



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“BIODISPONIBILIDAD DEL CALCIO PRESENTE EN LA ESPECIE *Opuntia ficus indica* EN DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO PARA LA FORMACIÓN DE MASA ÓSEA EN UN MODELO DE RATAS EN CRECIMIENTO”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

M. EN C. EZEQUIEL HERNÁNDEZ BECERRA

DIRIGIDO POR:

DRA. JUANA ISELA ROJAS MOLINA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

MÉXICO

NOVIEMBRE, 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

"BIODISPONIBILIDAD DEL CALCIO PRESENTE EN LA ESPECIE *Opuntia ficus indica* EN DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO PARA LA FORMACIÓN DE MASA ÓSEA EN UN MODELO DE RATAS EN CRECIMIENTO"

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

M. EN C. EZEQUIEL HERNÁNDEZ BECERRA

DIRIGIDO POR:

DRA. JUANA ISELA ROJAS MOLINA

SINODALES

Dra. Juana Isela Rojas Molina
Presidente

Dra. Elsa Gutiérrez Cortez
Secretario

Dra. Alejandra Rojas Molina
Vocal

Dra. Ma. de los Ángeles Aguilera Barreiro
Suplente

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Suplente


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director Facultad de Ciencias Químicas


Firma


Firma

Alejandra Rojas M.
Firma


Firma


Firma


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro
Octubre, 2017

RESUMEN

El consumo de calcio (Ca) durante la infancia y adolescencia es primordial para que el esqueleto alcance el pico máximo de densidad mineral ósea, cuya importancia se relaciona con la resistencia del hueso y el riesgo de fractura en la edad adulta. En las últimas décadas, el consumo de Ca ha disminuido considerablemente debido a factores fisiológicos, digestivos, culturales y económicos principalmente, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de Ca en la dieta. El contenido de Ca y oxalatos en el nopal (*Opuntia ficus indica*) se modifica con la edad de esta cactácea, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del consumo de *O. ficus indica* en diferentes etapas de desarrollo como fuente de Ca sobre la absorción aparente de calcio (AACa), marcadores bioquímicos de remodelado óseo y en las propiedades densitométricas, mecánicas, microestructurales y cristalinas del fémur de ratas en crecimiento. Se utilizaron ratas macho recién destetadas y se alimentaron con cladodios de *O. ficus indica* en etapa de madurez temprana (25 y 60 días de desarrollo pertenecientes a los grupos N-60 y N-200, respectivamente) y cladodios en etapa de madurez tardía (100 y 135 días de desarrollo pertenecientes a los grupos N-400 y N-600, respectivamente) durante 6 semanas. Adicionalmente, se incluyó un grupo control alimentado con CaCO_3 como fuente de Ca. Las dietas se ajustaron a un contenido de Ca de 5 g/kg dieta. La AACa en el grupo N-60 fue significativamente menor ($P \leq 0.05$) con respecto al grupo control, N-200, N-400 y N-600 en todas las etapas de crecimiento de los animales experimentales. En la pubertad el índice calcio/creatinina urinario (Ca/CrU) en el grupo N-60 fue mayor que los grupos N-200, N-400, N-600 y el control. En la adolescencia dicho índice en todos los grupos a excepción del N-400 fue mayor que en el grupo control y en la etapa adulta dicho índice disminuyó en todos los grupos experimentales con respecto a la pubertad resultando incluso menor que en el grupo control. Los niveles de osteocalcina (OC) en los grupos alimentados con *O. ficus indica* fueron mayores en la etapa puberal y adolescencia con respecto a la etapa adulta. En ésta etapa, los niveles de OC en los grupos alimentados con *O. ficus indica* fueron menores o iguales al control. Los niveles de péptido amino terminal de pro-colágeno tipo I (PINP) se incrementó con la edad de los animales en el grupo N-600 y control. El nivel de este biomarcador en los grupos N-60 y N-200 se redujo desde la pubertad hasta la edad adulta. En el grupo N-400 la concentración de PINP no se modificó durante el crecimiento de los animales. La DMO en todos los grupos aumentó con la edad y los valores más altos se observaron en los grupos N-600 y control durante la pubertad y adolescencia. La fuerza de ruptura de los fémures fue significativamente menor ($P \leq 0.05$) en los grupos N-60 y N-200 comparada con los grupos N-400, N-600 y control. El grosor cortical (Ct.Wi) y el grosor trabecular (Tb.Th) de los fémures en los grupos control y N-600 fueron significativamente mayores ($P \leq 0.05$) que los Ct.Wi y Tb.Th de los fémures en los grupos N-60 y N-200. La separación trabecular de los fémures en los grupos N-60 y N-200 presentaron los valores más altos en comparación con todos los grupos experimentales. Los fémures de los grupos control, N-600 y N-400 mostraron el mayor contenido de Ca. Finalmente, el porcentaje de cristalinidad y tamaño del cristal de los compuestos cristalinos (hidroxiapatita) en el fémur del grupo N-60 fue menor en comparación con los grupos N-200, N-400, N-600 y control. Estos resultados demuestran, por primera vez, que el Ca presente en los cladodios de *O. ficus indica* es biodisponible y capaz de mejorar la densidad mineral, las propiedades mecánicas, microestructurales y cristalinas de los huesos, por lo que el consumo de cladodios en la etapa de madurez tardía podría tener un impacto benéfico sobre la salud ósea.

Palabras clave: *Opuntia ficus indica*, calcio, remodelado óseo, densidad mineral ósea, microestructura ósea, propiedades biomecánicas, cristalinidad del hueso.

ABSTRACT

An adequate intake of calcium during childhood and adolescence is necessary to achieve the peak bone mass (PBM), which is related to the adolescent growth spurt. A low PBM is a contributing factor for determining risk of fractures in children and osteoporosis in adulthood. In the last decades, the calcium consumption has diminished considerably due to physiological, digestive, cultural and economic factors among others; consequently, it is necessary to search new calcium sources in diet. Recently, it has been reported that calcium and oxalate content in *Opuntia ficus indica* cladodes change with the growth stage of the plant, thus the goal of this work was to evaluate the effect of *O. ficus indica* at different maturity stages as a calcium source within the diet on apparent calcium absorption, biochemical markers of bone remodeling, bone mineral density (BMD), mechanical, microstructural, crystalline properties, and mineral content of the femur in growing rats. Male weanling rats were fed with cladodes at early maturity stage (25 and 60 days of age, belonging to groups N-60 and N-200, respectively) and cladodes at late maturity stage (100 and 135 days of age, belonging to the groups N-400 and N-600, respectively) for 6 weeks. Additionally, a control group fed with calcium carbonate as calcium source was included. All diets were fitted to the same calcium content (5 g/kg diet). The apparent calcium absorption in the N-60 group was significantly lower ($P \leq 0.05$) than that of N-200, N-400, N-600 and control groups in all growth stages of experimental animals. At puberty the urinary calcium/creatinine ratio (Ca/CrU) in the N-60 group was higher than that of the N-200, N-400, N-600 and control groups. During adolescence, the Ca/CrU in all the groups was higher than that in the control group, with the exception of N-400. In the adulthood the Ca/CrU decreased in all experimental groups in comparison to puberty, the levels were lower than those detected in the control group. The osteocalcin (OC) levels in the groups fed with *O. ficus indica* were higher in the puberty and adolescence compared to the adult stage. In the early stages of growth, these levels were greater than or equal to the control group. In adulthood, the OC levels in the groups fed with *O. ficus indica* were less than those of the control group or equivalent. The N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) levels increased with the age of animals in the N-600 and control groups. In contrast, the level of this biomarker in the groups fed with cladodes at early maturity stage (N-60 and N-200 groups) decreased from puberty to adulthood. In the N-400 group the PINP concentration did not change during the growth of animals. BMD in all experimental groups increased with age; nevertheless, the highest values were observed in N-600 and control groups during pubertal and adolescence stages. The failure load of femurs was significantly lower ($p \leq 0.05$) in groups N-60 and N-200 in comparison to N-400, N-600, and control groups. The cortical width (Ct.Wi) and trabecular thickness (Tb.Th) of the femurs in control and N-600 groups were significantly higher ($p \leq 0.05$) than Ct.Wi and Tb.Th of femurs in groups N-60 and N-200. Trabecular separation of the femurs in N-60 and N-200 groups showed the highest values compared with all experimental groups. The highest calcium content in the femurs was observed in control, N-600, and N-400 groups. Finally, the percentage crystallinity and crystal size of crystalline compounds (hydroxyapatite) in the femur of the N-60 group were lower in comparison to the N-200, N-400, N-600 and control groups. The results derived from this research demonstrate, for the first time, that the calcium found in *O. ficus indica* cladodes is actually bioavailable and capable of improving mineral density and mechanical and microstructural properties of the bones. These findings suggest that the consumption of cladodes at late maturity stage within the diet might have a beneficial impact on bone health.

Keywords: *Opuntia ficus indica*, calcium, bone remodeling biomarkers, bone mineral density, bone microstructure, bone crystallinity, biomechanical properties.

El presente trabajo se realizó en los siguientes laboratorios: Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales del Posgrado en Ciencias Químico Biológicas y Bioterio del área de Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), Laboratorio de Fisicoquímica de Alimentos, Microscopia Electrónica de Barrido y Cristalografía de Rayos X en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México (CFATA-UNAM, Campus Juriquilla), Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Alimentos y en los Laboratorios de la Unidad Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán (UNAM). Así mismo, este trabajo se llevó a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través de los fondos otorgados al proyecto CB-2011-01/167769 y como becario del CONACYT.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Sistema esquelético	3
2.2 Fase inorgánica del hueso (minerales).....	5
2.2.1 Calcio	5
2.2.2 Fósforo	7
2.2.2.1 Relación calcio:fósforo (Ca/P) en la dieta	8
2.2.2.2 Relación calcio:fósforo (Ca/P) en el hueso	8
2.2.3 Magnesio	9
2.2.4 Potasio.....	9
2.3 Fase orgánica del hueso.....	10
2.3.1 Interacción entre las fases orgánica e inorgánica (proteínas y minerales) del hueso.....	11
2.3.2 Células osteoclastos y osteoblastos	12
2.3.3 Regulación hormonal del balance calcio/fósforo	12
2.3.3.1 Glándula paratiroides y paratohormona (HPT)	13
2.3.3.2 Glándula tiroides y calcitonina.....	14
2.3.3.3 Vitamina D3 (1,25-di-hidroxicolecalciferol).....	15
2.3.3.4 Hormonas esteroideas	16
2.4 Importancia del consumo de calcio en la salud ósea	16
2.4.1 Metabolismo del calcio en periodo de crecimiento	17
2.5 Técnicas de diagnóstico de la salud ósea	18
2.5.1 Densidad mineral ósea por absorciometría doble de rayos X.....	18
2.5.2 Ultrasonido cuantitativo.....	19
2.5.3 Tomografía computarizada cuantitativa	19

