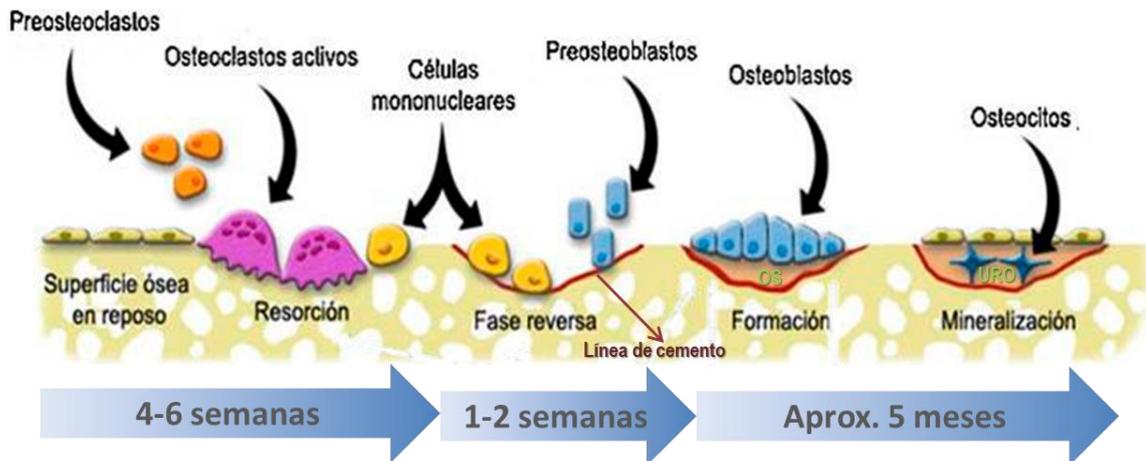
arquitectura, la mineralización y la geometría del hueso⁽⁶⁾. Fue Frost en 1964⁽⁷⁾ el primero en describir el remodelado óseo como el resultado de los procesos de resorción y reposición acoplados, es decir, que tienen lugar en una misma zona llamada unidad de remodelado óseo (URO)⁽⁸⁾. El remodelado óseo tiene lugar en cualquiera de las superficies del hueso: el periosteo, en la superficie endocortical, en la trabecular y en la intracortical⁽⁴⁾. Su principal objetivo es reemplazar una pequeña cantidad de hueso viejo por otra cantidad de hueso nuevo, obteniéndose, si ambas cantidades son iguales, un balance neutro o conservador. Sin embargo, el remodelado óseo puede generar un balance negativo, cuando la cantidad de hueso nuevo generado es menor que la cantidad de hueso viejo eliminado. Cuando el balance negativo ocurre en el hueso esponjoso se produce una disminución de la anchura trabecular, que puede dar lugar a perforaciones e incluso a fracturas. Si el balance negativo ocurre en el hueso cortical, se puede traducir en un aumento de la cavidad medular y/o en una disminución del grosor de la pared cortical, mientras que en la superficie intracortical puede generar un incremento de la porosidad que reduciría la rigidez y dureza del tejido óseo.

El remodelado del hueso se lleva a cabo por grupos especializados de células que constituyen la unidad multicelular básica (BMU, *Basic Multicellular Unit*) en las URO. Una BMU está compuesta por las principales células óseas: osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y células de revestimiento. Estas células actúan de manera coordinada en el tiempo y el espacio en un ciclo de remodelado. Se estima que en un momento dado existen unos 2 millones de unidades de remodelado activas⁽⁹⁾.

Hasta el momento, el remodelado óseo es el único mecanismo conocido por el que se reemplaza tejido óseo envejecido por tejido nuevo manteniendo la integridad del esqueleto⁽¹⁰⁾. El remodelado óseo se produce durante toda la vida y su velocidad puede ser tan alta como para que se produzca la renovación de hasta un 50% del tejido cortical en la diáfisis del fémur durante los dos primeros años de vida, para, más tarde, ir desacelerándose hasta llegar a una tasa de reposición del 2-5% en el hueso cortical de los ancianos. Por otro lado, en el hueso trabecular, las tasas de remodelado son proporcionalmente más altas, de 5 a 10 veces las tasas de remodelado del hueso cortical en el adulto⁽¹¹⁾.

El ciclo del remodelado óseo sigue la siguiente secuencia de fases: quiescente o reposo, activación, resorción, reversa o inversión y formación, tras la cual vuelve a la fase quiescente⁽¹²⁾ (Figura 2).

Figura 2. Fases del remodelado óseo en una Unidad de Remodelado Óseo (URO).



El remodelado es un ciclo que se produce en 5 etapas sucesivas: quiescencia o reposo, activación, resorción, inversión o fase reversa y formación. URO: Unidad de Remodelado Óseo; OS: Osteoide (modificada a partir de Reyes-García et al.⁽¹³⁾).

En la fase quiescente o de reposo, la superficie ósea se encuentra inactiva, cubierta por una capa de células de revestimiento provenientes de la línea osteoblástica⁽¹⁴⁾. Por debajo de esta capa celular se encuentra la membrana endóstica, compuesta por tejido conectivo no mineralizado. La superficie ósea permanece en este estado inactivo hasta que se inicia la siguiente fase⁽⁶⁾.

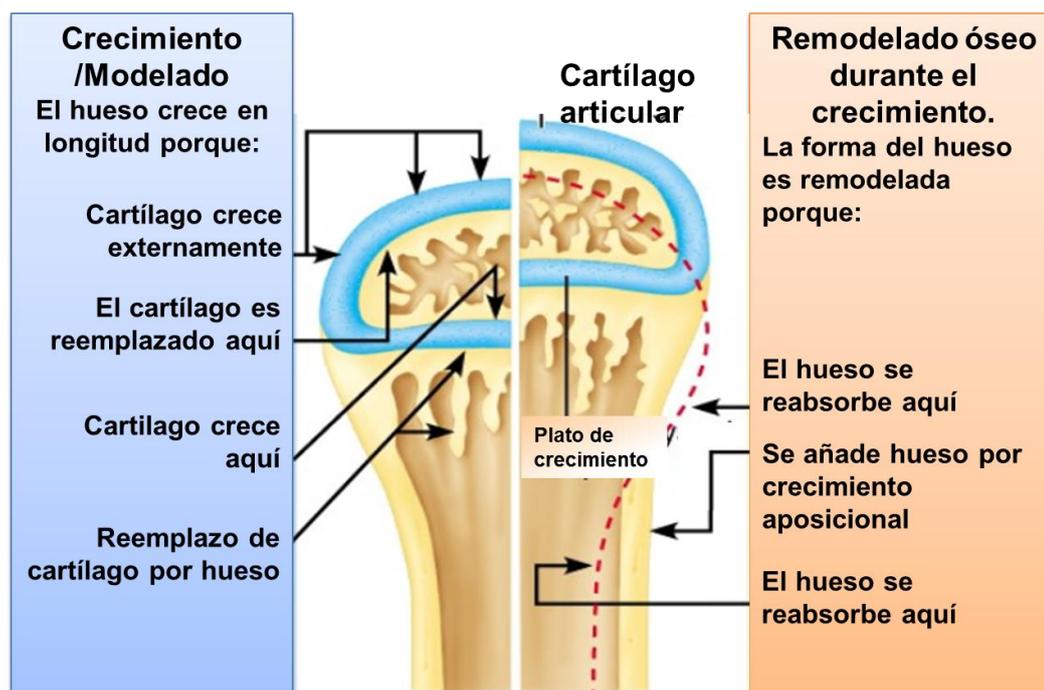
Durante la activación, las células de revestimiento comienzan a segregar colagenasa, disolviendo la capa no mineralizada (membrana endóstica) que protege al hueso y dejan expuesta la superficie mineralizada en la que se anclan los osteoclastos. Como consecuencia de la actividad de los osteoclastos se comienza a producir la resorción ósea, generándose una excavación poco profunda llamada bahía o laguna de resorción (también denominada laguna de Howship en el hueso trabecular y como penetrante en el hueso cortical⁽⁶⁾). Entre el final de la fase de resorción y el inicio de la de formación en una zona determinada transcurre un

tiempo de acoplamiento que dura entre 1-2 semanas y que se denomina fase de inversión o reversa. Durante esta fase se forma una línea de cemento en la que se observan células mononucleares, posiblemente fagocitos, y preosteoblastos que preparan la superficie para la formación del hueso y ausencia de osteoclastos. La fase de formación comienza con la síntesis de matriz, en la que los osteoblastos acoplados a la línea de cemento producen el osteoide (matriz colagénica principalmente). Cuando la capa de osteoide alcanza las 12-15 μ m, aproximadamente tras 5-10 días, los osteoblastos comienzan con la mineralización primaria, cuyo frente se sitúa en el fondo de la cavidad de manera que, conforme avanza, va dejando la matriz ósea mineralizada por la formación de cristales de hidroxapatita. Una vez rellena la cavidad, la mineralización continúa aunque a un ritmo menor, produciéndose la mineralización secundaria que dura entre 3 y 6 meses. Finalmente, la superficie ósea se vuelve a cubrir por una delgada capa de hueso no mineralizado y de células de revestimiento, entrando de nuevo en la fase quiescente (Figura 2). Por lo tanto, un ciclo completo de mineralización dura alrededor de los 4 meses, aunque es necesario más tiempo para que el hueso alcance la plena madurez⁽⁶⁾.

Los procesos de modelado (formación y conformación) y remodelado (reemplazamiento o renovación) ocurren durante todo el crecimiento, desde la infancia y la adolescencia simultáneamente, existiendo una alta resorción ósea acoplada a una formación aún mayor de hueso (figura 3), resultando en un aumento de la masa esquelética hasta alcanzar el llamado pico de masa ósea, entre los 20 y los 30 años. Mientras que durante la edad adulta es el remodelado el proceso predominante por el que se mantiene la integridad del esqueleto. Gracias a ambos procesos el esqueleto adulto se regenera totalmente cada 10 años⁽¹⁵⁾.

Debido a la importancia que tiene la obtención de un correcto pico de masa ósea, más adelante se le dedica un capítulo en esta memoria de tesis.

Figura 3. Procesos de modelado y remodelación durante el crecimiento óseo.



En el recuadro azul se representan la osificación endocondral que ocurre en los cartílagos articulares y en las placas epifisarias a medida que el hueso se alarga. En el recuadro naranja se muestran la remodelación ósea que ocurre durante el crecimiento del hueso largo para mantener proporciones óseas adecuadas. El contorno rojo discontinuo coincide con el perfil de la izquierda. (Modificada a partir de de Marieb et al.⁽¹⁶⁾)

Por último, el proceso de reparación ósea hace del hueso el único tejido capaz de repararse a sí mismo completamente mediante la reactivación de los procesos que tienen lugar durante su embriogénesis. Una fractura en el hueso produce daños y destrucción en la matriz ósea provocando la muerte celular y desgarros en el periostio y endostio. Además, la rotura de los vasos sanguíneos adyacentes a la línea de fractura provoca una hemorragia localizada formando un hematoma⁽³⁾. Durante el proceso de reparación, los macrófagos se encargarán de eliminar primeramente este hematoma. A continuación, aparecen células formadoras de hueso, procedentes de ambos lados de la línea de fractura, que forman puentes de tejido óseo inmaduro, sin orientación espacial definida (callo de fractura), uniendo entre sí los extremos del hueso fracturado. Finalmente este hueso, a través de un proceso de modelado, es sustituido por otro, de tipo laminar, orientado según las líneas de fuerza que actúan sobre la zona⁽¹⁷⁾.

Además de las funciones mecánicas del hueso, entre las que se encuentran la de protección de los órganos vitales, sostén, movimiento y transducción de sonido, el hueso lleva a cabo importantes funciones metabólicas entre las que se encuentran:

1.- Reserva mineral.

Los huesos actúan como un reservorio homeostático de minerales importantes para la función del cuerpo, entre los que se encuentran el calcio y el fósforo. Estos minerales óseos pueden ser movilizados para mantener la homeostasis mineral sistémica. Esta función metabólica del hueso prevalece frente a su función estructural ya que el calcio y otros minerales son secretados y reemplazados por el hueso para servir a las necesidades homeostáticas sistémicas independientemente de que ello resulte en una pérdida de la integridad estructural del esqueleto.

2.- Almacén de factores de crecimiento y citoquinas.

La matriz mineralizada del hueso también es un almacén de cierto tipo de citoquinas y factores de crecimiento que pueden ser liberados tras la resorción y pueden ejercer sus efectos localmente y sistémicamente. Entre estos factores destacan los factores de crecimiento insulínico (IGFs, *Insulin-Like Growth Factors*), los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs, *Fibroblast Growth Factors*), los factores de transformación de crecimiento beta (TGF- β , *Transformation Growing Factor beta*) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP, *Bone Morphogenetic Proteins*)

3.- Almacén de grasa.

Fundamentalmente la reserva de grasas se produce en la médula ósea amarilla que se infiltra tras la periadolescencia, cuando se produce un declive de la hematopoyesis.

4.- Equilibrio ácido-base.

El hueso se encarga de tamponar la sangre frente cambios en el pH, bien por la absorción o bien por la liberación de sales alcalinas.

5.- Detoxificación.

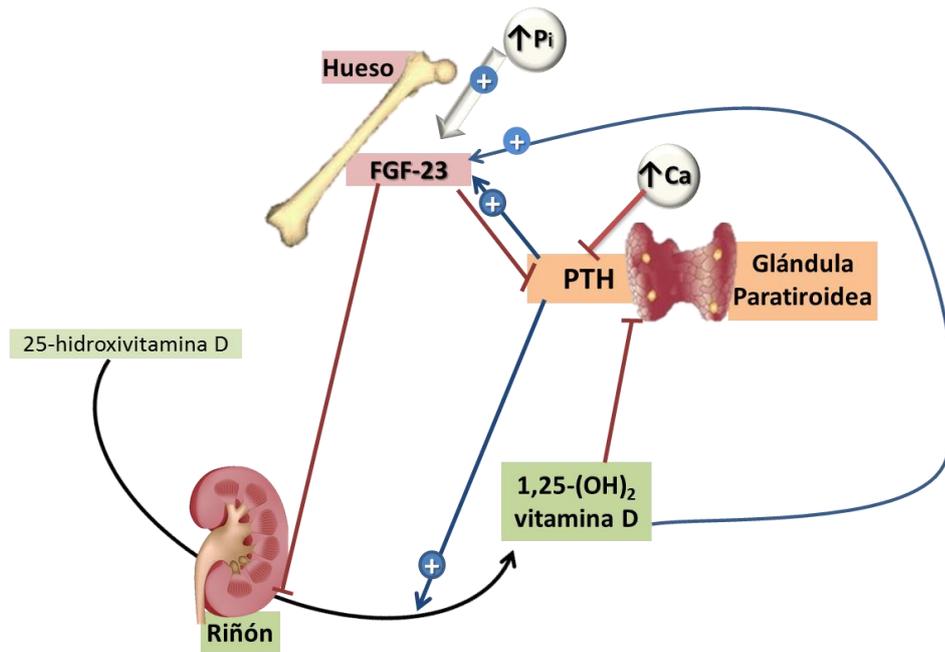
El tejido óseo es capaz de almacenar metales pesados y otros elementos extraños, eliminándolos de la circulación y ayudando a reducir sus efectos en otros tejidos.

2.1.1. FUNCIÓN ENDOCRINA DEL HUESO

Además de las funciones metabólicas descritas, durante los últimos años se ha dado a conocer la función endocrina del hueso gracias a la aparición de estudios en los que se muestran un verdadero papel endocrino de este órgano. Principalmente se ha debido a la demostración del papel hormonal de proteínas específicas óseas y al hallazgo de nuevas hormonas producidas por las células óseas que controlan el balance energético y la homeostasis mineral⁽¹⁸⁾. Entre estas “nuevas” hormonas se encuentran el factor de crecimiento fibroblástico (FGF-23) y la osteocalcina.

Así, el FGF-23, producido en el hueso principalmente por los osteocitos, regula los niveles de fósforo en el suero mediante la inhibición de la producción de vitamina D activa (calcitriol o 1,25-(OH)₂ Vitamina D3) y sobre los transportadores específicos de este mineral en los riñones^(19; 20) (Figura 4). El FGF-23 también regula la secreción de la hormona paratiroidea (PTH) de una manera dosis dependiente. Por otro lado, tanto los niveles séricos de calcitriol como los de la PTH influyen a su vez en la regulación de éste factor. Por todo esto, el FGF-23 ha sido identificado como el principal factor regulador del metabolismo del fósforo y parece jugar un papel crítico en la regulación mineral y en el metabolismo óseo de pacientes con enfermedad renal crónica o con enfermedad cardiovascular⁽²¹⁾.

Figura 4. Efecto del FGF-23 sobre la regulación del metabolismo de la vitamina D.

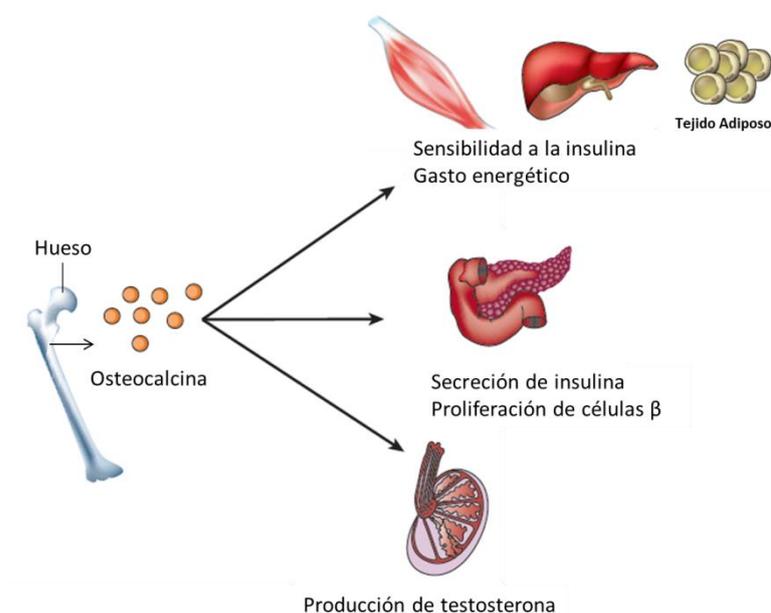


El FGF-23 producido por los osteocitos en el hueso inhibe la producción de 1,25(OH)₂ vitamina D, mientras que la PTH estimula su producción. A su vez, 1,25(OH)₂ vitamina D inhibe la producción de PTH y la secreción de las glándulas paratiroides y estimula la producción de FGF23 a partir del hueso. (Figura modificada de Bikle D. 2009⁽²²⁾)

Por otro lado, también recientemente se ha demostrado el papel hormonal de la osteocalcina, una proteína ósea específica liberada exclusivamente por los osteoblastos. Es en su estado descarboxilado cuando la osteocalcina liberada en el torrente sanguíneo actúa como hormona, contribuyendo a la regulación del metabolismo de la glucosa a través de una nueva ruta metabólica⁽²³⁾. Así, la osteocalcina regula la homeostasis de la glucosa a través del incremento de la secreción de insulina y la sensibilidad a la misma, además de aumentar el número de células β productoras de insulina⁽²⁴⁾ y de la estimulación de la expresión de la adiponectina en los adipocitos dando lugar a una mejora en la intolerancia a la glucosa⁽²⁵⁾ (Figura 5). Por otro lado, la insulina y la adiponectina estimulan la expresión de la osteocalcina en los osteoblastos, sugiriendo que existe una comunicación entre el hueso, el páncreas y el tejido adiposo⁽²⁵⁾. Además, estudios recientes han demostrado que la osteocalcina aumenta la sensibilidad a la insulina y la diferenciación en el músculo, mientras que mioquinas secretadas en el músculo son a su vez capaces de regular el metabolismo óseo. Estos hallazgos sugieren

que el metabolismo óseo y el metabolismo de la glucosa están asociados entre sí a través de la acción de la osteocalcina⁽²⁵⁾.

Figura 5. Funciones hormonales de la osteocalcina.



La osteocalcina descarboxilada estimula la secreción de la insulina y la proliferación de las células β en el páncreas, el gasto de energía por el músculo y la sensibilidad a la insulina tanto en los tejidos adiposo, muscular y hepático. Además, promueve la fertilidad masculina por la estimulación de la síntesis de testosterona en los testículos. (Modificada de Karsenty et al. 2012⁽²⁶⁾)

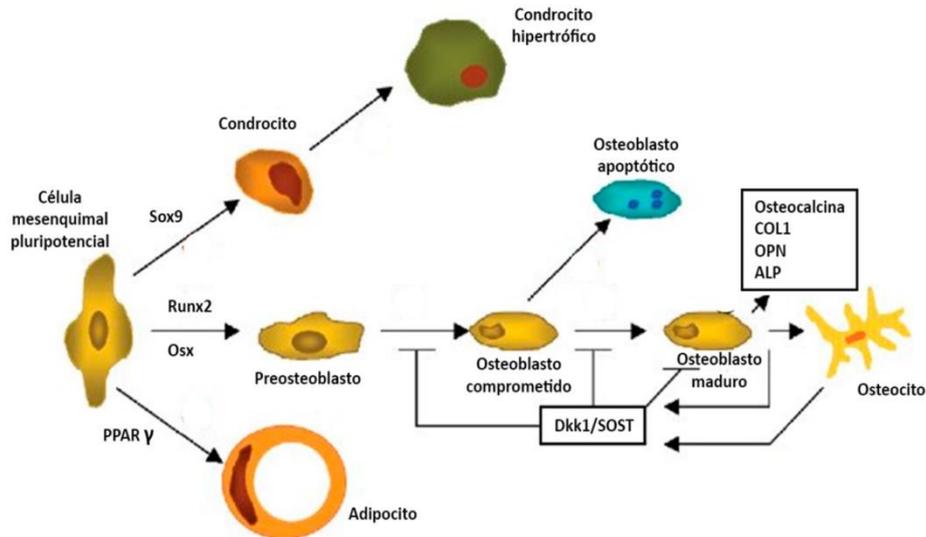
Ambas moléculas, el FGF23 y la osteocalcina, cumplirían por lo tanto con la definición clásica de hormona, es decir, se producen exclusivamente por el hueso y actúan sobre diferentes órganos diana siendo reguladas por mecanismos de retroalimentación⁽¹⁸⁾.

2.1.2. OSTEÓBLASTOS

Los osteoblastos son células mononucleadas grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante⁽²⁷⁾. Se localizan a lo largo de la superficie ósea, suponiendo un 4-6% del total de células óseas existentes. Los osteoblastos derivan de las células mesenquimales pluripotenciales (OSC, *Osteogenic Stem Cells*) de la médula ósea que a su vez pueden

diferenciarse también en otros tipos de células entre las que se incluyen los adipocitos, los condrocitos y los mioblastos⁽²⁸⁾ (Figura 6).

Figura 6. Diferenciación de las células mesenquimales pluripotenciales.



Esquema de diferenciación osteoblástica y sus principales señales moleculares. Sox9: sex determining region Y-box 9; Runx2 (runt-related transcription factor 2); Osx: osterix; PPARγ: peroxisome proliferator-activated receptor gamma; Dkk-1: proteína Dickkopf-1; SOST: gen de la esclerostina; COL1: colágeno tipo 1; OPN: osteopontina; ALP: Alcalina fosfatasa. (Modificada a partir de de Baron y Rawadi⁽²⁹⁾)

Para que la diferenciación sea selectiva hacia la formación de osteoblastos se requiere de dos factores de transcripción: Runx2 y Osterix (Osx)⁽³⁰⁾. El Runx2 no sólo regula la diferenciación a osteoblastos, también regula la expresión de genes relacionados con la maduración de los mismos entre los que se incluyen los de la osteocalcina, la osteopontina (OPN), la sialoproteína ósea (BSP, *Bone Sialoprotein*) y el colágeno tipo I (Col1)⁽³¹⁾. Por otro lado, el mecanismo a través del cual Osterix (Osx) regula la diferenciación en osteoblastos está poco estudiado, aunque parece que este factor de transcripción juega un papel en la maduración osteoblástica, es decir, en el paso del preosteoblasto a osteoblasto y en la osteogénesis (formación del hueso)⁽³²⁾.

Una vez diferenciados, los osteoblastos se encargan de generar la matriz ósea así como de la regulación de los osteoclastos⁽³³⁾, como más adelante explicaremos. La síntesis de la matriz ósea por los osteoblastos ocurre en dos pasos principales: síntesis de la matriz colagénica y mineralización.

En el primer paso, los osteoblastos sintetizan colágeno tipo I, que es depositado en paralelo o en capas concéntricas para producir el hueso maduro o hueso lamelar. Las fibras de colágeno se acomplejan con las proteínas no colagénicas formadas por el osteoblasto, como la osteocalcina o la osteonectina, que, de esta forma, quedan incluidas en la matriz ósea.

El mecanismo por el que se produce la mineralización de la matriz colagénica no está aún muy bien definido. Parece que en él juega un papel fundamental la fosfatasa alcalina, que es expresada en concentraciones relativamente altas en el osteoblasto y que se encuentra anclada en la superficie de su membrana plasmática⁽³⁴⁾. Además, el osteoblasto es capaz de regular las concentraciones locales de calcio y fosfatos, de forma que puede controlar la formación de hidroxapatita y, por tanto, la mineralización. La síntesis de la matriz determina el volumen del hueso, aunque no su densidad, mientras que la mineralización aumenta la densidad del hueso pero no altera su volumen.

Una vez que la superficie del hueso entra en estado quiescente los osteoblastos pueden: sufrir apoptosis, incorporarse dentro de la matriz como osteocitos o transformarse en células de revestimiento (*bone surface-lining cells*).

2.1.2.1. Osteocitos

Los osteocitos son las células más abundantes presentes en el hueso, aproximadamente 10 veces más que osteoblastos, lo que supone el 90-95% del total de células óseas. Son células muy longevas con una duración de hasta 25 años de vida⁽³⁵⁾. Los osteocitos poseen una morfología dendrítica y se localizan dentro de las lacunae rodeados de matriz ósea mineralizada (figura 7). Son capaces de comunicarse con las células de su alrededor a través de su membrana plasmática que se extienden a lo largo de los canalículos. Debido a su situación estratégica, los osteocitos actúan como mecanorreceptores indicando a los

osteoclastos dónde y cuándo reabsorber hueso y a los osteoblastos cómo y cuándo generarlo⁽⁹⁾, detectando así las necesidades de aumentar o reducir el hueso durante las adaptaciones funcionales del esqueleto, como también la necesidad de reparar microrroturas⁽³⁴⁾. Los osteocitos son, por tanto, capaces de detectar cambios hormonales, como por ejemplo de estrógeno o de glucocorticoides, así como también cambios debidos a fuerzas mecánicas. Es esta última cualidad la que hace pensar que los osteocitos actúan como mediadores del remodelado óseo, a través de la regulación de las actividades de los osteoblastos y los osteoclastos. Es más, se ha reconocido la apoptosis de los osteocitos como una de las señales quimiotáctica en los osteoclastos para el inicio de la resorción⁽³⁶⁾.

Figura 7. Osteocitos.

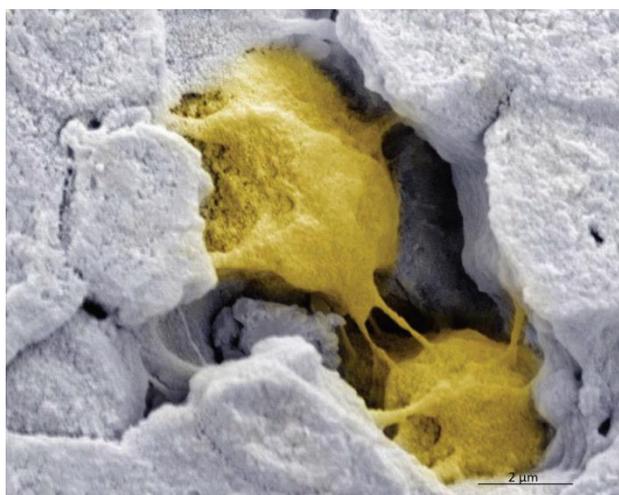


Imagen de microscopía electrónica de barrido mostrando dos osteocitos (en amarillo) rodeados de matriz ósea (en blanco). Se puede observar los procesos citoplasmáticos entre los osteocitos formando una red interconectada. Barra de escala: 2 μm. (Modificada a partir de de Florencio-Silva et al.⁽³¹⁾)

2.1.2.2. Células de Revestimiento

Los osteoblastos también pueden dar lugar a las células de revestimiento. Estas células no son más que osteoblastos en forma plana. Se encuentran formando una capa por encima de la matriz colagénica no mineralizada que recubre al hueso cuando se encuentra en su estado quiescente⁽¹⁴⁾. Una de las posibles funciones de las células de revestimiento es la eliminación de esta matriz colagénica para facilitar la unión de los osteoclastos a la superficie

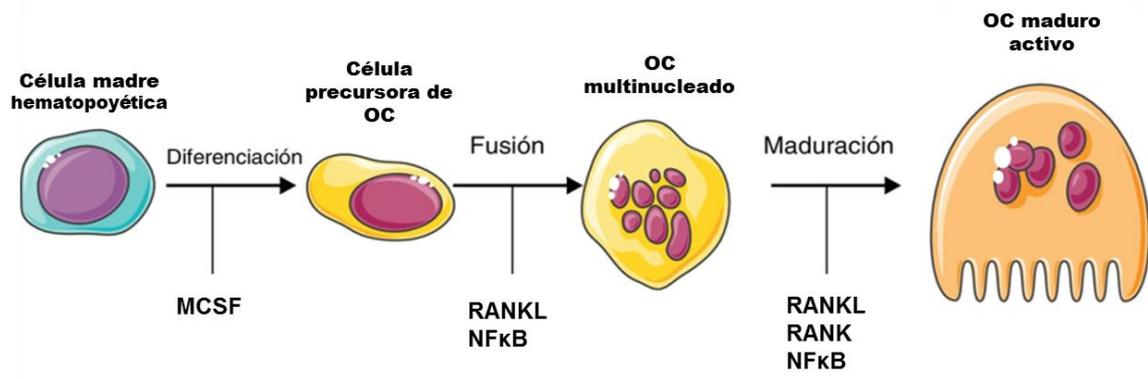
del hueso durante la fase de activación del proceso de resorción, como ya hemos explicado. Otra de las funciones sería la contraria: prevenir la resorción ósea impidiendo la interacción entre los osteoclastos y la matriz ósea cuando la resorción no debe ocurrir en un determinado espacio⁽³¹⁾.

Así, existe una comunicación activa entre las diferentes células que componen el hueso, en donde los osteocitos indicarían a las células de revestimiento qué zona está necesitada de ser remodelada y, a su vez, las células de revestimiento generarían la señal que indicaría a los osteoclastos la localización en dónde actuar⁽³⁷⁾.

2.1.3. OSTEOCLASTOS

Los osteoclastos son células grandes (100µm) multinucleadas derivadas de las células hematopoyéticas mononucleares, ricas en mitocondrias y vacuolas⁽³²⁾. Son las células encargadas de la resorción ósea a través del borde en cepillo de su membrana. Este borde se polariza y se adhiere a la matriz ósea mediante integrinas, formando una zona de sellado. En esta zona comienza el proceso de resorción, con la secreción de lisosomas y enzimas, principalmente proteasas como la catepsina K, por el aparato de Golgi que digieren la matriz orgánica. Conjuntamente se genera un microambiente ácido debido a la acción de la H⁺-ATPasa y que permite la disolución de la hidroxiapatita⁽¹⁰⁾, produciéndose la eliminación del hueso (Figura 8).

Figura 8. Formación de los osteoclastos a partir de las células hematopoyéticas.

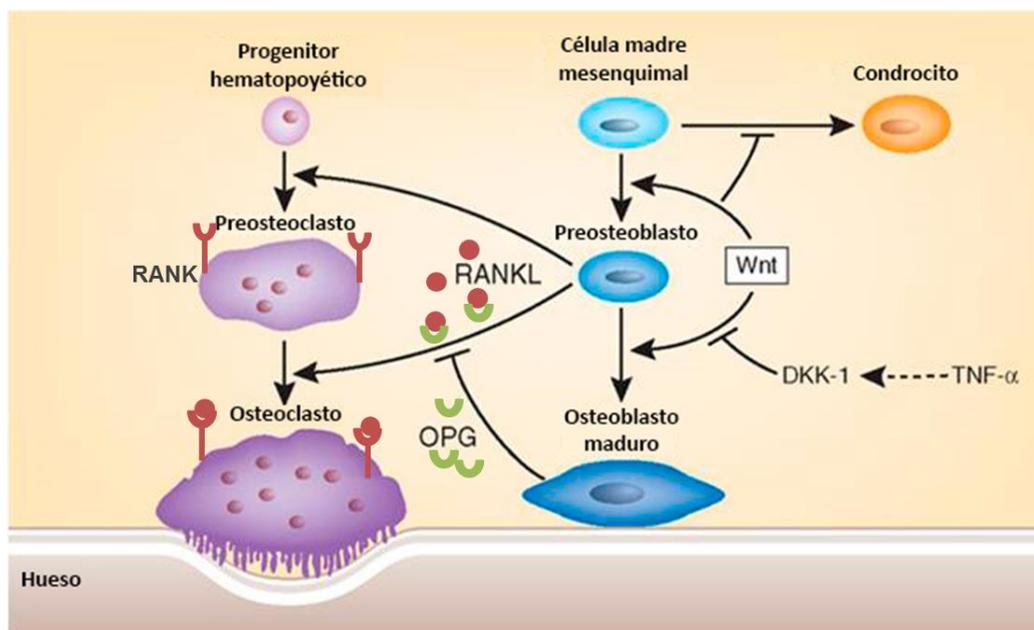


Etapas madurativas del osteoclasto. Durante este proceso actúan citoquinas, factores de transcripción y proteínas transmembrana. En el esquema sólo se han mantenido las más significativas, véase: MCSF, factor estimulante de colonias de macrófagos, implicado en los estadios iniciales de la diferenciación osteoclastica. RANK, receptor activador del factor nuclear κ B), como receptor de membrana de tipo I expresado en la superficie de los osteoclastos y su ligando el RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear κ B); NFκB: factor nuclear κ B. (modificada a partir de de Arboleya et al.⁽³⁸⁾).

La acción de los osteoclastos durante la resorción ósea produce una gran concentración de fragmentos de colágeno degradado, junto a minerales como el calcio y el fósforo (en forma de fosfato) que son transportados a través del osteoclasto para finalmente ser expulsados al exterior. Los osteoclastos son capaces de moverse a lo largo de la superficie ósea, solubilizando hueso en un área definida⁽³²⁾.

Los osteoblastos juegan un papel fundamental en la diferenciación y formación de los osteoclastos (figura 9).

Figura 9. Regulación de la osteoclastogénesis por el osteoblasto.



Las células madres mesenquimales se diferencian a osteoblastos por la señalización Wnt. El DKK-1 se une al complejo receptor de Wnt en la superficie del preosteoblasto bloqueando su diferenciación. Por otra parte, los preosteoblastos liberan RANKL que al unirse a su receptor, RANK, aumenta la osteoclastogénesis y, en consecuencia, la resorción del hueso. La reactivación de la vía de señalización Wnt en los osteoblastos maduros aumenta la liberación de osteoprotegerina (OPG) que bloquea al RANKL y por tanto la osteoclastogénesis. (Modificada a partir de Goldring et al. ⁽³⁹⁾)

Por un lado, los osteoblastos sintetizan el factor estimulante de las colonias de tipo monocito macrófago (M-CSF o CSF-1), que actúa tanto en las etapas tempranas de la diferenciación del osteoclasto como en la expresión del receptor activador del NF- κ B (RANK, *Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B*), crítico para la diferenciación del osteoclasto. Por otro lado, los osteoblastos también producen el ligando del receptor activador de NF- κ B (RANKL), un factor perteneciente a la familia del TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Cuando el RANKL, liberado por los osteoblastos, se fija en su receptor (RANK) presente en la membrana de los precursores osteoclásticos, induce una serie de señales que promueven la diferenciación, la formación y la activación de los osteoclastos^(9; 40; 41). La expresión del RANKL se incrementa, al menos en parte, por diferentes factores como la hormona paratiroidea, la 1,25-dihidroxitamina D3 y algunas citoquinas como la IL-6⁽⁴²⁾.

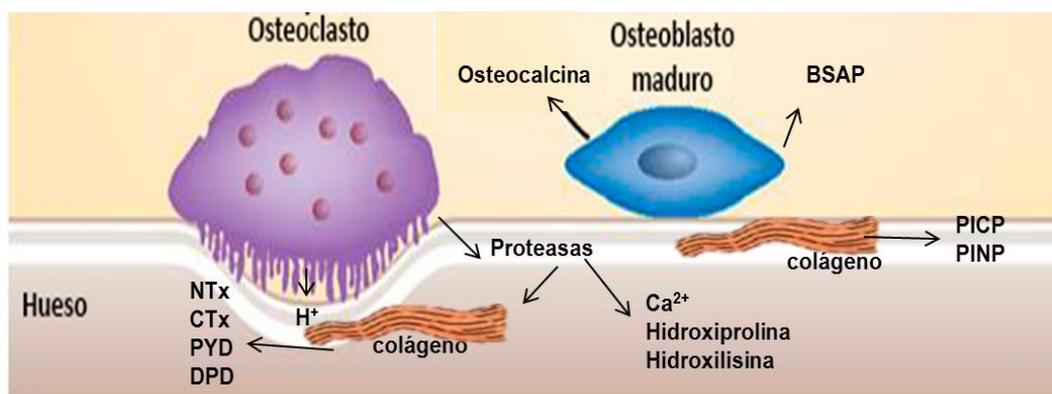
Curiosamente, por otro lado, los osteoblastos además de producir el RANKL también producen la osteoprotegerina (OPG), una proteína soluble con similitud estructural con el RANK y, en consecuencia, se fija a la RANKL inhibiendo su acción⁽⁴³⁾. Así, el sistema RANKL-RANK-OPG desempeña un papel esencial en la osteoclastogénesis e indica la interacción existente entre osteoblasto y osteoclasto.

La disfunción en la formación y actividad de los osteoclastos conlleva a algunas enfermedades como la osteoporosis, donde la resorción excede a la formación causando una disminución de la densidad ósea y un incremento de las fracturas óseas, o la osteopetrosis, donde la disminución de la funcionalidad del osteoclasto resulta en una acumulación desproporcionada de masa ósea^(31; 44).

2.1.4. MARCADORES DEL REMODELADO ÓSEO

Como se ha comentado anteriormente, los osteoblastos y los osteoclastos están involucrados en los procesos de modelado y remodelado óseo. Debido a estos procesos, el modelado, principalmente durante el crecimiento, y el remodelado, durante la edad adulta, la matriz orgánica se forma y se reabsorbe. Los productos moleculares de estos dos procesos, como los derivados del colágeno tipo I y las proteínas no colagénicas óseas como la fosfatasa ácida tartrato resistente 5-b (TRAP-5b), la alcalina fosfatasa ósea o la osteocalcina, son liberados dentro del compartimento sistémico extracelular, pudiendo ser analizados y usados como marcadores de formación y resorción ósea y cuyos cambios se pueden utilizar para analizar el efecto en el hueso de intervenciones físicas, farmacéuticas o nutricionales⁽⁴⁵⁾ (Figura 10).

Figura 10. Representación de una unidad de remodelado y los productos generados en ella.



Los osteoclastos se adhieren al hueso y comienzan a degradarlo mediante acidificación y digestión proteolítica. Los osteoblastos empiezan el proceso de formación de hueso nuevo secretando osteoide que más tarde mineralizará. De la acción de ambos procesos se vierten a la circulación productos de degradación del colágeno o de la matriz ósea (resorción ósea) y productos resultantes de la actividad osteoblástica (formación ósea). PINP: propéptido N-terminal del protocolágeno tipo I; PICP: propéptido C-terminal del protocolágeno tipo I; NTx: telopéptido N-terminal del colágeno tipo I; CTx: telopéptido C-terminal del colágeno tipo I; DPD: deoxipiridinolina; PYD: piridinolina; ALP: Alcalina fosfatasa. Modificada a partir de de (García-Pérez et al.⁽⁴⁶⁾)

Para que las moléculas liberadas sean consideradas como marcadores del remodelado óseo, es decir de formación o de resorción, deben cumplir una serie de características entre las que se encuentran: determinación no invasiva, facilidad de recogida de la muestra, ser un producto específico del metabolismo óseo, mostrar correlación con técnicas de referencia en el análisis óseo como la densitometría, y responder al tratamiento específico de enfermedades que afecten al metabolismo óseo.

Los marcadores del remodelado incluyen hormonas, proteínas, enzimas y péptidos enzimáticos que se clasifican en función de la fase que representan, aunque algunos pueden ser reflejo tanto de la fase de formación como de la resorción⁽⁴⁷⁾ (Tabla 1).

Tabla 1. Marcadores de formación y resorción óseos.

Marcadores de formación
<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatasa alcalina total y Fosfatasa alcalina ósea (BSAP)
<ul style="list-style-type: none"> • Osteocalcina
<ul style="list-style-type: none"> • Propéptidos amino terminales del procolágeno tipo I (PINP)
<ul style="list-style-type: none"> • Propéptidos carboxi terminales del procolágeno tipo I (PICP)
Marcadores de resorción
<ul style="list-style-type: none"> • Hidroxiprolina e Hidroxilisina
<ul style="list-style-type: none"> • Cross-links del Piridinio: Piridinolina (PYD) y Deoxipiridinolina (DPD)
<ul style="list-style-type: none"> • Telopéptidos amino y carboxiterminales del procolágeno tipo I (CTX, NTX)
<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP)

2.1.4.1. Marcadores De Formación Ósea

2.1.4.1.i. Fosfatasa Alcalina y Fosfatasa Alcalina Ósea

La fosfatasa alcalina fue el primer marcador utilizado para evaluar la formación ósea por dar información acerca del *turnover* óseo⁽⁴⁸⁾.

Esta enzima se encuentra en la membrana celular de los osteoblastos y en las células del hígado, el riñón, el intestino, el bazo y la placenta, siendo la ósea y la hepática las isoformas más abundantes.

Como ya comentamos, su función está relacionada con la calcificación de la matriz orgánica, bien por liberación de fosfato o bien por ser un estimulador indirecto de la formación

de cristales de hidroxapatita. La actividad de la fosfatasa alcalina varía según la edad y el sexo siendo mayor en los niños en edad de crecimiento y disminuyendo con la edad.

La fosfatasa alcalina ósea es la fracción mayoritaria en las situaciones donde existe un recambio óseo aumentado como durante el crecimiento o en algunas enfermedades como la enfermedad de Paget o el hiperparatiroidismo⁽⁴⁷⁾. En adultos normales, aproximadamente la mitad de la fosfatasa alcalina circulante en el suero proviene del hueso⁽⁴⁹⁾, por lo que un análisis de la fosfatasa alcalina puede relacionarse con la concentración de la isoforma procedente del hueso. El análisis de la fosfatasa alcalina sérica es un ensayo colorimétrico sencillo por su reacción directa con el para-nitrofenilfosfato, mientras que la determinación específica de su isoforma ósea, fosfatasa alcalina ósea, necesita de un ensayo inmunohistoquímico específico.

2.1.4.1.ii. Osteocalcina

Otro de los marcadores de formación ósea es la osteocalcina. Sintetizada por los osteoblastos, es la proteína no colagénica más importante del hueso. La osteocalcina está formada por 49 aminoácidos con tres grupos carboxiglutámicos (Gla) cuya carboxilación es dependiente de la vitamina K. A través de los residuos Gla la osteocalcina puede unirse al calcio y a la hidroxapatita, incorporándose a la matriz del hueso. Su actividad principal es la de regular la maduración de la mineralización ósea⁽⁵⁰⁾ aunque recientemente se le ha dado un papel hormonal por el que actúa regulando no solo la masa ósea, sino también el metabolismo energético, la secreción de insulina e, incluso, el sistema reproductor^(51; 52) tal y como se comentó anteriormente. La osteocalcina es un marcador sensible y específico de la actividad osteoblástica. Su concentración varía con la edad siendo particularmente elevada en niños durante el primer año de vida y en la pubertad, cuando la concentración aumenta con el crecimiento del esqueleto, para luego bajar a los niveles normales presentes en un adulto⁽⁵³⁾. También presenta un aumento en mujeres tras la menopausia, entre los 50-60 años, posiblemente debido a un aumento en el *turnover* con un exceso relativo de resorción ósea debido a la osteoporosis. En mujeres gestantes, la concentración de osteocalcina se eleva durante el primer trimestre, volviendo a los valores pre-gestación durante el tercer trimestre. Durante la lactación los niveles vuelven a aumentar, siendo superiores a los de mujeres

gestantes o no lactantes, debido al mayor *turnover* óseo que existe en las madres durante éste periodo⁽⁵⁴⁾.

2.1.4.1.iii. Propéptidos Amino- Y Carboxi- Terminales Del Procolágeno Tipo I (PINP, PICP)

Durante la síntesis del colágeno tipo I, el componente más abundante de la matriz ósea, se liberan fragmentos peptídicos amino y carboxi terminales de la molécula precursora, el pro-colágeno, que son liberados a la circulación⁽⁵⁵⁾. Los productos fraccionados de este proceso son el PINP y el PICP, que son medibles en suero y por lo tanto usados como marcadores de formación específicos de hueso.

2.1.4.2. Marcadores De Resorción Ósea.

2.1.4.2.i. Hidroxiprolina e Hidroxilisina

Son aminoácidos característicos del colágeno. Un aumento de sus niveles en orina ha sido relacionado con un aumento de la resorción ósea ya que la hidroxiprolina liberada durante la degradación del colágeno no puede ser utilizada en una nueva síntesis. Sin embargo, la hidroxiprolina es considerada poco específica como marcador de resorción ósea puesto que puede existir liberación de ésta por parte de otros tejidos como la piel o ser modificada por la dieta. De las dos formas de hidroxilisina existentes, la forma galactosil-hidroxilisina es más específica de hueso y puede ser cuantificada en orina⁽⁵⁶⁾.

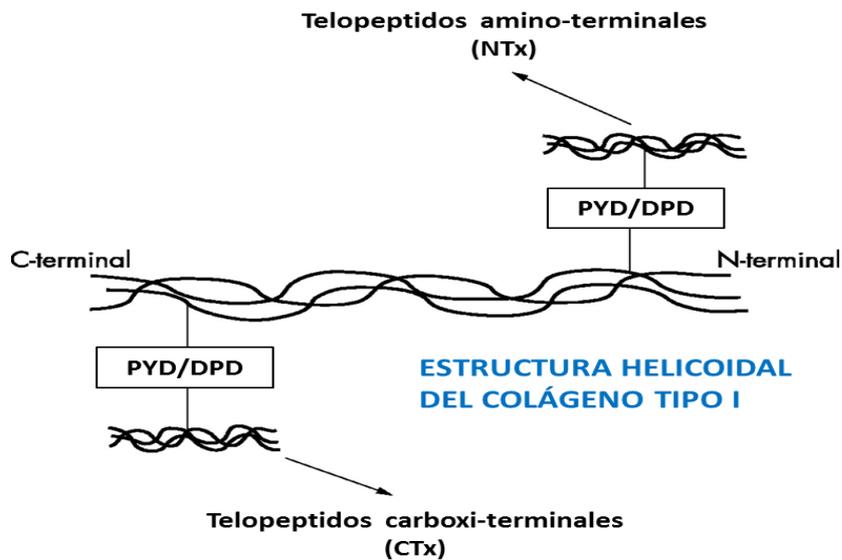
2.1.4.2.ii. Interrelaciones entre la Piridinio: Piridinolina (PYD) y Desoxipiridinolina (DPD)

El colágeno óseo se caracteriza por la presencia de uniones cruzadas o *cross-links* de piridinio entre el extremo de una molécula de colágeno y la porción helicoidal de la molécula adyacente (figura 11). Estas uniones o puentes son el mecanismo principal para la estabilización de las moléculas de colágeno en el hueso, proporcionándole una elevada

insolubilidad y resistencia que lo diferencian del colágeno contenido en otros tejidos⁽⁵⁷⁾. Los puentes intermoleculares son de dos formas: la piridinolina (PYD) y la desoxipiridinolina (DPD). Durante la resorción, el colágeno es degradado y se liberan tanto la PYD como la DPD a la circulación, un 20% en forma libre y el restante ligada a proteínas. La fracción de DPD y PYD ligada a proteínas se encuentra unida bien a N-telopéptido, (NTx, N-telopéptido de pro-colágeno tipo I) o al telopéptido C, (CTX, C-telopéptido de pro-colágeno tipo I). Una vez en circulación, esta fracción de PYD y DPD ligada a proteínas se somete a degradación renal produciendo un 40% de formas libres y 60% de proteínas unidas en la orina⁽⁵⁸⁾.

La PYD se encuentra distribuida en los tejidos conectivos del hueso y del cartílago, siendo su concentración mayor en este último mientras que la DPD es específica de hueso y se encuentra en menor concentración en la dentina, la aorta y en ligamentos. Ya que el recambio óseo es mucho mayor que el de otros tejidos, la concentración de estos dos marcadores en suero y orina se considera procedente, en su mayoría, del hueso y, por lo tanto, se utilizan como marcadores de resorción ósea⁽⁴⁷⁾. Tanto la PYD como la DPD no son catabolizadas *in vivo*, y son secretadas por la orina en forma libre, aproximadamente un 40%, o unidas a péptidos.

Figura 11. Marcadores de resorción ósea derivados de la degradación del colágeno tipo I.



La cadena peptídica del colágeno tiene terminaciones amino (N) y carboxy (C) a las que están unidos covalentemente los N-telopéptidos y los C-telopéptidos a través de los enlaces cruzados de piridinio (PYD y DPD)(Modificada de Dogan et al.⁽⁵⁸⁾)

2.1.4.2.iii. TELOPÉPTIDOS AMINO Y CARBOXI-TERMINALES DEL PROCOLÁGENO TIPO I (CTX, NTX)

Como ya hemos comentado, durante la acción de los osteoclastos en la resorción, las piridinolinas son excretadas principalmente unidas a péptidos de la molécula de colágeno dando lugar a los CTX y NTX (figura 11). El NTX es un producto directo de la degradación del colágeno por los osteoclastos, no es metabolizado en el hígado y se elimina rápidamente por el riñón, lo que lo hace un marcador específico de la resorción ósea⁽⁵⁹⁾. Su concentración en orina crece con la edad llegando a un pico en la adolescencia, posteriormente disminuye en la madurez para volver a elevarse durante la menopausia.

2.1.4.2.iv. Fosfatasa Ácida Tartrato Resistente (TRAP)

La fosfatasa ácida es una enzima lisosómica que está presente en el hueso, la próstata, las plaquetas, los eritrocitos y el bazo. La fosfatasa ácida ósea es tartrato resistente (TRAP-5b)

y es secretada por los osteoclastos durante el proceso de resorción como una enzima activa que posteriormente es inactivada y degradada a fragmentos más pequeños antes de ser eliminada de la circulación. Los niveles de TRAP-5b no se ven afectados por la alimentación aunque si tiene una pequeña variabilidad diurna de, aproximadamente, un 14%^(55; 60).

2.1.5. FACTORES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO.

El balance entre la formación y la resorción óseas está influido por una serie de factores que se encuentran interrelacionados, como son factores genéticos, mecánicos, nutricionales, hormonales y locales⁽⁶¹⁾.

Los factores genéticos: Son los determinantes principales del pico de masa ósea, explicando entre el 60 y el 80%⁽⁶²⁾ de la variabilidad del contenido mineral óseo en la población normal. La regulación de la masa ósea es un proceso poligénico, ya que son múltiples los genes que intervienen en la síntesis de hormonas y factores de crecimiento relacionados con la misma. La masa ósea se transmite de padres a hijos, por ello la predisposición a padecer osteoporosis es mayor en hijas de madres que la padecen⁽⁶³⁾.

Los factores mecánicos: Son imprescindibles para el correcto desarrollo del hueso como, por ejemplo, la actividad física. La acción muscular transmite al hueso una tensión que produce un cambio en el fluido óseo que es detectado por la red de osteocitos. Estos osteocitos producen mediadores como prostaglandinas, óxido nítrico e IGF-I, que estimulan tanto su actividad como la de los osteoblastos y originan una mayor formación ósea. Por el contrario, la falta de actividad muscular, el reposo o la ingravidez tienen un efecto negativo sobre el hueso, acelerando la resorción⁽⁶⁴⁾.

Los factores vasculonerviosos: La vascularización es fundamental para el normal desarrollo óseo, permitiendo el aporte de células sanguíneas, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento. Además constituye el primer paso para la osificación: los vasos sanguíneos invaden el cartílago y posteriormente se produce la resorción

ósea por los osteoclastos, procedentes de los vasos próximos. De la misma forma este fenómeno es importante en la reparación de fracturas o de la regeneración ósea, ya que la existencia de oxígeno es fundamental para que se produzca.

La inervación es necesaria para el normal fisiologismo óseo. El hueso es inervado por el sistema nervioso autónomo y por fibras nerviosas sensoriales⁽⁶¹⁾.

Los factores nutricionales: Pueden ser fácilmente modificados, y por lo tanto son de gran interés. Así, se pueden producir efectos beneficiosos a través de la nutrición, como los generados por la ingesta adecuada de proteínas o negativos como los producidos por el consumo de cafeína, alcohol o un exceso de sal que constituyen factores de riesgo para la aparición de osteopenia. Como parte fundamental de esta tesis, el efecto nutricional sobre el hueso será desarrollado más adelante.

Los factores hormonales: El desarrollo normal del esqueleto está condicionado por el correcto funcionamiento del sistema endocrino, fundamentalmente de la hormona somatotropa (GH) y las hormonas calcitrópicas (hormona paratiroidea, calcitonina y metabolitos de la vitamina D). Debido a su importancia, a continuación se describe el papel de las hormonas y precursores hormonales más importantes que intervienen en la fisiología ósea.

2.1.6. HORMONAS Y PRECURSORES HORMONALES

2.1.6.1. Hormona Paratiroidea (PTH)

El papel fisiológico fundamental de la PTH es la regulación de la homeostasis del calcio plasmático. La PTH tiende a aumentar la calcemia por diferentes mecanismos: aumenta la resorción de hueso, disminuye la excreción renal de calcio y estimula la síntesis renal de calcitriol, lo que secundariamente favorece la absorción intestinal de calcio. La administración de PTH produce un rápido movimiento de salida del calcio del hueso que implica un cambio en las células de revestimiento y una activación de los osteoclastos lo que genera un incremento en la resorción.

Sin embargo también tiene un papel estimulante de la formación ósea a través de la síntesis de IGF-I y TGF- β ⁽⁶¹⁾. Este doble efecto de resorción y formación se explicaría porque la PTH en administración continua estimularía la resorción ósea a través de la síntesis de RANKL por los osteoblastos, mientras que a dosis intermitentes estimularía la formación de hueso, a través de un incremento de los factores de crecimiento y de la disminución de la apoptosis de los osteoblastos⁽⁶⁵⁾. Al igual que la PTH, se ha encontrado que la proteína relacionada con la PTH (PTHrP), que también se une al receptor de la PTH influye en el remodelado óseo⁽⁶⁶⁾. Es precisamente la PTHrP una de las moléculas encargadas de la activación del *turnover* óseo materno que se produce durante la gestación y la lactancia, como ya comentaremos más adelante.

La determinación de la concentración de PTH en suero es una medida de la actividad osteoclástica y, por lo tanto, de resorción ósea.

2.1.6.2. Calcitriol o 1,25(OH)₂ Vitamina D3

La vitamina D (calciferol) debe de ser considerada como un substrato necesario para la síntesis de una familia de hormonas reconocidas por su papel en la regulación del calcio. Aunque una de sus fuentes es la dieta, en la mayoría de los individuos se genera en mucha más cantidad por producción endógena a través de la piel. Como resultado, su nivel en el organismo no es sólo un problema determinado por la carencia en la alimentación, sino también por una deficiencia en la exposición a la luz solar. A partir de la vitamina D (calciferol) sintetizada por la piel se producen una serie de moléculas esteroideas que son importantes reguladores del metabolismo del calcio⁽⁶⁷⁾.

Los calciferoles, entre los que se encuentran la vitamina D₂ (ergocalciferol) y la vitamina D₃ (colecalfiferol) son compuestos liposolubles que se absorben en el yeyuno y en el íleon, por lo que procesos de eliminación de grasas o malabsorción de las mismas pueden dar lugar a deficiencias en vitamina D. Esta "vitamina" se encuentra en alimentos como los aceites de pescado, la yema de huevo, el hígado o la mantequilla.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El calcitriol o 1,25 dihidroxivitamina D₃ (1,25 (OH)₂ D₃) es la hormona calcitrópica producida a partir de la vitamina D y cuya función primaria es la de elevar las concentraciones de calcio en el suero. El primer paso en la activación de la vitamina D es a través de las enzimas del hígado que la hidroxilan en la posición 25 dando lugar al 25(OH) vitamina D, para, posteriormente en un segundo paso, ser activada en los riñones generando la vitamina D activada o 1,25(OH)₂ D₃.

Aunque su acción principal es la de favorecer la absorción intestinal de calcio y fosfato también se le ha relacionado con un aumento de la síntesis de osteocalcina y de fosfatasa alcalina por los osteoblastos⁽⁴⁷⁾. El resultado de ambas acciones produciría una mayor mineralización ósea. Además el 1,25(OH)₂ D₃ está relacionado con una disminución en la expresión del gen de la PTH, lo que supondría una disminución de la secreción de la PTH, y, por lo tanto, una disminución de la resorción ósea.

El calcitriol es también esencial durante la gestación y la lactancia a través de la regulación de la síntesis de hormonas que regulan estos estados. En la fase temprana de la gestación induce la transformación de los tejidos permitiendo la implantación del embrión en el útero. Tanto el endometrio durante la gestación (decidua) como la placenta sintetizan esta hormona⁽⁶⁸⁾.

Existen cambios importantes en la concentración de la vitamina D y el metabolismo del calcio en la madre durante la gestación. El transporte del calcio de la madre al feto ocurre a través de la placenta, y seguramente este paso se vea facilitado por la mayor concentración de 1,25(OH)₂ D₃ existentes en el suero de la madre en comparación con las circulantes en el feto⁽⁶⁹⁾. Estos niveles más altos en el suero materno se deben a que, durante la gestación, aumenta la síntesis materna de 1,25(OH)₂ D₃ por el riñón que se sumaría a la síntesis por la placenta y la decidua, como ya hemos comentado⁽⁷⁰⁾. Como resultado, la producción de calcitriol excede a la de su eliminación incrementando los niveles en el suero. Es por esto que las mujeres en el tercer trimestre de gestación presentan dos veces más concentración que mujeres no preñadas o que mujeres tras el parto⁽⁶⁹⁾. Las principales funciones del 1,25(OH)₂ D₃ durante la gestación parecen estar relacionadas con el transporte de calcio a través de la placenta, como indicamos, y con el aumento de la osificación del esqueleto del feto⁽⁷⁰⁾.

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

La ingesta de vitamina D es, por tanto, esencial para la salud materna y la prevención de problemas/enfermedades. La deficiencia en vitamina D está asociada a un mal metabolismo del calcio, un deficiente crecimiento fetal, preclamsia y diabetes gestacional entre otros. Un nivel adecuado de vitamina D en la madre no sólo es importante para la salud fetal sino también para la del recién nacido. Bajas ingestas de vitamina D durante la gestación y la lactancia están relacionadas con bajo peso al nacimiento, un ablandamiento de los huesos de la cabeza, con un bajo desarrollo del esqueleto fetal en el útero y con un desarrollo óseo deficiente en niños a los 9 años⁽⁷⁰⁻⁷²⁾(efecto *programming*). Además, el calcitriol es necesario para el crecimiento normal del esqueleto y su deficiencia, o la deficiencia de vitamina D, puede llegar a generar enfermedades graves como el raquitismo y la osteomalacia.

2.1.6.3. Hormonas Sexuales.

Las hormonas sexuales tienen un papel muy importante en la regulación del desarrollo del esqueleto así como en el remodelado óseo.

Los andrógenos tienen un efecto anabolizante sobre el hueso, a través del estímulo de los receptores de los osteoblastos. Mientras que la deficiencia androgénica se asocia a una menor densidad ósea, la administración de testosterona en jóvenes antes del cierre epifisario incrementa la masa ósea. Igualmente, las mujeres con exceso de andrógenos presentan densidades óseas más altas⁽⁶¹⁾. Por otro lado el efecto de los andrógenos en el desarrollo muscular puede tener un efecto indirecto positivo en el esqueleto al alterar las fuerzas mecánicas ejercidas en el hueso. (Un aumento de la fuerza muscular ejercida sobre el hueso, durante el crecimiento o en respuesta al incremento de la carga, o la disminución de la carga, por inactividad o inmovilización, afectan a la masa, al tamaño y a la resistencia del hueso de forma positiva o negativa, respectivamente, siguiendo el modelo mecanostato propuesto por Harold Frost⁽⁷³⁾ en 1987).

Los estrógenos son esenciales para el cierre de los cartílagos de crecimiento jugando un papel importante en el desarrollo esquelético tanto femenino como masculino durante la adolescencia. Los estrógenos tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo: por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos e inhibiendo

la apoptosis de osteoblastos y osteocitos y por otro lado, disminuyen la resorción suprimiendo la formación y actividad de los osteoclastos e induce su apoptosis^(31; 74). Se han descrito receptores de estrógenos en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos humanos. Investigaciones recientes han comprobado que los estrógenos pueden aumentar los niveles de osteoprotegerina (OPG) y disminuir la síntesis de RANKL, ambos generados por los osteoblastos, por lo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis⁽⁶¹⁾. Es por esto que la deficiencia de estrógenos durante la menopausia constituye el factor patogénico más importante de la pérdida ósea asociada a la osteoporosis.

La progesterona tiene un efecto anabolizante sobre el hueso, bien directamente, a través de los osteoblastos, que poseen receptores para la hormona o bien de forma indirecta, mediante la competición por los receptores osteoblásticos de los glucocorticoides⁽⁵⁵⁾.

2.1.6.4. Hormona de Crecimiento (GH)

La GH tiene dos acciones sobre el hueso, directa e indirecta. La acción directa recae sobre los osteoblastos, que poseen receptores para esta hormona, estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina. La acción indirecta se produce a través del aumento de la síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función⁽⁶¹⁾.

Desde hace unos años se viene considerando a la GH como un factor de crecimiento local, ya que no sólo se sintetiza en la adenohipófisis, sino en casi todas las células del organismo, incluidos los osteoblastos⁽⁷⁵⁾, teniendo un efecto autocrino y paracrino, además de endocrino.

2.1.6.5. Factores Reguladores Locales.

Existen un gran número de factores locales que regulan el remodelado óseo entre los que se encuentran: citoquinas, como la IL-1 y el TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*), factores de crecimiento como el IGF-I (*Factor de Crecimiento Análogo a La Insulina-I*) y el TGF- β (*Factor de*

Crecimiento Transformante β), las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs, Bone Morphogenic Proteins), ciertas prostaglandinas, leucotrienos y el óxido nítrico. Todas estas moléculas han demostrado estar implicadas de una u otra forma en las respuestas tanto fisiológicas como patológicas del hueso⁽⁶¹⁾. En la siguiente tabla (Tabla 2) se hace un resumen de la acción de estos factores sobre el metabolismo del hueso.

Tabla 2. Factores locales reguladores del remodelado óseo.

	Estimulan formación	Estimulan reabsorción	Inhiben reabsorción
Factores de crecimiento	BMP-2 (Proteína morfogenética ósea-2) BMP-4 (Proteína morfogenética ósea-4) BMP-6 (Proteína morfogenética ósea-6) BMP-7 (Proteína morfogenética ósea-7) IGF-I (factor análogo a la insulina I) IGF-II (Factor análogo a la insulina II) TGF- β (Factor transformante del crecimiento β) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas) VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial)	TNF (Factor de necrosis tumoral) EGF (Factor de crecimiento epidérmico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos) GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)	
Citoquinas		IL-1 (Interleuquina -1) IL-6 (Interleuquina -6) IL-8 (Interleuquina -8) IL-11 (Interleuquina -11) PGE ₂ (Prostaglandina E-2) PGE ₁ (Prostaglandina E-1) PGG ₂ (Prostaglandina G-2) PGI ₂ (Prostaglandina I-2) PGH ₂ (Prostaglandina H-2)	IFN- γ (Interferón γ) IL-4 (Interleuquina-4)

Las células óseas juegan también un papel importante en la producción de prostaglandinas, óxido nítrico así como en las citoquinas y factores de crecimiento. (Modificada a partir de Fernández-Tresguerres et al.⁽⁶¹⁾).

2.2. LA NUTRICIÓN Y LA SALUD ÓSEA.

La nutrición afecta a la salud del hueso de dos maneras diferentes. Por un lado las células óseas responsables del mantenimiento, reparación y del depósito del tejido óseo son tan dependientes de la nutrición como las de cualquier otro tejido. Por ejemplo, la matriz ósea requiere de la síntesis y la modificación post-transduccional del colágeno y de otras proteínas. En esta síntesis se ven involucrados diferentes nutrientes entre los que se encuentran las vitaminas C, D, y K y minerales como el cobre, el manganeso y el cinc que son aportados a través de la dieta. Por otro lado, el esqueleto sirve como reserva de nutrientes, en especial de minerales como el calcio y el fósforo, y esta reserva depende en parte del balance diario entre su ingesta y su excreción⁽⁴⁷⁾. Si este balance se desequilibra, el esqueleto se encarga de aportar los minerales necesarios para mantener los niveles de forma que haya un correcto funcionamiento del organismo. Así, durante el remodelado óseo, tanto las deficiencias como los excesos nutricionales pueden dar lugar a la aparición de alteraciones o enfermedades como el raquitismo o la osteomalacia.

Existen un gran número de nutrientes y alimentos que han demostrado tener un efecto sobre la salud ósea. Entre estos se incluyen macronutrientes como las proteínas, los ácidos grasos o los azúcares, minerales como el calcio, el magnesio, el potasio, cobre, cinc y sodio, y vitaminas entre las que se encuentran la D, C, A, K y B₁₂. También ciertos alimentos como la leche, frutas y algunos vegetales, bebidas carbonatadas, alcohol, productos con o derivados de la soja y algunas fibras tienen un efecto sobre el hueso por diferentes vías, fundamentalmente actuando sobre la absorción y/o el metabolismo del calcio.

2.2.1. EL CALCIO.

El calcio es el mineral más abundante del organismo, aproximadamente el 99% (lo que supone alrededor de 1,2 Kg) se encuentra en los dientes y en la matriz inorgánica del esqueleto formando los cristales de hidroxiapatita $[(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. El 1% restante está disuelto en la sangre y en los fluidos celulares donde lleva a cabo su principal función metabólica que es servir como un segundo mensajero acoplado a varias respuestas intracelulares a señales extracelulares⁽⁷⁶⁾ entre las que se incluyen la conducción nerviosa, la

contracción muscular, la secreción hormonal, la proliferación celular y la coagulación sanguínea^(77; 78). Todas estas funciones vitales justifican que el organismo proporcione un nivel constante de calcio en la sangre y en las células, por lo que en caso de carencia debida a la alimentación, el organismo recurrirá a la reserva de calcio que constituye el esqueleto, aun poniendo en peligro la fortaleza ósea⁽⁷⁹⁾.

Desde el punto de vista óseo, el calcio muestra un comportamiento umbral, es decir, conforme la ingesta de calcio aumenta, aumenta la retención del mismo en el hueso, hasta que se llega a un punto en el que la retención llega a un máximo y no sigue ascendiendo en paralelo con la ingesta, es decir, un aumento de la ingesta de calcio no se traduce en un aumento de la absorción por parte del hueso⁽⁸⁰⁾. Esta ingesta umbral da lugar a una retención positiva durante el crecimiento, nula durante la etapa adulta y negativa en la vejez, como más adelante será explicado.

El valor umbral medio del calcio según las diferentes edades se ha utilizado para generar las actuales recomendaciones de ingesta de calcio, convirtiéndose en la cifra denominada "Ingesta Adecuada" (AI) para el calcio, publicada en el informe final de la *Food and Nutrition Board* (FNB). Así, las recomendaciones de calcio son más altas en los periodos de crecimiento, en el embarazo y la lactancia, en casos de deficiencia o en la vejez. Una ingesta de calcio debe ser tal que permita la formación de un pico de masa ósea adecuado, que se mantenga durante la edad adulta y que reduzca al mínimo las pérdidas durante la vejez⁽⁸¹⁾.

Según el FNB-Instituto de Medicina (*Institute of Medicine, US National Academy of Sciences*) las actuales recomendaciones sobre la ingesta de calcio en la dieta, para mantener unos niveles correctos y teniendo en cuenta las diferencias en los requerimientos según la edad son las que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3. Requerimientos de diarios recomendados según la edad (modificada a partir de Moreiras *et al.*⁽⁸²⁾)

Infancia y Adolescencia	Calcio (mg/ día)
0-6 meses	Aprox. 200
6-12 meses	Aprox. 260
1-3 años	700
4-8 años	1000
9-13 años	1300
14-18 años	1300
Mujeres	
19 - 50 años	1000
Post-menopausia (51+ años)	1200
Durante la gestación y la lactancia 14-18 años	1300
Durante la gestación y la lactancia 19-50 años	1000
Hombres	
19-70 años	1000
70+ años	1200

El calcio está presente en diferentes alimentos, entre los que destacan la leche y los productos lácteos como fuentes primarias aunque existen otros alimentos con igual o mayor aporte de este elemento. Así, destacan por su contenido en calcio las verduras como el brócoli, el repollo o el apio, aunque hay que tener en cuenta que en algunos casos el ácido oxálico que

contienen las verduras de hoja verde limita la biodisponibilidad de este mineral, como pasa en las espinacas o la remolacha. También son fuentes de calcio algunos pescados azules como el bacalao, la caballa, el salmón o las sardinas, que no sólo tienen un efecto beneficioso en el hueso por el aporte de calcio, sino también por el alto contenido en ácidos grasos omega 3, que están relacionados con un aumento de la formación y una disminución en la resorción ósea que se traduce en un incremento de la DMO (Densidad Mineral Ósea).

Otros alimentos ricos en calcio son los frutos secos (almendras, avellanas, nueces etc.) y las legumbres, como los garbanzos o las judías. Además, hay que destacar a la soja y sus derivados, como el tofu, no sólo por su contenido en calcio sino también por el contenido en sustancias activas como las isoflavonas que favorecen la formación ósea debido a su capacidad de activar receptores estrogénicos.

Tabla 4. Aporte de calcio de algunos alimentos (modificada a partir de Siedentopp et al.⁽⁸³⁾).

Alimentos (100g)	Calcio (mg)
Queso Gruyere, emmental, roquefort, bola	560-850
Queso manchego fresco	470
Sardinias en aceite	400
Almendras, avellanas	240
Cigalas, langostinos, gambas	220
Queso de Burgos	186
Yogur	180-127
Higos secos	180
Garbanzos	145
Natillas y flanes	140
Pistachos	136
Leche de vaca	130
Judias blancas, habas secas	130
Almejas, berberechos, chirlas...	120
Chocolate con leche	120
Batidos lácteos	120
Acelgas, cardo, espinacas, puerro...	114-87
Nueces, dátiles, pasas...	70
Aceitunas	63
Requesón y cuajada	60
Lentejas	56
Huevo de gallinas	51
Bacalao	51
Pasteles y pastas	48
Sardinias	43

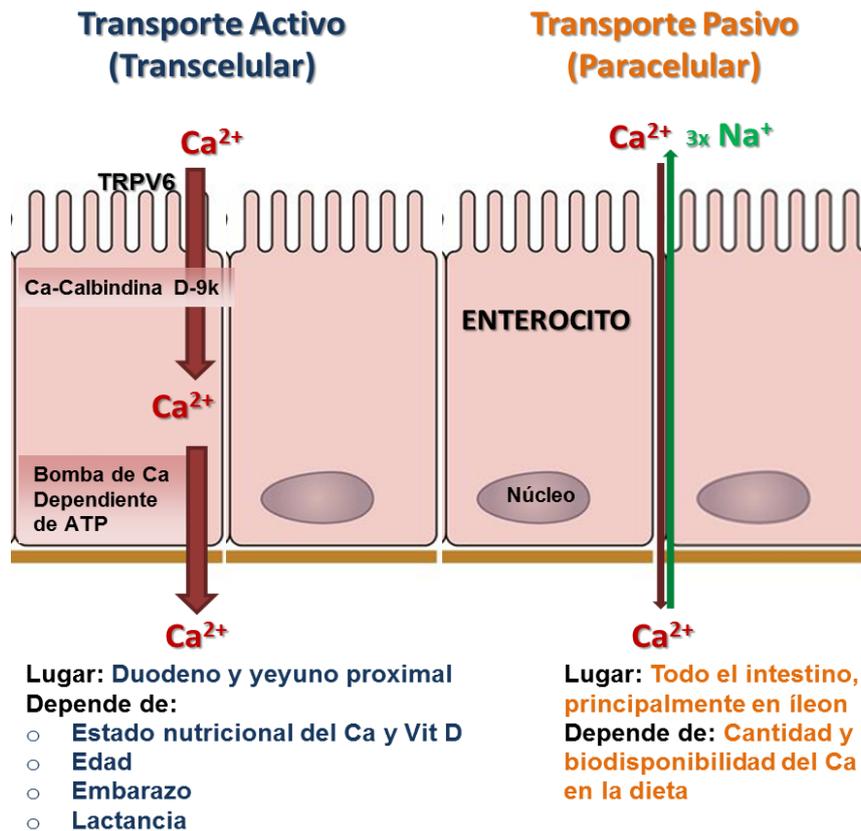
Finalmente, y debido a su auge, hay que considerar como fuentes de calcio los zumos, batidos y otras bebidas fortificadas o suplementadas con calcio y con vitamina D, puesto que suponen un aporte de ambos compuestos beneficiosos para el hueso. Así, se ha comprobado que la biodisponibilidad del calcio es mayor en leches fortificadas en comparación con las que no lo están⁽⁸⁴⁾. Por otro lado, la fuente de calcio, es decir, el tipo de sal que se utiliza en la fortificación del producto, puede hacer que la biodisponibilidad de este ion cambie. De esta manera, la biodisponibilidad del calcio en sus sales en forma de citrato o malato es mayor que en forma de carbonato, cuando se ingieren en ayunas⁽⁸⁵⁾. Sin embargo, cuando el calcio se ingiere con una comida, tanto en forma de carbonato cálcico como de fosfato cálcico es igual de bien absorbido como el calcio de la leche⁽⁸⁴⁾. No obstante, la suplementación con sales minerales en productos de alimentación plantea el riesgo de reducir la biodisponibilidad de otros minerales debido a un cambio en la solubilidad intestinal o por la existencia de competencia por los sitios de absorción entre minerales con parecidas propiedades físico-químicas. De hecho, el efecto inhibitorio del calcio en la absorción del hierro y el cinc es uno de los ejemplos más documentados^(84; 86; 87).

2.2.2. ABSORCIÓN INTESTINAL DEL CALCIO

La absorción intestinal de calcio (Ca) es, como la de todos los nutrientes esenciales, una función que está perfectamente regulada. Sus alteraciones se asocia a desórdenes como el hiperparatiroidismo secundario y no sólo tienen relevancia en enfermedades como la osteoporosis, sino que también se asocian a desórdenes de la conducción nerviosa, de la contracción muscular y de los mecanismos de transducción de señales⁽⁷⁸⁾.

El Ca debe encontrarse en su forma ionizada, Ca^{2+} , o unido a una molécula orgánica soluble para poder pasar la barrera intestinal. Se absorbe a nivel intestinal por dos mecanismos principales: el transporte paracelular o pasivo y el transporte transcelular o activo (figura 12).

Figura 12. Mecanismos de absorción del calcio.



La absorción neta de calcio es el resultado del balance entre la absorción intestinal por la vía transcelular y la paracelular y la secreción de calcio por diferentes órganos en el intestino. En la absorción transcelular intervienen canales de Ca^{2+} del epitelio (TRPV6) la calbindina D-9k como proteína transportadora y la Ca-ATPasa para la expulsión del Calcio. El transporte paracelular es dependiente de las uniones comunicantes intercelulares y de un sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Hernández et al.⁽⁸⁸⁾).

El transporte paracelular o pasivo se caracteriza por la difusión pasiva de pequeñas moléculas e iones a través de las uniones intercelulares de las células epiteliales. La absorción de Ca tiene lugar en un sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, en donde tres moléculas de Na^+ se intercambian por una de Ca^{2+} ⁽⁸⁹⁾. Este transporte ocurre normalmente cuando existen concentraciones elevadas de Ca en el lumen, y por lo tanto, se produce un gradiente de concentraciones de este elemento entre el lumen y la parte basolateral del enterocito. El aumento de las concentraciones de iones Ca^{2+} intracelular parece que forma parte del proceso por el que finalmente se separan las uniones yuxtacelulares facilitando la absorción de Ca.

La absorción paracelular es, por lo tanto, una difusión dependiente de la concentración del Ca^{2+} , y se da a lo largo de todo el intestino, aunque principalmente en el íleon y en menor extensión en el intestino grueso⁽⁹⁰⁾. Sustancias como los fructooligosacáridos, la inulina y otros sacáridos no digeribles son susceptibles de aumentar el transporte paracelular⁽⁹¹⁾ en la parte distal del intestino delgado y la proximal del colon posiblemente debido al incremento de Ca^{2+} soluble⁽⁹²⁾.

El transporte transcelular o activo tiene lugar predominantemente en el duodeno y el yeyuno. Se encuentra regulado por la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ y conlleva un gasto energético. Comprende tres fases:

- Entrada del Ca^{2+} a favor de un gradiente electroquímico desde el lumen a la célula intestinal a través de canales de Ca^{2+} especializados, localizados en la membrana de borde en cepillo del enterocito, principalmente el canal receptor de catión de potencial transitorio, subfamilia V, miembro 6 (TRPV6, *Transient Receptor Potential Vanilloid 6*, antes denominado CaT1)⁽⁹³⁾.
- Difusión intracelular, mediada por la proteína citosólica ligadora de Ca^{2+} (calbindina D-9k) involucrada tanto en el transporte de Ca^{2+} hacia la membrana basolateral como en la regulación intracelular de la concentración de este catión, lo que previene la apoptosis del enterocito⁽⁸⁹⁾.
- Extrusión del Ca al sistema vascular contra gradiente, mediado por la Ca-ATPasa y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ localizados en la membrana de borde en cepillo. Parte del Ca^{2+} puede ser transportado en las células por vesículas endosómicas y lisosómicas y salir a través de un proceso de exocitosis⁽⁹⁴⁾.

Como resultado de este proceso, se produce una absorción de Ca^{2+} desde el espacio luminal al compartimiento extracelular (Figura 12).

Como hemos comentado, el calcitriol o $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, es el principal regulador de la absorción transcelular de Ca. Su actuación se produce a través de dos mecanismos, uno por unión con su receptor específico (VDR) en el citosol o en el núcleo y el otro es un mecanismo

que se produce a nivel de membrana, activándose las vías de transducción y la síntesis de proteínas como la calbindina D-9k, que aumenta la absorción intestinal^(88; 93).

2.2.3. BIODISPONIBILIDAD DEL CALCIO.

Una ingesta adecuada de Ca resulta en evidentes beneficios a nivel óseo: desde la consecución del pico de masa ósea, la mineralización correcta del hueso hasta una protección frente a la pérdida en la edad adulta. El aporte más adecuado del Ca es a través de la dieta⁽⁷⁹⁾, puesto que suele ser mejor tolerado y resulta más económico que los suplementos. La biodisponibilidad de un nutriente es la proporción que puede ser absorbida y utilizada por el organismo a partir de los alimentos ingeridos que lo contienen. La biodisponibilidad del Ca oscila entre el 20-35% y depende de factores fisiológicos, condiciones patológicas, factores nutricionales y alimentarios.

Entre los ingredientes que afectan a la biodisponibilidad del Ca^{2+} se encuentran:

2.2.3.1. Las Proteínas

Los estudios epidemiológicos indican la existencia de una relación directa entre el consumo de proteínas y su efecto sobre la salud ósea. Las proteínas son necesarias para la síntesis de la matriz de tejido conectivo, que luego permitirá el depósito mineral adecuado para el tejido esquelético. El efecto de la ingesta de una dieta pobre en proteínas o con un alto contenido proteico ha sido cuestionado y controvertido, ya que los trabajos publicados no son muchas veces comparables debido a la variabilidad entre los mismos (población, dieta suministrada, etc.). Aun así, se ha demostrado que no sólo las dietas con bajo contenido proteico afectan al hueso, sino que una dieta con alto contenido proteico puede ejercer un impacto negativo sobre el mismo^(95; 96). Una de las razones más importantes de la interacción de la ingesta de proteínas con el metabolismo del Ca es el incremento que ocasionan en la pérdida de calcio urinario diario a razón de 1-1.75 mg por gramo de proteína metabolizada⁽⁹⁵⁾. Este efecto se atribuye a la mayor carga ácida, debido al sulfato producido en el metabolismo de los aminoácidos azufrados (metionina, cistina, homocisteína, cisteína). Estos iones sulfato se unen al Ca impidiendo su reabsorción tubular, y produciendo la pérdida del mineral.

Además, la acidificación ocasionada estimula la actividad osteoclástica y la resorción ósea e inhibe la actividad osteoblástica y la síntesis de colágeno^(97; 98). Por otro lado la urea, producto final del metabolismo proteico, tiene un efecto diurético⁽⁹⁶⁾ que incrementaría las pérdidas del mineral. Shapses et al. han demostrado que en la práctica, la relación Ca/proteína, más que la cantidad absoluta de proteína, es la determinante de la retención de Ca y de la resorción ósea en mujeres jóvenes⁽⁹⁹⁾.