2.5.4 Absorciometría simple de rayos X	20
2.5.5 Análisis cristalográfico mediante difracción de rayos X.....	20
2.5.6 Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo	21
2.5.7 Absorción intestinal aparente de calcio	21
2.5.8 Calcio urinario e índice calcio/creatinina	22
2.5.9 Hidroxiprolina urinaria	22
2.5.10 Fosfatasa ácida/alcalina.....	23
2.5.11 Osteocalcina	23
2.5.12 Pro-péptido amino terminal del pro-colágeno tipo I.....	23
2.6 Prevención y tratamiento de las enfermedades óseas	24
2.7 Tratamientos alternativos (alimentos funcionales)	24
2.8 Composición nutrimental del nopal.....	25
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	27
5. HIPÓTESIS	27
6. OBJETIVOS	28
6.1 Objetivo general.....	28
6.2 Objetivos particulares	28
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
7.1 Material vegetal.....	29
7.1.1 Preparación de muestras	29
7.1.2 Análisis del contenido de minerales.....	30
7.2 Elaboración de las dietas experimentales.....	31
7.3 Absorción aparente de minerales del nopal en ratas Wistar	32
7.3.1 Determinación de minerales en heces de rata	32
7.4 Determinación de marcadores bioquímicos de formación ósea.....	33
7.4.1 Análisis de osteocalcina en suero	34
7.4.2 Análisis del pro-péptido amino terminal del pro-colágeno tipo I (PINP)	34
7.4.3 Determinación del índice calcio/creatinina urinario (Ca/CrU).....	35
7.5 Determinación <i>in vivo</i> de la densidad mineral ósea mediante absorciometría..	36
simple de rayos X (SXA)	36
7.5.1 Procedimiento para la obtención de la radiografía en el sistema SXA.....	37

7.5.2 Cálculo de la DMO	38
7.6 Pruebas mecánicas en fémur de ratas alimentadas con nopal <i>O. ficus indica</i> .39	
7.6.1 Prueba de flexión en tres puntos	40
7.6.2 Prueba de compresión	40
7.7 Análisis micro estructural del fémur por microscopía electrónica de barrido...41	
7.8 Análisis de cristalinidad del fémur mediante difracción de rayos X.....42	
7.9 Contenido mineral en fémur de ratas alimentadas con nopal <i>O. ficus indica</i>42	
7.10 Análisis estadísticos	42
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
8.1 Contenido mineral en el nopal en diferentes etapas de desarrollo.....	43
8.2 Composición nutrimental de las dietas elaboradas con nopal como fuente de exclusiva de calcio	44
8.3 Eficiencia dietética y ganancia de peso en las ratas alimentadas con nopal como fuente de calcio durante la etapa de crecimiento	45
8.4 Absorción aparente de minerales durante la etapa de crecimiento.....	47
8.5 Marcadores bioquímicos	50
8.5.1 Calcio/Creatinina urinaria para evaluar la hipercalciuria	50
8.5.2 Osteocalcina (OC).....	52
8.5.3 Pro-péptido amino terminal del pro-colágeno tipo I (PINP)	53
8.6 Propiedades densitométricas del fémur de ratas alimentadas con <i>O. ficus indica</i> como fuente de calcio durante la etapa de crecimiento	54
8.7 Evaluación física y propiedades mecánicas del fémur de ratas alimentadas con nopal como fuente de calcio	56
8.8 Propiedades mecánicas del hueso	58
8.9 Análisis micro estructural del fémur de ratas alimentadas con nopal como fuente de calcio mediante imágenes SEM.....	58
8.10 Parámetros microestructurales del fémur de ratas alimentadas con nopal.....	60
8.11 Análisis del contenido mineral óseo (CMO).....	62
8.12 Análisis cristalográfico del fémur mediante difracción de rayos X	65
8.13 Análisis de correlación entre la DMO con las propiedades del fémur.....	68
9. CONCLUSIONES.....	70
10. REFERENCIAS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Parte interna del fémur distal de rata.....	4
Figura 2. Identificación de las zonas anatómicas del fémur de rata.....	4
Figura 3. Esquema representativo de la homeostasis del calcio en el organismo....	7
Figura 4. Interacciones osteoblasto/osteoclasto en el proceso de remodelado óseo.	11
Figura 5. Representación esquemática de la regulación hormonal del remodelado óseo e interacción osteoblastos/osteoclastos.	13
Figura 6. Representación esquemática de los órganos blanco de la hormonaparatiroidea en la regulación homeostática del calcio y mecanismo de retroalimentación.....	14
Figura 7. Homeostasis del calcio mediado por la hormona calcitonina.....	15
Figura 8. Proceso de la síntesis de la forma activa de la vitamina D (1,25-dihidro colecalciferol).....	16
Figura 9. Preparación del nopal <i>Opuntia ficus indica</i> y elaboración del granulado para el análisis químico proximal y elaboración de las dietas experimentales	30
Figura 10. Obtención de muestra sanguínea vía vena caudal en ratas alimentadas con nopal (<i>Opuntia ficus indica</i>) como fuente de calcio durante la etapa de crecimiento.	34
Figura 11. Diagrama esquemático para la obtención de la imagen electrónica sobre la cual se calcula la DMO modificando la ecuación de Lambert-Beer.....	37

Figura 12. Procedimiento para la obtención de las radiografías digitales para la determinación de la densidad mineral ósea en los sujetos de experimentación con el sistema SXA.38

Figura 13. a) Prueba flexión en tres puntos en el fémur de rata alimentada con *O. ficus indica* como fuente de calcio en la dieta. b) Prueba de compresión en la diáfisis femoral.41

Figura 14. Densidad mineral ósea del fémur de ratas Wistar macho durante la etapa de crecimiento, alimentadas con nopal *O. ficus indica* como fuente de calcio.....56

Figura 15. Imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la parte interna del fémur de las ratas alimentadas con *O. ficus indica* como fuente de calcio en la dieta.....59

Figura 16. Parámetros microestructurales del fémur de ratas Wistar macho alimentadas con nopal como fuente de calcio en la dieta durante el periodo de crecimiento.61

Figura 17. Análisis cristalográficos en los fémures de ratas alimentadas con nopal *O. ficus indica* como fuente de calcio al final del periodo experimental.67

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Ingredientes de las dietas experimentales elaboradas a base de nopal como única fuente de calcio.....	31
Tabla 2. Contenido de minerales en el nopal <i>Opuntia ficus indica</i> en diferentes etapas de madurez	43
Tabla 3. Contenido nutrimental de las dietas elaboradas con <i>O. ficus indica</i>	45
Tabla 4. Estado nutricional de las ratas alimentadas con nopal como fuente de calcio durante la etapa de crecimiento	46
Tabla 5. Absorción aparente de minerales en ratas alimentadas con nopal <i>O. ficus indica</i> durante la etapa de crecimiento.....	48
Tabla 6. Efecto del consumo de nopal como fuente de calcio sobre el índice Ca/Cr en orina, OC y PINP en suero durante la etapa de crecimiento.	52
Tabla 7. Propiedades físicas y biomecánicas del fémur de ratas alimentadas con nopal como fuente de calcio.	57
Tabla 8. Contenido mineral y relación molar Ca/P en el fémur de ratas alimentadas con nopal como fuente de calcio	64
Tabla 9. Coeficiente de correlación entre densidad mineral ósea con propiedades mecánicas, estructurales, cristalográficas y contenido mineral del fémur de ratas.	69

1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, México y otros países de América Latina han presentado una transición alimentaria que ha modificado los hábitos y patrones dietéticos de la población, la cual se caracteriza por dietas con una alta densidad energética y un deficiente balance nutricional, que incluye altos niveles de azúcares simples, grasas saturadas y una insuficiente ingesta de frutas y verduras, lo cual se traduce en un bajo aporte de fibra, vitaminas y minerales (Rivera *et al.*, 2004; Astrup *et al.*, 2008; Roman *et al.*, 2013; Aguilera-Barreiro *et al.*, 2017).

De manera particular, diversos organismos internacionales han reportado que el consumo de calcio por parte de diferentes grupos etarios se encuentra por debajo de la ingesta diaria recomendada (IDR) (Fernández-Ortega, 2008; Barquera *et al.*, 2009; Aguilera-Barreiro *et al.*, 2013). El consumo de este mineral durante la infancia y adolescencia es primordial para que el esqueleto alcance el denominado “pico máximo de densidad mineral ósea” (P-DMO), cuya importancia se relaciona con la resistencia del hueso y el riesgo de fractura en la edad adulta (Bonjour *et al.*, 2009; Viguet-Carrin *et al.*, 2014). Las principales fuentes de calcio en la dieta incluyen la leche y sus derivados; sin embargo, en las últimas décadas, el consumo de este mineral ha disminuido considerablemente debido a diversos factores, entre los que destacan los factores fisiológicos, digestivos, culturales y económicos, principalmente (Calvo *et al.*, 2006; Moran *et al.*, 2013). Los alimentos de origen vegetal ricos en calcio incluyen espinacas, acelgas y nopal entre otros, desafortunadamente, estos alimentos contienen compuestos anti-nutricionales conocidos como agentes quelantes que interfieren con la digestión y absorción de ciertos nutrimentos a nivel intestinal entre los que se destaca el calcio (McConn y Nakata, 2004). Por otra parte, la relación molar calcio/oxalato en un alimento es otro aspecto a considerar para determinar si la disponibilidad del calcio a nivel intestinal se encuentra comprometida. En años recientes se ha reportado que el contenido de calcio y de oxalatos en el nopal (*Opuntia ficus indica*) se modifica con la edad. En este contexto, se ha señalado que el contenido de calcio se incrementa con la etapa de desarrollo de esta cactácea, en tanto que la concentración de compuestos quelantes como los oxalatos muestran una tendencia cíclica durante el crecimiento del vegetal; no obstante, en las etapas tardías de desarrollo la concentración de oxalatos

presenta los niveles más bajos (Rodríguez-García *et al.*, 2007; Contreras-Padilla *et al.*, 2011). La reciente identificación de compuestos minerales en el nopal con importancia en la salud del hueso como carbonatos de calcio, bicarbonatos calcio-magnesio, óxido de magnesio y cloruro de potasio, cuyo contenido se modifica también en función de la edad de la planta, confieren a *O ficus indica* mayor potencial como alimento funcional. Sin embargo; hasta el momento, la etapa de desarrollo del nopal no ha sido considerada para el estudio de la biodisponibilidad del calcio presente en este vegetal. Con base en lo anteriormente señalado, el presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto del consumo de *O. ficus indica* en diferentes etapas de desarrollo, como fuente exclusiva de calcio en la dieta, en la formación de masa ósea en ratas Wistar macho en etapa de crecimiento, a fin de conocer el potencial de esta cactácea como fuente de calcio biodisponible.

2. ANTECEDENTES

2.1 Sistema esquelético

El esqueleto es una estructura dinámica, sus funciones incluyen: soporte de tejidos blandos, locomoción, protección de órganos internos y almacén de minerales. El sistema esquelético se divide en dos secciones; esqueleto axial (cabeza y tronco) y esqueleto apendicular (extremidades). Los huesos presentan tejido esponjoso (hueso trabecular) y tejido compacto (hueso cortical). Ambos tejidos están constituidos por una fase orgánica (25 %) conformada principalmente de colágeno tipo I (PINP) y proteínas no colágenas como osteocalcina (OC), osteonectina y sialoproteínas (Chen *et al.*, 2002; Boskey *et al.*, 2013) y una fase inorgánica (65 %) integrada por calcio (Ca^{2+}) y fósforo (P) principalmente; además de pequeñas inclusiones de otros minerales como Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- y F^- . El principal cristal es la hidroxiapatita (HAp) y compuestos amorfos depositados sobre la matriz orgánica del hueso. Ambas fases confieren la dureza y flexibilidad característica del hueso (García-Garduño y Reyes-Gasca, 2006). Durante la etapa de crecimiento, el esqueleto se encuentra en constante actividad metabólica (remodelado), donde las actividades de formación ósea (modelado) son mayores a las actividades de degradación del hueso (resorción ósea). Durante la etapa adulta, se presenta un equilibrio en el remodelado óseo; en tanto que después de los 50 años las actividades de resorción ósea son mayores a las de formación, ocasionando alteraciones en parámetros de calidad ósea e incrementando el riesgo de fracturas en el adulto mayor.