2.2.3.2. Fósforo.

El fósforo (P) es uno de los minerales más abundantes en el cuerpo humano, siendo un constituyente importante de los huesos y dientes, donde se encuentra el 85% del P del organismo como parte de los cristales de hidroxiapatita⁽¹⁰⁰⁾. El fósforo como fósforo inorgánico (P_i) interviene en diferentes funciones biológicas entre las que se encuentran el metabolismo celular y energético, la regulación de la síntesis proteica, la función de membrana y por supuesto, en la mineralización ósea⁽¹⁰¹⁾. La concentración de fósforo en la sangre está determinada por un equilibrio entre la absorción del fósforo de la dieta en el intestino, el almacenamiento en los huesos, y la eliminación a través de la orina. La regulación de los niveles de P_i en la sangre conlleva una importante regulación hormonal por parte de la PTH y el FGF23⁽¹⁰²⁾. Existen otras hormonas que también contribuirían en esta regulación, por ejemplo la insulina, aunque sus acciones aún no han sido bien estudiadas⁽¹⁰³⁾. La homeostasis del P_i está muy unida al metabolismo del Ca, que se encuentra firmemente regulado para mantener los niveles séricos adecuados. La presencia de una cantidad adecuada de P_i es crítica en el proceso de apoptosis de los condrocitos maduros del plato de crecimiento, regulando por tanto la generación de nuevo hueso y el crecimiento⁽¹⁰²⁾. Bajas concentraciones séricas de P_i dan lugar a la osteomalacia, en gran parte debido a que los osteoblastos requieren de este mineral para su correcto funcionamiento. Por el contrario, concentraciones séricas altas de P_i incrementan el riesgo de calcificaciones fuera del esqueleto, incrementan la secreción de PTH y reducen la absorción intestinal de Ca por formación de complejos insolubles Ca-P contribuyendo a la patogénesis de la osteoporosis⁽¹⁰⁴⁾.

El fósforo está ampliamente distribuido en los alimentos por formar parte de los tejidos celulares. Así, las proteínas y el fósforo tienden a ir de la mano en las dietas, lo que significa que una dieta que contenga una cantidad de proteína adecuada para la salud va a contener también el fósforo necesario. Además, la absorción neta del fósforo es mucho más eficiente que la del Ca, variando entre el 50 y el 70%. Su absorción conjunta a la del Ca incrementa la captación de Ca por el hueso disminuyendo su excreción por la orina. En general se admite que una relación Ca/P 2/1, como la existente en la leche materna, es óptima para la biodisponibilidad.

2.2.3.3. Magnesio

El magnesio (Mg^{2+}) es el segundo catión más abundante intracelularmente del organismo. La dieta es la única fuente de Mg^{2+} para el organismo y su absorción en el intestino tiene lugar principalmente en el duodeno y el yeyuno proximal. Aproximadamente el 60% del Mg^{2+} está almacenado en el hueso, bien en la superficie de hidroxiapatita bien en la capa de hidratación alrededor del cristal⁽¹⁰⁵⁾, sirviendo de reservorio para mantener las concentraciones extracelulares del catión. Entre sus funciones se incluyen la regulación de la actividad enzimática, el control de varios canales Ca^{2+}/K^+ y la estabilización de la membrana celular. Su carencia está relacionada con enfermedades como la hipocalcemia, hipertensión, arritmias e infarto de miocardio. Su deficiencia, cuando es severa, puede provocar cambios en la homeostasis del Ca que dan lugar a una secreción deteriorada de la PTH y una resistencia a la PTH de los órganos produciendo hipocalcemia e hiper-excitabilidad neuromuscular. El magnesio se encuentra en grandes cantidades en el hueso y su deficiencia ha sido relacionada con un mayor riesgo de sufrir osteoporosis⁽¹⁰⁶⁾ directamente por su efecto sobre la formación de los cristales de hidroxiapatita y sobre las células óseas (osteoblastos y osteoclastos) e indirectamente por su efecto en la secreción de la PTH⁽¹⁰⁷⁾, como hemos comentado. Los animales con deficiencia de Mg presentan huesos frágiles, con micro-fracturas en las trabéculas y con las propiedades mecánicas altamente afectadas⁽¹⁰⁸⁾.

2.2.3.4. Sodio y Sal.

Una ingesta elevada de Na aumenta la excreción renal de Ca, posiblemente debido a la competencia Na-Ca en la reabsorción renal o por un efecto del Na en la secreción de PTH. En estudios en roedores se ha visto una disminución de la DMO en grupos con ingestas altas en sal⁽¹⁰⁹⁾.

2.2.3.5. Grasas.

Aunque una cierta cantidad de grasa es necesaria para la absorción de Ca, las dietas con alto contenido en grasas disminuyen la biodisponibilidad del Ca, debido a la unión entre el Ca y los ácidos grasos saturados formando jabones insolubles que son excretados por las heces. Sin embargo, los complejos formados entre los ácidos grasos de cadena media o corta y el Ca parecen favorecer la absorción del mismo⁽¹¹⁰⁾. Así, se sabe que la grasa láctea y el ácido oleico favorecen la absorción de Ca. Campos et al.⁽¹¹¹⁾ compararon en ratas los efectos de la leche de cabra, rica en ácidos grasos de cadena media, frente a la leche de vaca sobre la absorción de calcio y su contenido en diferentes tejidos, y encontraron un incremento en la absorción y contenido en hueso de calcio en los animales alimentados con leche de cabra. Los resultados se atribuyeron a que los ácidos grasos de cadena media más abundantes en la leche de cabra, podrían incrementar el transporte pasivo de calcio en el intestino al favorecerse la formación de micelas y el flujo mucosa-serosa. Pero además, en la leche entera de cabra, la fracción proteica rica en lisina, y el contenido de vitamina D, podrían jugar también un papel positivo en la utilización del calcio.

2.2.3.6. Hidratos de Carbono.

Los hidratos de carbono van a presentar diferente funcionalidad con respecto a la absorción de Ca dependiendo de su tamaño. Aunque en general parece que aumentan la absorción de Ca siendo la lactosa, dentro de los disacáridos, el más eficaz. La lactosa también podría afectar la absorción de otros minerales, como el Zn, al menos según se deduce de estudios animales⁽¹¹²⁾. También se ha visto una mayor absorción de Ca en aquellas fórmulas infantiles que presentaban lactosa comparadas con las que no. Los efectos de la lactosa en la

absorción de minerales pueden ser atribuidos a la acción del disacárido como tal, ya que ni la glucosa ni la galactosa tienen efecto, aunque el mecanismo de acción no está claro aún.

2.2.3.7. Fibra.

La EFSA (*European Food Safety Authority*) define como fibra dietética a aquellos carbohidratos no digeribles y la lignina, incluyendo en la definición a todo carbohidrato existente en los alimentos que no sea digerible por el intestino delgado humano y pase al intestino grueso⁽¹¹³⁾. No obstante, hay que tener en cuenta que parte de la fibra puede ser degradada en el colon por la fermentación bacteriana, llegando a ser total o parcialmente digeridas⁽¹¹⁴⁾ según la definición aceptada por la AACC (*American Association of Cereal Chemists, 2001*)⁽¹¹⁵⁾ y además promueven efectos beneficiosos fisiológicos, como el efecto laxante, y/o atenúan los niveles de colesterol y/o de glucosa en sangre (definición de fibra dietética por la AACC)

La fibra dietética se clasifica en dos tipos básicos debido al diferente comportamiento en relación con el agua: fibra soluble y fibra insoluble. La solubilidad determina sus diversos efectos fisiológicos. Las fibras solubles en contacto con el agua forman soluciones de gran viscosidad, al atrapar el agua entre sus moléculas. Es por esto que tienen una alta capacidad para retener el agua. Algunas de estas fibras son las pectinas, las gomas, los mucílagos y algunos polisacáridos. La capacidad gelificante de estas fibras parece ser la responsable de sus efectos fisiológicos beneficiosos, como la disminución de la glucemia postprandial o de los niveles de colesterol⁽⁸⁸⁾. La fibra dietética insoluble no se disuelve en agua, no forma soluciones viscosas, tiene menos capacidad de retención de agua y pasa a través del tracto intestinal sin sufrir cambios. Sus formas más importantes son la celulosa, hemicelulosa y lignina.

Una alta ingesta de fibra puede perjudicar la absorción de vitaminas y minerales, sobre todo de Ca, ya que debido a la naturaleza poli-aniónica reacciona con los iones metálicos formando complejos no absorbibles. La relación entre la fibra dietética y el Ca es controvertida puesto que algunos estudios muestran su efecto negativo sobre la absorción de Ca, mientras que otros no observan ningún cambio ni en la absorción ni en el balance mineral de una dieta

rica en fibra. Estos resultados contradictorios seguramente son debidos a la variabilidad que hay entre ellos.

En general, aquellas fibras con capacidad de fermentación en el colon están asociadas con la liberación y solubilización de minerales, lo que facilita su absorción. Por el contrario, las dietas ricas en otros tipos de fibra dietética, particularmente aquéllas asociadas con el fitato, parecen disminuir la absorción de varios minerales en el intestino delgado, principalmente hierro, calcio, magnesio y zinc. Esto se ha observado en estudios tanto en animales como en humanos. El fitato se une con estos minerales y así reduce potencialmente la disponibilidad para la absorción en el intestino delgado⁽¹¹⁶⁾.

Como hemos comentado antes, las fibras dietéticas, una vez pasado el intestino, pueden ser digeridas en mayor o menor medida, dependiendo de su estructura, en el ciego y por las bacterias del colon. Así, todas las fibras, a excepción de la lignina pueden ser fermentadas por las bacterias intestinales, siendo normalmente las fibras solubles más fermentables que las insolubles⁽⁸⁸⁾. Dentro de la capacidad de ser fermentadas, existe un grupo de fibras que son fermentadas totalmente de una forma selectiva por una o un número limitado de bacterias beneficiosas de la flora del colon, generando un beneficio en la salud humana. A este grupo de fibras se le ha denominado prebióticos.

2.2.4. LOS PREBIÓTICOS Y EL HUESO.

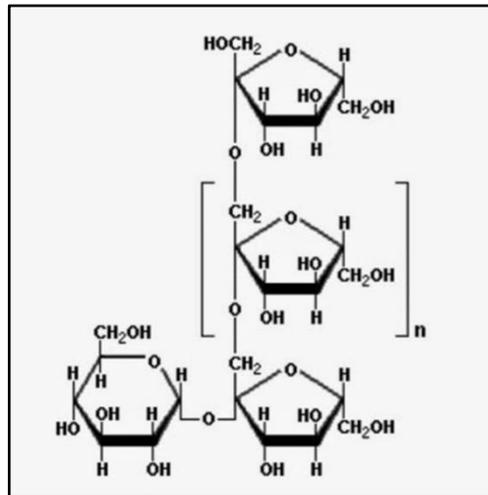
Como hemos dicho, los hidratos de carbono susceptibles de ser fermentados en el colon están alcanzando especial interés por su efecto prebiótico. Los prebióticos fueron definidos por primera vez por Gibson y Roberfroid en 1995⁽¹¹⁷⁾. Actualmente se definen como “ingredientes que al ser fermentados selectivamente dan lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal confiriendo beneficios tanto para la salud como para el bienestar del individuo”⁽¹¹⁸⁾.

De los hidratos de carbono fermentables existentes en la actualidad, los oligosacáridos no digeribles (OND) son los únicos que pueden ser considerados como compuestos prebióticos⁽¹¹⁹⁾. Entre estos compuestos se encuentran la rafinosa; los fructo, galacto, isomalto

y xilooligosacáridos; las maltodextrinas; y algunas inulinas^(120; 121), todos los cuales presentan grados diferentes de polimerización, con variación predominante de 3 a 10.

De entre los prebióticos, los más estudiados son los derivados de la achicoria: la inulina y los fructooligosacáridos (FOS). La inulina es obtenida directamente de las raíces de achicoria, está constituida por una mezcla polidispersa de moléculas lineales cuya estructura química se simboliza como G-F_n, donde G= glucosa y F= fracción fructosa, n=número de unidades de fructosa unidas a través de los enlaces β(2-1) (figura 13). El grado de polimerización de la inulina procedente de la achicoria varía entre 3-60, con un valor medio de 10. La oligofructosa se obtiene a través de una hidrólisis parcial enzimática de la inulina. Está compuesta por cadenas lineales G-F_n y F_n, con un grado de polimerización variable de 2-8, con un valor medio de 4⁽¹²²⁾.

Figura 13. Estructura química de la inulina.



Estructura química de la inulina con una molécula terminal de glucosa y n fructosas (G-F_n) donde el grado de polimerización (n) es variable entre 3-60.

Estudios recientes indican un posible efecto beneficioso de los prebióticos sobre la disponibilidad de los minerales y de algunos oligoelementos incluidos en los alimentos, influyendo tanto en su absorción, su retención como su uso por el organismo.^(123; 124)

Aunque en el caso del Ca y el Mg, su absorción principal se sitúa en el intestino delgado, estudios recientes en ratas indican que estos minerales pueden absorberse en el intestino grueso (ciego y colon)⁽¹²⁵⁻¹²⁸⁾. Se ha comprobado que el consumo de alimentos funcionales que contienen prebióticos (inulina y FOS) puede contribuir al aumento en la biodisponibilidad de estos minerales. Además, la combinación de prebióticos con diferentes grados de polimerización puede mejorar la eficacia de la absorción de minerales ya que los prebióticos de baja polimerización, tales como los FOS, son más activos en el colon proximal, donde pueden servir como inductores de la fermentación bifidogénica, mientras que las moléculas de cadena más larga, como la inulina, podrían tener su efecto en la parte distal (donde pueden mantener la actividad metabólica de la microflora). Combinar ambos tipos de componentes en un producto puede ofrecer un efecto sinérgico sobre la absorción del Ca, ya que dicha absorción ocurriría a lo largo de todo el intestino⁽¹²⁹⁾.

El efecto positivo de los prebióticos sobre la absorción del Ca puede deberse a diferentes mecanismos⁽¹³⁰⁾:

- Como ya hemos comentado, las bacterias colónicas fermentan los FOS y otros carbohidratos no digeribles, aumentando la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) entre los que se incluyen el butírico, propiónico, y acético además de otros ácidos orgánicos, como el ácido láctico (Figura 14). Estos AGCC bajan el pH, acidificando el contenido luminal y favoreciendo la disolución de compuestos insolubles de Ca tales como el fosfato, y aumentando la concentración de Ca soluble en el lumen (Ca ionizado). De esta forma se eleva su absorción por difusión pasiva (transporte transcelular)⁽¹³¹⁻¹³⁵⁾. Sin embargo, una reducción de las concentraciones de Ca en la dieta aumenta la acidez del lumen intestinal y puede perjudicar la mucosa ya que el Ca actúa como tampón en la acidificación causada por la fermentación bacteriana en el intestino grueso⁽¹³⁶⁾, por lo que su concentración en la dieta puede afectar los efectos positivos de los fructanos. Es también posible que los AGCC contribuyan directamente al aumento de la absorción de Ca vía un mecanismo de intercambio catiónico y al aumento del intercambio de H⁺ celular con Ca²⁺ luminal (de nuevo, transporte transcelular) en el colon distal^(92; 129).

Figura 14. Representación de los efectos de los carbohidratos no digeribles en la absorción de minerales.



Las bacterias del colon fermentan los FOS y otros carbohidratos no digeribles generando AGCC. Esto produce una bajada en el pH que induce un incremento en la solubilidad de ciertos minerales aumentando la concentración de cationes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} o Zn^{2+} , entre otros. FOS, Fructooligosacáridos; AGCC, Ácidos grasos de cadena corta. (Modificada de Xiao et al.⁽¹³⁷⁾).

- Otro mecanismo de actuación de los prebióticos puede ser vía calbindina-D9k, proteína implicada en el transporte transcelular del Ca. Algunos estudios muestran que la ingesta de oligofruktanos reduce los niveles de calbindina D-9k en el intestino delgado, mientras que aumentan en el intestino grueso⁽¹³⁸⁾. El aumento en la absorción de Ca por difusión pasiva en el colon podría accionar un mecanismo de regeneración que inhibiría la absorción activa (o transcelular) en el duodeno y disminuiría la calbindina D-9k en el intestino delgado⁽¹³⁹⁾. Otro estudio sugiere que también podría verse aumentada la absorción transcelular, típica del intestino delgado, en el intestino grueso⁽¹⁴⁰⁾. Además, recientemente se ha visto que el consumo de FOS aumenta la expresión genética de TRPV6 y de la proteína calbindinaD9k a través de los AGCC⁽¹⁴¹⁾.

- Los AGCC son una importante fuente de nutrientes de las células intestinales. Principalmente el butírico estimula la proliferación de células epiteliales, produciendo un efecto trófico en la mucosa tanto en el ciego como en el colon en humanos y animales^(136; 142; 143). La ingesta de prebióticos también causa un aumento del tamaño del ciego y del intestino grueso, lo que supone una mayor capacidad de fermentación y absorción de nutrientes⁽¹³⁷⁾. Así, trabajos en animales han permitido comprobar el aumento de la profundidad de la cripta, del número de células epiteliales y hasta de las bifurcaciones en las criptas lo que supone un aumento general de la superficie de absorción^(126; 144).

El conjunto de estos mecanismos contribuirían a un aumento en la absorción de Ca procedente de la dieta. Este aumento de la absorción de Ca puede ser de gran utilidad en aquellas etapas en las que su aporte es esencial como por ejemplo, para la adquisición del pico de masa ósea o para proteger el hueso frente a pérdidas, como ocurre en la menopausia. También tiene una gran importancia la biodisponibilidad óptima de minerales y de oligoelementos durante la lactancia debido a que los requerimientos durante la misma son altos a causa de la gran velocidad de crecimiento y desarrollo del niño⁽¹⁴⁵⁾. Esta necesidad de minerales se extiende hasta que se consigue el desarrollo total del esqueleto, con la consecución del pico de masa ósea al final de la adolescencia.

Así, diferentes estudios con adolescentes han demostrado que la ingesta de prebióticos, entre los que destacan la inulina, los FOS y su mezcla, produce un incremento en la absorción de Ca junto con otros minerales como el Mg sin que exista un aumento paralelo de la excreción de ambos minerales, lo que indicaría su posible captación por el hueso⁽¹⁴⁶⁾.

El efecto beneficioso de los prebióticos sobre la DMO y el CMO ha sido demostrado tanto por estudios animales como en humanos. En ratas al crecimiento, la suplementación con inulina (5 ó 10%) supuso un incremento de ambos parámetros tras 22 semanas de alimentación incluso en las alimentadas con dietas deficientes en Ca⁽¹⁴⁷⁾. Este efecto beneficioso también se ha encontrado en estudios con modelos animales de osteoporosis (ratas ovariectomizadas), donde la suplementación con oligofruktosa (10%) se asoció con un

mayor contenido de Ca en el fémur y la vértebra lumbar. Además, la suplementación de la dieta con oligofructosa impidió la pérdida de hueso trabecular en la tibia⁽¹⁴⁸⁾.

La mezcla de prebióticos con diferente longitud de cadena, inulina enriquecida en oligofructosa, también ha mostrado tener efectos beneficiosos en el balance de Ca en ratas adultas y ovariectomizadas. Además en este último modelo se observó un incremento en la DMO y en el contenido de Ca del fémur tras la alimentación con la mezcla prebiótica⁽¹⁴⁹⁾.

En humanos, el uso de inulina enriquecida en oligofructosa, 8g/d generó una mayor absorción de Ca en muchachas adolescentes con ingestas normales de Ca. Curiosamente, el mayor aumento en este parámetro como respuesta a la suplementación con el prebiótico lo presentaron los individuos con ingestas de Ca más bajas⁽¹⁴⁹⁾. Este efecto positivo de la mezcla prebiótica en la absorción de Ca en adolescentes se ha visto tanto en estudios a corto plazo como en estudios a largo plazo (1 año)⁽¹⁵⁰⁾. Además, en este último estudio, realizado por Jackman et al. los adolescentes en el grupo prebiótico presentaron cambios significativos en el CMO y la DMO, lo que hace suponer que la suplementación con inulina enriquecida en oligofructosa durante el periodo de crecimiento produce un incremento en la mineralización ósea que seguramente se traduce en un incremento del pico de masa ósea de los adolescentes.

Sin embargo, hasta el momento, no hay estudios sobre los efectos de la suplementación de prebióticos durante la gestación y la lactancia y sus habilidades en la protección del hueso materno o en la programación del hueso del niño a largo plazo.

2.3. EL CALCIO DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA.

Durante la gestación y la lactancia se producen modificaciones muy significativas en el metabolismo materno del calcio principalmente para poder satisfacer la demanda de este mineral, tanto del feto como del neonato, durante estos periodos. Estas modificaciones incluyen cambios en el metabolismo mineral óseo, en respuesta a la necesidad de calcio para cubrir las demandas del feto en crecimiento y de los requerimientos del lactante por su demanda de calcio a través de la leche materna. Un niño a término contiene aproximadamente entre 30 y 35 g de Ca, la mayoría acumulados durante el tercer trimestre de la gestación, a una velocidad de 250-300 mg al día. Durante la lactancia, la demanda de calcio procedente de la madre sigue siendo alta, ya que se pierde entre 200 y 300 mg de Ca al día debido a la producción de leche materna⁽¹⁵¹⁾ lo que supone un total de 35-50 g de Ca en el niño tras 6 meses de lactación⁽¹⁵²⁾. Teniendo en cuenta que el esqueleto de una mujer contiene aproximadamente 1200 g de calcio⁽¹⁵³⁾ en su madurez, la gestación y la lactancia suponen pérdidas cercanas al 7% del contenido total de calcio materno.

Los reguladores más importantes de la homeostasis del calcio en la madre son la PTH, la calcitonina y la $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$, que se complementan entre sí para mantener las concentraciones de calcio sérico dentro de sus rangos normales, a través de tres mecanismos principales: Incrementar la absorción intestinal del calcio procedente de la dieta, estimular la reabsorción renal de calcio o incrementar la movilización del calcio de los huesos⁽¹⁵⁴⁾.

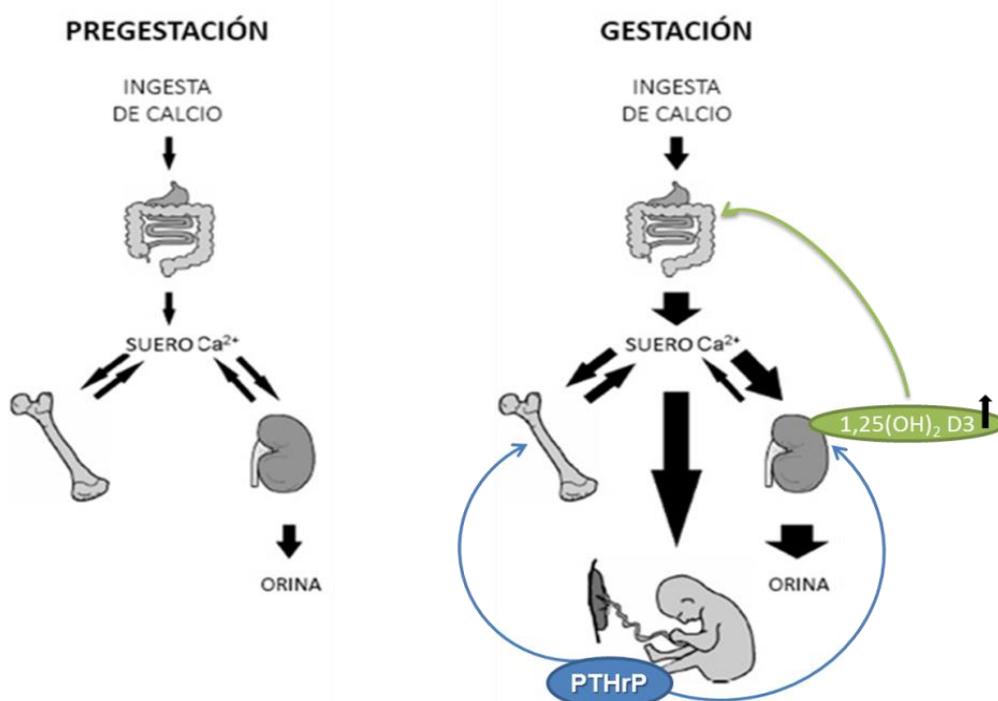
El estrés adicional, generado por el esqueleto fetal en desarrollo y por el requerimiento de calcio en la leche materna durante la lactancia, puede traer como consecuencia cambios en la densidad mineral ósea de la madre, lo cual parece ser dependiente del estatus nutricional de la madre y del aporte de calcio a través de la dieta durante estas etapas de la vida.

2.3.1. GESTACIÓN

En la gestación, el feto es totalmente dependiente de la madre para adquirir minerales, como el calcio, el fósforo y el magnesio, los cuales se transportan activamente a través de la placenta a la circulación fetal. Las concentraciones séricas de estos minerales en el feto se incrementa durante las últimas semanas de gestación llegando a ser incluso mayores que las de la madre⁽¹⁵⁵⁾.

Al final de este periodo, aproximadamente de 30 a 35 gramos de calcio de la madre , aproximadamente el 3% del contenido de calcio de la madre⁽¹⁵³⁾, han sido destinados al desarrollo del esqueleto fetal. De estos, el 80% es transferido al feto a través de la placenta durante el último trimestre de gestación. Debido a que el esqueleto fetal se mineraliza rápidamente después de la segunda mitad del embarazo y alcanza su tasa máxima durante el tercer trimestre, la necesidad de calcio se eleva de 50 mg/día, en la 20ª semana, a 330 mg/día, en la 35ª semana de gestación⁽¹⁵⁶⁾, el fósforo se deposita en cantidades que varían entre los 60-75mg/ kg de peso del feto/día y el magnesio fluctúa entre los 2.5-3.4mg/kg/día⁽¹⁵⁷⁾. Sin embargo, los requerimientos de vitamina D para que se produzca una acreción ósea en el feto se desconocen. Este requerimiento tan elevado de minerales promueve las adaptaciones en el metabolismo mineral de la madre para cumplir con la demanda adicional por parte del esqueleto fetal⁽¹⁵¹⁾.

Figura 15. Cambios de la homeostasis del calcio de la madre durante la gestación comparado con mujeres pregestantes.



Durante la gestación existe una elevación en los valores del péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrP), procedente de la placenta y el feto que contribuyen a elevar la $1,25(OH)_2 D_3$, indicado por la flecha azul. El aumento de la $1,25(OH)_2 D_3$ produce un incremento en la absorción de Ca por el intestino (flecha verde). El incremento del flujo de calcio se indica por el grosor de las flechas negras. (Modificada a partir de de Kovacs et al.⁽¹⁵⁸⁾).

Durante la gestación, la fracción de calcio absorbido aumenta del 35% existente antes del embarazo, a un 60% durante el tercer trimestre, lo que supone unos 300 mg de calcio más al día en un consumo de calcio total de 1200mg/día, y que serían almacenados en el esqueleto del feto. Este incremento está relacionado con un aumento en los niveles de $1,25(OH)_2 D_3$, que se duplican durante el tercer trimestre⁽¹⁵⁹⁾ aumentando la eficiencia intestinal de absorción del calcio de la dieta. Aunque actualmente no se sabe exactamente por qué se produce un incremento en la $1,25(OH)_2 D_3$, por un lado se ha especulado que pueda proceder de la placenta mientras que por otro parece que puede proceder de un aumento de su síntesis por los riñones de la madre⁽¹⁶⁰⁾. (Figura 15)

En este periodo también se incrementan los valores del péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrP), el cual proviene de la placenta en etapas tempranas del embarazo y en fases avanzadas de la glándulas paratiroideas del feto⁽¹⁶¹⁾. El PTHrP podría contribuir a elevar la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a promover la resorción ósea materna y a la regulación del transporte de calcio de la placenta al feto. El PTHrP tiene además importantes funciones en la regulación del desarrollo del hueso endocondral y en el desarrollo del esqueleto fetal⁽¹⁶²⁾.

Por otro lado, durante la gestación se encuentra incrementa la excreción renal de calcio, probablemente debido al aumento en la tasa de filtración glomerular, así como del incremento en la absorción intestinal de calcio. La cantidad de calcio perdido en la orina se calcula entre 80 y 136 mg por día y representa una pérdida que reduce en parte el calcio ganado con el incremento en la absorción intestinal. Después del parto, la absorción de calcio y la excreción urinaria de calcio retornan a los valores previos a la gestación⁽¹⁶³⁾.

También el remodelado óseo se ve afectado por el embarazo. Así, tanto los marcadores de formación, como por ejemplo, la fosfatasa alcalina específica de hueso, como los marcadores de resorción, como el TRAP y la DPD, se ven aumentados indicando un incremento en el *turnover* óseo. Estudios en animales, en condiciones no deficientes, relacionan este incremento con un mayor DMO, indicando una mayor deposición de calcio en los huesos durante la gestación⁽¹⁵⁸⁾. Este incremento en la DMO de la madre puede servir para proteger al esqueleto materno de una excesiva desmineralización y fragilidad que se produce posteriormente durante la lactancia. Los estudios en humanos sobre la influencia de la gestación en la DMO de las madres son escasos (debido a que requieren el uso de Rayos X) y en algunos casos contradictorios. Además, al evaluar la DMO antes y después del parto, los resultados pueden depender del tiempo transcurrido entre el parto y la medición. En general, los estudios así realizados indican una pérdida en las zonas trabeculares y una ganancia en las corticales, sobre todo en mujeres con ingestas no deficientes. Por otro lado, los estudios histológicos existentes sugieren una pérdida temprana tras la concepción para posteriormente restaurarse mediante la formación de nuevas trabéculas, que incrementan en número pero no en anchura⁽¹⁶⁴⁾.

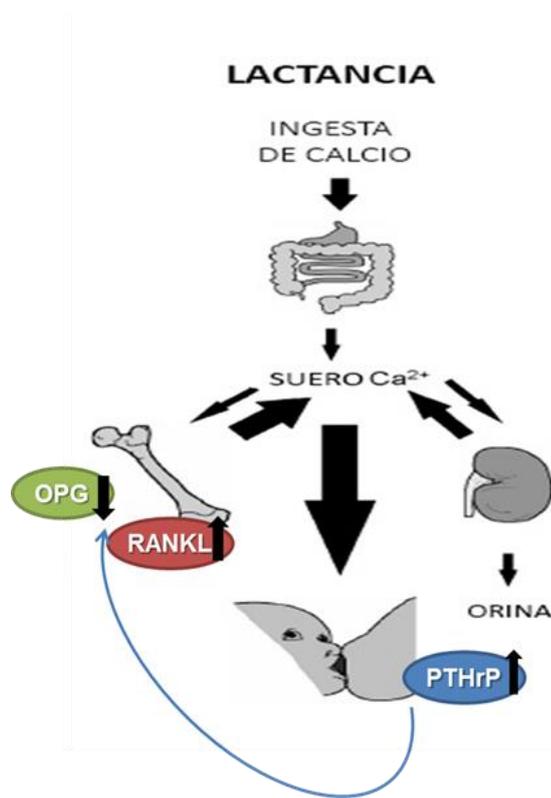
Durante la gestación, una ingesta deficiente de Ca está asociada con un incremento en la tasa de remodelado óseo materno, lo cual produciría un efecto negativo sobre el esqueleto materno. Es en estas condiciones donde se ha visto que el uso de un suplemento de calcio sería beneficioso para evitar la pérdida de masa ósea del esqueleto materno tanto disminuyendo los marcadores de remodelado⁽¹⁶⁵⁾, como protegiendo el hueso de la descalcificación⁽¹⁵⁶⁾.

La ingesta materna de Ca durante la gestación también influye la acreción mineral ósea del feto. Así, Koo et al.⁽¹⁶⁶⁾ realizó un estudio en mujeres embarazadas sanas en el que vio que suplementaciones con este mineral (2g/día) desde la semana 22 de gestación en mujeres con ingestas deficientes (<660mg/día) suponían un aumento en el contenido mineral óseo (BMC) de los niños a término⁽¹⁶⁶⁾.

2.3.2. LACTACIÓN

Durante la lactación también se produce un cambio del metabolismo del Ca que se traduce en un incremento del metabolismo óseo y mineral en la madre que viene condicionado por la mayor demanda de Ca del lactante a través de la leche materna⁽⁶⁹⁾.

Figura 16. Adaptaciones de la homeostasis del calcio de la madre durante la gestación



El tejido mamario segrega PTHrP, que incrementa la producción de RANKL en el hueso materno y disminuye la OPG, favoreciendo así la resorción del mismo, indicado por la flecha azul. El grosor de las flechas negras indica el incremento del flujo de calcio. (Modificada a partir de de Kovacs et al.⁽¹⁵⁸⁾)

A pesar del alto requerimiento de Ca durante este periodo, diferentes estudios han visto que la absorción intestinal de calcio no cambia durante la lactación, siendo alta en las madres durante el periodo de post-parto aun cuando no se dé lactancia y, además, no se ve influenciada por la ingesta de Ca⁽¹⁶³⁾. Este efecto puede ser debido a la disminución en los niveles de 1,25 (OH)₂ D₃ que tras el parto vuelven a los niveles prenatales. Respecto a la variación de la excreción de Ca por la orina, sin embargo, los estudios no son concluyentes, puesto que unos indican una menor excreción en las madres lactantes frente a las que no son⁽⁵⁵⁾ seguramente debido a una menor velocidad de filtración glomerular y que supondría un pequeño “ahorro” de Ca, mientras que otros estudios no encuentran diferencias⁽¹⁵⁹⁾, posiblemente porque la excreción de Ca sí está influenciada por la alimentación.

Los marcadores de resorción y formación ósea se encuentran elevados durante la lactación, aunque parece ser que la resorción se encuentra favorecida frente a la formación, lo que produciría una salida del Ca del hueso materno. Estos cambios en los marcadores óseos se pueden deber por un lado a la deficiencia estrogénica que se presenta durante la lactación y por otro la liberación por el tejido mamario del péptido relacionado de la PTH (PTHrP) que posee una funcionalidad similar a la propia PTH y además incrementa la producción de RANKL y disminuye la de OPG, lo que resultaría en un incremento de la resorción del hueso.

Así, durante la lactancia se produce una pérdida de hueso significativa, especialmente en los huesos axiales entre los que se encuentran las vértebras. La pérdida de hueso se produce desde el principio de la lactancia y empieza a recuperarse tras la vuelta de la menstruación. Las pérdidas de hueso debidas a la lactancia varían entre un 5 y el 10% a nivel trabecular tras un periodo de 2 a 6 meses de lactación, que son unas pérdidas muy altas si se tiene en cuenta que tras la menopausia se pierde entre un 1-3% por año. Un incremento de la ingesta de calcio en la dieta no influye en la pérdida de masa ósea que se produce en este periodo, ni siquiera en poblaciones con baja ingesta de Ca (<800mg/día). En esta población no se ha observado un beneficio⁽¹⁶⁷⁾ de la adición de Ca e incluso se ha llegado a observar una pérdida aún mayor⁽¹⁶⁸⁾. Tampoco se ven afectadas la concentración en la leche materna⁽¹⁶⁷⁾ ni la absorción intestinal de Ca⁽¹⁶⁹⁾.

En modelos experimentales se ha observado que durante la lactancia, las ratas pierden aproximadamente un tercio de su esqueleto para la producción de leche⁽¹⁷⁰⁾. Esta pérdida se duplica en animales sometidos a dietas bajas en Ca y no se ve afectada en dietas suplementadas con este mineral⁽⁴⁷⁾.

Durante el destete, la madre recupera el Ca perdido a través del incremento de la absorción intestinal debido a los altos niveles séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y una disminución en la excreción posiblemente debido a la alta concentración de PTH⁽¹⁵⁴⁾. Esto dos factores ayudan a que la pérdida en la masa ósea que ha ocurrido durante la lactancia pueda ser revertida aproximadamente tras los 6 meses de su finalización y una vez que los ciclos menstruales se han reestablecido⁽¹⁶⁷⁾. De hecho, cuanto antes se recupera la menstruación, menor es el nivel de hueso perdido durante la lactancia. La ganancia de masa ósea tras el destete es de 0,5% al

2% mensual, excediendo en gran medida aquella ganancia que ocurre durante el tratamiento de la osteoporosis⁽¹⁷⁰⁾. Entre los factores que pueden influenciar la recuperación ósea tras el periodo de lactación se incluirían embarazos distanciados, la edad de la madre y seguramente la ingesta de calcio. En general, parece que ni el número de embarazos ni el tiempo transcurrido entre ellos tenga un efecto negativo en la recuperación de la masa ósea tras la lactancia. Así no se ha encontrado diferencia entre las DMOs de las madres de familias de ≤ 2 hijos con las DMOs de madres de familias numerosas de >7 hijos⁽¹⁷¹⁾, ni tampoco se ha visto un efecto positivo por dejar más tiempo entre el fin de la lactancia y el siguiente embarazo.

Sin embargo, la edad materna en el momento del embarazo y, por lo tanto, de la lactación sí tiene una influencia en la recuperación de la masa ósea tras estos periodos⁽¹⁷²⁾. El metabolismo de una madre adolescente se adapta de diferente forma que el de una mujer adulta, ya que sus propios requerimientos son diferentes. Hopkinson y sus colaboradores⁽¹⁷²⁾ han descrito que los cambios netos en la masa ósea tras el periodo de lactación están negativamente asociados con la edad, es decir, las madres mayores tienen una menor recuperación tras el destete. Además es interesante suponer que siendo esta situación cada vez más habitual, puesto que la edad del último embarazo es cada vez más tardía y por lo tanto se acerca el periodo de recuperación post-lactación a edades perimenopáusicas, se puede crear una situación en la que el hueso de las mujeres no se encuentre totalmente recuperado de la pérdida sufrida durante la gestación y la lactancia, para poder enfrentarse más saludablemente a la pérdida que se genera tras la menopausia.

Toda esta información nos hace pensar en la búsqueda de compuestos nutricionales que puedan mejorar o disminuir la pérdida de masa ósea que se produce durante la gestación y la lactancia, de manera que se produzca una protección del hueso materno, lo que generaría un beneficio no sólo durante estos periodos sino también frente a la pérdida que se produce tras la menopausia.

2.4. LA NUTRICIÓN DURANTE EL DESARROLLO DEL NIÑO: EL EFECTO DE LA PROGRAMACIÓN TEMPRANA “PROGRAMMING”.

Por un lado la genética y por otro la nutrición y el estilo de vida de la madre son los factores que influyen en el desarrollo de la masa ósea no solo durante el desarrollo fetal sino también durante el posterior crecimiento del niño⁽¹⁷³⁾. Como se ha comentado anteriormente, los factores genéticos explican hasta un 80% de las variaciones en el pico de masa ósea, y su influencia se expresa principalmente y casi en su totalidad antes de la pubertad⁽¹⁷⁴⁾. A pesar de la fuerte influencia de la genética sobre el desarrollo óseo, otros factores como la nutrición han demostrado tener una influencia en el desarrollo del hueso llegando a generar cambios en la densidad mineral ósea (DMO) no explicados por el genotipo. Es por esto que aunque exista un componente genético no implica que el pico de masa ósea venga determinado por este, ya que los nutrientes pueden influir en la adquisición de masa ósea durante el crecimiento. Así, existen cada vez evidencias más claras de que factores nutricionales y genéticos interactúan influyendo el modelado óseo, o lo que es lo mismo, produciendo cambios en la DMO, talla, arquitectura y homeostasis mineral del hueso durante los años en los que se adquiere el pico de masa ósea⁽¹⁷⁵⁾.

Como comentamos, esta interacción entre genotipo y nutrición comienza en el inicio de la vida, durante el desarrollo intrauterino y se conoce como “programming”. En 1998, Baker, en el prefacio de su libro “*Mothers, babies and health in later life*”⁽¹⁷⁶⁾, fue uno de los primeros en plantear que la nutrición durante el período intrauterino y la exposición a infecciones tras el nacimiento determinan la susceptibilidad a enfermar en la edad adulta. Apoyada por esta teoría, se lanzó la hipótesis sobre los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (*Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD*)⁽¹⁷⁷⁾ donde se propone que un mayor riesgo de enfermedad con la edad puede ser inducido inicialmente a través de respuestas adaptativas que el feto o el niño hace a las señales que recibe de su madre acerca de su salud o estado físico. Las respuestas fetales y/o perinatales pueden incluir cambios en el metabolismo, la producción de hormonas y la sensibilidad de los tejidos a las mismas, que pueden afectar al desarrollo relativo de diversos órganos, provocando alteraciones fisiológicas

y metabólicas⁽¹⁷⁸⁾. Apoyando a esta hipótesis, diferentes estudios epidemiológicos han revelado que la malnutrición materna durante la gestación incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades coronarias, hipertensión o diabetes en sus hijos adultos.

El término programación nutricional o *nutritional programming* se define como cambios a largo plazo en la función y estructura causados por un estímulo medioambiental (la nutrición) que actúa durante los “periodos críticos” del desarrollo temprano. Se consideran periodos críticos aquellos en los que existen cambios rápidos, como ocurre durante el crecimiento uterino⁽¹⁷⁹⁾ y el nacimiento, periodos donde se produce una división celular muy rápida⁽¹⁸⁰⁾. Es decir, la plasticidad que hay presente durante el desarrollo del niño supone una modulación de la expresión génica, que parece estar mediada, al menos en parte, por procesos epigenéticos como, por ejemplo, la metilación del DNA. Tanto el genoma como el epigenoma influyen el fenotipo maduro y determina la sensibilidad a factores ambientales posteriores y, por lo tanto, al posible riesgo de enfermedad del niño⁽¹⁸¹⁾. De esta manera, en el desarrollo de los mamíferos, la madre transduce información del ambiente, como por ejemplo, su estado nutricional, a su embrión o feto a través de la placenta o a su hijo lactante a través de la lactación, produciendo una interacción activa con el fenotipo del niño durante la primera parte de su vida. Así, durante el crecimiento intrauterino y la vida post-natal existe una rápida adquisición de minerales por el feto/niño en crecimiento, que, acoplados con la plasticidad del desarrollo del esqueleto en el útero, genera la posibilidad de que existan interacciones entre el genoma y el “ambiente” en este periodo de la vida⁽¹⁸²⁾. Por esto, ya en el útero materno, principalmente durante la segunda parte de la gestación⁽¹⁸³⁾, se producen las influencias nutricionales que van a actuar sobre el desarrollo del hueso del niño, y, además, debido a esta programación uterina, estas influencias se van a extender más allá de la adquisición de la masa ósea en el feto⁽¹⁸³⁾.

No existen muchos estudios que relacionen el efecto positivo (el efecto negativo directo produce raquitismo y secuelas en el esqueleto de por vida y el “*programing*” de osteoporosis en el niño⁽¹⁸⁴⁾, y no es nuestro objeto de estudio) de la nutrición materna y el desarrollo óseo de la descendencia, pero los datos presentados en ellos son bastante homogéneos. De esta forma, Jones *et al.*⁽¹⁸⁵⁾ han llegado a relacionar positivamente la ingesta materna de minerales como el Mg, P, y K y de proteínas durante el tercer trimestre de

gestación con un aumento en la densidad ósea de los niños a los 8 años, mientras que el consumo de grasas se relacionó negativamente. Este mismo grupo de investigadores han visto, en el seguimiento de este primer estudio, que la ingesta materna de leche, grasa y magnesio durante la gestación puede influir de una manera independiente sobre la masa ósea de los niños hasta la adolescencia (16 años)⁽¹⁸⁶⁾. En este estudio se concluye que las asociaciones entre estos nutrientes y la masa ósea de la descendencia reflejarían principalmente una programación temprana, “*early programming*”, de las respuestas del hueso que podrían influir en la adquisición del pico de masa ósea.

También en la cohorte realizada en Inglaterra (ALSPAC, *Avon Longitudinal Study of Parents and Children*), se encontraron asociaciones entre la dieta materna a las 32 semanas de gestación y la DMO y el CMO de los niños a los 9 años⁽¹⁸⁷⁾. En este estudio, la ingesta de Mg, K y de folato fue asociada positivamente con los parámetros óseos medidos, aunque dichas asociaciones se perdieron o disminuyeron al corregir por la altura o el peso de los niños. Estos resultados concuerdan con los encontrados con Yin et al.⁽¹⁸⁶⁾ en el estudio anteriormente mencionado con niños hasta los 16 años. Otro de las cohortes que muestra los efectos positivos de la nutrición materna antes y durante el embarazo y la geometría ósea (DMO y CMO) de la descendencia es el llevado a cabo por Harvey et al.⁽¹⁸⁸⁾.: *The Southampton Women’s Survey* (SWS) donde se relacionó la concentración de vitamina D materna con la morfología del fémur del feto en desarrollo. En esta cohorte se sugiere que la relación entre la concentración de vitamina D (en su forma 25(OH) vitamina D) y la masa ósea del feto se debe, al menos en parte, por el transporte de Ca a través de la placenta⁽¹⁸⁹⁾.

Ganpule et al.⁽¹⁹⁰⁾ en su estudio realizado en la India (*The Pune Maternal Nutrition Study*), encontró que la DMO y CMO, tanto de la columna como del cuerpo entero, de los niños a los 6 años era mayor si las madres durante el embarazo habían tomado con mayor frecuencia alimentos ricos en Ca (leche y sus derivados, verduras de hoja verde, fruta o legumbres). En este estudio también se encontró una relación positiva entre la ingesta de folato a las 28 semanas de gestación y los parámetros óseos de los niños. También el estudio de Cole et al.⁽¹⁹¹⁾ muestra el efecto de una alimentación materna más “sana” y completa (mayor ingesta de fruta y verdura, alimentos integrales, pescado y derivados lácteos) durante, al menos, la última parte de la gestación y una mayor acreción ósea de los niños a los 9 años.

De este estudio resulta curiosa la observación del autor sobre la mayor ingesta de leche por los niños en el grupo con mayor densidad ósea.

Desgraciadamente no existen muchos estudios que incluyan adolescentes, por lo que no se sabe si estas asociaciones perduran a largo plazo. La relación más larga estudiada se encuentra en el estudio relativamente reciente realizado por Yin et al.⁽¹⁸⁶⁾ en adolescentes de 16 años mencionado anteriormente.

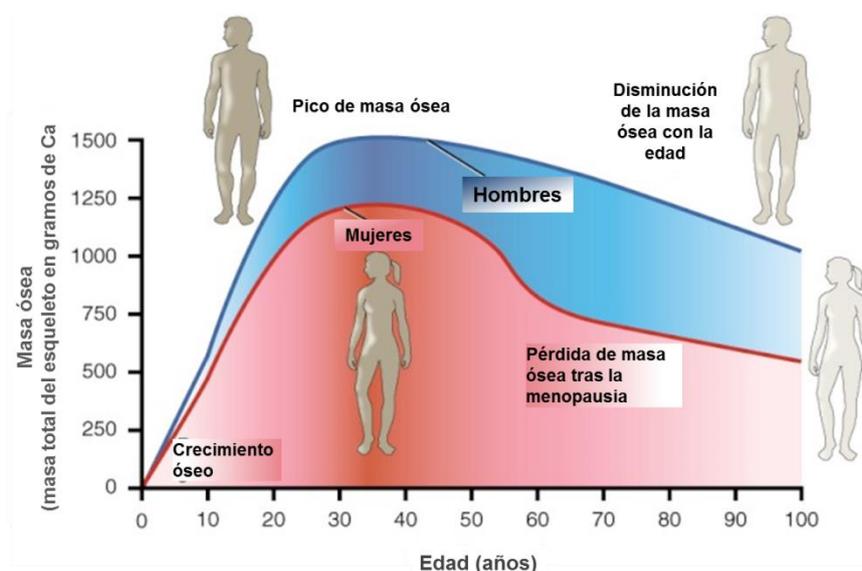
Además, curiosamente, ninguno de los estudios de programación temprana analizados encuentra una relación entre la ingesta materna de Ca durante el embarazo y la DMO o el CMO de los niños, ni a edades tempranas, 6-9 años, ni en la adolescencia, 16 años.

2.4.1. DESARROLLO ÓSEO Y PICO DE MASA ÓSEA.

Como ya comentamos, los procesos de modelado y remodelado ocurren durante la infancia y la adolescencia simultáneamente, resultando en un aumento de la masa esquelética hasta alcanzar el llamado pico de masa ósea, entre los 20 y los 30 años.

El pico de masa ósea se define como el máximo nivel de masa ósea que se adquiere como el resultado de un crecimiento normal⁽¹⁹²⁾ y refleja tanto las influencias ocurridas durante la vida uterina como las ocurridas durante el crecimiento hasta la madurez (figura 17). El pico de masa ósea es importante porque determina la resistencia o susceptibilidad a fracturas del adulto, por lo que su aumento, mediante la suplementación de calcio, durante la formación del esqueleto puede contribuir a la prevención de la osteoporosis^(193; 194).

Figura 17. Evolución de la masa ósea.



La masa ósea aumenta desde el nacimiento hasta alcanzar un valor máximo alrededor de los 30-35 años (pico de masa ósea); a partir de ese momento comienza lentamente a reducirse, principalmente en la mujer y se agrava posteriormente a partir de la menopausia. El pico de masa ósea en la mujer puede ser entre un 30-50% inferior al del hombre. (Modificada de Mahan et al.⁽¹⁹⁵⁾)

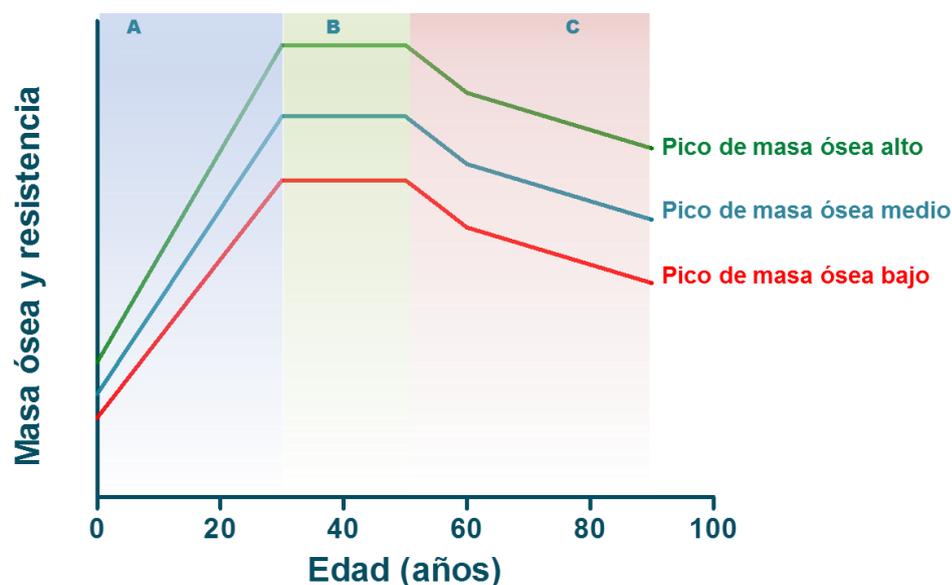
La mayor parte de la masa ósea del esqueleto se acumula aproximadamente durante los primeros 18-20 años, tras los cuales los cambios con la edad en la masa ósea y en la densidad son mínimos hasta que se produce la menopausia. No todos los huesos adquieren y mantienen su masa por igual. Así, el fémur proximal y el hueso trabecular de la vértebra pierden hueso inmediatamente a partir de los 18, mientras que otros huesos, como la cabeza o el antebrazo, continúan con la aposición mineral hasta la menopausia^(196; 197).

Por lo tanto, la cantidad y calidad del esqueleto de una persona refleja todo aquello que le ha ocurrido desde el útero hasta su máximo crecimiento en el inicio de la edad adulta y posteriormente cuando comienza a perder progresivamente hueso por la vejez. Aunque generalmente se le ha dado una mayor importancia al conocimiento de los mecanismos de la pérdida de masa ósea durante la edad adulta, existe un consenso casi universal acerca de que las influencias ejercidas durante el desarrollo del esqueleto son tanto o más importantes⁽¹⁹²⁾.

Fueron en los estudios observacionales de Newton-John y Morgan⁽¹⁹⁸⁾ donde se sugirió por primera vez la importancia de la adquisición del pico de masa ósea para obtener una mayor resistencia ósea en el adulto. Posteriormente, tras las observaciones de Matkovic et al.⁽¹⁹⁴⁾ se sugirió que, si otros factores se mantenían constantes, la masa ósea se conserva a lo largo de la vida, es decir, si un individuo está en el extremo superior de la distribución de la población a los 30 años (pico de masa ósea máximo), probablemente estará en la parte alta a los 70 años. Un poco más recientes son las observaciones de Ferrari et al.⁽¹⁹⁹⁾ y Dertina et al.⁽²⁰⁰⁾ que demuestran este mismo patrón en niños en plena actividad prepuberal, es decir, aquellos con mayor masa ósea ganaron más hueso durante la pubertad manteniéndose en el extremo superior 2 años después. Estas observaciones llevaron a ambos autores a sugerir que los individuos propensos a la osteoporosis podrían ser identificados incluso antes de la pubertad por mostrar unos valores de densidad ósea bajos para su edad, o dicho de otra forma, alcanzar un pico de masa ósea relativamente alto supondría una mayor masa ósea y por lo tanto una mayor protección frente a las fracturas durante la vejez⁽¹⁹²⁾ (figura 18).

Factores externos, entre los que se incluye la nutrición, pueden favorecer (ingesta adecuada) o desfavorecer (desnutrición o ingestas no adecuadas) la optimización del pico de masa ósea⁽²⁰¹⁾. Como consecuencia, para la adquisición del pico de masa ósea es necesario que el Ca procedente de la dieta y su absorción estén en el umbral o por encima del umbral, de forma que se puedan llevar a cabo tanto el modelado óseo como su consolidación teniendo en cuenta las pérdidas de Ca en orina, heces y sudor. Por esta razón, los individuos en edad de crecimiento, al contrario que los adultos, deben tener un balance positivo de Ca para cubrir las necesidades del crecimiento y consolidación del esqueleto⁽²⁰²⁾.

Figura 18. El pico de masa ósea y su potencial efecto protector ante la pérdida de masa ósea en la vejez.



A: Adquisición del pico de masa ósea; B: consolidación y mantenimiento de la masa ósea; C: pérdida de masa ósea. Un pico de masa ósea un 10% menor al normal (valor bajo, línea roja, frente al valor medio, línea azul) supone duplicar el riesgo de fractura en la vejez. (Modificada a partir de Rizzoli⁽²⁰¹⁾)

Las evidencias de que las influencias “ambientales” durante las fases tempranas de la vida pueden influenciar positiva o negativamente el riesgo de sufrir osteoporosis provienen de cuatro tipos de estudio diferentes:

- Estudios sobre la nutrición y los estilos de vida de mujeres embarazadas y su relación con la masa ósea de sus hijos, como las mencionadas SWS y ALSPAC.
- Medidas de la masa ósea llevadas a cabo en cohortes realizados en adultos con datos sobre su nacimiento y/o su infancia⁽¹⁸²⁾.
- Detallados estudios fisiológicos que exploran la relación entre posibles sistemas endocrinos que puede ser programables (GH, IGF-1, hipotálamo-hipófisis adrenal, esteroides) y la pérdida de hueso debida a la edad⁽¹⁸⁰⁾.
- Estudios relacionando las tasas de crecimiento desde la infancia con el riesgo de rotura de cadera en la vejez^(203; 204).

De todos estos estudios se puede concluir que la programación del crecimiento óseo puede ser un factor importante y determinante sobre el riesgo de padecer fracturas debidas a la osteoporosis durante la edad adulta^(179; 180; 182). Así, factores como el peso durante la infancia o los niveles basales de actividad de la GH/IGF-1 están relacionados con el CMO del adulto⁽¹⁸²⁾. Otros factores como que la madre fume o los niveles de vitamina D durante el embarazo determinan la mineralización intrauterina del esqueleto del niño. Por último, la velocidad en el crecimiento está directamente asociada con el riesgo de sufrir una rotura de cadera algunas décadas después⁽¹⁸²⁾.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, se plantea el objetivo de esta tesis doctoral:

Estudiar el efecto beneficioso que la suplementación de la dieta materna con el prebiótico, inulina enriquecida con oligofructosa, durante la gestación y la lactancia, puede generar no sólo en la salud ósea de la madre sino también en la formación y desarrollo del esqueleto de la cría a lo largo de su vida, desde su nacimiento hasta el final de la adolescencia, a través de un estudio preclínico en ratas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los procesos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto en Formación de Nutrición Animal, IFNA (Estación Experimental del Zaidín, CSIC) y se llevaron a cabo siguiendo las directrices éticas y la legislación para la utilización de animales de experimentación establecidas en el Real Decreto 1201/2005 del 10 de octubre de 2005, B.O.E. nº 252 del 21 de octubre de 2005 que está de acuerdo con la Declaración de Helsinki y las directrices europeas vigentes.

El presente estudio se ha realizado con 30 ratas hembras gestantes de la raza Sprague-Dawley de 15 semanas de edad, que se encontraban en el 11º día de gestación. Las ratas fueron suministradas por los Laboratorios Charles Rives (Orleans Cedex, Francia).

Tras la recepción, los animales fueron pesados y se dividieron aleatoriamente en los 3 grupos de estudio. Se colocaron individualmente en jaulas adecuadas para la cría en el animalario que consiste en una habitación termostatazada a 22°C, con una humedad relativa del 50% y dotada de sistemas de iluminación y ventilación automáticos. La iluminación artificial permitía generar un ciclo de 12h de luz (7:00 a 19:00)/12h oscuridad.

Cada grupo de estudio contó con un total de 10 animales y se definieron de la siguiente manera:

Grupo control (grupo CC), ratas alimentadas durante la gestación y lactancia con dieta estándar AIN93G. La dieta AIN93G es una dieta estándar control para animales en periodo de gestación, lactancia o crecimiento. Esta dieta cubre los requerimientos de los animales en estos periodos, aportando los niveles de Ca y Vitamina D necesarios⁽²⁰⁵⁾.

Grupo fortificado en calcio (Grupo Ca) ratas alimentadas durante la gestación y lactancia con dieta AIN93G fortificada con 0.5% de carbonato cálcico, lo que resulta en una concentración final de ión Ca²⁺ de 1g/100 g de producto.

Grupo enriquecido con prebiótico (Grupo Pre) alimentado durante la gestación y lactancia con dieta AIN93G con un 7.5% de los carbohidratos totales como inulina enriquecida

con fructooligosacáridos (FOS) (Synergy-1[®], Orafti, Bélgica). Este prebiótico es una mezcla 1:1 de fructooligosacáridos con un grado medio de polimerización de 4, y una inulina de alto rendimiento con un grado medio de polimerización de 25.

Durante la gestación y la lactancia, las ratas tuvieron libre acceso a la comida y al agua desionizada (MilliQ) que se suministraron *ad libitum*. Durante estos periodos se realizaron controles de peso y de ingesta al menos dos veces por semana.

3.1.1. COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS.

La composición de las dietas cumplen con las normas internacionales de composición del *American Institute of Nutrition (AIN) (1997)* ^(205; 206) y se recoge en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición nutricional de las dietas ensayadas.

	AIN93-G (Grupo CC)	AIN93-G+Ca (Grupo Ca)	AIN93-G+Pre (Grupo Pre)
Grasa total (g/kg dieta)			
Aceite de Soja	71.8	71.8	71.8
Proteínas (g/kg dieta)			
	183.1	183.1	183.1
Carbohidratos (g/kg dieta)			
Celulosa	49.5	49.5	0.0
Inulina enriquecida en FOS*	0.0	0.0	75.0
Minerales (/kg diet)			
Calcio (g)	5.25	10.5	5.25
Fósforo (g)	3.15	3.15	3.15
Magnesio (mg)	539.0	539.0	539.0
Zinc (mg)	39.9	39.9	39.9
Vitaminas (/kg diet)			
Vitamina A (UI)	4200	4200	4200
Vitamina D ₃ (UI)	1200	1200	1200
Vitamina E (UI)	90	90	90
Vitamina K ₁ (mg)	1.08	1.08	1.08
Energía (kcal/kg diet)	3880.0	3880.0	3840.0

*La fuente de prebiótico, la Inulina enriquecida en fructooligosacáridos proviene de Orafti® Synergy 1 (Beneo, Alemania) y es una mezcla 1/1 de oligofructosa e inulina de alto rendimiento.

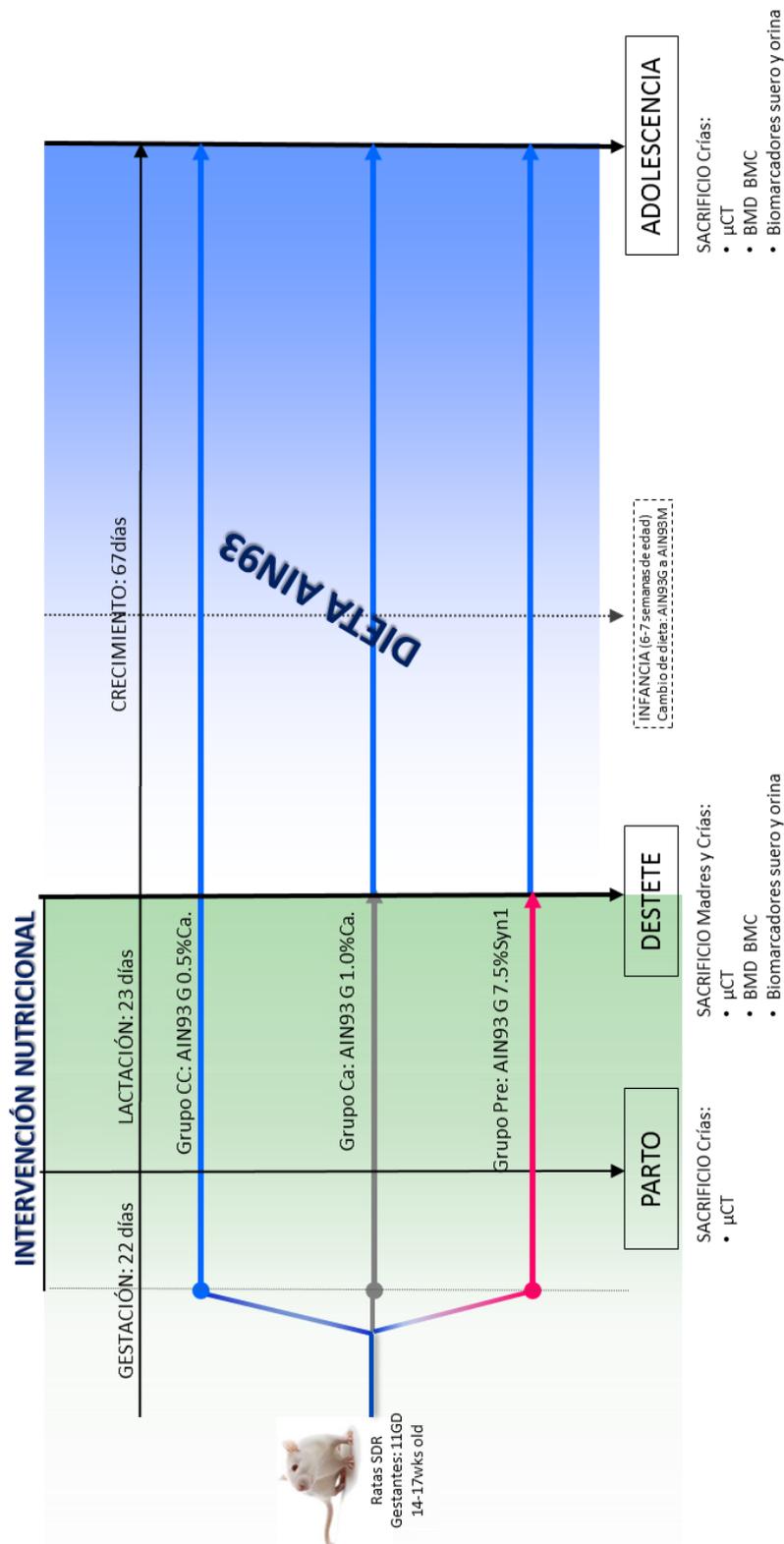
Tras el parto, las camadas fueron pesadas individualmente. Para estandarizar y minimizar las variaciones en la nutrición de las crías durante el periodo de lactancia y evitar efectos de interacción madre-cría, las crías pertenecientes a un mismo grupo de alimentación se mezclaron y se asignaron aleatoriamente a las madres del grupo. Finalmente, las nuevas camadas se formaron con un total de 8 animales, 5 hembras y 3 machos. Aunque en este estudio no se utilizaron, se introdujeron machos en cada camada para mimetizar las camadas naturales y para evitar una posible diferencia durante la lactancia debida al género de las crías.

La intervención nutricional en las madres terminó con el destete de las crías que se produjo a los 22 ± 1 días tras el nacimiento. Una vez destetadas, las crías hembras se alojaron en grupos de 4 animales por jaula y fueron alimentadas *ad libitum* con dieta estándar adecuada para el crecimiento, AIN93G (dieta control), hasta los 43 días de edad. Pasado este periodo, las ratas se individualizaron y pasaron a ser alimentadas con dieta estándar de mantenimiento, AIN93M, hasta el final del periodo de adolescencia, 90 días de edad. Durante todo el periodo de crecimiento transcurrido tras el destete, las ratas tuvieron libre acceso a agua desionizada (MilliQ).

Las crías fueron pesadas dos veces por semana durante el periodo de lactancia y semanalmente desde el destete hasta el final de la adolescencia.

La Figura 19 muestra el diseño experimental del estudio.

Figura 19. Diseño experimental del estudio.



3.1.2. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Los animales fueron sacrificados tras el nacimiento (tiempo 0, crías), el destete (tiempo 23, madres y crías) y al final de la adolescencia (tiempo 90, crías).

Para el sacrificio, los animales fueron puestos en ayunas sin acceso a comida pero con libre acceso al agua desionizada durante 4h en el caso de las ratas del tiempo 23 días y durante 12h en el caso de las de las madres y de las crías sacrificadas a tiempo 90 días. El ayuno fue relativo a la edad del animal. Durante el periodo de ayunas, tanto las madres como las crías al final de la adolescencia fueron introducidos en jaulas metabólicas para la recogida de la orina de las 12h nocturnas. Para esto, se colocó un tubo acidificado con 60µl de ácido clorhídrico 6N y protegido de la luz en el colector de orina de las jaulas. A las 12h, se midió el volumen de la orina de 12h, se acidificó con HCl 6N, 35µL por cada 1ml de orina, se agitó y centrifugó a 1500 r.p.m. durante 10min a 4°C. El centrifugado se alícuotó y se congeló a -80°C para medir los biomarcadores de resorción: deoxipiridinolina (DPD) y piridinolina (PYD).

Tras el periodo de ayuno, los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con pentobarbital sódico, 30mg/kg de peso (*Abbott Laboratories*, Chicago, IL, EEUU). Una vez anestesiados, se les realizó una incisión abdominal y se le extrajo sangre por punción cardiaca. Tras ser desangrados, se aisló el ciego y se recogió su contenido que fue congelado a -80°C para su posterior análisis del pH cecal.

La sangre extraída se recogió en tubos especiales para la separación de suero (Sarstedt, Alemania) y se centrifugó a 1500xg durante 10 minutos a 4°C. El suero así obtenido se dividió en alícuotas que fueron congeladas y conservadas a -80°C. Del suero obtenido se midieron marcadores bioquímicos de formación ósea osteocalcina (OC) y fosfatasa alcalina (ALP), y de resorción ósea como la hormona paratiroidea (PTH) según los protocolos descritos a continuación.

3.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

3.2.1.1. Osteocalcina.

Para la determinación de osteocalcina sérica se utilizó un kit de inmunoensayo enzimático Rat-MID™ Osteocalcin EIA de la casa IDS (Immunodiagnostic Systems, Boldon, Reino Unido) para la determinación cuantitativa de osteocalcina en suero de rata.

El kit de determinación se basa en la unión competitiva del anticuerpo monoclonal con la osteocalcina soluble o inmovilizada. El anticuerpo monoclonal reconoce la parte molecular intermedia (aminoácidos 21-29) de la molécula⁽²⁰⁷⁾. Brevemente, durante la pre-incubación, la osteocalcina biotinilada se inmoviliza al unirse con la estreptavidina adherida en el fondo de los pocillos. Tras vaciar y lavar los pocillos, las muestras, controles y estándares se pipetea seguidos de la solución de anticuerpo monoclonal. Tras la incubación primaria, los pocillos se vuelven a vaciar y lavar. En la incubación secundaria se añade las inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con peroxidasa que se unen con el anticuerpo monoclonal. Tras un tercer paso de vaciado-lavado, se añade un substrato cromógeno (tetrametilbenzidina, TMB) que produce un reacción coloreada que se detiene con ácido sulfúrico. Se realiza la medición de absorbancia a 450nm en un lector de microplacas. El nivel de absorción es inversamente proporcional a la concentración de osteocalcina encontrada en la muestra.

3.2.1.2. Hormona Paratiroidea Sérica (PTH)

Para la determinación de la hormona paratiroidea (PTH) en suero de rata se utilizó el kit de determinación cuantitativa de PTH intacta en plasma o cultivo celular por ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Rat BioActive Intact PTH ELISA Kit, de la casa Immunotopics (Immunotopics Int, California, EEUU).

El kit está compuesto de dos anticuerpos policlonales seleccionados para detectar solamente la forma biológicamente activa de larga duración de la PTH intacta de rata. Por un lado el anticuerpo que reconoce los epítopes de la porción C-terminal del péptido se encuentra biotinilado para la captura, mientras que el anticuerpo que reconoce el epítipo N-terminal se encuentra conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) para la detección. De ésta

manera, la PTH intacta presente en la muestra se une inmunológicamente al anticuerpo de captura y junto al anticuerpo de detección se forma un complejo tipo sándwich:

Pocillo/Avidina-Biotina Anti-Rat PTH —PTH Intacta — HRP Anti-Rat PTH

Tras el periodo de incubación, los pocillos se lavan eliminando cualquier anticuerpo no unido junto con otros componentes presentes en la muestra. Las enzimas unidas en los pocillos se incuban con la solución de sustrato (TMB) generando color que se mide espectrofotométricamente. La actividad enzimática del complejo de anticuerpos unidos en los pocillos es directamente proporcional a la cantidad de PTH bioactiva intacta que hay en la muestra.

La cuantificación única de la forma biológicamente activa de larga duración de la PTH intacta de rata con este kit proporciona una evaluación exacta y sensible de los cambios en el hueso y en el metabolismo mineral.

3.2.1.3. Deoxipiridinolina (DPD).

Para la determinación de deoxipiridinolina (DPD) en orina de rata se utilizó el kit de determinación de DPD total por ensayo inmunoenzimático (EIA) (Quidel Corporation, California, EEUU).

La medida de DPD total se realizó en las muestras hidrolizadas de orina de 12h. Para la hidrólisis ácida a cada muestra de orina, 50µl, se le añadió un volumen igual de ácido clorhídrico 6N, 50µl, y se incubó durante 18-20 horas a 99°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se enfriaron y se neutralizaron con 25µl de hidróxido sódico 10N y 25µl del tampón suministrado en el kit (tampón fosfato, pH=7.2). La determinación del DPD se realiza por un ensayo enzimático competitivo donde el DPD de las muestras hidrolizadas compete con la fosfatasa alcalina conjugada con DPD en la unión con el anticuerpo monoclonal anti-DPD. Finalmente la reacción se detecta a través del sustrato para-nitrofenilfosfato (pNPP) que produce una reacción coloreada que se detiene con hidróxido

sódico 0.5N. El nivel de absorción a 405nm es inversamente proporcional a la concentración de DPD total encontrada en la muestra.

EL DPD se forma por medio de la acción enzimática de la lisil-oxidasa sobre la lisina y de libera a la circulación durante los procesos de resorción ósea. Al ser excretado sin metabolizar por la orina y al no verse afectado por la dieta, lo hacen un marcador adecuado de la resorción ósea.

3.2.1.4. Piridinolina (PYD).

Para la determinación de la piridinolina (PYD) en orina de rata se utilizó el kit de determinación de PYD total por enzimoimmunoensayo (EIA) (Quidel Corporation, California, EEUU).

La medida de PYD se realizó en las muestras acidificadas de orina de 12h. La determinación del PYD se realiza por un inmunoensayo enzimático competitivo donde el PYD y el DPD de la muestra compiten por el anticuerpo con el PYD recubierto en la tira. La reacción se detecta con el sustrato para-nitrofenilfosfato (pNPP) que produce una reacción coloreada que se detiene con hidróxido sódico 0.5N. Por último se determina el nivel de absorción a 405nm.

Metra PYD es un análisis de orina que permite una determinación cuantitativa de la excreción de enlaces cruzados de piridinio como indicador de la reabsorción de colágeno de tipo I, en especial del colágeno óseo.

3.2.1.5. Fosfatasa Alcalina (ALP).

La determinación de esta enzima en suero se realizó utilizando un kit comercial suministrado por Rolf Greiner BioChemica (DiaSys Greiner, Flacht, Alemania) y analizada utilizando el analizador automático ALCYON 300 (Abbott laboratorios Ltd, EEUU). La reacción de determinación se basa en el método estándar optimizado por la Deutsche Gesellschaft für

Klinische Chemie⁽²⁰⁸⁾, según el cual, la fosfatasa alcalina (ALP) cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (pNPP) a pH 10,4 liberando p-nitrofenol y fosfato, según la siguiente reacción:

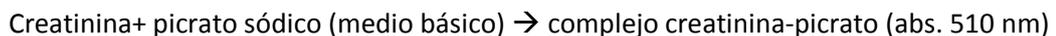


La velocidad de formación del p-nitrofenol, determinado fotométricamente a 405 nm, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra ensayada^(209; 210).

La actividad de la fosfatasa alcalina en suero comprende a la de varias isoformas que se originan en diferentes tejidos siendo las dos fracciones mayoritarias la fosfatasa alcalina ósea y la hepática. Los niveles de fosfatasa alcalina, siempre que se descarte un fallo hepático, son usados como marcador de la actividad osteoblástica⁽²¹¹⁾.

3.2.1.6. Creatinina (CRE).

Para la determinación de creatinina en suero y orina se utilizó un kit comercial suministrado por Rolf Greiner BioChemica (DiaSys Greiner, Flacht, Alemania) y analizada utilizando el analizador automático ALCYON 300 (Abbott laboratorios Ltd, EEUU). La determinación se basa en la reacción descrita por Jaffé (1886)⁽²¹²⁾. La creatinina y otros compuestos de la muestra reaccionan con el ácido pícrico en medio alcalino dando un complejo color rojo el cual absorbe a 510 nm. La velocidad con la que se forma el color es proporcional a la creatinina en la muestra.



3.3. ANÁLISIS DEL pH EN EL CONTENIDO DEL CIEGO.

El análisis del pH del contenido del ciego se realizó en una homogenización en agua desionizada (MilliQ). Para ello, 0,5 gramos de contenido cecal se homogenizaron en 10 ml de agua y el pH de la disolución resultante se midió con un pHmetro standard de laboratorio (CRISON, Barcelona, España).

3.4. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO EX-VIVO.

Para el análisis de la densidad mineral ósea (DMO) y el contenido mineral óseo (CMO) se utilizó el equipo de densitometría o absorciometría con rayos X de doble energía (dual energy X-ray absorptiometry, DEXA) pDEXA®(Norland corp., Fort Atkinson, WI, EEUU). Se midieron DMO y CMO del cuerpo entero en el caso de las crías al destete y de los huesos aislados, fémur, tibia y vértebra, de las madres y de las crías al final de la adolescencia. Los fémures fueron analizados desde el cuello femoral hasta la inserción de la rodilla. El análisis de la tibia incluyó el peroné o fíbula y se realizó desde la rodilla hasta el tobillo. Por último, las vértebras se midieron desde el nivel inferior de la vértebra lumbar número 2 hasta la parte superior de la vértebra lumbar 5 (LV2-LV5). Para evitar posibles variaciones debido al uso del equipo y posterior análisis de las muestras, todas las medidas se realizaron por el mismo técnico especializado.

La medición por DEXA permite la discriminación de diferentes estructuras del organismo. Es una técnica utilizada habitualmente en la práctica clínica centrándose sobre la columna lumbar y la cadera que permite cuantificar la DMO de los pacientes. A partir de esos datos, se puede estimar el riesgo de fractura, tomar decisiones terapéuticas, y evaluar la respuesta al tratamiento⁽²¹³⁻²¹⁵⁾.

3.5. MICRO-TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA (μ CT)

Los fémures, tibias y vértebras lumbares 4 (LV4) fueron escaneados *ex-vivo* de las crías al nacimiento, destete y al final de la adolescencia, así como de las madres tras el destete usando los equipos de μ CT de alta resolución Metris (XTek) Benchtop 160Xi CT Scanner (Universidad de Southampton, Reino Unido) y VivaCT-40 system (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Suiza). Brevemente, en el fémur y la tibia se escaneo la zona trabecular secundaria dentro de la metáfisis y por debajo del plato de crecimiento. En la vértebra, LV4, se escaneo la zona esponjosa entre los dos platos de crecimiento. Todos los escáneres realizados al nacimiento y al destete de los huesos de las crías fueron realizados a 150kV, 60 μ A utilizando un patrón de molibdeno. Las muestras a estas edades se escanearon a una resolución de 19 μ m con un tiempo de exposición de 534ms y una ganancia digital 4x. Las imágenes volumétricas en 3D se reconstruyeron desde las imágenes individuales tiff obtenidas del escáner de CT usando el software Metris (XTek) CT-Pro. El análisis del hueso cortical y esponjoso de los animales al

final de la adolescencia y de las madres al destete se realizó a 70kV y 114 μ A, con una resolución de 16 μ m y un tiempo de integración de 600 ms para los fémures y tibias y de 20 μ m con un tiempo de integración de 800ms para las vértebras, LV4. En este caso, para obtener las imágenes tridimensionales, 3D, se utilizaron unos portales o umbrales de 204 y 240 que permitieron binarizar los análisis del hueso cortical y trabecular.

Los parámetros de la arquitectura trabecular medidos fueron

Numero de trabéculas (Tb.N, 1/mm) mide el número medio de trabéculas por unidad de longitud. Es un parámetro relacionado con la densidad trabecular.

Grosor trabecular (Tb.Th, mm) que mide el grosor trabecular.

Separación trabecular (Tb.Sp, mm) que determina la distancia o espacio entre trabéculas.

La fracción volumétrica de hueso (BV/TV) determina la fracción de hueso esponjoso incluyendo el hueso mineralizado y los osteoides.

La superficie ósea específica (BS/BV, mm⁻¹) caracteriza el grosor y la complejidad de las estructuras.

La densidad conectiva (Conn.D, mm⁻³) indica una medida del grado de conectividad entre trabéculas normalizada por el volumen total (TV).

Entre los parámetros corticales medidos se encuentran:

La densidad mineral ósea volumétrica del hueso cortical (C.BMD),

La anchura cortical (C.Th, mm) como una medida de la anchura de la pared cortical.

La porosidad cortical (C.SP, %) definida como el volumen de poros dividido por el volumen del hueso cortical.

El Momento polar de inercia (pMOI, mm⁴) es un índice estructural de resistencia a la torsión.

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

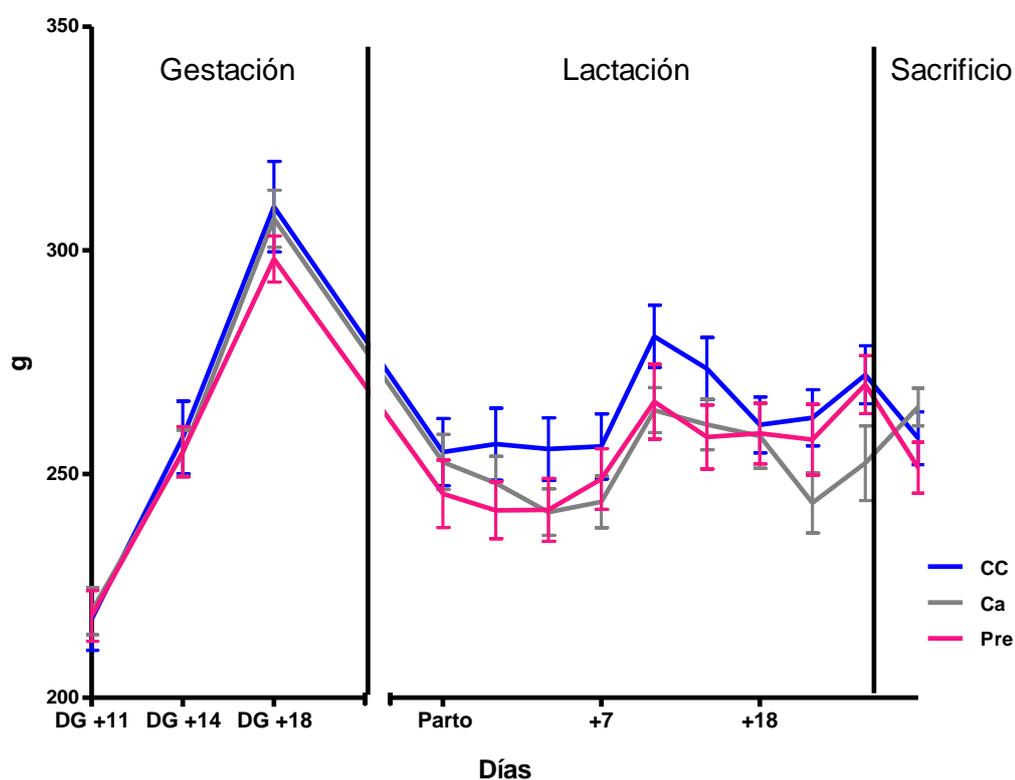
Los datos se presentan como valor medio \pm error estándar de la media (EEM). Para comprobar diferencias entre grupos atribuidas a la dieta en los diferentes parámetros, se realizó un análisis de la varianza one-way ANOVA seguido del test “*post hoc*” LSD protegido (*protected least significant difference mean separation*) de Fisher. A aquellos grupos que no mostraron una distribución normal o igualdad de la varianza se les realizó el test de Kruskal-Wallis. Las diferencias son consideradas significativas para todos los tratamientos estadísticos a un nivel de $p < 0.05$, mientras que diferencias significativas con valores de p entre el 0.05 y el 0.10 son definidas como tendencias. Todos los análisis se han efectuado con el software estadístico *Statgraphics Centurion XVI* (Stat Point Inc., Herndon, Virginia, EEUU).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DE LA DIETA MATERNA EN EL PESO DE LAS MADRES Y CRÍAS.

La evolución tanto del peso como de la ingesta de las madres durante el tiempo de la intervención nutricional, esto es, durante la gestación y la lactancia fue similar entre el grupo control y los grupos experimentales. Así, el día del sacrificio, los pesos de las madres no fueron distintos entre los tres grupos de estudio: grupo CC: 258.0 ± 5.9 g; grupo Ca: 265.0 ± 4.2 g y el grupo Pre: 251.4 ± 5.7 g (figuras 13-14).