Los huesos del esqueleto pueden presentar tejido cortical (compacto), trabecular (esponjoso) o ambos. La estructura del hueso compacto es continua y confiere la dureza característica a dicho material. Por otro lado, el hueso esponjoso se ubica principalmente en los extremos del hueso y muestra una estructura irregular con espacios denominados poros que proporcionan cierta flexibilidad al hueso (Figura 1).

En el caso de los huesos largos como el fémur, éstos presentan tres secciones: a) el fémur proximal (epífisis y metáfisis), b) diáfisis femoral (parte media del fémur) que posee hueso cortical principalmente y c) fémur distal, esta última zona presenta tejidos trabecular y cortical (ver Figura 2).

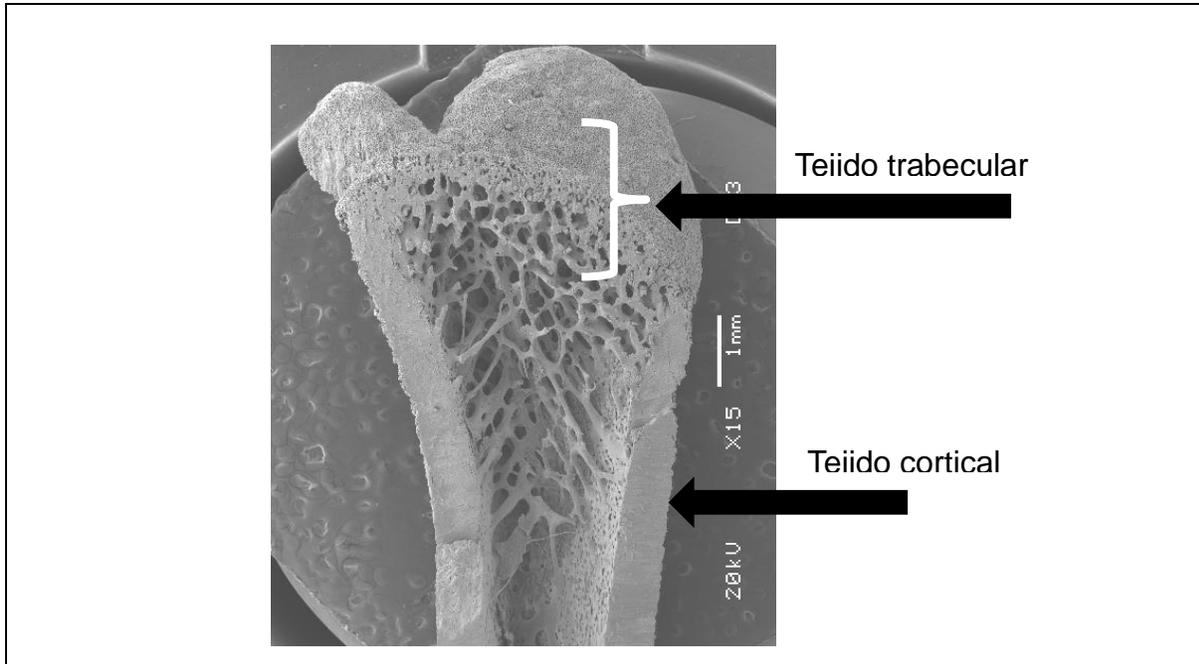


Figura 1. Parte interna del fémur distal de rata. Las flechas señalan ambos tipos de tejido óseo (tejido cortical y trabecular).

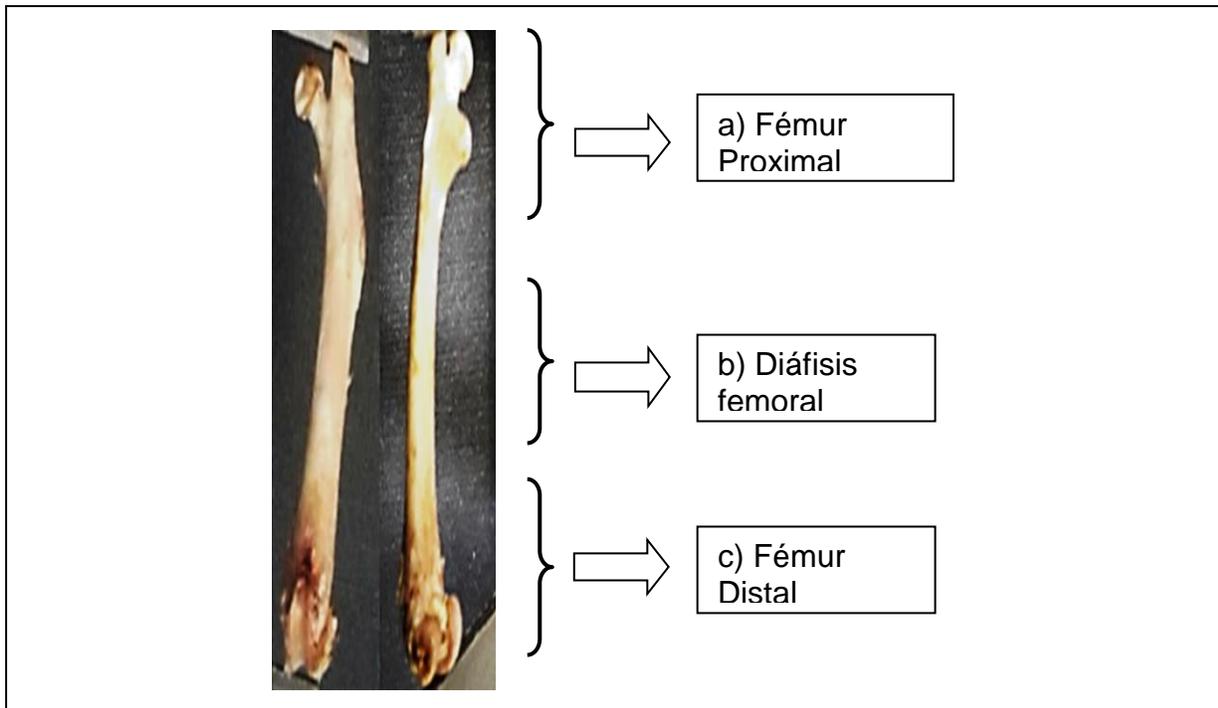


Figura 2. Identificación de las zonas anatómicas del fémur de rata (Hernández-Becerra *et al.*, 2017).

2.2 Fase inorgánica del hueso (minerales)

La fase inorgánica del hueso es el principal material responsable de la dureza y resistencia ósea. Los minerales más estudiados en relación con la salud del hueso son el calcio y el fósforo, a pesar de que en años recientes la importancia de otros minerales presentes en el hueso y en la dieta en cantidades trazas, tales como magnesio, estroncio, cadmio, cobre, cloro, flúor y potasio entre otros han cobrado mayor interés (Prescha *et al.*, 2014; Roczniac *et al.*, 2017). Se ha reportado que algunos minerales dentro del cristal de hidroxapatita modulan la orientación de los cristales adyacentes a la molécula que los contiene. De la misma manera, las características químicas de estos minerales dentro del cristal afectan su tamaño (Matsunaga y Murata, 2009).

2.2.1 Calcio

El calcio es un micronutriente trascendental para realizar diferentes funciones en el organismo. Este mineral participa en la liberación de neurotransmisores, estimula y disminuye reacciones enzimáticas, uniéndose a hormonas y formando complejos, participa en la contracción muscular, en la permeabilidad celular, vasodilatación y constituye la estructura ósea. Los requerimientos de Ca^{2+} en la dieta varían entre 800 y 1300 mg/día dependiendo de la etapa fisiológica de la persona. La absorción intestinal del calcio involucra principalmente el transporte activo y en menor grado el transporte pasivo; este último ocurre en el íleon y en menor medida en el intestino grueso. En el transporte activo, el calcio tiene que ser solubilizado en el medio ácido del estómago para disociarlo a su estado iónico (Bronner y Pansu *et al.*, 1999; Ramesh y Nemere, 2008). En el transporte activo participa la forma activa de la vitamina D (1,25-D, dihidroxicolecalciferol o vitamina D_3), promoviendo en el enterocito la síntesis de proteínas transportadoras de Ca^{2+} llamadas calbindinas, las cuales se unen al Ca^{2+} y lo liberan al torrente sanguíneo. La cantidad de Ca^{2+} absorbido de la dieta depende de sus interacciones con otros componentes alimenticios, la ingesta de vitamina D, la velocidad del tránsito intestinal, los niveles de calcio en sangre, las reservas de calcio, el estado fisiológico del individuo como desarrollo y embarazo, la menopausia y la edad avanzada. Las hormonas que regulan el metabolismo del calcio incluyen la hormona paratiroidea (HPT), calcitriol y la calcitonina (Fournier *et al.*, 2014). La concentración de Ca^{2+} en

sangre es de 8.5 a 10.5 mg/dL. En el líquido extracelular, el Ca^{2+} puede estar en forma ligada primordialmente con albumina o en estado iónico capaz de unirse con fosfato (PO_4) y grupos hidroxilo (OH) para formar HAp, principal cristal en el hueso, su fórmula molecular es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, las moléculas de este cristal se depositan en la matriz orgánica que sirve como molde para la nucleación de un nuevo cristal (García-Garduño y Reyes-Gasca, 2006), en conjunto éstas estructuras le confieren la dureza característica y elasticidad del hueso (Nair *et al.*, 2013; Viguet-Carrin *et al.*, 2014).

El exceso de calcio absorbido que no puede ser almacenado en el hueso se excreta en orina, heces y sudor. Únicamente el calcio plasmático no ligado a proteínas (60 %) es filtrado a nivel glomerular. El 70 % del calcio filtrado se reabsorbe en el túbulo proximal a nivel intercelular. El 20 % del calcio es reabsorbido en el Asa de Henle por acción de las bombas ATPasa sodio-potasio e intercambio sodio/calcio. En la orina se pierden entre 150 y 200 mg/día de calcio. La calciuria está en función de la carga de calcio filtrada, la cual depende a su vez de la absorción intestinal de calcio, su liberación en el hueso, la filtración glomerular y la capacidad de reabsorción de los túbulos renales. Normalmente, existe un balance entre la absorción neta y las pérdidas urinarias del calcio, por lo que la concentración extra celular permanece constante. En una dieta con un aporte de calcio de 1000 mg/día se absorben 300 mg, de esta cantidad se utilizan 125 mg aproximadamente para la secreción de los jugos digestivos que, adicionado a los 700 mg no absorbidos en el tracto digestivo, suman la cantidad de 825 mg de calcio que se eliminan a través de heces y orina. Con base en lo anterior, se tiene que la absorción neta de calcio es de 175 mg/día como se observa en la Figura 3 (Taylor y Bushinsky, 2009).

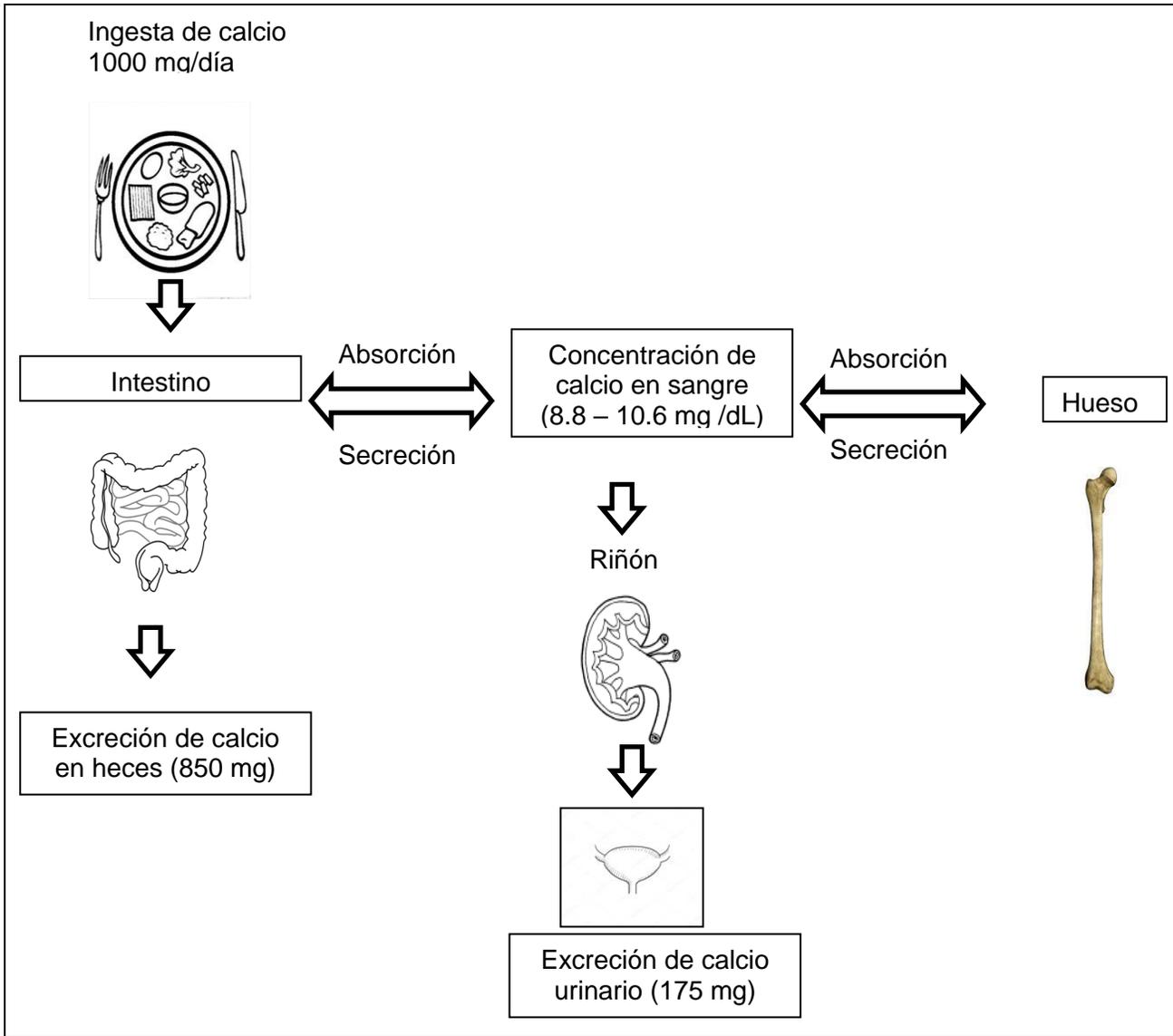


Figura 3. Esquema representativo de la homeostasis del calcio en el organismo (Taylor y Bushinsky, 2009).

2.2.2 Fósforo

El fósforo en conjunto con el calcio es uno de los minerales más abundantes en el esqueleto. La presencia de este mineral en los alimentos es muy común, por lo que su deficiencia en la dieta es poco frecuente. Un adulto ingiere alrededor de 1400 mg/día. La absorción de P en el intestino es muy eficaz, su concentración en sangre oscila entre 2.5 y 5.6 mg/dL (Uribarri, 2007). La determinación extracelular del fósforo no refleja su disponibilidad al interior de la célula. El 85 % de este mineral se encuentra en el

esqueleto, el resto se distribuye en tejidos blandos. El fosfato plasmático interviene en muchos procesos metabólicos, ya sea unido a proteínas, ionizado (PO_4^-) o en complejos. En la eliminación del P a través de la orina, el riñón ejerce un control muy importante sobre la homeostasis del fósforo; este mineral se reabsorbe en el túbulo proximal de la Asa de Henle mediante el estímulo de la HPT (Ito *et al.*, 2011). En el hueso el P forma junto con el Ca la molécula de HAp; dicho mineral también forma parte de compuestos amorfos como carbonatos de calcio, carbonatos de potasio y magnesio así como fosfatos de calcio y probablemente fosfatos de magnesio y potasio aunque estos últimos no han sido reportados en el hueso (Matsunaga y Murata, 2009).

2.2.2.1 Relación calcio:fósforo (Ca/P) en la dieta

La relación calcio:fósforo (Ca/P) en la dieta desempeña un papel muy importante en la disponibilidad de ambos minerales a nivel intestinal. Una dieta alta en fósforo disminuye la relación molar Ca/P en la dieta (Koshihara *et al.*, 2004). La relación molar Ca/P en un rango 0.6 – 1 reduce la densidad mineral ósea (DMO) en humanos y roedores (Hunt *et al.*, 2008). Se ha reportado que la relación molar ideal Ca/P en la dieta para el desarrollo y mantenimiento de los huesos en humanos es de 1 – 1.5 dependiendo del estado fisiológico (Anderson, 1996). En este sentido, ingestas elevadas de fósforo han sido reportadas en las dietas occidentales debido al consumo de productos industrializados (Kemi *et al.*, 2006); de igual forma, la dieta típica mexicana presenta elevados consumos de fósforo que comprometen la absorción de calcio a nivel intestinal (Wyatt *et al.*, 2000). Una relación Ca/P en la dieta de ratas en crecimiento por debajo de 1 causa efectos negativos en diferentes parámetros de calidad ósea como la resistencia a la fractura y DMO (Hunt *et al.*, 2008 y Viguet-Carrin *et al.*, 2014).

2.2.2.2 Relación calcio:fósforo (Ca/P) en el hueso

La fase inorgánica del hueso constituida por minerales y agua, forman cristales y compuestos amorfos, el cristal más abundante en el hueso es la HAp. Si bien el calcio es el principal mineral que forma el cristal, otros minerales como el magnesio, potasio, estroncio, cromo, flúor y zinc entre otros pueden sustituir al calcio en la formación del cristal (Matsunaga y Murata, 2009). La relación molar Ca/P en el hueso es no

estequiométrica debido a la inclusión de iones en sustitución del calcio. Mientras que la HAp pura sintetizada presenta una relación molar Ca/P de 1.66 (Giraldo-Betancurt *et al.*, 2013), la bio-HAp muestra una relación molar Ca/P mayor por la inclusión de otros minerales dentro de la red cristalina en forma de complejos amorfos como por ejemplo, fosfato y carbonato de calcio que pueden constituir hasta un 20 % de la bio-HAp. La interacción de ambos complejos con la matriz orgánica determina la calidad ósea (Li, *et al.*, 2007; Rollo *et al.*, 2015).

2.2.3 Magnesio

Al igual que el calcio y el fósforo, la mayor parte del contenido corporal del Mg^{2+} se localiza en los huesos (67 %). La concentración sérica de este mineral es de 1.9 - 2.1 mg/dL principalmente en su forma ionizada. El Mg^{2+} unido a ATP es fundamental para las reacciones metabólicas, su eliminación se realiza por orina y sudor. La deficiencia de Mg^{2+} en la dieta es muy difícil; sin embargo, en enfermedades como diabetes mellitus, alcoholismo y mala absorción su deficiencia provoca mayor riesgo de fracturas óseas (Huang *et al.*, 2007; Chaudhary *et al.*, 2010). Niveles bajos de magnesio en sangre activan el proceso de resorción del hueso, estudios previos sobre el efecto de la deficiencia de óxido de Mg en la dieta se relacionan con un incremento en el número de osteoclastos y una disminución de osteoblastos, incrementándose con ello el riesgo de presentar DMO baja (Gruber *et al.*, 2003; Matsuzaky *et al.*, 2005).

2.2.4 Potasio

El potasio se encuentra ampliamente distribuido en los alimentos de origen vegetal, principalmente los productos integrales o aquellos consumidos con cáscara. El potasio en conjunto con el sodio participan en el proceso de polarización de la membrana (Morth *et al.*, 2011). El papel que desempeña el potasio en el metabolismo óseo no está bien determinado, por lo que la información relacionada con el efecto del dicho mineral sobre la salud del hueso es muy escasa; aun así se ha reportado que la presencia de este mineral está relacionada con efectos benéficos sobre la masa ósea (Lemann *et al.*, 1995; Dawson-Huges *et al.*, 2009).

2.3 Fase orgánica del hueso

La matriz orgánica del hueso representa un 25 - 30 % de la masa ósea y está constituida principalmente por colágeno tipo I, el cual contiene aminoácidos ricos en grupos hidroxilo como serina y treonina que atraen la deposición de calcio; por esta razón, la fase orgánica es considerada como un agente de nucleación. Por su parte, las proteínas no colágenas representan entre el 3 y el 5 % del componente orgánico entre las que destacan la OC, osteonectina y sialoproteínas (Konstantinos *et al.*, 2012). La fase orgánica sirve como base sobre la cual, los compuestos minerales amorfos y cristalinos como la HAp se anclan mediante enlaces moleculares ion-dipolo (Farbod *et al.*, 2014). El remodelado óseo está controlado por una compleja interacción entre las células osteoblásticas y osteoclasticas, las cuales le permiten al organismo eliminar y reparar el hueso viejo o dañado por hueso nuevo y regular los niveles séricos de calcio. En términos generales, los osteoblastos sintetizan el componente orgánico llamado osteoide, el cual queda incrustado con los minerales que son depositados en la superficie. Por otra parte, los osteoclastos realizan la función resortiva uniéndose al hueso y sintetizando enzimas (fosfatasa ácida), que secretan protones (H^+) y disuelven la matriz y la fase mineral (Ross, 2009). Normalmente, el remodelado presenta un balance positivo durante el crecimiento, es decir, la formación ósea es mayor que la resorción. Por otra parte, en la etapa adulta el remodelado se mantiene en equilibrio, no hay ganancia ni pérdida de masa ósea; sin embargo, después de los 50 años y principalmente en las mujeres, la resorción ósea supera la formación dando lugar a una pérdida de hueso que incrementa el riesgo de fracturas con el menor trauma. El remodelado incluye tres etapas: a) fase de atracción en donde los osteoclastos son atraídos a un área localizada en la superficie de un hueso dañado, b) fase resortiva cuando los osteoclastos degradan hueso en aproximadamente 1-2 semanas y c) fase de inversión en donde los osteoclastos desaparecen de la cavidad (inhibición de la resorción ósea). Por otro lado, los osteoblastos maduros sintetizan matriz orgánica que gradualmente va rellenando la cavidad producida por los osteoclastos para posteriormente servir como andamio para la deposición de sales minerales, este proceso puede durar desde 3 hasta 6 meses (Figura 4) (Bronner y Pansu, 1999; Rucci, 2008).