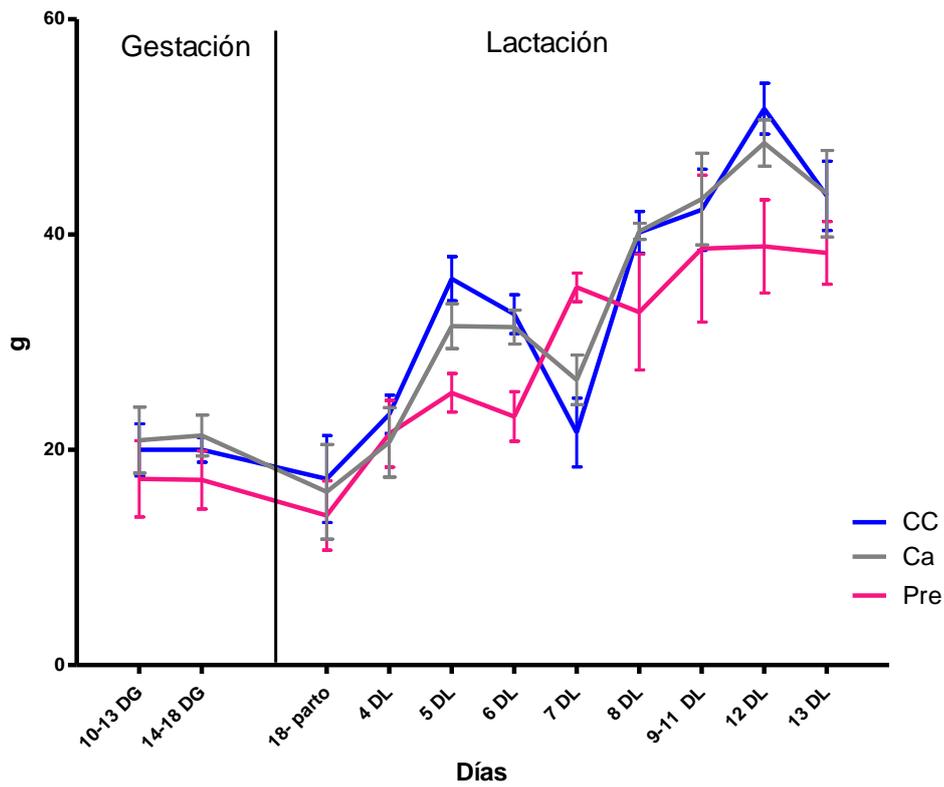
Figura 20. Evolución del peso de las madres durante el periodo de intervención nutricional.



Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS); DG, Día gestacional.

Figura 21. Evolución de la ingesta de las madres durante el periodo de intervención nutricional.



Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.

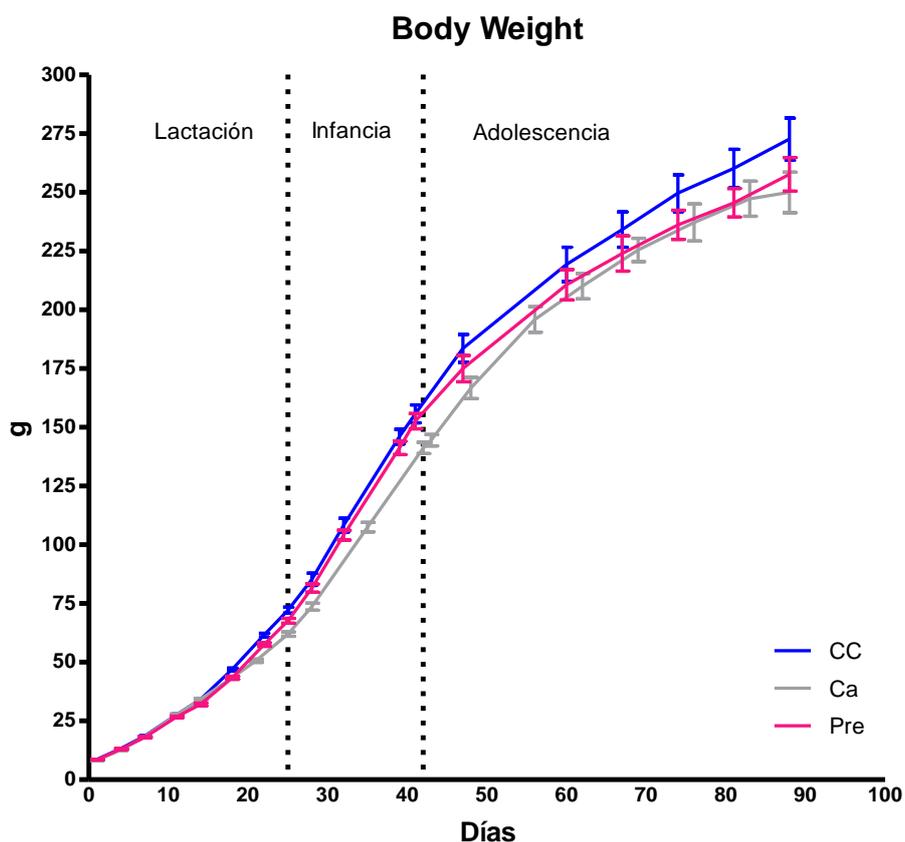
Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS); DG, Día gestacional; DL, Día de lactación.

A pesar de no haber diferencias entre los pesos de las madres, la intervención nutricional llevada a cabo durante la gestación y la lactancia afectó significativamente los pesos de la descendencia (figura 22). Así, al nacimiento, el peso medio de las crías del grupo Ca fue significativamente menor que la media en peso del grupo control: $8.24 \pm 0.10g$ frente a $8.65 \pm 0.12g$ ($p < 0.05$), mientras que no hubo diferencias entre el grupo control y el grupo Pre ($8.52 \pm 0.13g$).

En el destete, las crías del grupo Ca continuaron mostrando un menor peso ($62.0 \pm 0.9\text{g}$; $p < 0.05$) que el grupo CC ($72.2 \pm 1.3\text{g}$) y a esta edad también que el grupo Pre ($67.6 \pm 1.0\text{g}$).

Estas diferencias en peso entre las crías del grupo Ca y las de los grupos CC y Pre se fueron perdiendo durante la fase de crecimiento, llegando a no haber diferencias en el peso entre los grupos al final de la adolescencia: grupo CC: $272.7 \pm 9.0\text{g}$; grupo Ca: $250.0 \pm 8.6\text{g}$ y grupo Pre: $257.7 \pm 7.1\text{g}$.

Figura 22. Evolución del peso de las crías durante el estudio.



Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS).

4.2. EFECTO DE LA DIETA MATERNA EN EL HUESO DE LAS MADRES.

4.2.1. RESULTADOS DENSITOMÉTRICOS.

Tras la medición con el pDEXA de los diferentes huesos aislados de las madres se obtienen los datos de densidad y contenido mineral óseo (DMO y CMO).

En términos de valores absolutos, en los tres huesos medidos, el fémur, la tibia y la vértebra, los valores de DMO y CMO son más bajos en las madres que recibieron la dieta fortificada con Ca frente a los de las madres de los grupos CC y Pre. Además, son éstas últimas, las madres alimentadas con la dieta suplementada con el prebiótico (inulina enriquecida con FOS), las que presenta los mayores valores absolutos en DMO y CMO de entre los tres grupos. La estadística sólo muestra diferencias significativas en la tibia, donde los valores de DMO y CMO obtienen significación ($p < 0.05$) para los grupos CC y Pre al compararlos con los del grupo Ca (tabla 6, figura 23).

Tabla 6. Resultados densitométricos (pDEXA) del contenido mineral óseo (CMO) y de la densidad mineral ósea (DMO) de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).

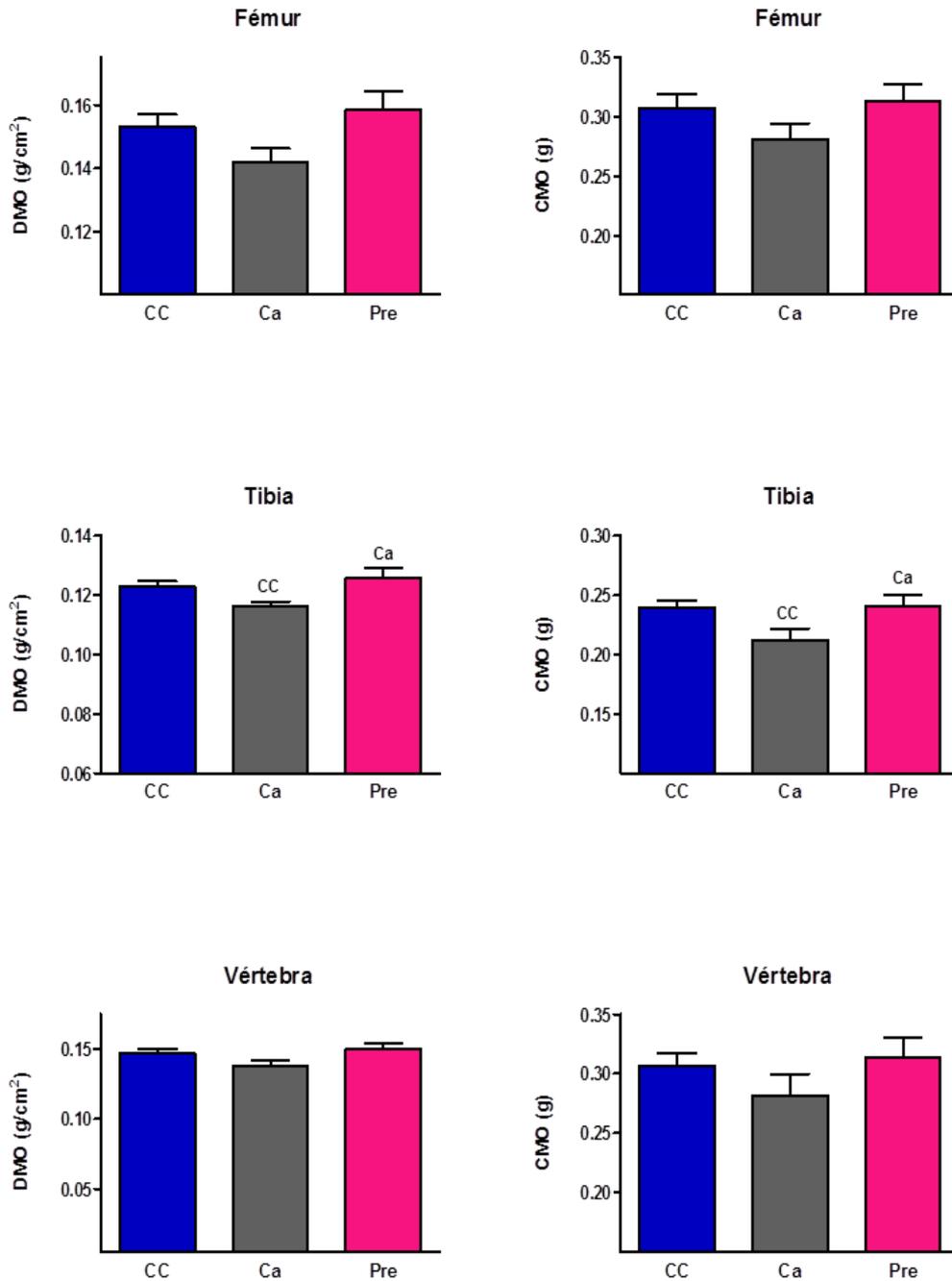
Los valores están expresados como la media ± E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo

	Grupo CC (n = 10)	Grupo Ca (n = 10)	Grupo Pre (n = 10)
Fémur			
CMO (g)	0.3075 ± 0.0114	0.2813 ± 0.0128	0.3127 ± 0.0146
DMO (g/cm ²)	0.1532 ± 0.0038	0.1419 ± 0.0044	0.1585 ± 0.0057
Tibia			
CMO (g)	0.2394 ± 0.0062	0.2122 ± 0.0094 ^{CC}	0.2407 ± 0.0096 ^{Ca}
DMO (g/cm ²)	0.1229 ± 0.0019	0.1161 ± 0.0019 ^{CC}	0.1258 ± 0.0032 ^{Ca}
LV4-5			
CMO (g)	0.3064 ± 0.0106	0.2815 ± 0.0180	0.3138 ± 0.0165
DMO (g/cm ²)	0.1473 ± 0.0029	0.1373 ± 0.0048	0.1500 ± 0.0039

suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS). Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

Figura 23. Resultados de la densitometría ósea (pDEXA): densidad mineral ósea (DMO) y de la contenido mineral óseo (CMO) de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).



Los valores están expresados como la media ± E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS). Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo el grupo Ca.

4.2.2. RESULTADOS DE LA MICRO-ESTRUCTURA.

El estudio de la micro-estructura de los huesos realizado a través de la técnica μ CT muestra la mismas tendencias descritas por la densitometría.

De una manera general, en todos los huesos analizados, el grupo Pre presenta una mejor micro-estructura trabecular que los grupos CC y Ca (tabla 7, figuras 24-26) siendo la tibia la que muestra el mayor impacto de la intervención nutricional y en la que se obtuvieron las diferencias estadísticas (Figura 25).

Así, la tibia de las madres del grupo Pre muestra un incremento significativo en la anchura trabecular (Tb.Th) ($p < 0.05$) y una disminución del ratio BS/BV ($p < 0.01$) con respecto al grupo control. Aunque al compararlos con los del grupo Ca éstos dos parámetros no alcanzan diferencias significativas, sí muestran una tendencia ($p < 0.08$). Además, el grupo Pre muestra un incremento significativo ($p < 0.05$) tanto en BV/TV como en la densidad conectiva (Conn.D) de la trabécula comparados con los del grupo CC y Ca.

Por otro lado, y aunque la estadística no muestre significación, es interesante destacar el mayor número de trabéculas (Tb.N) que presenta el grupo Pre frente al grupo CC (+14%) o frente al grupo Ca (+38%) así como también la disminución en el espacio trabecular (Tb.Sp) de un -6% vs control y de un -23% vs el grupo Ca.

Tabla 7. Arquitectura trabecular de los huesos de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).

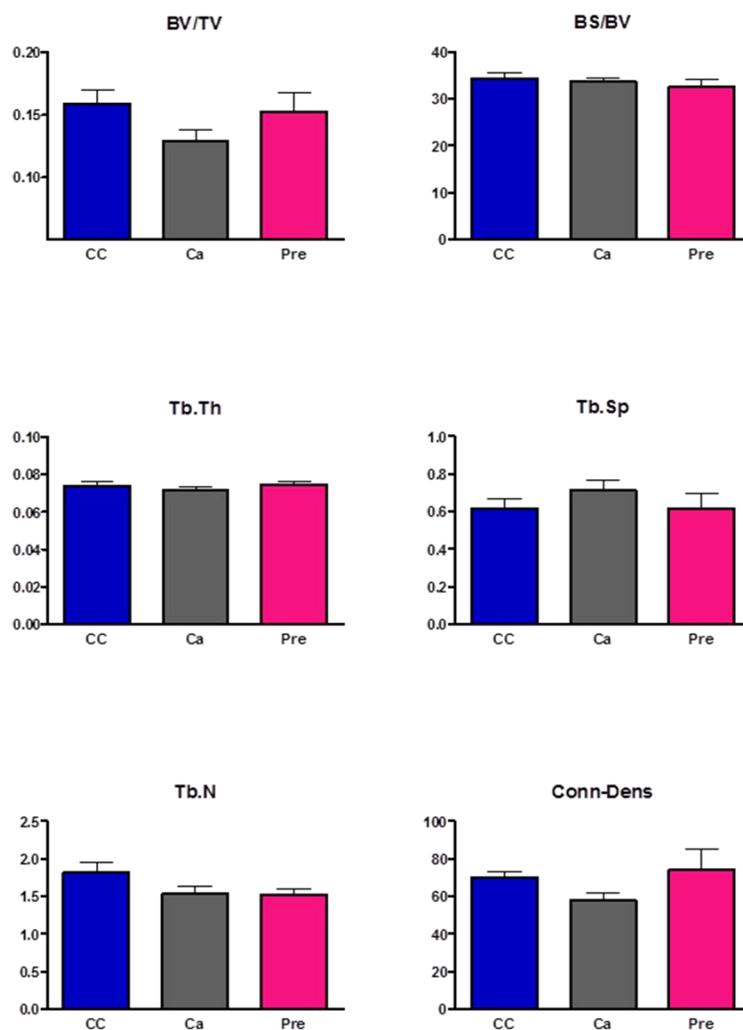
Los valores están expresados como la media ± E.E.M.

	Grupo CC (n = 8)	Grupo Ca (n = 8)	Grupo Pre (n = 8)
Fémur			
BV/TV	0.1584 ± 0.0116	0.1291 ± 0.0086	0.1521 ± 0.0154
BS/BV (1/mm)	34.29 ± 1.27	33.77 ± 0.62	32.59 ± 1.45
Tb. Th (mm)	0.0736 ± 0.0023	0.0715 ± 0.0018	0.0744 ± 0.0020
Tb. Sp (mm)	0.6185 ± 0.0482	0.7150 ± 0.050	0.6169 ± 0.0767
Tb. N (1/mm)	1.816 ± 0.1389	1.535 ± 0.0985	1.516 ± 0.077
Conn.D	70.01 ± 3.14	57.85 ± 4.25	73.97 ± 11.47
Tibia			
BV/TV	0.1274 ± 0.0094	0.1211 ± 0.0065	0.1723 ± 0.0213 ^{CC,Ca}
BS/BV (1/mm)	43.55 ± 1.13	41.30 ± 0.85	38.33 ± 1.31 ^{CC}
Tb. Th (mm)	0.0614 ± 0.0014	0.0631 ± 0.0011	0.0669 ± 0.0017 ^{CC}
Tb. Sp (mm)	0.4036 ± 0.0300	0.4956 ± 0.0364	0.3795 ± 0.0472
Tb. N (1/mm)	2.598 ± 0.1933	2.151 ± 0.1371	2.979 ± 0.3915
Conn.D	73.78 ± 4.57	66.18 ± 4.71	100.1 ± 14.58 ^{CC,Ca}
Vértebra (LV4)			
BV/TV	0.2759 ± 0.0127	0.2580 ± 0.0143	0.2985 ± 0.0234
BS/BV (1/mm)	30.27 ± 1.01	31.83 ± 1.11	28.92 ± 1.18
Tb. Th (mm)	0.0750 ± 0.0018	0.0713 ± 0.0016	0.0768 ± 0.0019
Tb. Sp (mm)	0.2544 ± 0.0063	0.2571 ± 0.0095	0.2419 ± 0.0119
Tb. N (1/mm)	3.978 ± 0.081	3.947 ± 0.124	4.140 ± 0.179
Conn.D	104.0 ± 4.1	104.6 ± 3.6	99.1 ± 4.5

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS. BV/TV, ratio volumen de hueso/Volumen total; BS/BV, ratio Superficie de hueso/volumen de hueso; Tb.Th, Anchura trabecular; Tb.Sp, Separación Trabecular; Tb.N, número de trabéculas; Conn.D, Densidad del tejido conectivo, LV4, vértebra lumbar 4.

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

Figura 24. Resultados trabeculares óseos del fémur de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).

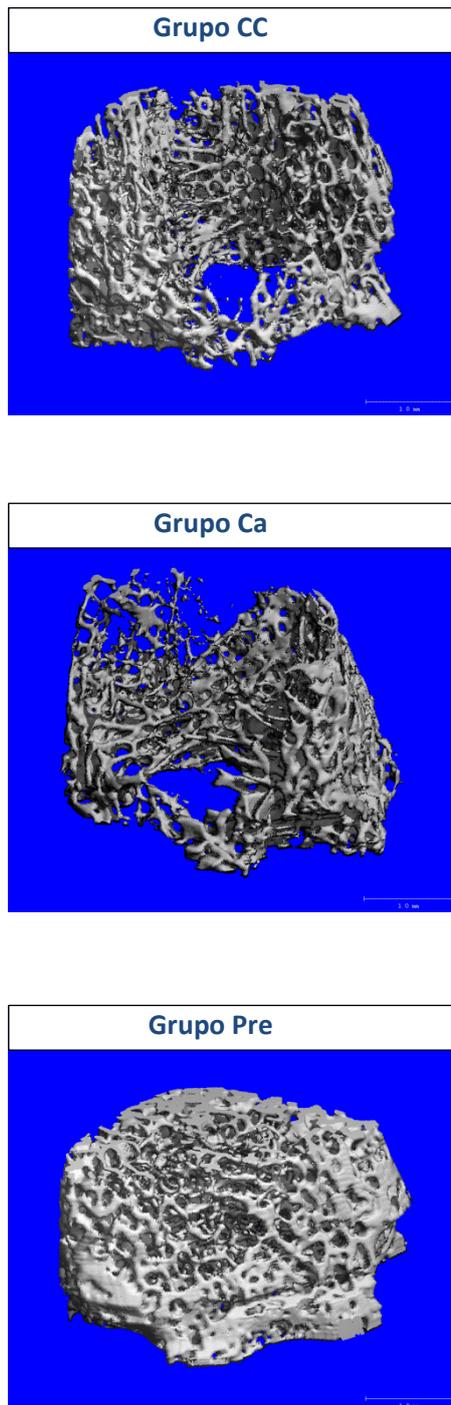


Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS). BV/TV, ratio volumen de hueso/Volumen total; BS/BV, ratio Superficie de hueso/volumen de hueso; Tb.Th, Anchura trabecular; Tb.Sp, Separación Trabecular; Tb.N, número de trabéculas.

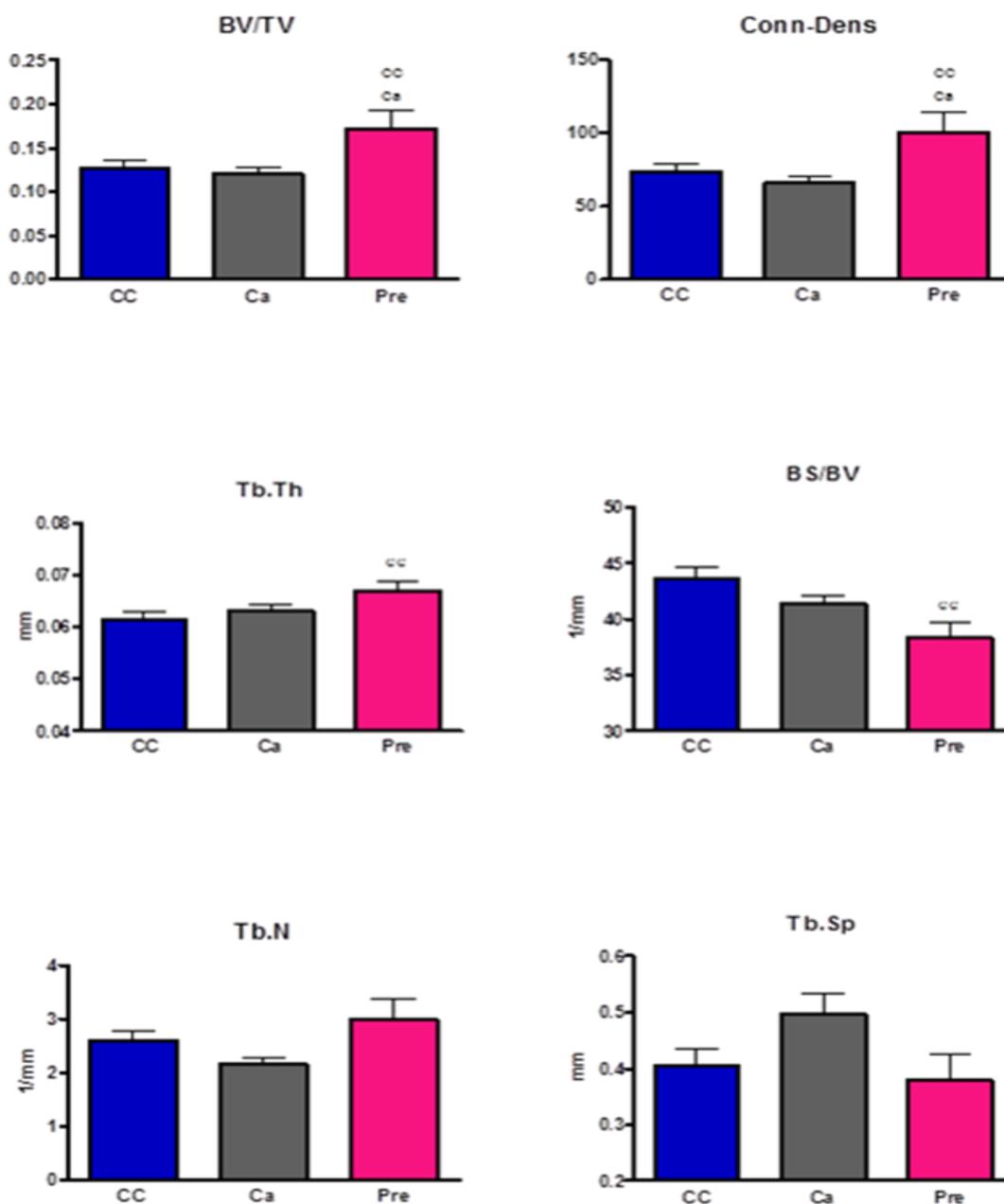
Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

Figura 25. Imágenes tridimensionales del hueso trabecular del fémur de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).



Las Imágenes se han elegido como representativas de su grupo. Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS).

Figura 26. Resultados trabeculares óseos de la tibia de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).

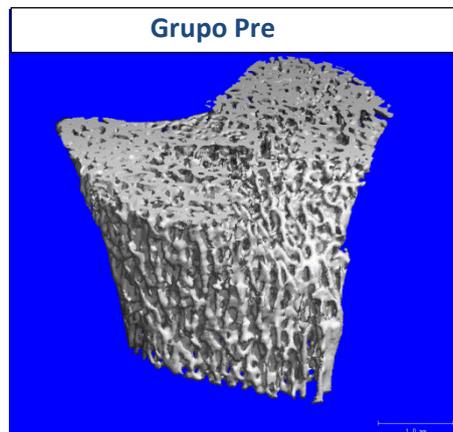
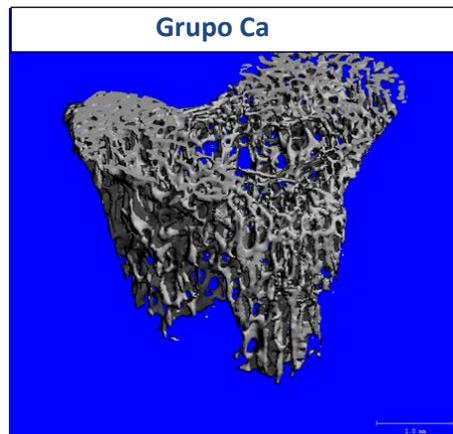
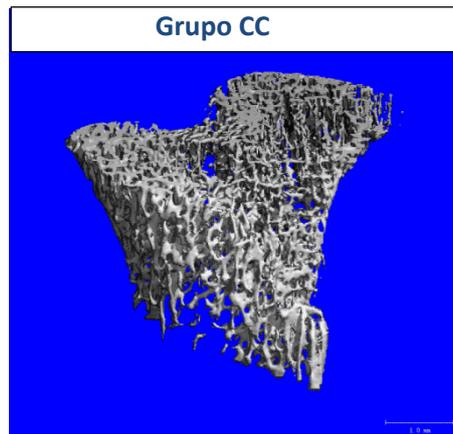


Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS). BV/TV, ratio volumen de hueso/Volumen total; BS/BV, ratio Superficie de hueso/volumen de hueso; Tb.Th, Anchura trabecular; Tb.Sp, Separación Trabecular; Tb.N, número de trabéculas.

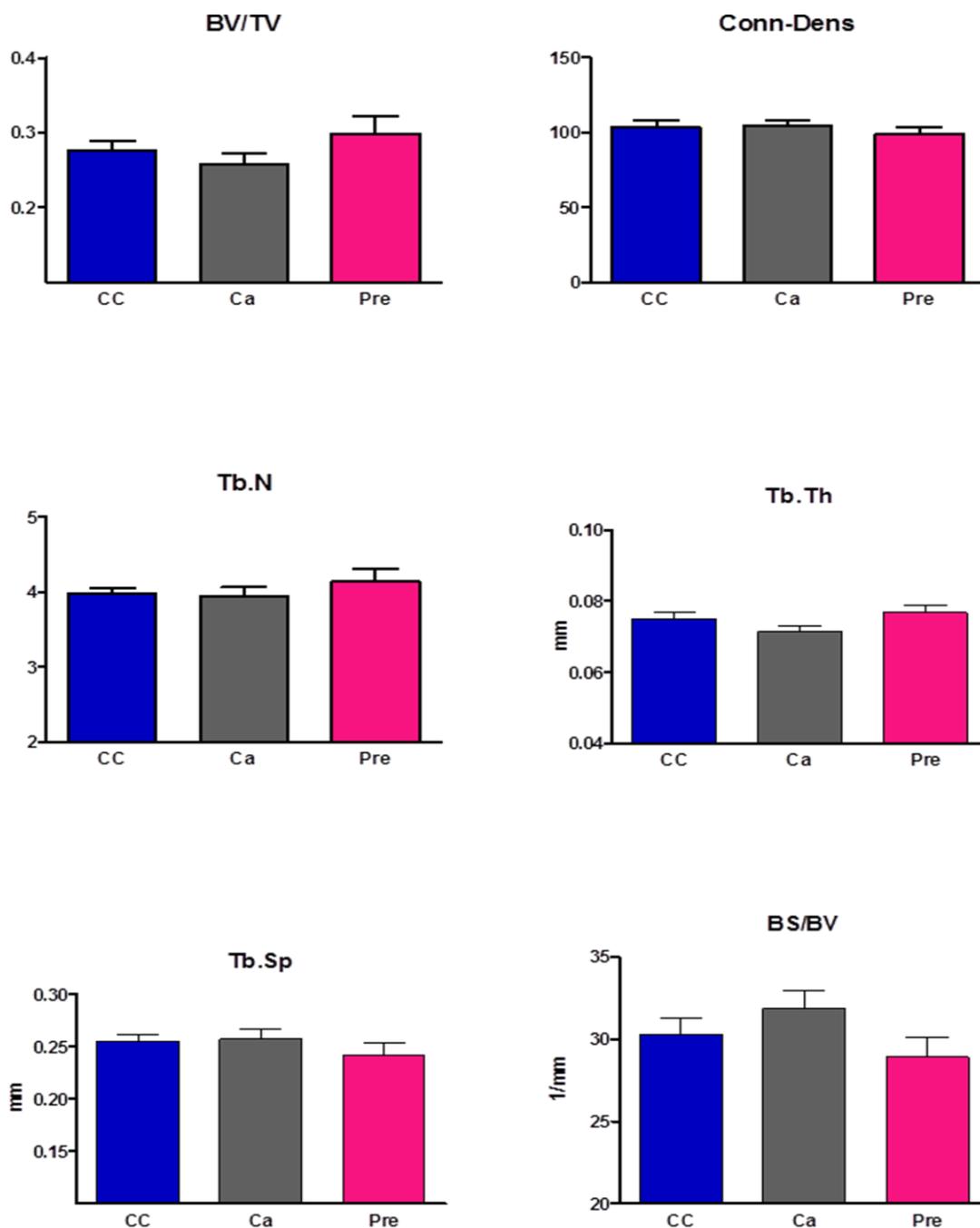
Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

Figura 27. Imágenes tridimensionales del hueso trabecular de la tibia de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).



Las Imágenes se han elegido como representativas de su grupo. Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS).

Figura 28. Resultados trabeculares óseos de la vértebra LV4 de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).

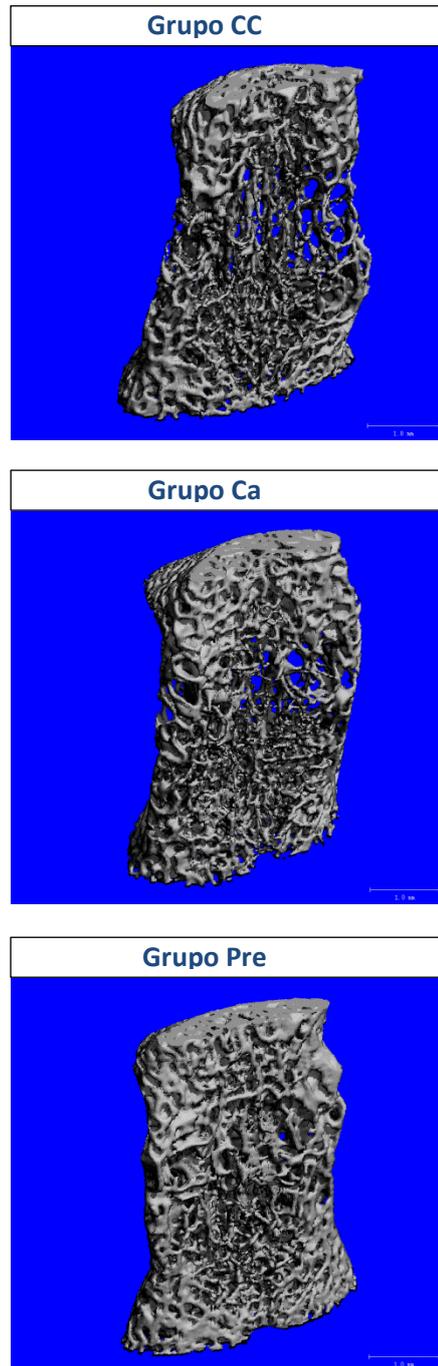


Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS). BV/TV, ratio volumen de hueso/Volumen total; BS/BV, ratio Superficie de hueso/volumen de hueso; Tb.Th, Anchura trabecular; Tb.Sp, Separación Trabecular; Tb.N, número de trabéculas.

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

Figura 29. Imágenes tridimensionales del hueso trabecular de la vértebra LV4 de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).



*Las Imágenes se han elegido como representativas de su grupo.
 Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS).*

4.2.3. RESULTADOS BIOQUÍMICOS.

En términos generales no se encontraron diferencias en los marcadores bioquímicos séricos entre los grupos de estudio. Cabe destacar que las madres del grupo Ca presentan más elevados los marcadores relacionados con la formación ósea, osteocalcina y fosfatasa alcalina, y también los parámetros de resorción ósea, DPD y PYD (tabla 8). Tan sólo en la osteocalcina el grupo Ca se vuelve significativamente diferente ($p < 0.01$) frente al grupo control pero no frente al grupo Pre. También el grupo Pre muestra en éste parámetro una tendencia a un aumento con respecto el grupo CC ($p < 0.07$).

Tabla 8. Marcadores de formación y resorción ósea en suero y orina de 12h de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).

	Grupo CC (n = 10)	Grupo Ca (n = 10)	Grupo Pre (n = 10)
Marcadores de Formación			
Osteocalcina (mg/mol creatinina)	7489 ± 759.4	11133 ± 1008 ^{CC}	9763 ± 869.6
Fosfatasa Alcalina (U/mmol creatinina)	3874 ± 726.3	5045 ± 639.8	3242 ± 380.3
Marcadores de Resorción			
PTH (mg/mol creatinina)	1030 ± 113.0	880.5 ± 120.3	828.0 ± 90.74
DPD (μmol/mol creatinina)	166.3 ± 13.03	219.4 ± 26.59	187.5 ± 20.22
PYD (μmol/mol creatinina)	214.4 ± 11.46	242.4 ± 26.30	213.1 ± 19.87

Los valores están expresados como la media ± E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS); Osteocalcina, Fosfatasa alcalina y la PTH (Hormona Paratiroidea) se midieron en suero. DPD (Deoxipiridinolina) y PYD (Piridinolina) se midieron en orina de 12h-acidificada.

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

4.2.4. ANÁLISIS DEL pH DEL CONTENIDO CECAL.

El pH del contenido cecal procedente de las madres del grupo Pre (8.083 ± 0.208) es significativamente inferior al de los grupos CC (8.872 ± 0.080 ; $p < 0.01$) y Ca (8.558 ± 0.127 ; $p < 0.05$).

4.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS MADRES

El esqueleto materno juega un papel fundamental en el desarrollo del hueso de la descendencia. Durante el desarrollo fetal, el esqueleto materno provee del calcio requerido por el feto, principalmente durante el tercer trimestre de gestación. Más tarde, en el parto y durante la lactancia, provee del calcio necesario para la producción de la leche. Por esto, los depósitos maternos de Ca menguan conforme avanza la edad gestacional, ya que el feto acumula de 25 a 30g de Ca durante éste periodo, y posteriormente, durante la lactancia, cuando se transfieren unos 210mg de Ca por día para la producción de la leche materna^(151; 216; 217).

En este estudio, el esqueleto de las ratas madres alimentadas con una dieta no deficiente suplementada con inulina enriquecida con FOS presenta una mayor protección frente a la pérdida de hueso u osteopenia transitoria que se produce durante la gestación y la lactancia. Sin embargo, la fortificación con Ca de la dieta materna que no es deficiente nutricionalmente durante estos mismos periodos no produce ningún efecto protector en el esqueleto de las madres.

El Ca es un nutriente esencial durante la gestación y la lactancia. Es interesante subrayar que se considera que la mayoría de la población, y en especial las mujeres gestantes o lactantes, no consumen la cantidad de Ca recomendada, de 1000 a 1200mg Ca por día, por lo que la suplementación con éste mineral está altamente recomendada durante estos periodos. De hecho, la suplementación con Ca ha mostrado tener efectos beneficiosos tanto sobre el esqueleto materno como sobre el del feto. Además se la ha relacionado con otros efectos positivos, como la reducción del riesgo materno a tener hipertensión inducida por el embarazo, preeclampsia y otras complicaciones⁽²¹⁸⁾. Por otro lado hay que tener en cuenta que

la mayoría de los estudios epidemiológicos han sido realizados en poblaciones que presenta una deficiencia en Ca, por lo que, como antes mencionaba, una suplementación con éste mineral puede ejercer un efecto positivo sobre la salud ósea^(216; 219). Sin embargo, no todos los estudios realizados en humanos han mostrado un efecto positivo de la suplementación con Ca durante la gestación y la lactancia sobre la conservación y/o protección de la salud ósea materna, incluso en poblaciones altamente deficientes con consumos muy bajos, menores a los 280 mg/día⁽²²⁰⁾. Así, en un estudio reciente, Jarjou *et al.*⁽¹⁶⁸⁾ muestran como una suplementación con Ca en mujeres embarazadas con una baja ingesta de este mineral produce una disminución en el CMO durante la lactación.

Conforme a estos resultados, en nuestro estudio, las madres pertenecientes al grupo Ca muestran las menores CMO y DMO cuando se comparan con los grupos CC y Pre. Además, es este grupo el que muestra el mayor deterioro en la arquitectura trabecular, lo que hace pensar que es el que mayor descalcificación sufre durante los periodos estudiados, gestación y lactación. Esto es, según nuestros datos, en condiciones no deficientes, una fortificación de la dieta materna con Ca durante la gestación y la lactación no produce ninguna protección en la salud ósea de la madre. Al igual que en nuestro estudio, Shackelford *et al.*⁽²²¹⁾ en un estudio con ratas preñadas alimentadas con una dieta no deficiente, observó la interacción negativa entre la fortificación de la dieta con Ca durante la gestación y los niveles de otros minerales esenciales como el Fe, Zn, Mg y P (hierro, zinc, magnesio y fósforo) en diferentes tejidos. Estos resultados sugieren que una suplementación “mono-mineral” con Ca durante la gestación y la lactancia puede no ser suficiente, ya que podría generar una disfunción en el metabolismo de otros minerales esenciales que son importantes tanto para la salud materna como para el desarrollo de la cría. De hecho, algunos investigadores han sugerido que no sólo debe ser el Ca el que promueve la salud ósea, sino que puede deberse a un efecto sinérgico de todos los nutrientes que se encuentran en los alimentos ricos en Ca.^(222; 223)

Por otro lado, en nuestro estudio, la administración de inulina enriquecida en fructooligosacáridos genera un mayor efecto protector en los huesos de las madres frente a la osteopenia transitoria asociada a la gestación y la lactación. A pesar de no ser significativamente diferentes, todos los huesos analizados de las madres pertenecientes al grupo Pre tienen unos valores, en términos absolutos, de DMO y CMO mayores que los huesos

de las madres control. Hay que tener en cuenta que el análisis de densitometría ósea no diferencia entre hueso cortical y hueso trabecular, por lo que las diferencias existentes pueden encontrarse enmascaradas al estar el hueso cortical menos afectado por la desmineralización que el hueso trabecular. De hecho, en estudios con madres lactantes es el hueso trabecular el que se ve más afectado durante la lactancia, mostrando una caída en la CMO trabecular de las mujeres de entre el 3 y el 10% tras un periodo de 2 a 6 meses de haber dado pecho⁽²²⁴⁾. De igual modo, Zeni *et al.*⁽²²⁵⁾ encontraron que la contribución del esqueleto de la rata durante el periodo de lactación era mayor en las áreas con mayor contenido trabecular. En este estudio, la tibia proximal de las ratas madres al destete era la zona y el hueso más afectados por la desmineralización producida durante la lactación, llegando a tener una disminución de la DMO del 20% al compararlas con la misma zona de ratas no-preñadas usadas como control. Sin embargo no encontraron pérdidas significativas en las áreas donde predomina el hueso cortical, como son las zonas distal y media de la tibia.