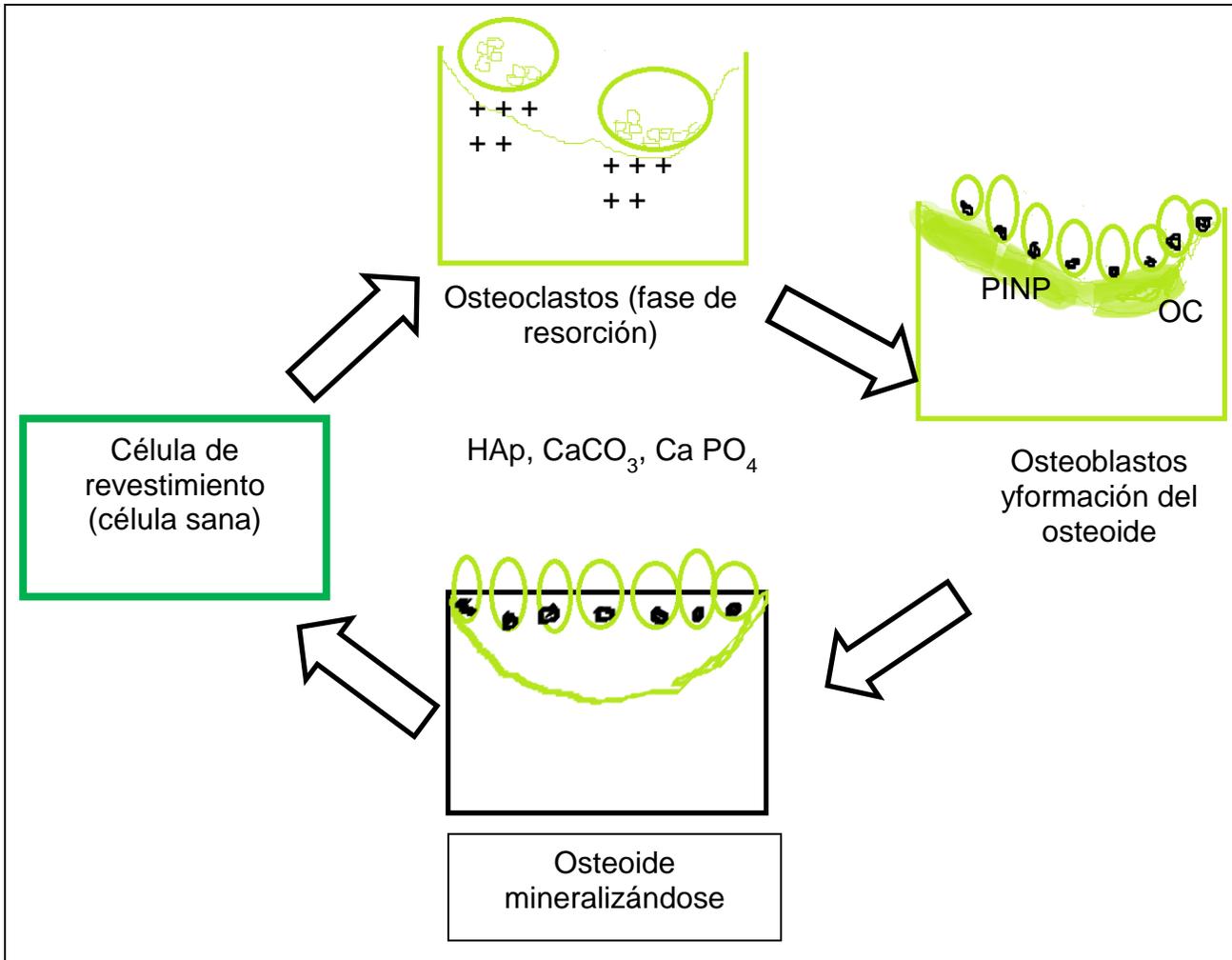


Figura 4. Interacciones osteoblasto/osteoclasto en el proceso de remodelado óseo (Rucci *et al.*, 2008).

2.3.1 Interacción entre las fases orgánica e inorgánica (proteínas y minerales) del hueso.

El colágeno es una proteína presente en el hueso y sirve como base (cimiento o andamio) para la deposición de minerales. Dicha proteína está constituida por tres polipéptidos, cuya estructura poli hidroxilada obedece a la presencia de aminoácidos como la prolina, glicina, serina y lisina entre otros, esta característica le permite comportarse como un agente de nucleación. Las proteínas no colágenas del hueso como la osteocalcina y osteonectina influyen en la orientación de las fibras de colágeno y de los minerales presentes en el hueso principalmente los cristales de HAp y compuestos

amorfos. El grado de interacción entre ambas fases determina las características de la calidad ósea (Wang *et al.*, 2001; Lafita, 2009).

2.3.2 Células osteoclastos y osteoblastos

Los osteoclastos son células multinucleadas y acidófilas que ocupan la cavidad llamada laguna de resorción (Howship), proceden de precursores hematopoyéticos que contienen abundantes complejos de Golgi, mitocondrias y vesículas lisosómicas. Estas células presentan receptores específicos para diferentes ligandos como la HPT, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), la vitamina D y el ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL), entre otros. Al finalizar la resorción ósea, los osteoclastos sufren apoptosis. Por otro lado, los osteoblastos son células mono nucleares que expresan RANKL, el cual tras unirse a su receptor, estimula la actividad osteoclástica, aumentando la diferenciación y disminuyendo la apoptosis. Para frenar la actividad osteoclástica, los osteoblastos sintetizan osteoprotegerina (OPG), la cual presenta una gran afinidad por RANKL, al unirse a éste provoca una disminución en la diferenciación de los osteoclastos (Boyce y Xing, 2008; Bilbao y Gil, 2011). Además, los osteoblastos son células sintetizadoras de la matriz orgánica del hueso, la cual, está involucrada en la formación y el crecimiento del hueso (ver Figura 5).

2.3.3 Regulación hormonal del balance calcio/fósforo

El equilibrio calcio/fósforo en el cuerpo está regulado por diferentes hormonas y órganos que responden a las señales registradas en el receptor sensor de calcio (CARS) localizado en la glándula paratiroides, cuyo sensor bidireccional de niveles altos o bajos de Ca^{2+} en sangre promueve la síntesis o la activación de ciertas hormonas principalmente la HPT, vitamina D, calcitonina entre otras (Peterlik *et al.*, 2013). La HPT actúa en tres principales órganos blanco; en el riñón promueve la reabsorción de calcio en los túbulos colectores y en el asa de Henle de la nefrona (Kemi *et al.*, 2006) mientras que en el hueso la hormona paratiroidea promueve la resorción del hueso y la liberación de calcio para regular las concentraciones de calcio en la sangre (Nora *et al.*, 2012). Además la HPT promueve la conversión del calcidiol (25-OH-colecalciferol) a calcitriol (1,25-[OH]₂ colecalciferol) la forma activa de la vitamina D, que a su vez estimula la

liberación de calcio en el hueso mientras que en el enterocito estimula la síntesis de proteínas transportadoras de calcio en el intestino delgado conocidos como potenciales receptores transitorios dependientes de vaniloides 5-6 (TRPV5-6).

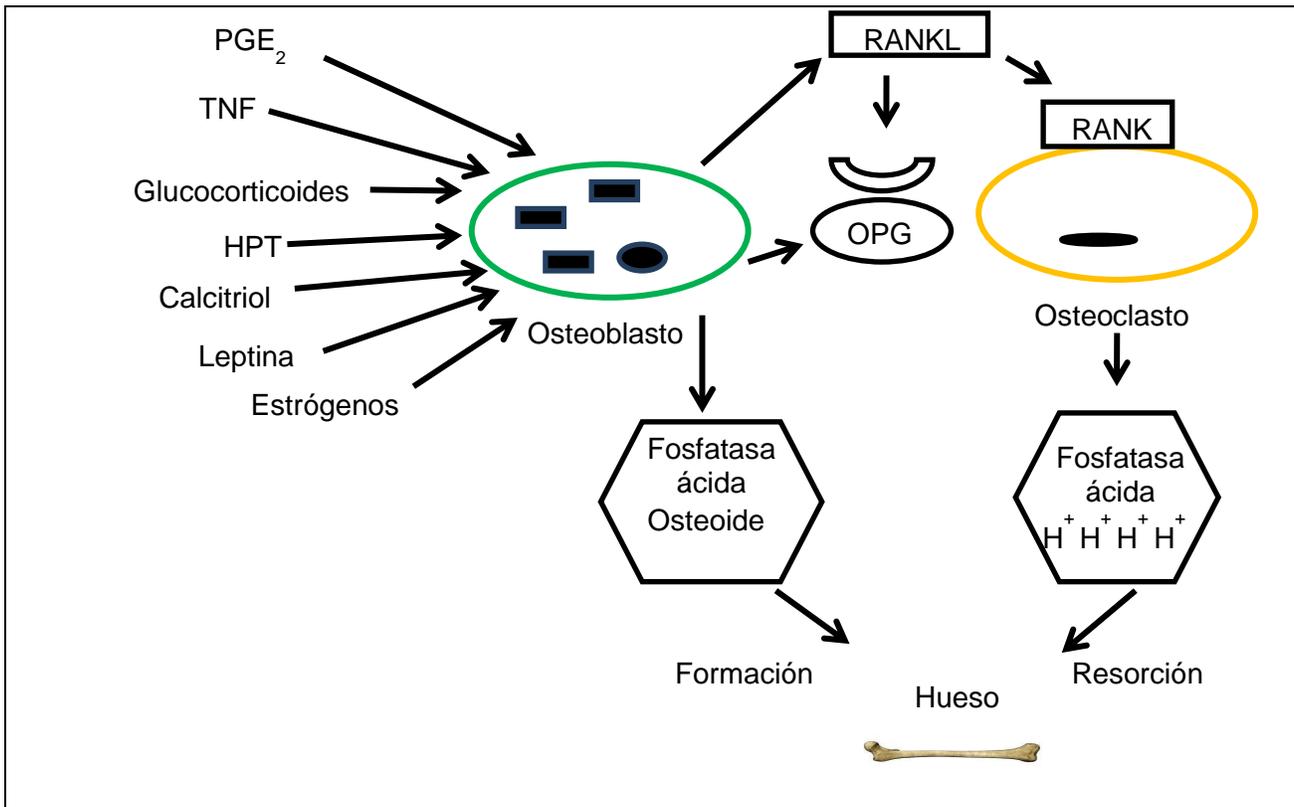


Figura 5. Representación esquemática de la regulación hormonal del remodelado óseo e interacción osteoblastos/osteoclastos (Peterlik *et al.*, 2013).