En este sentido, nuestros resultados muestran que es a nivel micro-estructural y en el hueso esponjoso, principalmente de la tibia (tabla 6, figura 16), donde se alcanzan las mayores diferencias. Así, el grupo Pre presenta significativamente más anchura trabecular (Tb.Th), mayor ratio BV/TV y mayor densidad conectiva (Conn.D) y a su vez una disminución, también significativa, en el ratio BS/BV al compararlo con el grupo CC. Todo esto indica que las ratas madres pertenecientes al grupo Pre presenta una mayor protección ya que las trabéculas se encuentran menos descalcificadas. Asimismo, el hueso trabecular en este grupo presenta menor espacio trabecular (Tb.Sp), mayor número de trabéculas (Tb.N) y significativamente mayor densidad conectiva (Conn.D) que el grupo Ca, lo que le confiere al grupo Pre una mayor resistencia y dureza ósea. De hecho, la resistencia de un hueso no sólo depende de la cantidad de tejido óseo, que viene evaluada por la DMO medida por densitometría, sino que también depende de la calidad del mismo, la cual es caracterizada por la organización tridimensional de las trabéculas, es decir, por la micro-estructura⁽²²⁶⁾.

En resumen, la suplementación de la dieta materna con inulina enriquecida con fructooligosacáridos durante los periodos de gestación y lactación consigue proteger al hueso materno contra la pérdida producida por la respuesta del esqueleto ante la demanda de Ca generada por el feto para su desarrollo.

Esta protección del hueso materno puede llevarnos a suponer un efecto beneficioso más allá del producido directamente durante los periodos mencionados. Así, son diversos, y con resultados contradictorios, los estudios epidemiológicos que evalúan la relación entre la pérdida ósea durante estos periodos, principalmente durante la lactación, y la osteoporosis que se produce tras la menopausia. Mientras que algunos estudios muestran un efecto beneficioso de la lactación sobre la DMO materna, otros muestran un impacto negativo⁽²²⁷⁻²²⁹⁾. Incluso se ha llegado a sugerir que la recuperación en la DMO materna tras la lactación no consigue alcanzar los niveles de DMO existentes antes del embarazo⁽²¹⁶⁾, por lo que es posible suponer que una prevención de la pérdida de hueso asociada a la lactancia puede suponer un efecto positivo sobre el esqueleto materno, ayudando a retrasar e incluso a disminuir el riesgo de padecer osteoporosis en el futuro. Además, tenemos que tener en cuenta que cada vez se están teniendo embarazos a edades más tardías, lo que aproxima el fin de la recuperación ósea tras el periodo de lactancia al periodo peri-menopáusico, dejando al esqueleto materno en una situación de debilidad, al no encontrarse totalmente recuperado para enfrentarse a la pérdida debida a la menopausia. Por lo tanto, una menor pérdida de hueso durante la gestación y la lactancia podría significar una mayor protección contra la osteoporosis asociada a la menopausia.

Por otro lado, nuestros resultados muestran una disminución significativa en el pH del contenido cecal de aquellas madres alimentadas con la dieta suplementada con el prebiótico, inulina enriquecida con FOS, comparado con el pH de los otros dos grupos experimentales. Uno de los posibles mecanismos de acción a través de los cuales los prebióticos pueden ejercer un efecto protector sobre el esqueleto materno es a través de la producción de los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, Short Chain Fatty Acids,). Los AGCC, principalmente compuestos por los ácidos butírico, propiónico y acético, son generados por la fermentación bacteriana en el lumen intestinal. Estos AGCCs han demostrado tener influencia sobre la salud ósea a través de diferentes mecanismos. Uno de estos mecanismos es explicado por la generación de una disminución en el pH del ciego, lo que favorece la disolución de las sales insolubles de Ca y Mg acelerando su difusión pasiva y su absorción junto con la de los propios AGCC^(147; 230-232), tal y como ocurre en nuestro grupo Pre.

En cuanto a los marcadores bioquímicos de remodelado óseo, en términos generales, es el grupo Ca el que muestra una mayor actividad, tanto en los marcadores de formación como en los de resorción, lo que podría justificar la mayor pérdida ósea que presenta éste grupo frente a los otros dos grupos de estudio y que se refleja en menores valores de DMO y CMO para todos los huesos estudiados, así como una menor calidad de la estructura trabecular, según se puede extraer de los parámetros de micro-CT. Estos resultados están de acuerdo con el estudio de López *et al.*⁽²³³⁾ en el que las mujeres lactantes cuya ingesta de Ca diaria estaba por encima o era igual a la ingesta recomendada (≥ 1200 mg de Ca/día) mostraban un incremento en el *turnover* óseo y una pérdida temporal de hueso. Por otro lado, son diversos los estudios que relacionan un mayor *turnover* óseo como predictivo del porcentaje de pérdida ósea en mujeres posmenopáusicas^(234; 235) e incluso relacionándolo con un incremento en el riesgo de sufrir un rotura vertebral y no vertebral, normalmente de cadera, en esta misma población^(236; 237), lo que nos lleva a pensar que el grupo Ca no proporcionaría una protección ósea en mujeres cuya gestación y lactancia se diera cercana a la edad premenopáusica. Sin embargo, el grupo Pre presenta una mayor concentración de osteocalcina y menor de PTH que el grupo CC, lo que hace suponer un remodelado óseo más favorable hacia la formación, que coincide con los mejores parámetros trabeculares que presenta este grupo.

4.4. EFECTO DE LA DIETA MATERNA EN LA SALUDO ÓSEA Y EN LOS BIOMARCADORES DE LA DESCENDENCIA.

4.4.1. RESULTADOS EN LA DESCENDENCIA AL NACIMIENTO.

Al nacimiento no se realizó el análisis de densitometría ósea ya que el grado de mineralización del hueso de las ratas recién nacidas no es suficiente y, por lo tanto, se encuentra por debajo de los límites de detección del densitómetro. Sin embargo, tanto el fémur como la vértebra pudieron ser escaneados con el escáner de micro-CT para determinar los parámetros trabeculares, debido a la mayor sensibilidad de ésta técnica con respecto al DEXA.

Con respecto a la micro estructura, las crías de las madres del grupo CC muestran una mayor longitud en el fémur comparado con las del grupo Ca ($p < 0.01$) y el grupo Pre ($p < 0.07$). La anchura trabecular (Tb.Th) también es mayor en éste grupo con respecto a los otros dos ($p < 0.01$ vs grupo Ca; $p < 0.05$ vs grupo Pre). Por otro lado, las crías del grupo Ca presenta un número de trabéculas (Tb.N) ($p < 0.001$) y el ratio BS/BV ($p < 0.05$) mayor que el de las crías pertenecientes a los grupos CC y Pre (tabla 9; figuras 26 y 27).

En cuanto a los parámetros trabeculares de la vértebra no se observan diferencias significativas excepto para la anchura trabecular (Tb.Th) en la que las crías del grupo control destacan por su mayor Tb.Th ($p < 0.05$) frente a las de los otros dos grupos experimentales. A pesar de no haber diferencias significativas, hay que destacar el incremento positivo en el número de trabéculas (Tb.N) tanto en las crías del grupo Ca como en las pertenecientes al grupo Pre con respecto a las del grupo CC (+13% para el grupo Ca y +10% para el grupo Pre).

Tabla 9. Arquitectura trabecular de los huesos de las crías al nacimiento.

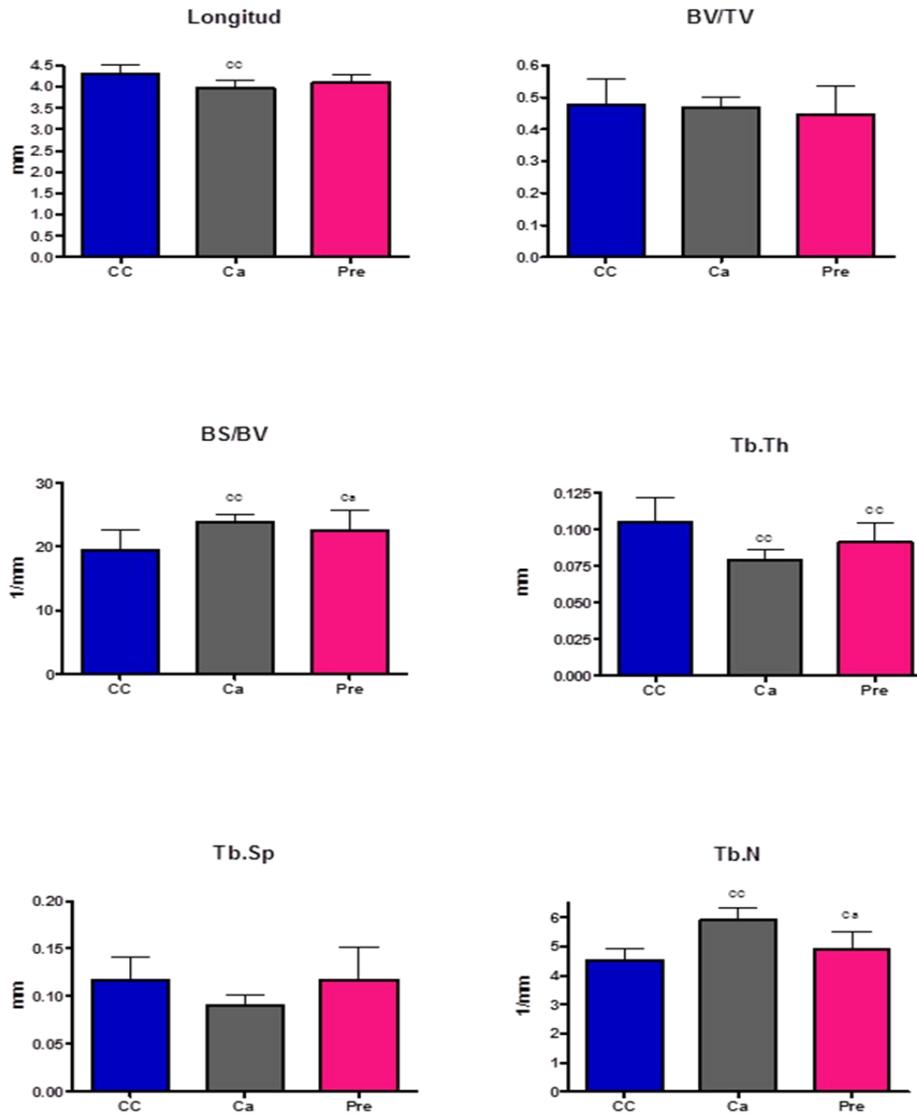
	Grupo CC (n = 8)	Grupo Ca (n = 8)	Grupo Pre (n = 8)
Fémur			
Longitud (mm)	4.283 ± 0.076	3.971 ± 0.058 ^{CC}	4.099 ± 0.069
BV/TV	0.476 ± 0.030	0.468 ± 0.012	0.445 ± 0.033
BS/BV (1/mm)	19.47 ± 1.09	23.90 ± 1.23 ^{CC}	22.41 ± 1.151 ^{Ca}
Tb. Th (mm)	0.105 ± 0.006	0.079 ± 0.003 ^{CC}	0.091 ± 0.005 ^{CC}
Tb. Sp (mm)	0.117 ± 0.009	0.091 ± 0.004	0.118 ± 0.012
Tb. N (1/mm)	4.53 ± 0.13	5.89 ± 0.15 ^{CC}	4.87 ± 0.22 ^{Ca}
Vértebra (LV4)			
Longitud (mm)	0.739 ± 0.016	0.756 ± 0.020	0.693 ± 0.023
BV/TV	0.742 ± 0.029	0.671 ± 0.038	0.676 ± 0.034
BS/BV (1/mm)	17.39 ± 1.55	18.81 ± 0.71	21.12 ± 1.38
Tb. Th (mm)	0.122 ± 0.012	0.093 ± 0.003 ^{CC}	0.098 ± 0.006 ^{CC}
Tb. Sp (mm)	0.041 ± 0.005	0.040 ± 0.004	0.047 ± 0.005
Tb. N (1/mm)	6.35 ± 0.46	7.20 ± 0.37	6.97 ± 0.27

Los valores están expresados como la media ± E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS); BV/TV, ratio volumen de hueso/Volumen total; BS/BV, ratio Superficie de hueso/volumen de hueso; Tb.Th, Anchura trabecular; Tb.Sp, Separación Trabecular; Tb.N, número de trabeculas; Conn.D, Densidad del tejido conectivo, LV4, vértebra lumbar 4.

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

Figura 30. Arquitectura trabecular del fémur de las crías al nacimiento.

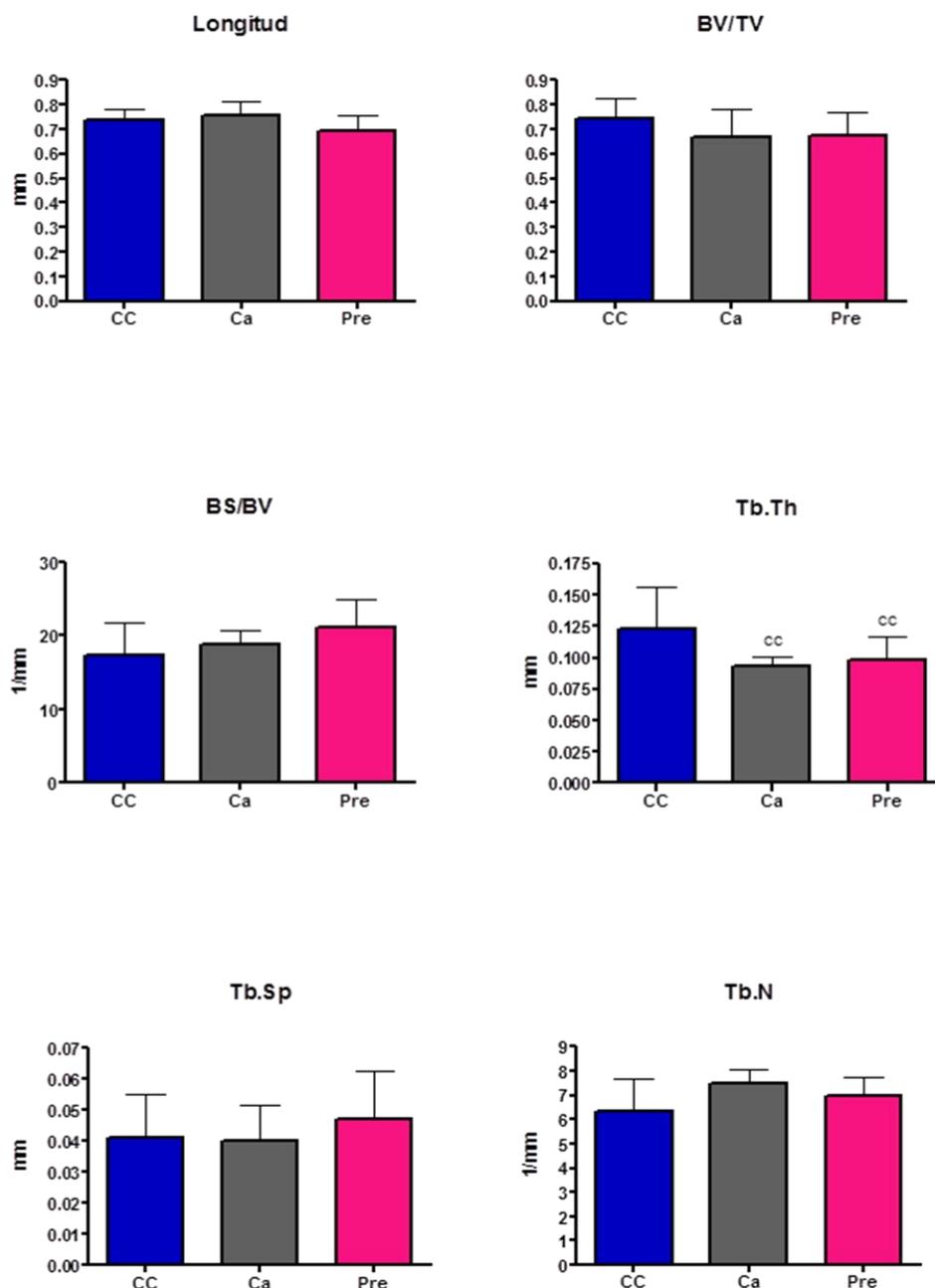


Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS); BV/TV, ratio volumen de hueso/Volumen total; BS/BV, ratio Superficie de hueso/volumen de hueso; Tb.Th, Anchura trabecular; Tb.Sp, Separación Trabecular; Tb.N, número de trabéculas.

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

Figura 31. Arquitectura trabecular de la vértebra de las crías al nacimiento.



Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS). BV/TV, ratio volumen de hueso/Volumen total; BS/BV, ratio Superficie de hueso/volumen de hueso; Tb.Th, Anchura trabecular; Tb.Sp, Separación Trabecular; Tb.N, número de trabéculas.

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

4.4.2. RESULTADOS EN LA DESCENDENCIA AL DESTETE.

En éste periodo la densitometría se realizó en el cuerpo completo de la cría y no en los huesos aislados. Los análisis de DMO y CMO no muestran diferencias significativas entre los grupos de estudio.

Sin embargo, en términos generales, la intervención nutricional temprana en la madre induce una mejora en la arquitectura trabecular de la vértebra de la descendencia. Así, aun no alcanzando significación estadística, la separación trabecular en los grupos Ca y Pre muestra un descenso de -35% y del -30% respectivamente frente al grupo CC. De la misma manera, se observa un pequeño aumento en ambos grupos al compararlos con el control en el ratio BV/TV del 7% y el 5% respectivamente y en la anchura trabecular del 11% para el grupo Ca y del 7% para el grupo Pre. Por otro lado el grupo Ca muestra un descenso significativo ($p < 0.05$) tanto en la longitud de la vértebra como en el ratio BS/BV al compararlo con los otros dos grupos de estudio (tabla 10; figuras 29 y 30).

Tabla 10. Arquitectura trabecular de los huesos de las crías al destete.

	Grupo CC (n = 8)	Grupo Ca (n = 8)	Grupo Pre (n = 8)
Fémur			
Longitud (mm)	19.44 ± 0.09	18.45 ± 0.28 ^{CC}	18.81 ± 0.24
BV/TV	0.717 ± 0.033	0.657 ± 0.043	0.704 ± 0.008
BS/BV (1/mm)	6.548 ± 0.506	7.812 ± 0.929	7.467 ± 0.239
Tb. Th (mm)	0.312 ± 0.023	0.295 ± 0.020	0.269 ± 0.009
Tb. Sp (mm)	0.122 ± 0.012	0.154 ± 0.021	0.126 ± 0.011
Tb. N (1/mm)	2.318 ± 0.098	2.235 ± 0.071	2.539 ± 0.064 ^{Ca}
Vértebra (LV4)			
Longitud (mm)	3.260 ± 0.098	2.737 ± 0.118 ^{CC}	3.191 ± 0.048 ^{Ca}
BV/TV	0.714 ± 0.038	0.764 ± 0.035	0.747 ± 0.038
BS/BV (1/mm)	8.068 ± 1.053	5.778 ± 0.267 ^{CC}	8.418 ± 0.584 ^{Ca}
Tb. Th (mm)	0.227 ± 0.042	0.252 ± 0.030	0.242 ± 0.016
Tb. Sp (mm)	0.112 ± 0.013	0.073 ± 0.006	0.081 ± 0.011
Tb. N (1/mm)	3.051 ± 0.288	3.150 ± 0.246	3.027 ± 0.052

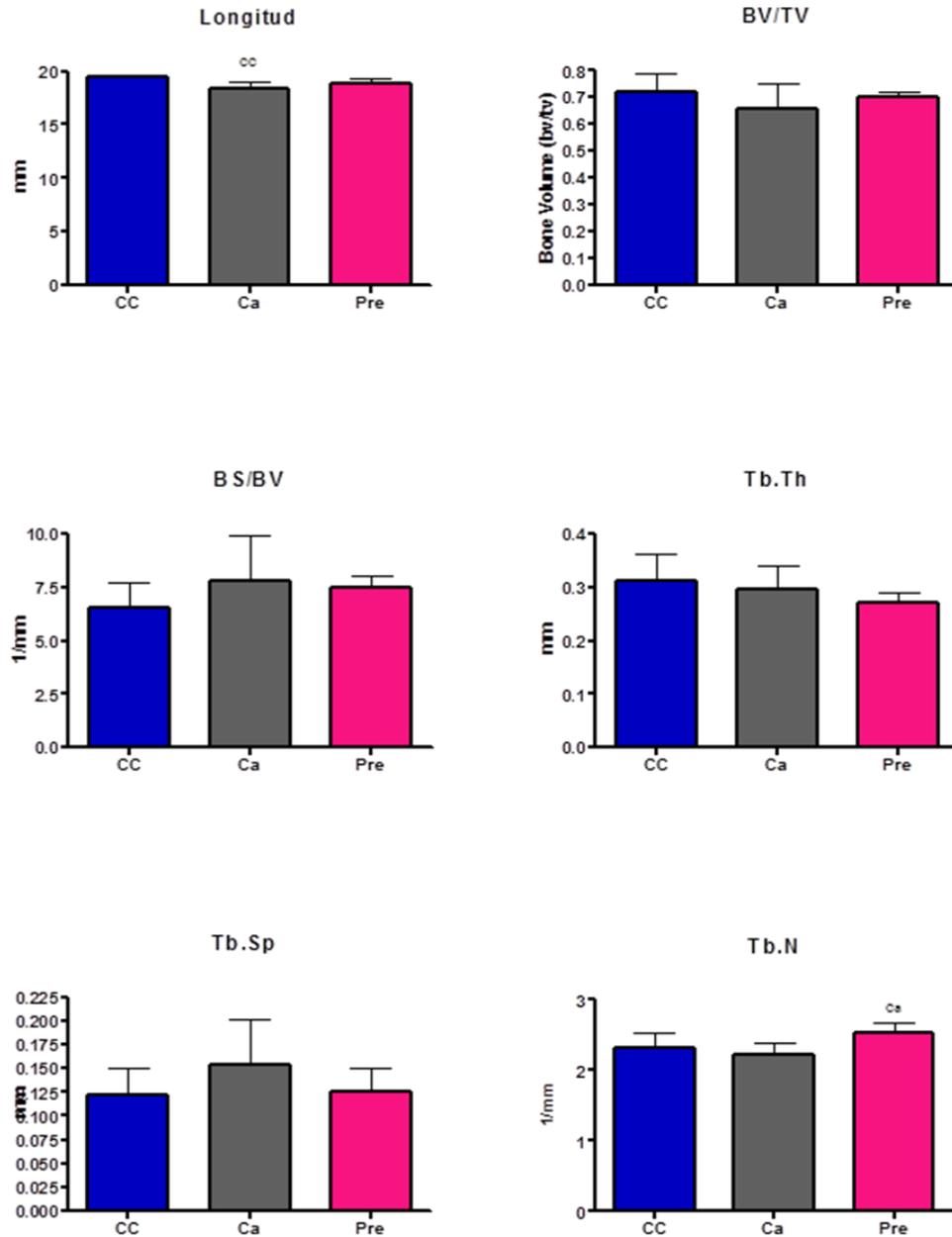
Los valores están expresados como la media ± E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS); BV/TV, ratio volumen de hueso/Volumen total; BS/BV, ratio Superficie de hueso/volumen de hueso; Tb.Th, Anchura trabecular; Tb.Sp, Separación Trabecular; Tb.N, número de trabeculas; Conn.D, Densidad del tejido conectivo, LV4, vértebra lumbar 4.

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

Figura 32. Arquitectura trabecular del fémur de las crías al destete.

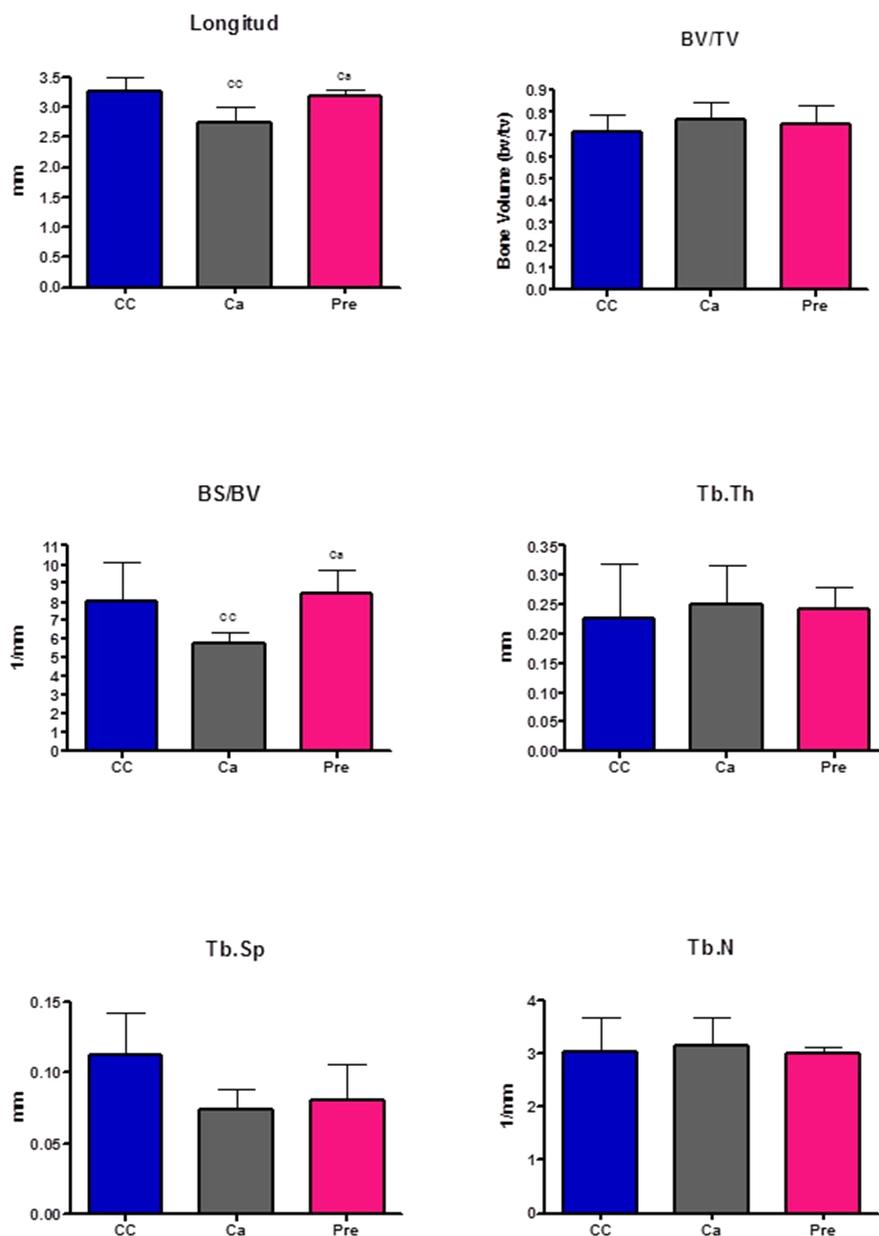
Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.



Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS). BV/TV, ratio volumen de hueso/Volumen total; BS/BV, ratio Superficie de hueso/volumen de hueso; Tb.Th, Anchura trabecular; Tb.Sp, Separación Trabecular; Tb.N, número de trabéculas.

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

Figura 33. Arquitectura trabecular de la vértebra de las crías al destete.



Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS); BV/TV, ratio volumen de hueso/Volumen total; BS/BV, ratio Superficie de hueso/volumen de hueso; Tb.Th, Anchura trabecular; Tb.Sp, Separación Trabecular; Tb.N, número de trabéculas.

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

4.4.3. RESULTADOS EN LA DESCENDENCIA AL FINAL DE LA ADOLESCENCIA.

Al final de la adolescencia, el análisis de densitometría ósea de los huesos apendiculares, el fémur y la tibia, no muestra diferencias entre los distintos grupos de alimentación. En contraste, la vértebra lumbar de las crías cuyas madres fueron alimentadas con la dieta suplementada con el prebiótico, grupo Pre, muestra una DMO significativamente diferente de la DMO de las crías pertenecientes a los grupos control ($p < 0.05$) y Ca ($p < 0.001$) (tabla 11, figura 31). Aunque no de una manera significativa, también la CMO se ve influenciada por la intervención nutricional en la madre, siendo +7% mayor en el grupo Pre frente al grupo CC y +16% frente al grupo Ca. También hay que destacar el incremento del 8% encontrado en la DMO del grupo Ca frente al grupo CC, que alcanza significación con un $p = 0.07$.

Tabla 11. Análisis densitométrico (pDEXA) del contenido mineral óseo (CMO) y de la densidad mineral ósea (DMO de los huesos de las crías al final de la adolescencia.

Los valores están expresados como la media ± E.E.M.

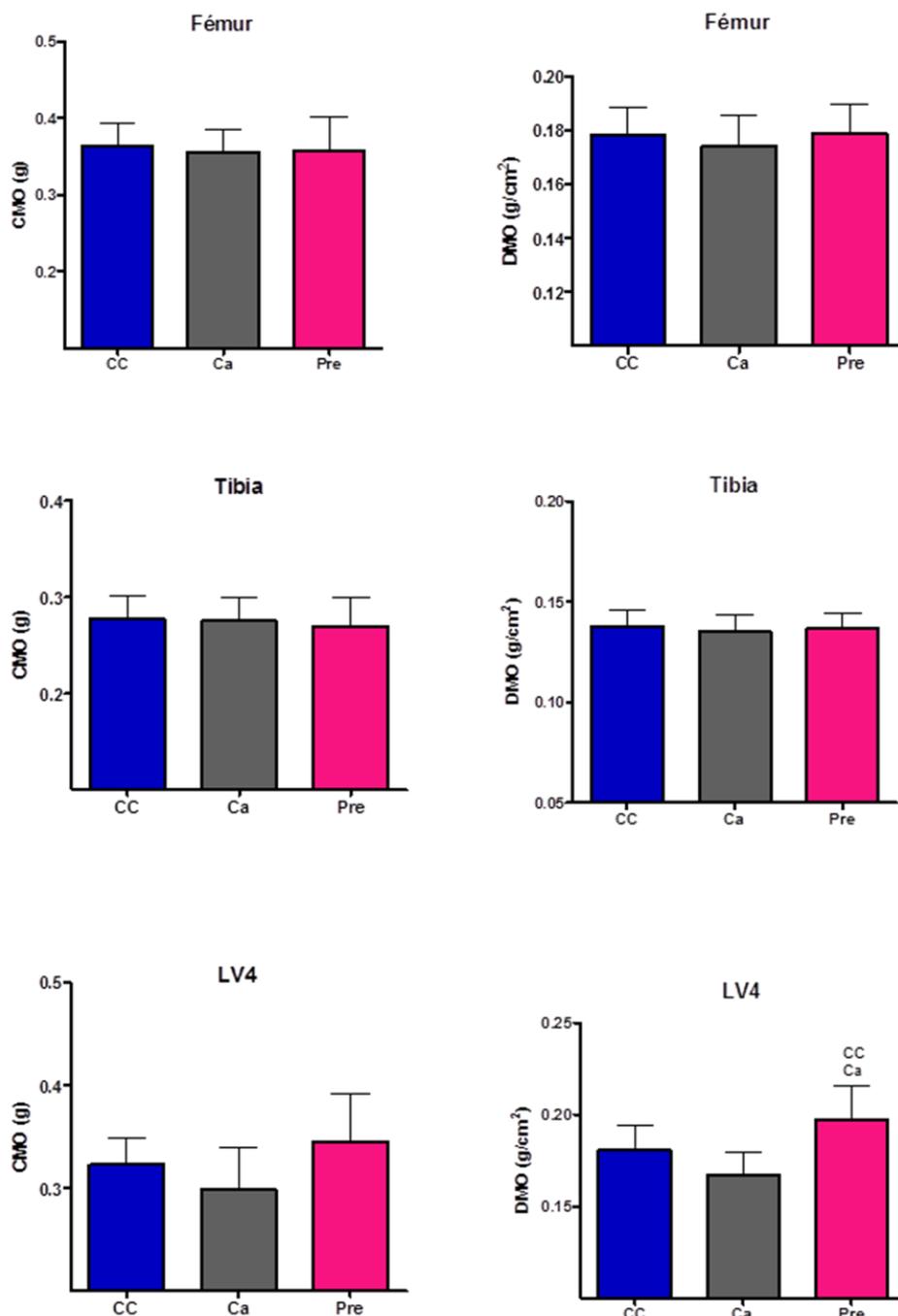
	Grupo CC (n = 8)	Grupo Ca (n = 8)	Grupo Pre (n = 8)
Fémur			
CMO (g)	0.3643 ± 0.0090	0.3557 ± 0.0095	0.3580 ± 0.0164
DMO (g/cm ²)	0.1782 ± 0.0033	0.1741 ± 0.0036	0.1787 ± 0.0042
Tibia			
CMO (g)	0.2770 ± 0.0079	0.2752 ± 0.0080	0.2697 ± 0.0106
DMO (g/cm ²)	0.1376 ± 0.0026	0.1353 ± 0.0025	0.1368 ± 0.0027
LV4-5			
CMO (g)	0.3228 ± 0.0093	0.2982 ± 0.0144	0.3457 ± 0.0175
DMO (g/cm ²)	0.1807 ± 0.0047	0.1670 ± 0.0043	0.1974 ± 0.0069 ^{CC Ca}

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS).

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

Figura 34. Resultados de la densitometría ósea (pDEXA): densidad mineral ósea (DMO) y de la contenido mineral óseo (CMO) de las crías al final de la adolescencia.

Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.



Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS). Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

Puesto que las mayores diferencias en la DMO y la CMO se encontraron en la vértebra lumbar, el análisis de la micro-estructura se realizó tan sólo en éste hueso.

La intervención nutricional en la madre durante la gestación y la lactación tanto con la dieta fortificada en calcio como con la dieta suplementada con la inulina enriquecida en FOS producen un efecto positivo en la arquitectura de las trabéculas en la vértebra de las crías al final de la adolescencia.

De esta manera, el ratio BV/TV se ve incrementado un 22% en el grupo Ca ($p<0.01$) y un 11% en el grupo Pre comparado con el grupo CC. Resultados similares se observan en la anchura trabecular, con un incremento del 17% en el grupo Ca ($p<0.01$) y del 13% en el grupo Pre ($p<0.05$) y en el ratio BS/BV, con una disminución del -17% ($p<0.01$) y del -10% ($p<0.05$) respectivamente frente al valor obtenido por el grupo CC. Además el grupo Ca muestra una disminución, aunque no significativa, en la separación trabecular frente al grupo CC (Tabla 12, figura 32)

Tabla 12. Arquitectura trabecular y cortical de la vértebra lumbar 4 (LV4) de las crías al final de la adolescencia.

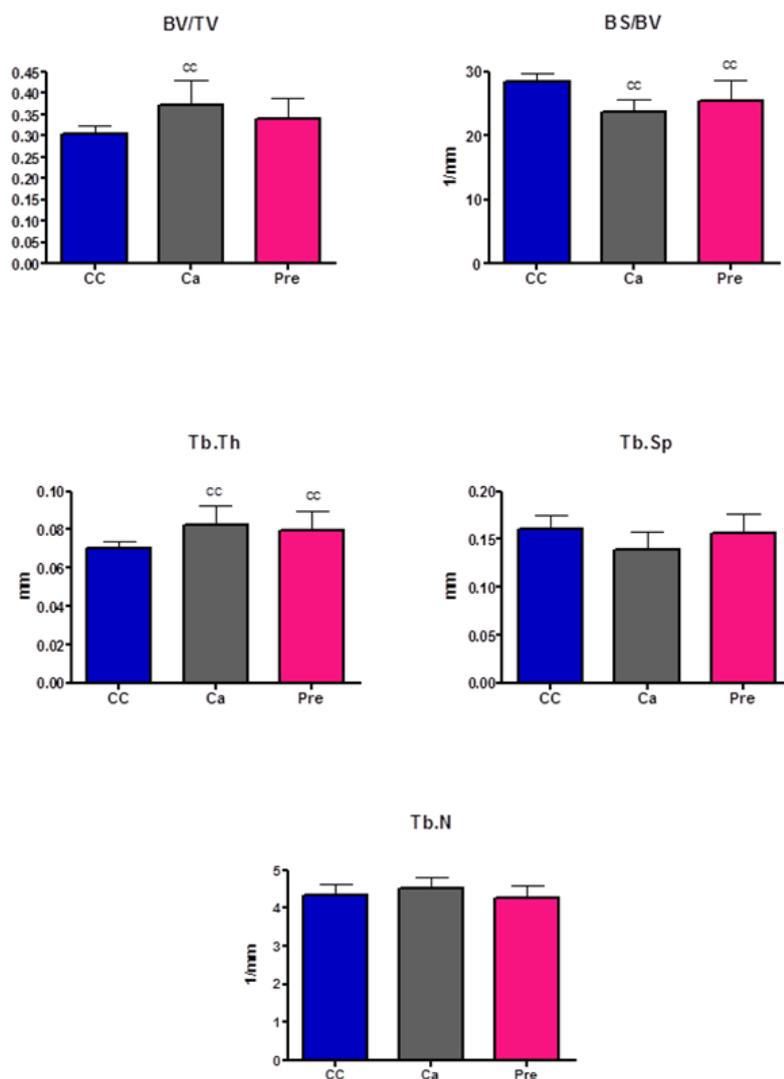
Los valores están expresados como la media ± E.E.M.

	Grupo CC (n = 8)	Grupo Ca (n = 8)	Grupo Pre (n = 8)
Parámetros Trabeculares			
BV/TV	0.306 ± 0.007	0.373 ± 0.021 ^{CC}	0.340 ± 0.017
BS/BV (1/mm)	28.370 ± 0.460	23.640 ± 0.723 ^{CC}	25.440 ± 1.160 ^{CC}
Tb. Th (mm)	0.071 ± 0.001	0.082 ± 0.004 ^{CC}	0.080 ± 0.003 ^{CC}
Tb. Sp (mm)	0.161 ± 0.005	0.139 ± 0.007	0.156 ± 0.007
Tb. N (1/mm)	4.331 ± 0.103	4.524 ± 0.095	4.257 ± 0.115
Parámetros Corticales			
C.BMD (mgHA/cm ³)	385.40 ± 12.07	450.90 ± 14.95 ^{CC}	435.20 ± 18.31 ^{CC}
pMOI(mm ⁴)	6.619 ± 0.352	7.026 ± 0.494	6.892 ± 0.355
C.Th (mm)	0.1674 ± 0.0045	0.1773 ± 0.0051	0.1836 ± 0.0058
C.Sp (%)	0.2743 ± 0.0086	0.2391 ± 0.0071 ^{CC}	0.2578 ± 0.0106

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS); BV/TV, ratio volumen de hueso/Volumen total; BS/BV, ratio Superficie de hueso/Volumen de hueso; Tb.Th, Anchura Trabecular; Tb.Sp, Separación Trabecular; Tb.N, número de trabeculas; C.BMD, DMO Cortical, pMOI, Momento polar de Inercia, C.Th, Anchura Cortical, C.Sp, Porosidad Cortical.

Las diferencias estadísticas se han definido como p<0.05. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

Figura 35. Arquitectura trabecular de la vértebra de las crías al final de la adolescencia.

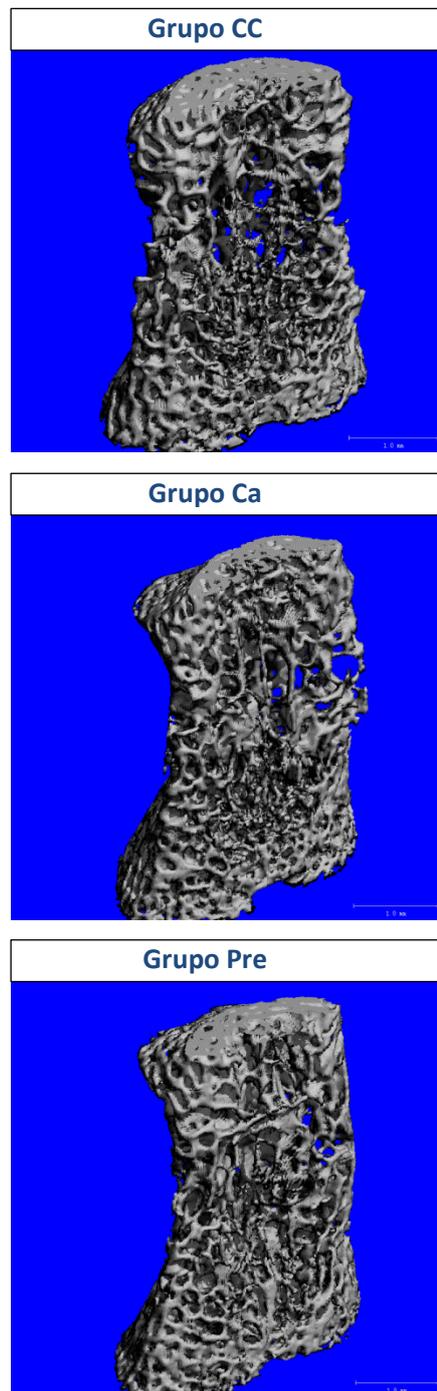


Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS); BV/TV, ratio volumen de hueso/Volumen total; BS/BV, ratio Superficie de hueso/volumen de hueso; Tb.Th, Anchura trabecular; Tb.Sp, Separación Trabecular; Tb.N, número de trabéculas.