2.3.3.1 Glándula paratiroides y paratohormona (HPT)

La glándula paratiroides está formada por células que poseen gránulos secretorios de la HTP. La actividad de la paratiroides depende de la concentración de calcio libre en la sangre. Un descenso en la concentración de calcio libre estimula la síntesis y secreción de la paratohormona, que a su vez, incrementa la reabsorción de calcio en el glomérulo, túbulos y asas de Henle. También promueve la resorción ósea para liberar iones de Ca²⁺ para la homeostasis de este mineral (Bronner, 2003; Khundmiri *et al.*,

2016). Indirectamente, la HPT estimula la absorción de calcio a nivel intestinal incrementando la actividad de la enzima α -1-hidroxilasa renal, la cual adiciona un grupo hidroxilo en el carbono 1 a la molécula de calcidiol convirtiéndola en la forma activa calcitriol (Figura 6). El exceso de calcio y calcitriol en sangre ejercen un sistema de retroalimentación negativa y disminuyen la síntesis de HPT.

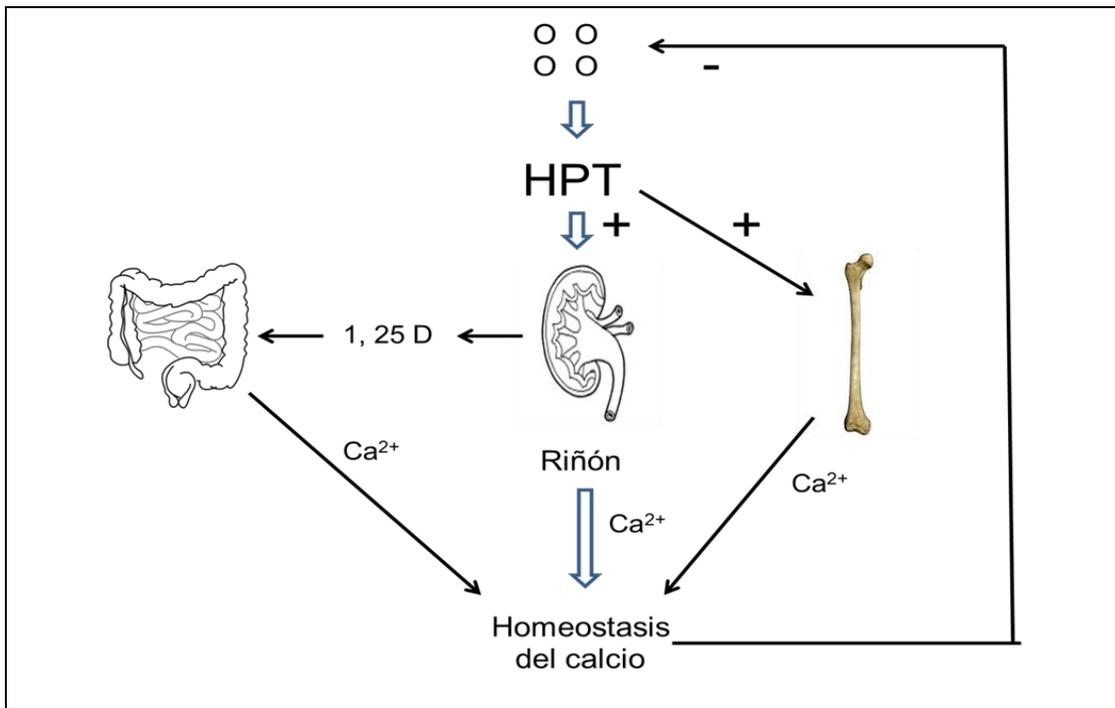


Figura 6. Representación esquemática de los órganos blanco de la hormona paratiroidea en la regulación homeostática del calcio y mecanismo de retroalimentación (Hamed *et al.*, 2011).

2.3.3.2 Glándula tiroides y calcitonina

La calcitonina contribuye a la homeostasis del calcio. Aunque principalmente se sintetiza en las células C de la tiroides, también puede sintetizarse en el aparato digestivo, páncreas y cerebro, sugiriendo que se comporta como un neurotransmisor. El osteoclasto es el principal blanco de la calcitonina, actúa directamente sobre el receptor del osteoclasto inhibiendo la resorción ósea y en riñón aumenta la excreción de calcio

inhibiendo la reabsorción glomerular (Figura 7). El osteoclasto es la célula más rica en receptores de calcitonina explicando así la acción biológica de esta hormona. En la clínica se utiliza como fármaco anti-resortivo en personas con pérdida de masa ósea. En el riñón aumenta la expresión del RNAm para la producción de la 1- α -hidroxilasa que promueve la forma activa de la vitamina D (Nora *et al.*, 2012).

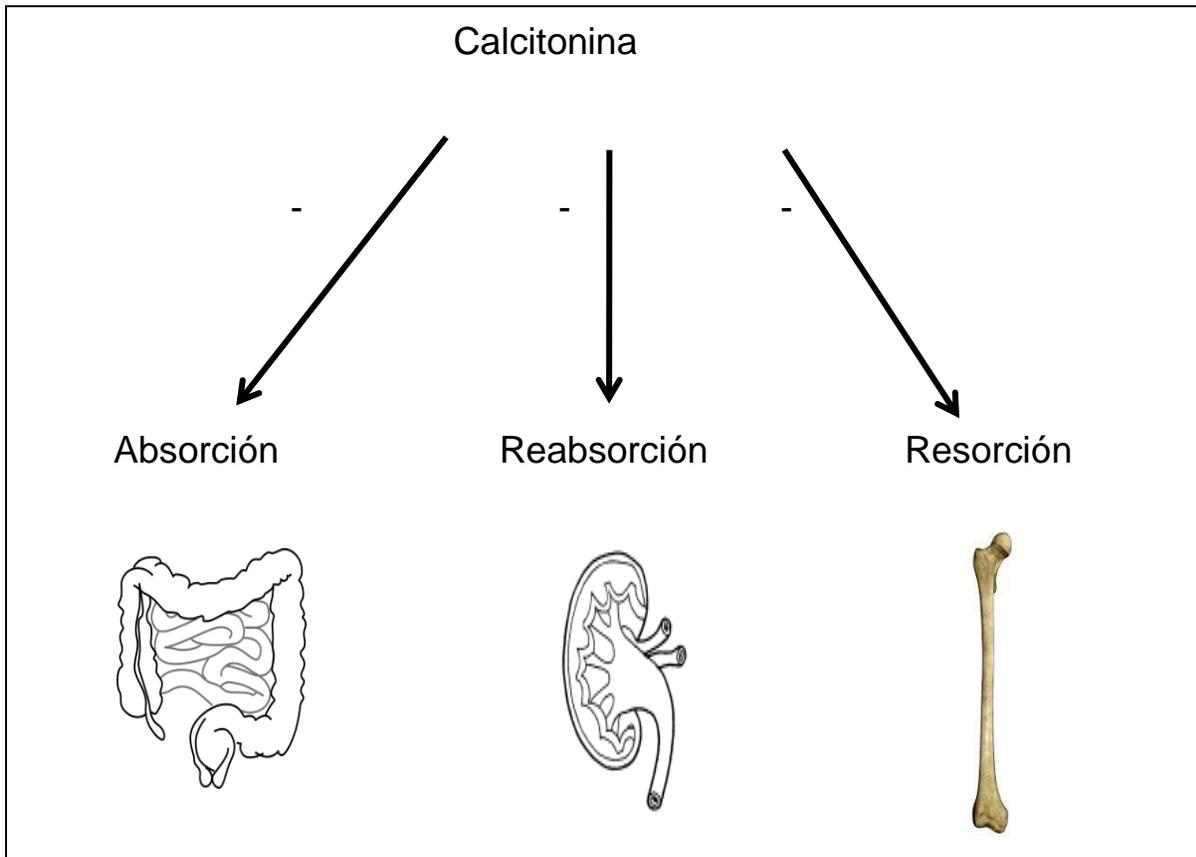


Figura 7. Homeostasis del calcio mediado por la hormona calcitonina (Nora *et al.*, 2012).

2.3.3.3 Vitamina D3 (1,25-D)

La forma nutricional de la vitamina D incluye el colecalciferol en productos de origen animal y ergocalciferol en alimentos de origen vegetal. En la biosíntesis endógena, el 7-dehidrocolesterol es el precursor de la vitamina D, este compuesto viaja al hígado acompañado de una proteína de unión de vitamina D, ahí la enzima 25-hidroxilasa adiciona un grupo hidroxilo en el carbono 25, formándose la 25-hidroxivitamina D (25-D) ó calcidiol que constituye la forma circulante más abundante de

vitamina D. El paso final de la activación tiene lugar en el riñón, donde la 1α -hidroxilasa añade un segundo grupo hidroxilo en el carbono 1 formándose la 1,25-dihidroxitamina D (calcitriol) que representa la forma activa de esta vitamina D (Figura 8) (Khundmiri *et al.*, 2016). El calcitriol aumenta los niveles de calcio sérico promoviendo la absorción de calcio en el intestino, incrementa la reabsorción de calcio en el riñón y modula la diferenciación de los osteoclastos originando resorción ósea para liberar calcio a la sangre. La vitamina D es degradada por la adición un grupo OH en el carbono 24 para hacerlo soluble en agua y se pueda eliminar en las heces principalmente.

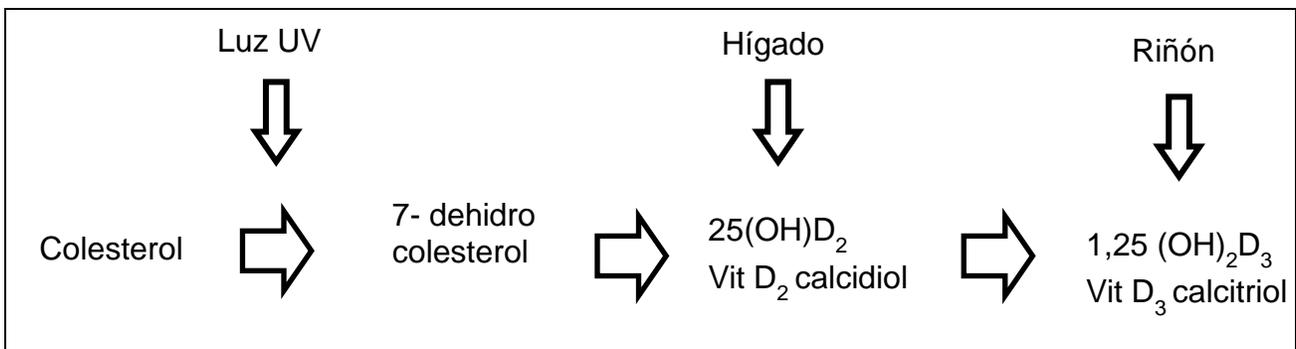


Figura 8. Proceso de la síntesis de la forma activa de la vitamina D (1,25-dihidro colecalciferol (Khundmiri *et al.*, 2016).

2.3.3.4 Hormonas esteroideas

Generalmente, estas hormonas se forman a partir del colesterol, razón por la cual son liposolubles y fácilmente atraviesan la membrana celular. La concentración circulante de estas hormonas disminuye con la edad, tienen un papel importante en el esqueleto durante la adolescencia. El aumento en la concentración de testosterona y androsterona circulante y la unión con sus receptores impacta en la salud ósea al promover la diferenciación de los osteoblastos y la formación de hueso (Manolagas *et al.*, 2013).