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

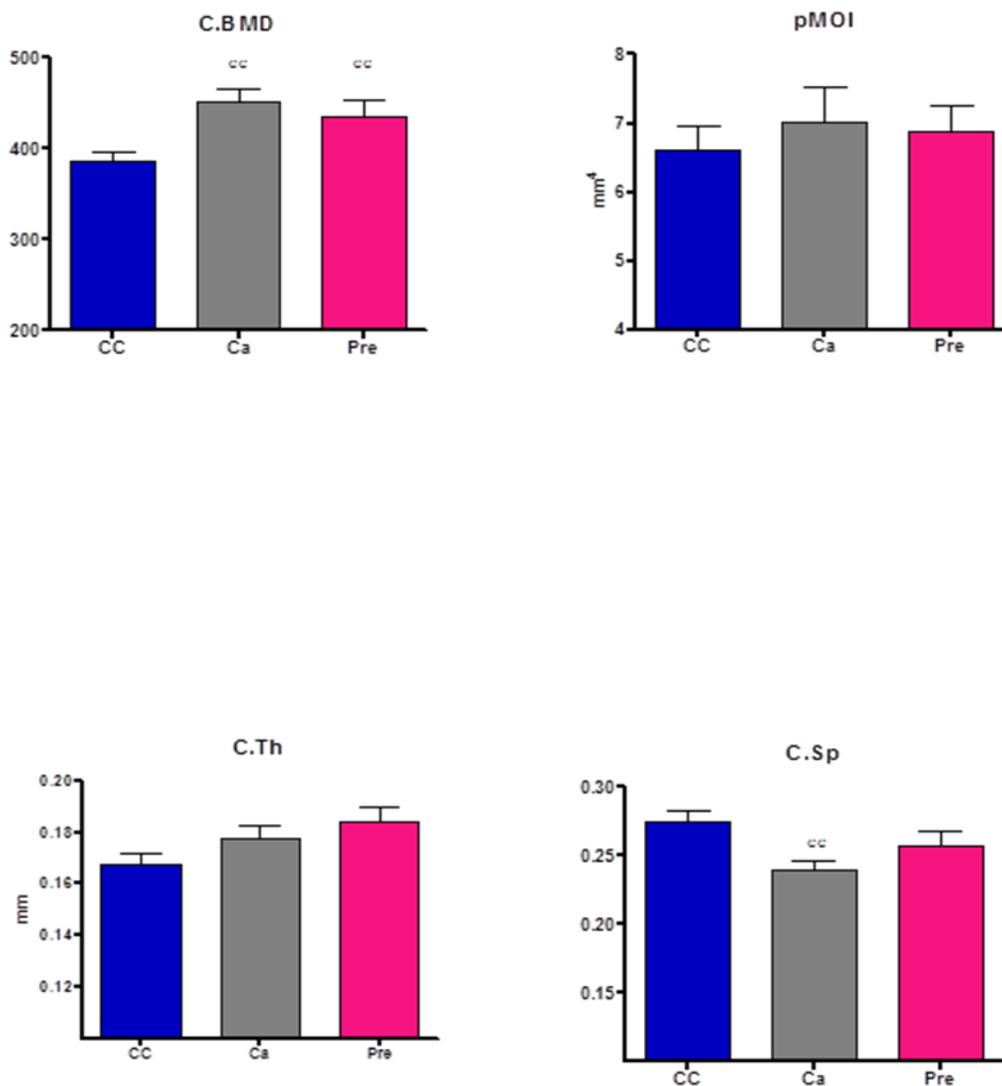
Figura 36. Imágenes tridimensionales del hueso trabecular de la vértebra LV4 las crías al final de la adolescencia



*Las Imágenes se han elegido como representativas de su grupo.
 Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS).*

El análisis cortical de la vértebra muestra de la misma manera el efecto positivo de la intervención temprana en la nutrición materna (tabla 12, Figura 33). El grupo cuyas madres tuvieron una alimentación suplementada con prebiótico presenta un incremento en la densidad mineral del hueso cortical (C.BMD) de un +13% ($p<0.05$) y de un +9% en la anchura de la pared cortical (C.Th) junto con una reducción en la porosidad (C.Sp) del 6% frente al grupo CC. Por otro lado, el enriquecimiento de la dieta materna en calcio produce un incremento significativo de un 17% en la C.BMD ($p<0.01$) y un descenso, también significativo, en la porosidad cortical del 13% ($p<0.01$). Este grupo presenta un aumento en la anchura del hueso cortical del 6%, aunque no es estadísticamente significativo.

Figura 37. Arquitectura del hueso cortical de la vértebra de las crías al final de la adolescencia.



Los valores están expresados como la media \pm E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS). C.BMD DMO Cortical, pMOI, Momento polar de Inercia, C.Th, Anchura Cortical, C.Sp, Porosidad Cortical.

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca

Al final de la adolescencia, los animales pertenecientes al grupo Ca presentan una mayor concentración de ALP comparados con los otros dos grupos de estudio. Es interesante destacar que, y a pesar de no haber diferencias estadísticas, los animales pertenecientes a los grupos Ca y Pre muestran unos niveles séricos más elevados en los marcadores de formación ósea, tales como la osteocalcina y, a su vez, unos niveles menores en los marcadores asociados a la resorción ósea, como la PTH, si se comparan en términos absolutos con los valores del grupo CC (tabla 13).

Tabla 13. Marcadores de formación y resorción ósea en suero y orina de 12h de las crías al final de la adolescencia.

	Grupo CC (n = 8)	Grupo Ca (n = 8)	Grupo Pre (n = 8)
Marcadores de Formación			
Osteocalcina (mg/mol creatinina)	8404 ± 398	9698 ± 593	9323 ± 815
Fosfatasa Alcalina (U/mmol creatinina)	1475 ± 139	1962 ± 136 ^{CC}	1311 ± 139 ^{Ca}
Marcadores de Resorción			
DPD (µmol/mol creatinina)	198.8 ± 16.5	210.2 ± 28.7	242.0 ± 19.8
PTH (µg/mol creatinina)	1313 ± 200	1019 ± 131	1107 ± 109

Los valores están expresados como la media ± E.E.M.

Grupo CC, Grupo control; Grupo Ca, Grupo fortificado con calcio; Grupo Pre, Grupo suplementado con prebiótico (Inulina enriquecida con FOS); la Osteocalcina, la Fosfatasa Alcalina y la PTH (Hormona Paratiroidea) se midieron en suero. DPD (Deoxipiridinolina) se midió en orina de 12h-acidificada.

Las diferencias estadísticas se han definido como $p < 0.05$. (CC) significativamente diferente vs el grupo control, (Ca) significativamente diferente vs el grupo Ca.

4.5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS CRIAS.

Al igual que los resultados obtenidos en las madres, los resultados en la descendencia muestran un efecto de la intervención nutricional ejercida en la madre durante la gestación y la lactancia sobre la adquisición de hueso de las crías.

Al nacimiento, las crías del grupo Ca reflejan en sus huesos los mismos efectos que el enriquecimiento de la dieta produjo en sus madres. En esta edad, los parámetros trabeculares indican que las crías del grupo Ca tienen una menor mineralización que la del grupo CC. Así, las crías del grupo Ca presentan una menor anchura trabecular tanto en el fémur como en la vértebra, y un mayor ratio BS/BV en el fémur que nos indica una menor acreción ósea durante el desarrollo fetal. Estos resultados pueden apoyar la idea de que una suplementación monomineral con Ca, cuando no existen deficiencias en la dieta de las madres, puede generar un efecto negativo en la mineralización del esqueleto del feto, seguramente debido una alteración en la absorción y metabolismo de otros minerales esenciales como el Mg, P o el Fe. Así, nuestros datos concuerdan con los de estudios previos en los que se muestran que una ingesta alta de calcio durante la gestación podría afectar negativamente al desarrollo del feto. En el estudio de Schakelford *et al.*⁽²²¹⁾ mencionado anteriormente, los autores observan una interacción negativa entre la ingesta durante la gestación de la dieta fortificada con Ca y los niveles minerales de diferentes tejidos fetales. En este estudio, los fetos procedentes de las madres que habían sido alimentadas con la dieta enriquecida en Ca mostraban una disminución en el contenido de los minerales Fe, Cu, P y Mg al analizar el cuerpo entero. Por otro lado, otros estudios en animales también han demostrado que una suplementación con Ca en hembras gestantes puede resultar en una disminución de la DMO de los fetos^(166; 238). Sin embargo es importante señalar que tanto unas reservas inadecuadas como la ingesta deficiente de minerales por las madres pueden producir efectos muy negativos en el desarrollo del feto pudiendo derivar en un crecimiento retardado intrauterino, en el desarrollo anormal de los órganos e incluso en la muerte del feto⁽²³⁹⁾.

Al destete, las crías del grupo Ca muestran una mejora en la arquitectura del hueso esponjoso en la vértebra lumbar (LV4) frente a los animales del grupo control, aunque estos

cambios no se ven reflejados en la DMO y CMO del cuerpo entero. Este incremento en la mineralización de las crías del grupo Ca contrasta con la baja mineralización que presentan al nacimiento, pero confirma la importancia de la suplementación de la ingesta materna con Ca durante la lactancia, puesto que es éste periodo en el que la única fuente de Ca que recibe la cría es la leche materna. En este sentido, los comités de expertos recomienda la suplementación con Ca en prematuros alimentados con leche materna. Es más, Lapillone *et al.*⁽²⁴⁰⁾ en su estudio realizado en niños prematuros alimentados con fórmula concluye que los niños prematuros sanos alimentados con un fórmula infantil fortificada con Ca y P adquieren una masa ósea normal debido a una mejora en la mineralización de los huesos.

Las diferencias más significativas debidas a la fortificación de la dieta materna con Ca son las encontradas en la adolescencia. En esta edad, las crías pertenecientes al grupo Ca presenta un incremento significativo en la mineralización del hueso esponjoso en la vértebra lumbar comparado con el grupo CC, tal y como indican los resultados dados por la micro-CT. El incremento en la anchura trabecular (Tb.Th) y la disminución en la separación trabecular (Tb.Sp) puede ser explicado si suponemos un incremento en el porcentaje de modelado (modeling) en la superficie de las trabéculas, lo que produciría un hueso trabecular mucho más denso en los animales del grupo Ca. Esta idea viene soportada por el hecho de que es éste grupo el que presenta mejores valores en los marcadores de formación. Con un valor significativamente mayor de la fosfatasa alcalina, frente a los otros dos grupos de estudio, junto a una mayor concentración de OC y una menor concentración de PTH nos indicaría un turnover óseo positivo que se pondría principalmente de manifiesto en la mejoría del hueso esponjoso. De una manera general, la vértebra lumbar (LV4) presenta mejores parámetros no sólo en el hueso esponjoso sino que también en el hueso cortical. Esta mejoría general en la micro-estructura de los huesos implica que la vértebra de las crías del grupo Ca puede tener un mayor resistencia contra la rotura ósea y el subsiguiente colapso que se produce en las vértebras comparado con el grupo control. Pero estas mejoras sólo se muestran a nivel micro-estructural y no se ven confirmadas a través del análisis de densitometría ósea, que no refleja diferencias en los valores de DMO y CMO del grupo Ca al compararlas con el grupo CC. Es más, estos datos no concuerdan con los de estudios previos en los que se demuestra que una fortificación con Ca de la dieta materna genera un aumento en el hueso de la descendencia⁽¹⁶⁶⁾.

Las diferencias con los resultados de estos estudios pueden ser explicadas si tenemos en cuenta que nuestro estudio se ha llevado a cabo en condiciones no-deficientes, es decir, las cantidades de Ca que proporcionan las dietas de roedores, AIN93-G y AIN93-M, son suficientes como para asegurar un desarrollo adecuado del esqueleto de las ratas. En la misma forma que nosotros, otros autores^(186; 191; 241) han demostrado que la fortificación de la dieta materna con Ca y Vitamina D no influye en los resultados clínicos relacionados con la talla del niño al nacimiento o con la DMO y la CMO de la descendencia en mujeres sin una deficiencia aparente en estos dos nutrientes esenciales para el desarrollo óseo. Además, nuestros resultados están alineados con el concepto de la existencia de un umbral de absorción del Ca ingerido definido por Maltkovic y Heaney⁽²⁴²⁾, que concluyeron que ingestas de Ca por encima de los niveles recomendados no producen un beneficio mayor (o sumatorio).

Por otro lado, la suplementación con inulina enriquecida con FOS de la dieta materna durante la gestación y la lactancia producen un beneficio en el hueso de las crías. Los resultados indican que ni al nacimiento ni al destete la intervención nutricional en la madre no ejerce ningún efecto significativo en la micro-estructura de las crías, haciéndolas iguales que las crías del grupo CC. Sin embargo, al final de la adolescencia, la suplementación materna durante la gestación y la lactancia determinó un incremento significativo en la DMO de la vértebra lumbar de las crías. La asociación entre el consumo del prebiótico, en forma de inulina enriquecida en FOS, por parte de la madre y una mayor DMO/CMO en la vértebra de las crías puede ser parcialmente atribuida al incremento de la absorción de minerales por el intestino materno, que puede aumentar la biodisponibilidad y la concentración de minerales en la placenta y la leche materna. Este incremento que, como hemos comentado anteriormente, tiene un efecto beneficioso evitando la pérdida de hueso en la madre también puede tener un efecto programador beneficioso sobre el proceso de osificación en el feto y/o en el recién nacido, que podría verse reflejado en una mayor adquisición de hueso por parte del niño durante el crecimiento. Así, en estudios realizados en mujeres gestantes sanas^(186; 187), los autores han observado la existencia de una relación positiva entre la ingesta de minerales durante el tercer trimestre de gestación y la masa ósea de la descendencia a los 9 y a los 16 años. Ambos estudios coinciden al mostrar una relación positiva entre la ingesta materna de Mg y la DMO de la vértebra lumbar de los niños. Sin embargo, no se ha encontrado esta

relación beneficiosa entre la ingesta materna de Ca y la salud ósea ni de la madre ni de los niños⁽²⁴³⁾.

Por otro lado se ha determinado que la relación de prebióticos como la inulina y/o los fructooligosacáridos de cadena corta (scFOS) con la salud ósea se debe, entre otros factores, a un incremento de la absorción intestinal no solo del Ca sino de también otros minerales con efectos positivos en la conservación y la formación ósea como el Mg y el P⁽²⁴⁴⁾. Esto explicaría el efecto beneficioso de la suplementación de la dieta materna con la inulina enriquecida en FOS tanto en la DMO del hueso de la madre como en el de la cría.

A nivel micro-estructural, la vértebra de las crías cuyas madres tomaron la dieta suplementada con la inulina enriquecida en FOS también muestra este efecto beneficioso. Así, las crías pertenecientes al grupo Pre comparadas con las crías del grupo control, muestran en el hueso esponjoso el mismo número trabecular (Tb.N) pero un incremento en la anchura de la trabécula (Tb.Th) del 13% y del ratio BV/TV del 11%, lo que indica un hueso más denso, tal y como se ve reflejado en la DMO medida por DEXA. En el hueso cortical las crías del grupo Pre, al compararlas con las del grupo CC, presentan un densidad cortical (C.BMD) significativamente mayor, junto a un aumento, aunque no significativo, de la anchura del hueso cortical, que seguramente es debido a un mayor depósito de mineral en el periostio junto con una menor resorción en el endostio (endocortical). Además, este grupo también presenta una menor porosidad cortical (C.Sp) (-6%) con respecto al control, lo que es indicativo de un remodeling positivo o bien balanceado dentro de cada unidad básica multicelular ósea (BMU) que incrementaría la resistencia del hueso cortical de la vértebra.

Como se mencionó anteriormente, uno de los posibles mecanismos por el cual el prebiótico puede ejercer un efecto beneficioso en el hueso es a través de la acción de los AGCC generados por la fermentación bacteriana, tanto en el ciego como en el intestino. En las crías, el efecto producido por los AGCC se debe relacionar con un efecto programador (*programming*) o de nutrición temprana ya que la intervención nutricional se realizó en las madres durante la gestación y la lactación. Así, los AGCC tendrían un efecto a largo plazo (efecto *programming*) en el desarrollo del esqueleto posiblemente relacionado tanto con la diferenciación de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea (*bone marrow*

mesenchymal stem cells) hacia osteoblastos⁽²⁴⁵⁾ como con la estimulación de la formación de nódulos mineralizados^(232; 246) en los mismos.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Este estudio evalúa cómo la nutrición materna enriquecida con prebióticos, en nuestro caso inulina enriquecida con FOS, o fortificada con calcio durante la gestación y la lactación puede influenciar por un lado el metabolismo óseo y la estructura del hueso materno asociada a éstas etapas y que, además, por otro lado, puede tener un efecto beneficioso en la cría, afectando positivamente al pico de masa ósea y a la calidad del hueso durante su desarrollo y crecimiento.

Las ratas madres gestantes recibieron *ad libitum* una dieta estándar control (AIN93G), o una dieta estándar fortificada con Ca, cuya concentración final en Ca fue del 1%, o una dieta estándar enriquecida con prebiótico (7.5% de los carbohidratos totales como Inulina enriquecida en FOS) durante la gestación y la lactancia. Tras el destete parte de las crías y las madres fueron sacrificadas, mientras que otra parte de las crías continuaron el experimento hasta el final de la adolescencia. Durante este periodo de crecimiento todas las crías se alimentaron con la dieta estándar control, de esta forma se ha podido evaluar el efecto de programación o de nutrición temprana en las mismas. Se ha determinado el efecto de las diferentes dietas tanto en la “macro-estructura” del hueso por densitometría ósea (DEXA), como en la micro-estructura a través del análisis de μ CT en los huesos de las madres y de las crías en tres etapas: nacimiento, destete y final de la adolescencia. También se han determinado parámetros bioquímicos de formación ósea, osteocalcina y fosfatasa alcalina, y de resorción ósea, PTH, DPD y PYD en el suero de las madres y de las crías al final de la adolescencia. Además, para evaluar el efecto del prebiótico se determinó el pH del contenido del ciego en las madres.

Los resultados obtenidos nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

CONCLUSIÓN PRIMERA

Este estudio se demuestra por primera vez que la suplementación con prebiótico, en nuestro caso la inulina enriquecida con FOS, durante la gestación y la lactancia en ratas podría

ejercer un efecto protector en el hueso materno frente a la pérdida de masa ósea que ocurre durante estos periodos. Este efecto es especialmente destacable en la tibia.

CONCLUSIÓN SEGUNDA:

Tanto la suplementación con prebiótico como la fortificación con Ca de la dieta materna produce un incremento en la micro-estructura trabecular y cortical en las vértebras de las crías al final de la adolescencia.

CONCLUSIÓN TERCERA:

La suplementación con el prebiótico sólo muestra un efecto positivo en la mineralización del osteoide a nivel macro-estructural, aumentando la DMO de las vértebras de la progenie al final de la adolescencia.

CONCLUSIÓN GENERAL:

Los resultados presentados en esta memoria de tesis nos permiten indicar que una suplementación con un prebiótico, conteniendo inulina enriquecida con FOS, en condiciones no deficientes nutricionalmente durante la gestación y la lactancia, puede ser considerada como una estrategia nutricional, incluso mejor que la suplementación con Ca, para proteger el hueso materno frente a la pérdida de hueso transitoria que ocurre durante estos periodos. Esta protección ayudaría a la madre a tener una mayor densidad de masa ósea y reserva de mineral para enfrentarse a la pérdida de masa ósea generada por la edad y por factores hormonales en la peri-menopausia. Además, la suplementación de la dieta con prebiótico genera un efecto programador (*programming*) en la cría, aumentando su pico de masa ósea durante el crecimiento. Este aumento se podría relacionar con un retraso en la pérdida de hueso durante la madurez y una potencial protección frente al riesgo de sufrir osteoporosis en la edad adulta.

6. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BS/BV	Ratio Superficie de hueso/volumen de hueso.
BV/TV	Ratio volumen de hueso/volumen total.
C.BMD	DMO cortical.
C.Sp	Porosidad cortical.
C.Th	Anchura del hueso cortical.
CMO	Contenido mineral óseo.
Conn.D	Densidad del tejido conectivo.
DL	Día de lactación.
DMO	Densidad mineral ósea.
DPD	Deoxipiridinolina.
S FOS/scFO	Fructooligosacáridos/ Fructooligosacáridos de cadena corta.
GD	Día gestacional.
Grupo Ca	Grupo fortificado con calcio.
Grupo CC	Grupo control.
Grupo Pre FOS).	Grupo suplementado con prebiótico (inulina enriquecida con FOS).
LV4	Vértebra Lumbar 4.

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

pMOI	Momento polar de inercia.
PTH	Hormona paratiroidea.
PYD	Piridinolina.
Tb.N	Número de trabéculas.
Tb.Sp	Separación trabecular.
Tb.Th	Anchura trabecular.

7. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. Partes de la formación ósea por osificación endocondral	9
Figura 2. Fases del remodelado óseo en una Unidad de Remodelado Óseo (URO).....	12
Figura 3. Procesos de modelado y remodelación durante el crecimiento óseo.	14
Figura 4. Efecto del FGF-23 sobre la regulación del metabolismo de la vitamina D.	17
Figura 5. Funciones hormonales de la osteocalcina.	18
Figura 6. Diferenciación de las células mesenquimales pluripotenciales.	19
Figura 7. Osteocitos.....	21
Figura 8. Formación de los osteoclastos a partir de las células hematopoyéticas.....	23
Figura 9. Regulación de la osteoclastogénesis por el osteoblasto.	24
Figura 10. Representación de una unidad de remodelado y los productos generados en ella.	26
Figura 11. Marcadores de resorción ósea derivados de la degradación del colágeno tipo I.	31
Figura 12. Mecanismos de absorción del calcio.	45
Figura 13. Estructura química de la inulina.	53
Figura 14. Representación de los efectos de los carbohidratos no digeribles en la absorción de minerales.	55
Figura 15. Cambios de la homeostasis del calcio de la madre durante la gestación comparado con mujeres pregestantes.	60

Figura 16. Adaptaciones de la homeostasis del calcio de la madre durante la gestación63

Figura 17. Evolución de la masa ósea.70

Figura 18. El pico de masa ósea y su potencial efecto protector ante la pérdida de masa ósea en la vejez.72

Figura 19. Diseño experimental del estudio.81

Figura 20. Evolución del peso de las madres durante el periodo de intervención nutricional.93

Figura 21. Evolución de la ingesta de las madres durante el periodo de intervención nutricional.94

Figura 22. Evolución del peso de las crías durante el estudio.....95

Figura 23. Resultados de la densitometría ósea (pDEXA): densidad mineral ósea (DMO) y de la contenido mineral óseo (CMO) de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).98

Figura 24. Resultados trabeculares óseos del fémur de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).101

Figura 25. Imágenes tridimensionales del hueso trabecular del fémur de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).....102

Figura 26. Resultados trabeculares óseos de la tibia de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).103

Figura 27. Imágenes tridimensionales del hueso trabecular de la tibia de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).....104

Figura 28. Resultados trabeculares óseos de la vértebra LV4 de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).105

Figura 29. Imágenes tridimensionales del hueso trabecular de la vértebra LV4 de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).....106

Figura 30. Arquitectura trabecular del fémur de las crías al nacimiento.116

Figura 31. Arquitectura trabecular de la vértebra de las crías al nacimiento.117

Figura 32. Arquitectura trabecular del fémur de las crías al destete.....120

Figura 33. Arquitectura trabecular de la vértebra de las crías al destete.121

Figura 34. Resultados de la densitometría ósea (pDEXA): densidad mineral ósea (DMO) y de la contenido mineral óseo (CMO) de las crías al final de la adolescencia.124

Figura 35. Arquitectura trabecular de la vértebra de las crías al final de la adolescencia.127

Figura 36. Imágenes tridimensionales del hueso trabecular de la vértebra LV4 las crías al final de la adolescencia128

Figura 37. Arquitectura del hueso cortical de la vértebra de las crías al final de la adolescencia.130

8. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Marcadores de formación y resorción óseos.	27
Tabla 2. Factores locales reguladores del remodelado óseo.	38
Tabla 3. Requerimientos de diarios recomendados según la edad (modificada a partir de Moreiras <i>et al.</i> ⁽⁸²⁾)	41
Tabla 4. Aporte de calcio de algunos alimentos (modificada a partir de Siedentopp <i>et al.</i> ⁽⁸³⁾)	43
Tabla 5. Composición nutricional de las dietas ensayadas.	79
Tabla 6. Resultados densitométricos (pDEXA) del contenido mineral óseo (CMO) y de la densidad mineral ósea (DMO) de las madres tras el sacrificio (final de la lactación). ...	97
Tabla 7. Arquitectura trabecular de los huesos de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).	100
Tabla 8. Marcadores de formación y resorción ósea en suero y orina de 12h de las madres tras el sacrificio (final de la lactación).	108
Tabla 9. Arquitectura trabecular de los huesos de las crías al nacimiento.	115
Tabla 10. Arquitectura trabecular de los huesos de las crías al destete.	119
Tabla 11. Análisis densitométrico (pDEXA) del contenido mineral óseo (CMO) y de la densidad mineral ósea (DMO) de los huesos de las crías al final de la adolescencia. ...	123

Tabla 12. Arquitectura trabecular y cortical de la vértebra lumbar 4 (LV4) de las crías al final de la adolescencia.....126

Tabla 13. Marcadores de formación y resorción ósea en suero y orina de 12h de las crías al final de la adolescencia.....131

9. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. West-Eberhard MJ (1989) Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual review of Ecology and Systematics*, 249-278.
2. Gluckman P, Hanson M (2009) Developmental plasticity and the developmental origins of health and disease. In *Early Life Origins Of Human Health and Disease*, pp. 1-10: Karger Publishers.
3. Gartner LP, Hiatt JL (2012) *Color Atlas and Text of Histology*: Wolters Kluwer Health.
4. Seeman E (2008) Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. *Rheumatology (Oxford)* 47 Suppl 4, iv2-8.
5. Parfitt AM, Travers R, Rauch F *et al.* (2000) Structural and cellular changes during bone growth in healthy children. *Bone* 27, 487-494.
6. Saidler LM, Pérez AD (2006) Qué significa la calidad ósea. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología* 7, 165-176.
7. Frost HM, Straatsma C (1964) Bone remodelling dynamics: LWW.
8. Mundy GR (1999) *Bone Remodelling and its Disorders*: Taylor & Francis.
9. Riancho JA, Delgado-Calle J (2011) [Osteoblast-osteoclast interaction mechanisms]. *Reumatol Clin* 7 Suppl 2, S1-4.
10. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP *et al.* (2011) Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 124, 991-998.
11. Parfitt AM (1988) Bone remodeling. *Henry Ford Hosp Med J* 36, 143-144.
12. Parfitt AM (1984) The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. *Calcif Tissue Int* 36 Suppl 1, S37-45.
13. Reyes-Garcia R, Rozas-Moreno P, Muñoz-Torres M (2011) [Cardiovascular disease and bone metabolism]. *Endocrinol Nutr* 58, 353-359.

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

14. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM *et al.* (1989) Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc* 3, 953-960; discussion 960-951.
15. Office of the Surgeon General (US) (2004) Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. In *Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General* [MUSDoHaHS Rockville, Office of the Surgeon General., editor]. Rockville (MD).
16. Marieb EN, Hoehn K (2007) *Human anatomy & physiology*: Pearson Education.
17. Bullough PG (2010) Orthopaedic Pathology.
18. DiGirolamo DJ, Clemens TL, Kousteni S (2012) The skeleton as an endocrine organ. *Nature Reviews Rheumatology* 8, 674-683.
19. Lu Y, Feng JQ (2011) FGF23 in skeletal modeling and remodeling. *Current osteoporosis reports* 9, 103-108.
20. Guo Y-C, Yuan Q (2015) Fibroblast growth factor 23 and bone mineralisation. *In J Oral Sci* 7, 8-13.
21. Sánchez-González MC, Salanova L, Ruano P (2011) FGF-23: ¿ solo regulador del metabolismo del fósforo o algo más? *Reumatología Clínica* 7, 5-7.
22. Bikle D (2009) Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 26-34.
23. Clemens TL, Karsenty G (2011) The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res* 26, 677-680.
24. Kini U, Nandeesh B (2012) Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. In *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*, pp. 29-57: Springer.
25. Kanazawa I (2015) Osteocalcin as a hormone regulating glucose metabolism. *World J Diabetes* 6, 1345-1354.
26. Karsenty G, Ferron M (2012) The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature* 481, 314-320.

BIBLIOGRAFÍA

27. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil Isabel AGMA, Canto Pingarrón Mariano del, Blanco Jerez Luis. (2006) Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Med oral patol oral cirbuca (Internet)* 11, 47-51.
28. Bianco P, Gehron Robey P (2000) Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105, 1663-1668.
29. Baron R, Rawadi G (2007) Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 148, 2635-2643.
30. Kobayashi T, Kronenberg H (2005) Minireview: transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology* 146, 1012-1017.
31. Florencio-Silva R, Sasso GRD, Sasso-Cerri E *et al.* (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Research International* 2015.
32. Marcus R, Feldman D, Dempster DW *et al.* (2013) *Osteoporosis: Two-Volume Set*: Elsevier Science.
33. Mackie EJ (2003) Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1301-1305.
34. Manolagas SC (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115-137.
35. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE (2006) Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics* 235, 176-190.
36. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA *et al.* (2006) Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *Journal of Bone and Mineral Research* 21, 605-615.
37. Parfitt AM, Mundy GR, Roodman GD *et al.* (1996) A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 11, 150-159.
38. Arboleya L, Castaneda S (2013) Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. *Reumatología Clínica (English Edition)* 9, 303-315.

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

39. Goldring SR, Goldring MB (2007) Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides. *Nature medicine* 13, 133-134.
40. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J *et al.* (2009) RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2, 56-64.
41. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ (2008) Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 29, 155-192.
42. O'Brien CA (2010) Control of RANKL gene expression. *Bone* 46, 911-919.
43. Raggatt LJ, Partridge NC (2010) Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 285, 25103-25108.
44. Feng X, McDonald JM (2011) Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol* 6, 121-145.
45. Bonjour J-P, Chevalley T, Amman P *et al.* (2015) Protein Intake and Bone Health. In *Nutrition and Bone Health*, pp. 301-317 [MF Holick and JW Nieves, editors]: Springer New York.
46. García-Pérez M, Moreno-Mercer J, Cano A (2002) Marcadores bioquímicos de remodelado óseo: aspectos descriptivos. *Progresos de Obstetricia y Ginecología* 45, 332-343.
47. Zanchetta JR, Talbot JR (2001) *Osteoporosis: fisiopatología, diagnóstico, prevención y tratamiento*: Médica Panamericana.
48. Schneider GB, Key LL, Popoff SN (1998) Osteopetrosis: Therapeutic Strategies. *The Endocrinologist* 8, 409-417.
49. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM (1996) Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 17, 333-368.
50. Heersche J, Reimers S, Wrana J *et al.* (1991) Changes in expression of alpha 1 type 1 collagen and osteocalcin mRNA in osteoblasts and odontoblasts at different stages of maturity as shown by in situ hybridization. *Proceedings of the Finnish Dental Society Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia* 88, 173-182.
51. Wei J, Karsenty G (2015) An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Rev Endocr Metab Disord* 16, 93-98.

BIBLIOGRAFÍA

52. Kirmani S, Atkinson EJ, Melton LJ, 3rd *et al.* (2011) Relationship of testosterone and osteocalcin levels during growth. *J Bone Miner Res* 26, 2212-2216.
53. Kanbur NÖ, Derman O, Şen TA *et al.* (2002) Osteocalcin. A biochemical marker of bone turnover during puberty.
54. Medicine I, Lactation CNSDP (1991) *Nutrition During Lactation*: National Academies Press.
55. Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ (2008) *Principles of Bone Biology: Two-Volume Set*: Elsevier Science.
56. Singer FR, Eyre DR (2008) Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Cleve Clin J Med* 75, 739-750.
57. Eyre DR, Dickson IR, Van Ness K (1988) Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxyypyridinium residues. *Biochem J* 252, 495-500.
58. Dogan E, Posaci C (2002) Monitoring hormone replacement therapy by biochemical markers of bone metabolism in menopausal women. *Postgraduate medical journal* 78, 727-731.
59. Molina C (2003) Marcadores bioquímicos del remodelado óseo. *Rev Metab Óseo Min* 1, 91-98.
60. Hannon RA, Clowes JA, Egleton AC *et al.* (2004) Clinical performance of immunoreactive tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone* 34, 187-194.
61. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarron M *et al.* (2006) Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11, E151-157.
62. Grant SF, Ralston SH (1997) Genes and osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 8, 232-236.
63. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL *et al.* (1987) Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *J Clin Invest* 80, 706-710.

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

64. Morey ER, Baylink DJ (1978) Inhibition of bone formation during space flight. *Science* 201, 1138-1141.
65. Cosman F, Lindsay R (2004) Therapeutic potential of parathyroid hormone. *Curr Osteoporos Rep* 2, 5-11.
66. Calvi L, Sims N, Hunzelman J *et al.* (2001) Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone. *The Journal of clinical investigation* 107, 277-286.
67. New SA, Bonjour J-P (2003) *Nutritional aspects of bone health*: Royal Society of Chemistry.
68. Weisman Y, Harell A, Edelstein S *et al.* (1979) 1α , 25-Dihydroxyvitamin D₃, and 24, 25-dihydroxyvitamin D₃ in vitro synthesis by human decidua and placenta. *Nature* 281, 317-319.
69. Kovacs CS, Kronenberg HM (1997) Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev* 18, 832-872.
70. Shin JS, Choi MY, Longtine MS *et al.* (2010) Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta* 31, 1027-1034.
71. Javaid MK, Crozier SR, Harvey NC *et al.* (2006) Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. *Lancet* 367, 36-43.
72. Sayers A, Tobias JH (2009) Estimated maternal ultraviolet B exposure levels in pregnancy influence skeletal development of the child. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 765-771.
73. Frost HM (1987) The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone and mineral* 2, 73.
74. Kousteni S, Bellido T, Plotkin L *et al.* (2001) Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104, 719-730.
75. Harvey S, Johnson CD, Sharma P *et al.* (1998) Growth hormone: a paracrine growth factor in embryonic development? *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 119, 305-315.

BIBLIOGRAFÍA

76. Awumey EM, Bukoski RD (2006) Cellular functions and fluxes of calcium. In *Calcium in Human Health*, pp. 13-35: Springer.
77. Miller GD, Jarvis JK, McBean LD (2001) The importance of meeting calcium needs with foods. *J Am Coll Nutr* 20, 168S-185S.
78. Weaver CM, Heaney RP (2007) *Calcium in Human Health*: Humana Press.
79. Heaney RP (2006) Calcium intake and disease prevention. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50, 685-693.
80. Heaney RP (2006) Bone as the calcium nutrient reserve. In *Calcium in Human Health*, pp. 7-12: Springer.
81. Flynn A (2003) The role of dietary calcium in bone health. *Proc Nutr Soc* 62, 851-858.
82. Moreiras OC, A; Cabrera, L; Cuadrado, C (2013) *Alimentos y nutrientes. Tablas de composición de alimentos. 16ª edición revisada y ampliada*. Madrid: Anaya.
83. Siedentopp U (2011) Tratamiento dietético integrador para la artrosis y la osteoporosis. *Revista Internacional de Acupuntura* 5, 13-17.
84. Perales S, Barbera R, Lagarda MJ *et al.* (2006) Fortification of milk with calcium: effect on calcium bioavailability and interactions with iron and zinc. *J Agric Food Chem* 54, 4901-4906.
85. Quesada Gomez JM, Blanch Rubio J, Diaz Curiel M *et al.* (2011) Calcium citrate and vitamin D in the treatment of osteoporosis. *Clin Drug Investig* 31, 285-298.
86. Cámara F, Amaro M (2003) Nutritional aspect of zinc availability. *International journal of food sciences and nutrition* 54, 143-151.
87. LijNNERDAL B (1997) Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace element absorption during infancy. *Physiological Reviews* 77, 643-669.
88. Hernandez AG, de Medina Contreras FS (2010) *Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*: Editorial Medica Panamericana Sa de.

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

89. Gropper S, Smith J (2012) *Advanced Nutrition and Human Metabolism*: Cengage Learning.
90. Bronner F (2003) Mechanisms and functional aspects of intestinal calcium absorption. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 300, 47-52.
91. McCabe L, Britton RA, Parameswaran N (2015) Prebiotic and Probiotic Regulation of Bone Health: Role of the Intestine and its Microbiome. *Curr Osteoporos Rep* 13, 363-371.
92. Cashman K (2003) Prebiotics and calcium bioavailability. *Curr Issues Intest Microbiol* 4, 21-32.
93. Diaz de Barboza G, Guizzardi S, Tolosa de Talamoni N (2015) Molecular aspects of intestinal calcium absorption. *World J Gastroenterol* 21, 7142-7154.
94. Khanal RC, Nemere I (2008) Regulation of intestinal calcium transport. *Annu Rev Nutr* 28, 179-196.
95. Puche R, Feldman S (1991) Relative importance of urinary sulfate and net acid excretion as determinants of calciuria in normal subjects. *Medicina* 52, 220-224.
96. Ponce GM, Fajardo MA, Zeni SN *et al.* (2006) Ingesta de calcio y proteínas: relación con marcadores bioquímicos óseos en mujeres pre y posmenopáusicas de Comodoro Rivadavia (Argentina). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 56, 237-243.
97. Krieger NS, Sessler NE, Bushinsky DA (1992) Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity in vitro. *Am J Physiol* 262, F442-448.
98. Brandao-Burch A, Utting JC, Orriss IR *et al.* (2005) Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. *Calcif Tissue Int* 77, 167-174.
99. Shapses SA, Robins SP, Schwartz EI *et al.* (1995) Short-term changes in calcium but not protein intake alter the rate of bone resorption in healthy subjects as assessed by urinary pyridinium cross-link excretion. *J Nutr* 125, 2814-2821.
100. Lamberg-Allardt C, Karp H, Kemi V (2011) Phosphorus and bone. In *Nutritional Influences on Bone Health*, pp. 87-97: Springer.
101. Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Weaver C (2010) *Nutritional influences on bone health*: Springer.

BIBLIOGRAFÍA

102. Penido MG, Alon US (2012) Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatr Nephrol* 27, 2039-2048.
103. Bergwitz C, Juppner H (2010) Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med* 61, 91-104.
104. Calvo MS, Park YK (1996) Changing phosphorus content of the US diet: potential for adverse effects on bone. *J Nutr* 126, 1168S-1180S.
105. Alfrey AC, Miller NL (1973) Bone magnesium pools in uremia. *J Clin Invest* 52, 3019-3027.
106. Rude RK (1998) Magnesium deficiency: a cause of heterogenous disease in humans. *J Bone Miner Res* 13, 749-758.
107. Castiglioni S, Cazzaniga A, Albisetti W *et al.* (2013) Magnesium and osteoporosis: current state of knowledge and future research directions. *Nutrients* 5, 3022-3033.
108. Boskey AL, Rimnac CM, Bansal M *et al.* (1992) Effect of short-term hypomagnesemia on the chemical and mechanical properties of rat bone. *J Orthop Res* 10, 774-783.
109. Nordin B, Need AG, Morris HA *et al.* (1993) The nature and significance of the relationship between urinary sodium and urinary calcium in women. *J Nutr* 123, 1615-1622.
110. Haderslev KV, Jeppesen PB, Mortensen PB *et al.* (2000) Absorption of calcium and magnesium in patients with intestinal resections treated with medium chain fatty acids. *Gut* 46, 819-823.
111. Campos MS, Lopez-Aliaga I, Alferez MJ *et al.* (2003) Effects of goats' or cows' milks on nutritive utilization of calcium and phosphorus in rats with intestinal resection. *Br J Nutr* 90, 61-67.
112. Bertolo RF, Bettger WJ, Atkinson SA (2001) Divalent metals inhibit and lactose stimulates zinc transport across brush border membrane vesicles from piglets. *J Nutr Biochem* 12, 73-80.
113. Efsa Panel on Dietetic Products N, Allergies (2010) Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal* 8, 1462.

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

114. Moreno AH, Científicas CSdl (2003) *Fibra alimentaria*: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
115. Jones JM (2014) CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the 'fiber gap'. *Nutr J* 13, 34.
116. Gray J, Europe I (2006) *Dietary fibre: definition, analysis, physiology & health*: ILSI Europe.
117. Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401-1412.
118. Gibson GR, Probert HM, Loo JV *et al.* (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 17, 259-275.
119. Roberfroid MB (2001) Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *Am J Clin Nutr* 73, 406S-409S.
120. Blackwood A, Salter J, Dettmar P *et al.* (2000) Dietary fibre, physicochemical properties and their relationship to health. *J R Soc Promot Health* 120, 242-247.
121. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ *et al.* (1987) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221-1227.
122. Franck A (2006) Oligofructose-enriched inulin stimulates calcium absorption and bone mineralisation. *Nutrition Bulletin* 31, 341-345.
123. Fairweather-Tait SJ (1998) Trace element bioavailability. *Bibl Nutr Dieta*, 29-39.
124. Lonnerdal B (1985) Dietary factors affecting trace element bioavailability from human milk, cow's milk and infant formulas. *Prog Food Nutr Sci* 9, 35-62.
125. Pérez-Conesa D, Lopez G, Ros G (2007) Effects of probiotic, prebiotic and synbiotic follow-up infant formulas on large intestine morphology and bone mineralisation in rats. *J Sci Food Agric* 87, 1059-1068.
126. Raschka L, Daniel H (2005) Mechanisms underlying the effects of inulin-type fructans on calcium absorption in the large intestine of rats. *Bone* 37, 728-735.