2.4 Importancia del consumo de calcio en la salud ósea

La ingesta dietaria de calcio en países latinoamericanos se encuentra por debajo de las recomendaciones establecidas por organismos internacionales (Fernández-

Ortega, 2008; Barquera *et al.*, 2009; Barrera *et al.*, 2012; Pu *et al.*, 2016). En la actualidad existe un gran interés por vigilar e incrementar el consumo de calcio en la dieta. Los estudios relacionados con el tema han demostrado que existe una relación directa entre una baja ingesta de calcio y los padecimientos asociados con la disminución en la densidad mineral ósea. A este respecto, se ha señalado que un incremento en la ingesta de calcio en la dieta constituye la terapia nutricional más efectiva para asegurar una absorción adecuada y prevenir o revertir la pérdida de masa ósea (Abrams, 2010; Zhu *et al.*, 2012). Acorde con la encuesta Nacional de Salud (ENSANUT, 2012) la población mexicana adulta consume entre 600 y 800 mg de calcio al día; tomando en cuenta que la IDR es de 1000 mg/día, esta deficiencia puede ser el detonante de nuevos casos de enfermedades esqueléticas. En otros países como Colombia y Panamá, el consumo de calcio en la adolescencia alcanza menos del 50 % de la IDR (Gao *et al.*, 2006). Las fuentes alimenticias de calcio con alto valor biológico más importantes son la leche y sus derivados, debido a que cuentan con promotores de su absorción a nivel intestinal como la vitamina D y carbonatos de calcio (Lanou *et al.*, 2005; Weaver *et al.*, 2009). Sin embargo, los altos costos de estos productos limitan la accesibilidad a gran parte de la población mexicana. Por otra parte, aunque la intolerancia a la lactosa se presenta con mayor frecuencia en adultos, recientemente, se estimó una prevalencia de mala absorción de lactosa entre 13.6 y 21.8 % en niños de 3 a 18 años, lo que condiciona una ingesta deficiente de este mineral (Lomer *et al.*, 2008; Moran *et al.*, 2013). Por lo anterior, en el caso de los países en vías de desarrollo como México, las principales fuentes de calcio son los productos nixtamalizados y vegetales. No obstante, en el caso de los productos de origen vegetal, la presencia de compuestos considerados anti nutricionales (agentes quelantes) capaces de fijar el calcio evitan que dicho mineral sea absorbido a través de la pared intestinal disminuyendo así su biodisponibilidad (Amalraj y Pius, 2015).

2.4.1 Metabolismo del calcio en periodo de crecimiento

El consumo adecuado de calcio durante la infancia y adolescencia es muy importante debido a que durante esta etapa ocurre la mayor adquisición de la masa ósea y DMO (Greer *et al.*, 2006). En este periodo se forma alrededor del 40 % de la masa ósea; esta es la razón por la cual los organismos de salud a nivel mundial están

muy interesados por que se cubran los requerimientos diarios de calcio principalmente en niños y adolescentes desde una perspectiva preventiva (Baroncelli *et al.*, 2005).

La capacidad de absorción del calcio en el humano también varía de acuerdo con la edad. En la etapa de recién nacido hasta los 3 meses de edad la absorción es de un 50 %, a partir del cuarto mes al año de edad es de un 35 %. En la pubertad se incrementa a un 45 % y a partir de esta edad se mantiene hasta la etapa adulta. Finalmente, después de los 50 años la absorción de calcio disminuye de manera constante por año. Es importante señalar que durante el embarazo, lactancia y menopausia el coeficiente de absorción alcanza un 45 % (Abrams, 2010). Los factores de riesgo modificables para evitar alteraciones esqueléticas incluyen cambios dietéticos, la disminución del consumo de alcohol y tabaco, consumir productos lácteos, frutas y verduras, e incrementar la actividad física (Whiting *et al.*, 2004).

2.5 Técnicas de diagnóstico de la salud ósea

En la actualidad existen diferentes métodos para evaluar la salud del hueso y monitorear la efectividad de los tratamientos empleados en la práctica clínica. Algunas determinaciones pueden llevarse a cabo directamente *in vivo* sobre el hueso como ocurre con las biopsias de hueso para pruebas de resistencia a la fractura y la determinación de la DMO. Otras herramientas empleadas para evaluar la salud ósea incluyen la determinación y cuantificación en sangre o suero de algunas moléculas secretadas por el organismo durante los procesos de formación y resorción ósea conocidos como marcadores bioquímicos de formación ósea. Las moléculas más estudiadas en relación a la formación del hueso son la OC y el pro péptido amino terminal del pro colágeno tipo I (PINP) (Lee *et al.*, 2009; Payne *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2014).

2.5.1 Densidad mineral ósea por absorciometría doble de rayos X

La absorciometría doble de rayos X (DEXA) es la técnica más empleada y aceptada para valorar la salud del hueso en humanos y se realiza principalmente en la columna lumbar, fémur proximal y cuerpo completo. La técnica se basa en medir la transmisión de un haz de fotones de rayos X con dos picos de energía a través del

cuerpo del paciente lo que permite calcular en contenido mineral. Por diferencia en la intensidad de electrones transmitidos al sensor, el sistema tiene su propio sistema de calibración. Indirectamente, esta técnica se relaciona con el riesgo de fractura, aunque la radiación a la que se somete la persona es alta, la densitometría ósea es una técnica segura, no invasiva e indolora. Desde el punto de vista operativo esta técnica se clasifica en densitometría central o axial, la cual, mide la densidad mineral ósea en cualquier región del esqueleto e inclusive en el cuerpo completo. Por otro lado, la densitometría periférica mide la masa ósea en una única región y extremidades (Lorente-Ramos *et al.*, 2012; Vaccaro *et al.*, 2012).

2.5.2 Ultrasonido cuantitativo

Los equipos para densitometría por ultrasonido ofrecen un sistema que puede estimar la masa ósea. Es un sistema no invasivo que utiliza una fuente de sonido inaudible para los humanos, no es irradiante ni presenta efectos colaterales. Son aparatos que miden la velocidad del sonido y la banda de atenuación del sonido a través del hueso. Este sistema tiene un transmisor que lanza los ecos y un receptor que los recibe después de su paso por el hueso lo cual mide el grosor del mismo. Los sistemas de ultrasonido generan un ancho de banda de energía ultrasónica entre los 0.2 y 0.6 MHz al pasar por el hueso, el cual actúa como filtro sensible a la frecuencia. La atenuación del ancho de banda ultrasónico expresado en decibelios es utilizada como la medida de la fuerza del hueso. Un hueso poroso tiene una atenuación del ancho de banda más baja que un hueso sano. La otra medida que se realiza con esta técnica es la velocidad del sonido, donde el hueso sano tendrá lecturas cuantitativas del índice de ultrasonido más altas que el hueso poroso (Baroncelli *et al.*, 2003).

2.5.3 Tomografía computarizada cuantitativa

La tomografía computarizada cuantitativa (TCC) es una técnica médica y también mide la densidad mineral ósea. En los años 80's las imágenes se proyectaban en dos dimensiones; sin embargo, la TCC ha evolucionado con imágenes en tres dimensiones. Normalmente, se utiliza en el diagnóstico y evaluación del tratamiento de la

osteoporosis. Estos estudios tienen un costo mayor al utilizar un escáner de tomografía computarizada de rayos X estándar (Schreiber *et al.*, 2011).

2.5.4 Absorciometría simple de rayos X

La absorciometría simple de rayos X (SXA) es un sistema diseñado para la evaluación de zonas pequeñas en hueso y dientes, el cual se ha adaptado para el estudio de pequeñas especies principalmente roedores (ratas, cobayos, conejos entre otros). Este método de diagnóstico utiliza una fuente de rayos X de tipo dental peri apical de un solo haz de energía que en conjunto con el sensor de imagen de rayos X conectado a un puerto USB y un software programado en C++ Builder permite la obtención de una imagen radiológica. En esta técnica se emplea el principio de Lambert-Beer modificado para los rayos X que permite encontrar la ecuación del perfil de calibración que relaciona los pixeles de una radiografía digital con la densidad de un patrón de calibración para obtener la DMO (Jimenez-Mendoza *et al.*, 2011). La ley de Lambert-Beer establece la relación exponencial entre la intensidad de luz incidente, la luz transmitida y la absorción del material, así como el grosor del medio absorbente (Parnis y Oldham, 2013). Este principio físico es aplicado en los sistemas DEXA y SXA pero en lugar de luz, la energía incidente son los rayos X, mientras que el material que absorbe los rayos X es la muestra a analizar (hueso) y el sensor registra la energía transmitida en dicho material. Es importante señalar que la técnica es menos costosa que el DEXA y disminuye la exposición a la radiación y posibilidad de sufrir cáncer. Una radiación 0.01 mSv es el equivalente a la radiación promedio que experimenta una persona diariamente en condiciones normales (Mondaca, 2006).

2.5.5 Análisis cristalográfico mediante difracción de rayos X

La fase mineral del hueso está constituida principalmente por cristales microscópicos de fosfato de calcio entre los que se destaca la Hap cuya fórmula molecular es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Otras fases minerales presentes en el hueso incluyen al fosfato cálcico ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), fosfato de calcio dibásico (Ca_2HPO_4), entre otros, y algunas fases amorfas de fosfato de calcio. Los iones como citrato y carbonato entre otros pueden causar ligeras modificaciones en la estructura del hueso. La cristalografía de

rayos X puede identificar la estructura del cristal de HAp y analizar el tamaño y calidad del cristal. La composición química de los cristales del hueso no corresponden a la composición estequiométrica de la HAp pura y la inclusión de iones que pueden reemplazar al Ca^{2+} , como por ejemplo el Mg^{2+} , Sr^{2+} , Na^{+} , y K^{+} , entre otros, modifican la calidad cristalina y sus propiedades mecánicas (Rey *et al.*, 2009; Rivera-Muñoz, 2011; Rollo *et al.*, 2015).

2.5.6 Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo

Los marcadores bioquímicos del metabolismo del hueso son moléculas como proteínas, péptidos, minerales o algún componente óseo que puede ser liberado y cuantificado en la circulación u orina (Szulk *et al.*, 2000). Dichos marcadores están directamente relacionados con las actividades de los osteoclastos y osteoblastos. Los marcadores de formación ósea incluyen fosfatasa alcalina específica del hueso (ALP-B), OC, pro péptido carboxilo terminal del procolágeno tipo 1 (PICP) y PINP. Los marcadores de resorción ósea incluyen piridolinas (PYD) y desoxipiridolinas (DPD), N-telopéptidos de enlaces cruzados de colágeno (NTX), C-telopéptidos de enlaces cruzados de colágeno (CTX) y fosfatasa ácida 5b resistente a tartrato (TRACP5b) (Payne *et al.*, 2011).