127. Peng JB, Brown EM, Hediger MA (2003) Apical entry channels in calcium-transporting epithelia. *News Physiol Sci* 18, 158-163.
128. Pedreschi R, Campos D, Noratto G *et al.* (2003) Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. *J Agric Food Chem* 51, 5278-5284.
129. Coxam V (2005) Inulin-type fructans and bone health: state of the art and perspectives in the management of osteoporosis. *Br J Nutr* 93 Suppl 1, S111-123.
130. Lavanda I, Saad SMI, Colli C (2011) Prebióticos y su efecto en la biodisponibilidad del calcio. *Revista de Nutrição* 24, 333-344.
131. Manning TS, Gibson GR (2004) Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18, 287-298.
132. Rastall RA, Gibson GR, Gill HS *et al.* (2005) Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol Ecol* 52, 145-152.
133. Lobo AR, Colli C, Filisetti TM (2006) Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. *Nutrition research* 26, 413-420.
134. Pérez-Conesa D, López G, Abellán P *et al.* (2006) Bioavailability of calcium, magnesium and phosphorus in rats fed probiotic, prebiotic and synbiotic powder follow-up infant formulas and their effect on physiological and nutritional parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2327-2336.
135. Kruger MC, Brown KE, Collett G *et al.* (2003) The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 683-688.
136. Lobo AR, Cocato ML, Jorgetti V *et al.* (2009) Changes in bone mass, biomechanical properties, and microarchitecture of calcium- and iron-deficient rats fed diets supplemented with inulin-type fructans. *Nutr Res* 29, 873-881.
137. Xiao J, Metzler-Zebeli BU, Zebeli Q (2015) Gut Function-Enhancing Properties and Metabolic Effects of Dietary Indigestible Sugars in Rodents and Rabbits. *Nutrients* 7, 8348-8365.

138. Sakuma K (2002) Molecular mechanism of the effect of fructooligosaccharides on calcium absorption. *Bioscience and microflora* 21, 13-20.
139. Takasaki M, Inaba H, Ohta A *et al.* (2000) Dietary short-chain fructooligosaccharides increase calbindin-D9k levels only in the large intestine in rats independent of dietary calcium deficiency or serum 1,25 dihydroxy vitamin D levels. *Int J Vitam Nutr Res* 70, 206-213.
140. Ohta A, Motohashi Y, Ohtsuki M *et al.* (1998) Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin-D9k differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. *J Nutr* 128, 934-939.
141. Fukushima A, Aizaki Y, Sakuma K (2009) Short-chain fatty acids induce intestinal transient receptor potential vanilloid type 6 expression in rats and Caco-2 cells. *J Nutr* 139, 20-25.
142. Blottiere HM, Buecher B, Galmiche JP *et al.* (2003) Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc* 62, 101-106.
143. Kien CL, Blauwiel R, Bunn JY *et al.* (2007) Cecal infusion of butyrate increases intestinal cell proliferation in piglets. *J Nutr* 137, 916-922.
144. Scholz-Ahrens KE, Schrezenmeir J (2002) Inulin, oligofructose and mineral metabolism - experimental data and mechanism. *Br J Nutr* 87 Suppl 2, S179-186.
145. Gropper SS, Smith JL (2012) *Advanced Nutrition and Human Metabolism*: Cengage Learning.
146. van den Heuvel ABE (2003) Compuestos prebióticos y biodisponibilidad de minerales y oligoelementos. *Gastroenterol Hepatol* 26, 50-63.
147. Roberfroid MB, Cumps J, Devogelaer JP (2002) Dietary chicory inulin increases whole-body bone mineral density in growing male rats. *J Nutr* 132, 3599-3602.
148. Scholz-Ahrens KE, Añşil Y, Schrezenmeir Jr (2002) Effect of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats. *Br J Nutr* 88, 365-377.
149. Bosscher D, Van Loo J, Franck A (2006) Inulin and oligofructose as functional ingredients to improve bone mineralization. *International Dairy Journal* 16, 1092-1097.

BIBLIOGRAFÍA

150. Jackman L, Millane SS, Martin BR *et al.* (1997) Calcium retention in relation to calcium intake and postmenarcheal age in adolescent females. *Am J Clin Nutr* 66, 327-333.
151. Prentice A (2000) Calcium in pregnancy and lactation. *Annu Rev Nutr* 20, 249-272.
152. Bezerra FF, Donangelo CM (2016) Calcium Supplementation during Pregnancy and Lactation: Implications for Maternal and Infant Bone Health. In *Calcium: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, pp. 484-508: The Royal Society of Chemistry.
153. Del Valle HB, Yaktine AL, Taylor CL *et al.* (2011) *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D*: National Academies Press.
154. Kalkwarf HJ, Specker BL (2002) Bone mineral changes during pregnancy and lactation. *Endocrine* 17, 49-53.
155. Namgung R, Tsang RC (2003) Bone in the pregnant mother and newborn at birth. *Clin Chim Acta* 333, 1-11.
156. Vidal L, Vidal M, Cabrera S *et al.* (2008) Metabolismo mineral óseo durante la gestación y efectos sobre la masa ósea de la madre. *Anales de la Facultad de Medicina* 69, 198-205.
157. Ziegler EE, O'Donnell AM, Nelson SE *et al.* (1976) Body composition of the reference fetus. *Growth* 40, 329-341.
158. Kovacs CS (2005) Calcium and bone metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10, 105-118.
159. Cross NA, Hillman LS, Allen SH *et al.* (1995) Calcium homeostasis and bone metabolism during pregnancy, lactation, and postweaning: a longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 61, 514-523.
160. Papapetrou PD (2010) The interrelationship of serum 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and 24,25-dihydroxyvitamin D in pregnancy at term: a meta-analysis. *Hormones (Athens)* 9, 136-144.
161. Ogueh O, Khastgir G, Abbas A *et al.* (2000) The feto-placental unit stimulates the pregnancy-associated increase in maternal bone metabolism. *Hum Reprod* 15, 1834-1837.
162. Kronenberg HM (2006) PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 1-13.

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

163. Salle BL, Delvin EE, Lapillonne A *et al.* (2000) Perinatal metabolism of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 71, 1317S-1324S.
164. Shahtaheri SM, Aaron JE, Johnson DR *et al.* (1999) Changes in trabecular bone architecture in women during pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 106, 432-438.
165. Zeni SN, Soler CRO, Lazzari A *et al.* (2003) Interrelationship between bone turnover markers and dietary calcium intake in pregnant women: a longitudinal study. *Bone* 33, 606-613.
166. Koo WW, Walters JC, Esterlitz J *et al.* (1999) Maternal calcium supplementation and fetal bone mineralization. *Obstet Gynecol* 94, 577-582.
167. Kalkwarf HJ, Specker BL, Bianchi DC *et al.* (1997) The effect of calcium supplementation on bone density during lactation and after weaning. *N Engl J Med* 337, 523-528.
168. Jarjou LM, Sawo Y, Goldberg GR *et al.* (2013) Unexpected long-term effects of calcium supplementation in pregnancy on maternal bone outcomes in women with a low calcium intake: a follow-up study. *Am J Clin Nutr* 98, 723-730.
169. Prentice A, Jarjou LM, Cole TJ *et al.* (1995) Calcium requirements of lactating Gambian mothers: effects of a calcium supplement on breast-milk calcium concentration, maternal bone mineral content, and urinary calcium excretion. *Am J Clin Nutr* 62, 58-67.
170. Kovacs CS (2001) Calcium and bone metabolism in pregnancy and lactation. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2344-2348.
171. Walker AR, Richardson B, Walker F (1972) The influence of numerous pregnancies and lactations on bone dimensions in South African Bantu and Caucasian mothers. *Clin Sci* 42, 189-196.
172. Hopkinson JM, Butte NF, Ellis K *et al.* (2000) Lactation delays postpartum bone mineral accretion and temporarily alters its regional distribution in women. *J Nutr* 130, 777-783.
173. Ferrari S (2004) Genetics, Nutrition, and Bone Health. In *Nutrition and Bone Health*, pp. 19-41 [M Holick and B Dawson-Hughes, editors]: Humana Press.
174. Eisman JA (1999) Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 20, 788-804.

BIBLIOGRAFÍA

175. Ferrari S, Rizzoli R, Bonjour J-P (2000) Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral homeostasis. In *The Genetics of Osteoporosis and Metabolic Bone Disease*, pp. 45-60: Springer.
176. Barker DJP (1998) *Mothers, babies, and health in later life*: Elsevier Health Sciences.
177. Haugen AC, Schug TT, Collman G *et al.* (2015) Evolution of DOHaD: the impact of environmental health sciences. *J Dev Orig Health Dis* 6, 55-64.
178. Gillman MW (2005) Developmental origins of health and disease. *N Engl J Med* 353, 1848-1850.
179. Cooper C, Javaid MK, Taylor P *et al.* (2002) The fetal origins of osteoporotic fracture. *Calcif Tissue Int* 70, 391-394.
180. Cooper C, Harvey N, Cole Z *et al.* (2009) Developmental origins of osteoporosis: the role of maternal nutrition. *Adv Exp Med Biol* 646, 31-39.
181. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C *et al.* (2008) Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* 359, 61-73.
182. Cooper C, Westlake S, Harvey N *et al.* (2006) Review: developmental origins of osteoporotic fracture. *Osteoporos Int* 17, 337-347.
183. Harvey NC, Mahon PA, Kim M *et al.* (2012) Intrauterine growth and postnatal skeletal development: findings from the Southampton Women's Survey. *Paediatr Perinat Epidemiol* 26, 34-44.
184. Javaid MK, Cooper C (2002) Prenatal and childhood influences on osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16, 349-367.
185. Jones G, Riley M, Dwyer T (2000) Maternal diet during pregnancy is associated with bone mineral density in children: a longitudinal study. *European journal of clinical nutrition* 54, 749-756.
186. Yin J, Dwyer T, Riley M *et al.* (2010) The association between maternal diet during pregnancy and bone mass of the children at age 16. *Eur J Clin Nutr* 64, 131-137.

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

187. Tobias JH, Steer CD, Emmett PM *et al.* (2005) Bone mass in childhood is related to maternal diet in pregnancy. *Osteoporos Int* 16, 1731-1741.
188. Harvey NC, Javaid MK, Arden NK *et al.* (2010) Maternal predictors of neonatal bone size and geometry: the Southampton Women's Survey. *J Dev Orig Health Dis* 1, 35-41.
189. Harvey N, Dennison E, Cooper C (2014) Osteoporosis: A Lifecourse Approach. *Journal of Bone and Mineral Research* 29, 1917-1925.
190. Ganpule A, Yajnik CS, Fall CH *et al.* (2006) Bone mass in Indian children--relationships to maternal nutritional status and diet during pregnancy: the Pune Maternal Nutrition Study. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2994-3001.
191. Cole ZA, Gale CR, Javaid MK *et al.* (2009) Maternal dietary patterns during pregnancy and childhood bone mass: a longitudinal study. *J Bone Miner Res* 24, 663-668.
192. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B *et al.* (2000) Peak bone mass. *Osteoporos Int* 11, 985-1009.
193. Bonjour JP, Theintz G, Law F *et al.* (1994) Peak bone mass. *Osteoporos Int* 4 Suppl 1, 7-13.
194. Matkovic V, Kostial K, Simonovic I *et al.* (1979) Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. *Am J Clin Nutr* 32, 540-549.
195. Mahan LK, Escott-Stump S, Raymond JL (2013) *Krause Dietoterapia*: Elsevier Health Sciences Spain.
196. Matkovic V, Jelic T, Wardlaw GM *et al.* (1994) Timing of peak bone mass in Caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. Inference from a cross-sectional model. *J Clin Invest* 93, 799-808.
197. Recker RR, Davies KM, Henders SM *et al.* (1992) Bone gain in young adult women. *JAMA* 268, 2403-2408.
198. Newton-John H, Morgan DB (1970) 27 The Loss of Bone with Age, Osteoporosis, and Fractures. *Clinical orthopaedics and related research* 71, 229-252.
199. Ferrari S, Rizzoli R, Slosman D *et al.* (1998) Familial Resemblance for Bone Mineral Mass Is Expressed before Puberty 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83, 358-361.

BIBLIOGRAFÍA

200. Dertina D, Loro M, Sayre J *et al.* (1998) Childhood bone measurements predict values at young adulthood. *Bone* 23, S288.
201. Rizzoli R (2014) Nutritional aspects of bone health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28, 795-808.
202. Holick MF, Dawson-Hughes B (2004) *Nutrition and bone health*: Springer.
203. Health UDo, Services H (2004) Bone health and osteoporosis: a report of the Surgeon General.
204. Cooper C, Eriksson J, Forsen T *et al.* (2001) Maternal height, childhood growth and risk of hip fracture in later life: a longitudinal study. *Osteoporosis International* 12, 623-629.
205. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. (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. *J Nutr* 123, 1939-1951.
206. Reeves PG (1997) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 127, 838S-841S.
207. Rosenquist C, Qvist P, Bjarnason N *et al.* (1995) Measurement of a more stable region of osteocalcin in serum by ELISA with two monoclonal antibodies. *Clin Chem* 41, 1439-1445.
208. DGKC (1970) [Recommendations of the German Society for Clinical Chemistry. Standardization of methods for the determination of enzyme activities in biological fluids]. *Z Klin Chem Klin Biochem* 8, 658-660.
209. Rosalki SB, Foo AY, Burlina A *et al.* (1993) Multicenter evaluation of Iso-ALP test kit for measurement of bone alkaline phosphatase activity in serum and plasma. *Clin Chem* 39, 648-652.
210. Wenger C, Kaplan L (editors) (1984) *Alkaline phosphatase*, 1st edition ed, *Clinical Chemistry Theory, Analysis and Correlation*: Mosby.
211. Seibel MJ (2006) Biochemical markers of bone turnover part II: clinical applications in the management of osteoporosis. *Clin Biochem Rev* 27, 123-138.

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

212. Husdan H, Rapoport A (1968) Estimation of creatinine by the Jaffe reaction. A comparison of three methods. *Clin Chem* 14, 222-238.
213. Feldman D, Marcus R, Nelson D *et al.* (2007) *Osteoporosis*: Elsevier Science.
214. Colares Neto GP, Pereira RM, Alvarenga JC *et al.* (2017) Evaluation of bone mineral density and microarchitectural parameters by DXA and HR-pQCT in 37 children and adults with X-linked hypophosphatemic rickets. *Osteoporos Int*.
215. Lewiecki EM (2015) *Osteoporosis: clinical evaluation*.
216. Thomas M, Weisman SM (2006) Calcium supplementation during pregnancy and lactation: effects on the mother and the fetus. *Am J Obstet Gynecol* 194, 937-945.
217. Kovacs CS, Fuleihan Gel H (2006) Calcium and bone disorders during pregnancy and lactation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 35, 21-51, v.
218. Imdad A, Bhutta ZA (2012) Effects of calcium supplementation during pregnancy on maternal, fetal and birth outcomes. *Paediatr Perinat Epidemiol* 26 Suppl 1, 138-152.
219. Hacker AN, Fung EB, King JC (2012) Role of calcium during pregnancy: maternal and fetal needs. *Nutr Rev* 70, 397-409.
220. Davey MR, De Villiers J, Lipschitz S *et al.* (2012) Pregnancy-and lactation-associated osteoporosis. *JEMDSA* 17, 149-153.
221. Shackelford ME, Collins TF, Black TN *et al.* (1994) Mineral interactions in rats fed AIN-76A diets with excess calcium. *Food Chem Toxicol* 32, 255-263.
222. Liu Z, Qiu L, Chen YM *et al.* (2011) Effect of milk and calcium supplementation on bone density and bone turnover in pregnant Chinese women: a randomized controlled trial. *Arch Gynecol Obstet* 283, 205-211.
223. Demmer E, Gertz E, Rogers T *et al.* (2014) Effect of dairy foods vs. calcium and vitamin-D supplements on bone metabolism: use of ⁴¹Ca tracer (1018.12). *The FASEB Journal* 28.
224. Kovacs CS (2011) Calcium and bone metabolism disorders during pregnancy and lactation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 40, 795-826.

BIBLIOGRAFÍA

225. Zeni SN, Di Gregorio S, Mautalen C (1999) Bone mass changes during pregnancy and lactation in the rat. *Bone* 25, 681-685.
226. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD (2006) The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* 17, 319-336.
227. Karlsson C, Obrant KJ, Karlsson M (2001) Pregnancy and lactation confer reversible bone loss in humans. *Osteoporos Int* 12, 828-834.
228. Okyay DO, Okyay E, Dogan E *et al.* (2013) Prolonged breast-feeding is an independent risk factor for postmenopausal osteoporosis. *Maturitas* 74, 270-275.
229. Sahin Ersoy G, Giray B, Subas S *et al.* (2015) Interpregnancy interval as a risk factor for postmenopausal osteoporosis. *Maturitas* 82, 236-240.
230. Kruger MC, Brown KE, Collett G *et al.* (2003) The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 683-688.
231. Roberfroid MB (2007) Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr* 137, 2493S-2502S.
232. Iwami K, Moriyama T (1993) Effects of short chain fatty acid, sodium butyrate, on osteoblastic cells and osteoclastic cells. *Int J Biochem* 25, 1631-1635.
233. Lopez JM, Gonzalez G, Reyes V *et al.* (1996) Bone turnover and density in healthy women during breastfeeding and after weaning. *Osteoporos Int* 6, 153-159.
234. Ivaska KK, Lenora J, Gerdhem P *et al.* (2008) Serial assessment of serum bone metabolism markers identifies women with the highest rate of bone loss and osteoporosis risk. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 2622-2632.
235. Chesnut CH, 3rd, Bell NH, Clark GS *et al.* (1997) Hormone replacement therapy in postmenopausal women: urinary N-telopeptide of type I collagen monitors therapeutic effect and predicts response of bone mineral density. *Am J Med* 102, 29-37.
236. Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC *et al.* (1996) Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *J Bone Miner Res* 11, 1531-1538.

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia

237. Gerdhem P, Ivaska KK, Alatalo SL *et al.* (2004) Biochemical markers of bone metabolism and prediction of fracture in elderly women. *J Bone Miner Res* 19, 386-393.
238. Corbellini CN, Krook L, Nathanielsz PW *et al.* (1991) Osteochondrosis in fetuses of ewes overfed calcium. *Calcif Tissue Int* 48, 37-45.
239. Ramakrishnan U, Manjrekar R, Rivera J *et al.* (1999) Micronutrients and pregnancy outcome: a review of the literature. *Nutrition Research* 19, 103-159.
240. Lapillonne A, Salle BL, Glorieux FH *et al.* (2004) Bone mineralization and growth are enhanced in preterm infants fed an isocaloric, nutrient-enriched preterm formula through term. *Am J Clin Nutr* 80, 1595-1603.
241. Kovacs CS (2008) Vitamin D in pregnancy and lactation: maternal, fetal, and neonatal outcomes from human and animal studies. *Am J Clin Nutr* 88, 520S-528S.
242. Matkovic V, Heaney RP (1992) Calcium balance during human growth: evidence for threshold behavior. *Am J Clin Nutr* 55, 992-996.
243. Prentice A (2003) Micronutrients and the bone mineral content of the mother, fetus and newborn. *J Nutr* 133, 1693S-1699S.
244. Scholz-Ahrens KE, Schrezenmeir J (2007) Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. *J Nutr* 137, 2513S-2523S.
245. Chen TH, Chen WM, Hsu KH *et al.* (2007) Sodium butyrate activates ERK to regulate differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 355, 913-918.
246. Katono T, Kawato T, Tanabe N *et al.* (2008) Sodium butyrate stimulates mineralized nodule formation and osteoprotegerin expression by human osteoblasts. *Arch Oral Biol* 53, 903-909.

10. ANEXO

La investigación que ha dado lugar a la realización del manuscrito de esta tesis doctoral ha generado las siguientes publicaciones, presentaciones en congresos y patentes:

Bueno Vargas, P. et al. (2016). Influencia del suplemento con inulina enriquecida con fructooligosacáridos sobre el contenido y la densidad mineral ósea tras el parto y la lactación en ratas. *Nutr Hosp*, 1074.

Bueno Vargas, P. et al (2016). Maternal Dietary Supplementation with Oligofructose-Enriched Inulin in Gestating/Lactating Rats Preserves Maternal Bone and Improves Bone Microarchitecture in Their Offspring. *PLoS one*, 11(4), e0154120.

Bueno-Vargas, P., Manzano, M., Jiménez, M. L et al (2014). Nutritional Strategy to Protect Maternal Bone Loss During Gestation and Lactation as an Approach to Prevent Osteoporosis Later in Life. *Osteoporosis International*, 25,S274

Bueno Vargas, P. et al (abstract) Impact of Maternal Nutrition on Programming Offspring Bone Development. 4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (WCPGHAN) Taiwan, 2012

Manzano, M., **Bueno-Vargas, P.,** Jiménez, M. L. et al (2010). Maximizing the Peak Bone Mass Accretion During Adolescence as a Strategy to Prevent Osteoporosis in Late Life: Prebiotic Supplementation vs Calcium Fortification. *OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL*, 21, 220.

Patent application (WO 2014105874 A1) RICARDO RUEDA CABRERA, MANUEL CRISTÓBAL MANZANO MARTÍN, **MARÍA DEL PILAR BUENO VARGAS,** JOSÉ MARÍA LÓPEZ PEDROSA. "Methods for maintaining bone quality". Pub. Date: 3 Jul 2014

Patent application (WO2012129222 A1) JOSE MARIA LOPEZ PEDROSA, MANUEL MANZANO MARTIN, RICARDO RUEDA CABRERA. "Methods for improving bone health in infants using long chain polyunsaturated fatty acids". Pub. Date: 27 Sep 2012



Trabajo Original

Obesidad y síndrome metabólico

Influencia del suplemento con inulina enriquecida con fructooligosacáridos sobre el contenido y la densidad mineral ósea tras el parto y la lactación en ratas

Influence of supplementation with oligofructose-enriched inulin on bone mineral content and density after delivery and lactation in rats

Pilar Bueno Vargas^{1,2}, Manuel Manzano Martín¹, Inmaculada López Aliaga² y José M.^a López Pedrosa¹

¹Abbott Nutrition R&D. Granada. ²Departamento de Fisiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada e Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos "José Mataix". Universidad de Granada. Granada

Resumen

Introducción: la gestación y lactancia están relacionadas con pérdidas temporales en la densidad mineral ósea (DMO) materna. Una suplementación con calcio podría resultar beneficiosa para evitar la pérdida de masa ósea del esqueleto materno. Otros nutrientes como los prebióticos han sido identificados como responsables de un incremento en la absorción de minerales, pudiendo condicionar la mineralización ósea.

Objetivo: estudiar el efecto de la suplementación de la dieta materna con el prebiótico inulina enriquecida con oligofructosa, durante la gestación y la lactancia sobre el contenido mineral óseo (CMO) y la DMO al final del periodo de lactancia.

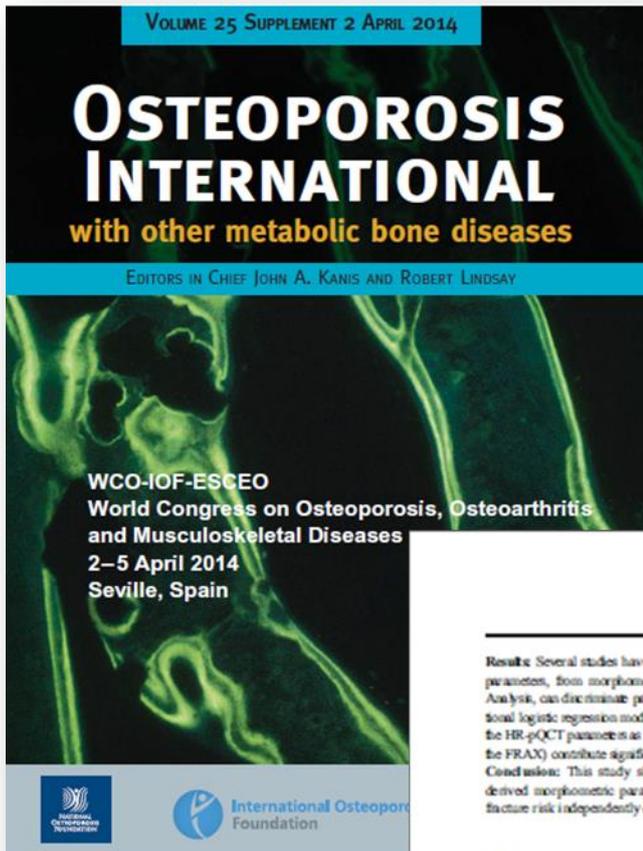
Métodos: las ratas gestantes fueron alimentadas con dieta estándar (grupo CC), dieta fortificada en calcio (grupo Ca) o enriquecida con el prebiótico inulina enriquecida con oligofructosa (grupo Pre) hasta el final del periodo de lactancia. Posteriormente se evaluó el CMO y DMO por absorciometría de rayos X (DEXA) y el pH del contenido cecal.

Resultados: en términos generales, el grupo Pre presenta los mayores valores absolutos de CMO y DMO de entre los tres grupos, siendo en la tibia significativamente diferentes en los grupos CC y Pre frente al grupo Ca. El pH del contenido cecal del grupo Pre es significativamente inferior al de los grupos CC y Ca.

Conclusión: la suplementación con inulina enriquecida con oligofructosa, en condiciones nutricionales no deficientes en calcio, durante la gestación y la lactancia, ejerce una protección del esqueleto materno en las ratas y puede ser considerada como una estrategia nutricional para proteger la masa ósea materna en el periodo perinatal.

Palabras clave:

Gestación. Lactación.
Prebióticos. Calcio.
Densidad ósea.



Osteoporosis Int

Results: Several studies have demonstrated that some structural parameters, from morphometry and from the Finite Element Analysis, can discriminate patients with fragility fracture. Conditional logistic regression models will be used to estimate whether the HR-pQCT parameters as well as other CRFs (not included in the FRAX) contribute significantly to the risk of fracture.

Conclusion: This study should demonstrate if HR-pQCT derived morphometric parameters and bone strength predict fracture risk independently of DXA and FRAX score.

P348
EXPRESSION OF GAP JUNCTION PROTEINS
CONNEXINS 26, 30, AND 43

L. A. Holzer¹, A. Čer², G. Holzer³

¹Department of Orthopaedic Surgery, Medical University of Graz, Graz, Austria, ²Faculty of Health Sciences, University of Primorska, Izola, Slovenia, ³Department of Orthopaedics, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Objective: Dupuytren's disease (DD) is a benign fibroproliferative process of the palmar aponeurosis showing similarities to wound healing. Communication of cells involved in wound healing is mediated by the composition of gap junction (GJ) proteins. We investigated the expression of 3 GJ proteins, connexins 26, 30, and 43 (Cx26, Cx30, and Cx43) in DD.

Material and Methods: Fragments of Dupuytren's tissue from 31 patients (mean age 56 (30-76) years, 24 male) were analyzed immunohistochemically and compared to control tissue for expression of the GJ proteins Cx26, Cx30, and Cx43 and also α -smooth muscle actin (α -SMA).

Results: 14 of 31 samples could be attributed to the involutonal phase (α -SMA positive) whereas 17 samples had to be considered cords in the residual phase (α -SMA negative). Expression of Cx26 and Cx43 was seen in 12 of the 14 samples from the involutonal phase, and Cx30 was seen in 7 of those. Only 4 of the 17 samples from the residual phase showed any Cx, and there was none in the controls.

Conclusion: The high expression of GJ proteins Cx26, Cx30, and Cx43 in α -SMA positive myofibroblast-rich nodules, which are characteristic of the active involutonal phase of DD, suggests that connexins could be a novel treatment target for the treatment of DD.

P349
NUTRITIONAL STRATEGY TO PROTECT
MATERNAL BONE LOSS DURING GESTATION AND
LACTATION AS AN APPROACH TO PREVENT
OSTEOPOROSIS LATER IN LIFE

P. Bueno-Muñoz¹, M. Muñoz¹, M. L. Jiménez¹, R. Ruoffa¹, J. M. Lopez-Pedrosa¹

¹Discovery R&D, Abbott Nutrition, Granada, Spain

Objective: Pregnancy and lactation have been related with temporary decreases in maternal BMD. Nutrition during these periods could be key on maternal bone preservation. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) and probiotics have been shown to have healthy effects on age-associated bone loss. Currently, maternity is becoming closer to the perimenopause period with the subsequent negative effect of increasing the risk of bone loss associated to the onset of menopause. Therefore, strategies addressed to reduce maternal bone loss are crucial to delay bone deterioration later in life. The aim of this study was to compare the effectiveness of calcium fortification vs. probiotic supplementation or LCPUFAs fortification in pregnant rats as a nutritional approach to reduce bone loss produced during gestation and lactation.

Material and Methods: Pregnant Sprague-Dawley rats were divided into four groups: Control group (CC group) was fed with a standard semipurified diet until the end of the lactation period. Ca group, Pre group and LCPUFAs were fed with the same diet fortified with 0.5 % calcium carbonate (total calcium content 1 %), supplemented with an inulin-type fructans (7.5 % of the total carbohydrate) or fortified with LCPUFAs (3.5 % Eupoly-DHA[®]), respectively. At the end of the lactation, BMD and bone mineral content (BMC) were determined by DXA; bone volume fraction as well as 3D parameters of trabecular architecture (trabecular number, thickness, separation and connectivity density) were analyzed by μ CT.

Results: In appendicular bones, higher BMD and BMC were found for Pre and LCPUFAs groups as compared with calcium fortified group. Furthermore μ CT data showed that Pre and LCPUFAs groups had an increase in bone volume/tissue volume, trabecular thickness, trabecular number and connectivity density value, with a concomitant reduction in the trabecular separation as compared not only with control but also and with calcium fortification group.

Conclusion: Based on our data, both probiotic supplementation as well as LCPUFAs fortification exert a protection on maternal skeleton during pregnancy and lactation. The beneficial effect may delay the onset of osteoporosis and its deleterious derived-consequences later in life.

P350
CHEMICAL COMPOSITION OF BONES AND
LOWER INCISOR DENTIN IN MATURE RATS
AFTER 60-DAY ADMINISTRATION OF SODIUM
BENZOATE

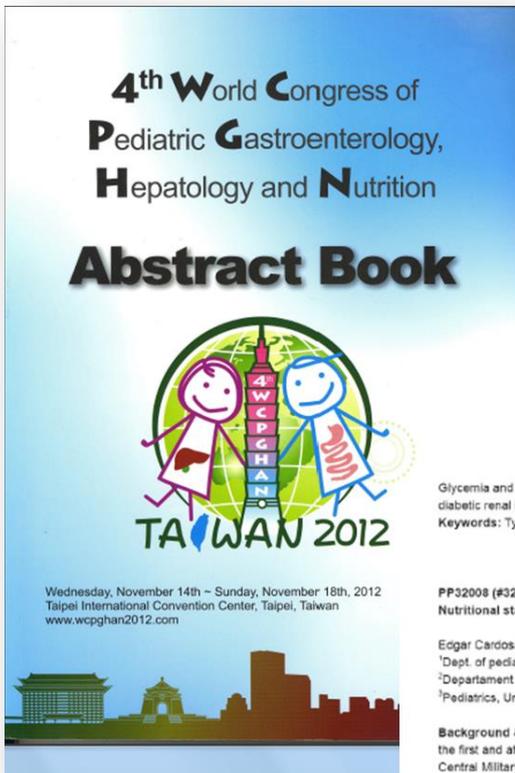
L. Galina¹, L. Viadyslav², T. Alexey², M. Vnaly²

¹National University of Physical Education and Sport of Ukraine, Kiev, Ukraine, ²Lugansk State Medical University, Lugansk, Ukraine

Springer

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia



Glycemia and lipid control is important to prevent, postpone or to improve the diabetic renal injury.

Keywords: Type 1 diabetes mellitus; dyslipidemia; microalbuminuria

PP32008 (#32025)

Nutritional status of hospitalized children at the Central Militar Hospital

Edgar Cardoso¹, Reynaldo Michel², Gabriela Herrera³

¹Dept. of pediatrics, Consejo mexicano de Gastroenterología, Mexico

²Department of pediatrics, Hospital Central Militar, Mexico

³Pediatrics, Unidad de Especialidades Medicas, Mexico

Background & Aims: Determine the nutritional status in pediatric patients on the first and at the seventh day of hospitalization in the Pediatric area of the Central Military Hospital, using Z Score, making the following assessments: weight / age, height for age, weight / height and body mass index (BMI). Identify

intervention contributed largest (45%), followed by inpatient care (37%), outpatient care (12%), and monitoring and labs (5%). Indirect costs were 34% of the estimated total costs.

Conclusion: Atopic diseases in young children are associated with substantial costs to Thailand. These costs can be reduced through nutritional intervention clinically proven to effectively decrease the incidence of atopic diseases.

Keywords: atopic disease, cow's milk allergy, cost of illness, Thailand, atopic dermatitis, rhinitis, asthma

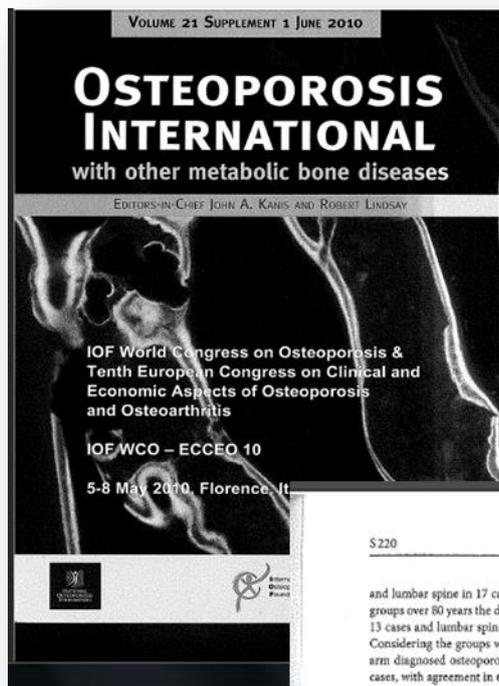
PP32010 (#32031)

Impact of Maternal Nutrition on Programming Offspring Bone Development

Pilar Bueno-Vargas¹, Manuel Manzano¹, Ricardo Rueda¹, Jose M López-Pedrosa¹

¹Abbott Nutrition Discovery-RD, Granada, Spain

— Q55 —



S 220

Osteoporos Int (2010) 21: [Suppl] S25-S388

and lumbar spine in 17 cases, with agreement in 11 cases. In age groups over 80 years the distal forearm diagnosed osteoporosis in 13 cases and lumbar spine in 4 cases, with agreement in 4 cases. Considering the groups with vertebral exclusion, the distal forearm diagnosed osteoporosis in 12 cases and lumbar spine in 10 cases, with agreement in 6 cases. The group with no vertebral exclusion had 50 cases of osteoporosis diagnosed by forearm studies and 52 by lumbar spine analysis, with agreement in 20 cases. **Conclusions:** The forearm study appeared to be more significant among patients over 80 years considering osteoporosis diagnosis, and a slight advantage was noticed in the group with vertebral exclusion. Further studies with more patients are necessary to provide evidence that the forearm studies can benefit a selected group in osteoporosis diagnosis, and to justify cost-effectiveness.

Disclosure of Interest: None Declared

P534 - MAXIMIZING THE PEAK BONE MASS ACCRETION DURING ADOLESCENCE AS A STRATEGY TO PREVENT OSTEOPOROSIS IN LATE LIFE: PREBIOTIC SUPPLEMENTATION VS CALCIUM FORTIFICATION
M. Manzano¹, P. Bueno-Vargas¹, M. L. Jimenez¹, R. Rueda¹, J. M. López-Pedrosa^{1,2}

¹Discovery Technology R&D, Abbott Nutrition, Granada, Spain

Aims: Clinical studies have shown that increasing calcium intake during growing period promoted an increase in bone mass. In recent years accumulating knowledge prompted the scientific community to consider that other technologies, including prebiotics, may influence bone mass accretion during growth period. The aim of this study was to compare the effectiveness of calcium fortification vs. prebiotic supplementation in growing rats as a nutritional approach to maximizing and consolidate the peak bone accretion and architecture during adolescence and to prevent or delay the onset of osteoporosis in later life

Methods: Weaned Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups: Control group (CC group) was fed with a standard semi-purified diet until the end of the adolescence period. Ca group and Syn-1 group were fed with the same diet fortified with 0.5% calcium carbonate (total calcium content 1%) or supplemented with an inulin-type fructans (7.5% of the total carbohydrate), respectively. At the end of the study period, bone mineral density (BMD) was determined by dual-energy X-ray absorptiometry; bone volume fraction as well as 3-D parameters of trabecular architecture (trabecular number, thickness and separation, connectivity density and structure model index) were analyzed by micro-computed tomography (μ CT). To evaluate differences attributable to the diet we performed a one-way ANOVA with a Dunnett posttest

volume/tissue volume, trabecular thickness, trabecular number and connectivity density value, with a concomitant reduction in the trabecular separation. However, in vertebra both nutritional approaches promoted a higher trabecular consolidation by increasing endocortical bone surface

Conclusions: Based on our data, prebiotic supplementation represents a superior technology than calcium fortification for maximizing and for consolidating the peak of bone mass and architecture in the adolescence.

Disclosure of Interest: M. Manzano Employee of: Abbott Nutrition, P. Bueno-Vargas Employee of: Abbott Nutrition, M. Jimenez Employee of: Abbott Nutrition, R. Rueda Employee of: Abbott Nutrition, J. López-Pedrosa Employee of: Abbott Nutrition

P535 - SEX SPECIFIC REFERENCE DATA FOR BONE DENSITY PARAMETERS MEASURED WITH DUAL ENERGY X-RAY ABSORPTIOMETRY IN A LARGE COHORT OF HEALTHY INDIAN CHILDREN AND ADOLESCENTS

R. Marwaha^{1,2}, N. Tandon², C. Shivaprasad³, K. Mani⁴, R. Kanwar⁵, A. Sastry⁵, K. Bhadra⁵, S. Singh⁵

¹Endocrinology, ²Institute of Nuclear Medicine and Allied Sciences, Delhi, ³Endocrinology & Metabolism, ⁴Biostatistics, ⁵All India Institute of Medical Sciences, New Delhi, India

Aims: Background: The correct interpretation of BMD in children requires appropriate reference data matched for sex, age, height, weight, pubertal development and ethnicity.

Aims: The primary aim of our study was to provide sex-specific reference centile curves of bone densitometric parameters measured by DXA, for Indian children, by using the LMS technique and to evaluate the determinants of BMC in this population.

Methods: Methods: The study population consisted of 1905 healthy children (835 male, 1070 female) aged 5-17 years. Anthropometric, biochemical and hormonal parameters were measured in all study subjects. Bone mineral content and BMD was measured using a LUNAR Prodigy Oracle DXA machine. Bone mineral apparent density (BMAD) was calculated for the lumbar spine and femoral neck. Sex-specific centile curves for BMAD (spine and femoral neck) and BMC (total body and spine) were generated using LMS method. For further interpretation of results, sex specific centile curves were derived for bone area for height, and BMC for bone area at spine and total body, using the approach suggested by Molgaard.

Results: Results: Height of the study population was comparable to the reference population from Delhi. Biochemical evidence of vitamin D deficiency was highly prevalent in the study group. 95% of boys and 98% of girls had 25(OH)D levels less than 50nmol/L.

TESIS DOCTORAL

Early Programming: Efecto de la Suplementación con Prebióticos de la Dieta Materna Durante la Gestación y Lactancia sobre el Metabolismo Óseo de la Madre y de su Descendencia



(11) **EP 2 745 706 A1**

(12) **EUROPEAN PATENT APPLICATION**

(43) Date of publication:
25.06.2014 Bulletin 2014/26

(51) Int Cl.:
A23L 1/30^(2006.01) A23L 1/29^(2006.01)
A61K 31/20^(2006.01)

(21) Application number: **12382533.3**

(22) Date of filing: **24.12.2012**

(84) Designated Contracting States:
AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
PL PT RO RS SE SI SK SM TR
Designated Extension States:
BA ME

- **LÓPEZ PEDROSA, José María**
18190 CENES DE LA VEGA (Granada) (ES)
- **MANZANO MARTÍN, Manuel Cristóbal**
18151 GRANADA (ES)
- **RUEDA CABRERA, Ricardo**
18008 GRANADA (ES)

(71) Applicant: **Abbott Laboratories, Inc.**
Abbott Park, IL 60064 (US)

(74) Representative: **Ungria López, Javier**
Avda. Ramón y Cajal, 78
28043 Madrid (ES)

(72) Inventors:
• **BUENO VARGAS, María del Pilar**
18012 GRANADA (ES)

(54) **Methods for maintaining bone quality**

(57) Methods for maintaining bone quality in an individual during pregnancy, during lactation, or during pregnancy and lactation are provided. The methods include providing an effective amount of a long chain polyunsaturated fatty acid, an effective amount of a prebiotic, or combinations thereof. The effective amount of the long

chain polyunsaturated fatty acid, the effective amount of the prebiotic, or combinations thereof may be provided in a nutritional composition. The bone quality that is maintained may include bone microarchitecture, bone mineral density, bone mineral content, or combinations thereof.

Tibia-
Tb-Th

150