2.5.7 Absorción intestinal aparente de calcio

La cantidad de calcio que se absorbe en el tracto digestivo, principalmente en el intestino delgado, depende de varios factores como por ejemplo, la ingesta de calcio y vitamina D, los cuales son importantes para mantener la salud ósea (Christakos *et al.*, 2011), ya que cuando el calcio es insuficiente en la dieta se incrementa la absorción de este mineral a nivel intestinal mediante el proceso de transporte activo transcelular (Bronner, 2003). La etapa fisiológica del individuo también determina la eficiencia en la absorción de ciertos minerales. En este sentido, se ha señalado que durante la pubertad y adolescencia la presencia de ciertas hormonas como la del crecimiento y el IGF entre otras incrementa cerca del 40 % la absorción del calcio (Bex y Bullion, 2003; Olney, 2003). Así mismo, la solubilización, digestión y absorción de las diferentes fuentes de calcio como carbonato, citrato y óxido de calcio también determinan su biodisponibilidad

(Bronner y Pansu, 1999). En el intestino grueso únicamente una pequeña cantidad de calcio es absorbida, principalmente cuando la dieta es alta en polisacáridos indigeribles (fibra dietética soluble e insoluble) para las enzimas digestivas humanas. No obstante, en esta porción del intestino, dichas fibras pueden ser fermentadas por la microbiota promoviendo un descenso del pH intestinal permitiendo con ello, la disociación de compuestos de calcio y difundirlo a torrente sanguíneo. Un método aproximado para conocer el porcentaje de absorción aparente de los minerales como el calcio consiste en determinar su consumo en la dieta y el contenido de éste mineral en las heces (Zafar *et al.*, 2004; Lobo *et al.*, 2006).

2.5.8 Calcio urinario e índice calcio/creatinina (Ca/Cr)

La evaluación de la excreción urinaria de calcio ha sido desarrollada tradicionalmente por el método de recolección total de orina en 24 horas. Predominantemente, se realiza en niños sospechosos de algún trastorno metabólico del calcio. Una de las desventajas de este método es el tiempo prolongado de recolección, pérdidas por evaporación y contaminación de la muestra. La creatinina (Cr) es una molécula que se produce en el organismo por la degradación de fosfocreatina, se excreta de manera constante en orina, es decir, no es reabsorbida en el riñón de forma tal que valores de Ca^{2+} observados con respecto a los detectados de Cr son conocidos como índice de Ca/Cr, son indicadores de hipercalcemia. La recolección de una muestra de orina aislada de orina ajustada a la excreción de Cr es un método muy práctico para establecer hipercalcemia. Varios autores coinciden que valores en la relación Ca/Cr en orina mayor a 0.2 mg/mg es compatible con hipercalcemia en adultos. En adolescentes existen diferentes factores a considerar como la edad, hábitos dietéticos y el ritmo circadiano etc. Valores en el índice Ca/Cr mayores a 0.17 en humanos se consideran altos indicando hipercalcemia (Sargent *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 2013).

2.5.9 Hidroxiprolina urinaria

La hidroxiprolina representa el 13 % de los aminoácidos contenidos en la molécula de colágeno, se considera que la excreción urinaria de hidroxiprolina es un marcador de resorción ósea y está fuertemente relacionada al aporte de este aminoácido en la dieta.

Por lo tanto, la recolección urinaria en humanos requiere un régimen previo con la ausencia de carnes rojas y aves (Singer y Eyre, 2008; Jagtap y Ganu, 2012).

2.5.10 Fosfatasa ácida/alcalina

La fosfatasa alcalina es una enzima liberada desde la membrana del osteoblasto, en ausencia de enfermedad hepática el aumento de fosfatasa alcalina obedece a un aumento a una actividad de los osteoblastos (Golub y Boesze, 2007; Mercado *et al.*, 2012).

2.5.11 Osteocalcina (OC)

La OC es la proteína no colágena más abundante que constituye la matriz orgánica del hueso, la cual es sintetizada por los osteoblastos y está constituida por 49 aminoácidos, por lo que es una de las proteínas del hueso más estudiadas. El 70 % de la OC sintetizada es incorporada a la matriz orgánica del hueso promoviendo gran atracción por la molécula de hidroxapatita debido a la presencia de ácido glutámico en las posiciones 17, 21 y 24. Únicamente una pequeña fracción (30 %) de OC sale a circulación sanguínea a través de vasos sanguíneos que fluyen en los canales de Harvers, se metaboliza en hígado y riñón. La OC tiene una vida media corta, por lo que puede ser medida por radio inmunoensayo y tiene un ritmo circadiano. La OC correlaciona bien con estados de aumento de la remodelación ósea. (Roy *et al.*, 2001; Rahnama *et al.*, 2010).

2.5.12 Pro-péptido amino terminal del pro-colágeno tipo I (PINP)

El PINP es sintetizado por diferentes tejidos como piel, tendones y ligamentos su principal síntesis se produce en el hueso por los osteoblastos. Estas células son estimuladas por la disminución en sangre de la HPT. El nivel del PINP en sangre refleja la cantidad de colágeno sintetizada, lo cual no significa que represente la cantidad que es depositada en el hueso para formar la matriz orgánica. Este marcador bioquímico de formación ósea llega a torrente sanguíneo a través de los vasos sanguíneos que recorren en conjunto con los nervios los conductos de Harvers (Koivula *et al.*, 2012).

2.6 Prevención y tratamiento de las enfermedades óseas

La alimentación y la nutrición repercuten de manera importante en el estado de salud de las personas, previenen enfermedades y son parte complementaria del tratamiento farmacológico en las diferentes etapas de una enfermedad. Una alimentación completa, variada, equilibrada e inocua, además de la adopción de estilos de vida sin adicciones (cigarro, alcohol, café, etc.) tiene amplias posibilidades de promover un estado de salud óptimo. A este respecto, es importante mencionar que en México como en otros países prevalece el sedentarismo y la mala alimentación. Adicionalmente, resulta importante destacar que una gran parte de la población mexicana no cumple con la ingesta diaria recomendada para ciertos nutrientes, entre ellos el calcio (Barrera *et al.*, 2012; Aguilera-Barreiro *et al.*, 2013; Ortega-Anta *et al.*, 2013).

2.7 Tratamientos alternativos (alimentos funcionales)

En las últimas décadas, las demandas de los consumidores en el campo de los alimentos han cambiado considerablemente. Actualmente, los alimentos no solo intentan satisfacer el hambre y proveer nutrientes necesarios para los humanos, sino que además aportan compuestos con actividad biológica para prevenir enfermedades relacionadas con la nutrición y coadyuvar en el tratamiento de diferentes patologías. La preferencia de estos alimentos es una tendencia en aumento debido al deseo de la gente de incrementar su esperanza y calidad de vida (Cencic y Chingwaru, 2010). Se encuentra ampliamente documentado que los problemas por carencias nutricionales son el resultado de patrones dietarios deficientes. La ingesta diaria recomendada (IDR) de calcio se puede cubrir con el consumo de alimentos que naturalmente son ricos en este mineral como los productos lácteos o alimentos de origen vegetal, principalmente los de hoja verde, aunque es sabido que contienen sustancias anti nutricionales que interfieren con la absorción de calcio en el intestino. La fortificación o adición de alimentos también es una vía válida para los individuos que no pueden alcanzar la IDR de calcio. Tomando en cuenta el detrimento en la salud y economía que conlleva la atención de enfermedades relacionadas con un consumo deficiente de calcio como son la densidad mineral baja y la osteoporosis, las dependencias gubernamentales de salud

pública están considerando la necesidad de implementar estrategias que ayuden a prevenir estos padecimientos (Miller *et al.*, 2001; Anderson, 2007).

2.8 Composición nutrimental del nopal

El nopal (*Opuntia* spp) es una planta ampliamente distribuida en el territorio mexicano, existe en forma silvestre y en huertos de cultivo tecnificados con sistemas de producción intensiva. Debido a la resistencia a los climas áridos y semiáridos su producción resulta muy rentable; no obstante, cuando el nopal continúa su desarrollo y se cosecha pesando más de 200 g disminuye su valor comercial con pérdidas económicas y aunque en el mejor de los casos es utilizado como forraje, en la mayoría de las veces no tiene utilidad y es considerado como de desecho. El nopal es un alimento hipo calórico con alto contenido de calcio que se incrementa con la madurez de la planta, en tanto que el contenido de oxalatos se modifica sin una tendencia clara (Hernandez-Urbiola *et al.*, 2010)

Aunque el interés del nopal como coadyuvante en la prevención y tratamiento de los padecimientos del hueso se ha incrementado en años recientes, hasta el momento no se ha reportado en la literatura científica el efecto de consumir nopal en diferentes etapas de madurez como fuente exclusiva de calcio en la dieta. Con base en lo anteriormente señalado, en el presente trabajo se determinó el potencial del nopal en diferentes estadios de madurez como única fuente de calcio sobre la salud del hueso en un modelo de ratas en crecimiento.

3. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los estudios con nopal (*Opuntia ficus indica*) como alimento funcional se han enfocado en las enfermedades crónico degenerativas como obesidad y diabetes mellitus principalmente (Frati *et al.*, 1989; Trejo-González *et al.*, 1996; Valencia-Sandoval *et al.*, 2010; Núñez-López *et al.*, 2013). En años recientes se ha incrementado el interés por estudiar el efecto del consumo de nopal sobre la salud del hueso (Kang *et al.*, 2012; Aguilera-Barreiro *et al.*, 2013; Ko *et al.*, 2014). El potencial de este vegetal como alimento funcional para la salud ósea tiene fundamento en su composición nutrimental, en virtud de que se encuentra ampliamente reportado que el contenido de calcio se incrementa con la edad de la penca o cladodio (Rodríguez-García *et al.*, 2007; Contreras-Padilla *et al.*, 2015). Aunque ha sido señalado que la presencia de oxalatos en los cladodios puede reducir la biodisponibilidad de calcio en el intestino (McConn y Nakata, 2004) esta suposición no ha sido evaluada considerando que la concentración de oxalato en el nopal varía con la etapa de desarrollo del cladodio (Contreras-Padilla *et al.*, 2011). Otra característica que aumenta el potencial del nopal para mejorar la salud del hueso es su alto contenido de Mg^{2+} y K^+ , ya que se ha reportado que la suplementación con estos minerales en la dieta incrementa la DMO y reduce la pérdida de masa ósea causada por el envejecimiento (Li *et al.*, 2013; Lambert *et al.*, 2015). Sin embargo; hasta el momento no se ha determinado el potencial del nopal como fuente exclusiva de calcio para la formación de masa ósea tomando en cuenta las diferentes etapas o estadios de desarrollo de los cladodios empleando un modelo de ratas en etapa de crecimiento.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo afecta la etapa de desarrollo del nopal *Opuntia ficus indica* la biodisponibilidad del calcio presente en ésta cactácea en un modelo de ratas en crecimiento?

5. HIPÓTESIS

La biodisponibilidad del calcio presente en los cladodios en etapa tardía de desarrollo será significativamente mayor con respecto a la biodisponibilidad de este mineral en los cladodios en etapa temprana de desarrollo en un modelo de ratas en crecimiento.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar el efecto del consumo de nopal *Opuntia ficus indica* en diferentes períodos de madurez sobre parámetros de calidad ósea en ratas Wistar macho en etapa de crecimiento, a fin de conocer el potencial de esta cactácea como fuente de calcio biodisponible.

6.2 Objetivos particulares

6.1.1 Analizar el contenido de macro nutrientes y minerales (Ca, P, Mg y K) del nopal *O. ficus indica* en cuatro etapas de desarrollo (60, 200, 400 y 600 g de peso).

6.1.2 Elaborar dietas experimentales de acuerdo a la dieta estándar AIN-93G, ajustando la porción de nopal en diferentes etapas de desarrollo que aporte el calcio recomendado para roedores en etapa de crecimiento.

6.1.3 Determinar el porcentaje de absorción aparente del calcio, magnesio, potasio y fósforo presente en *O. ficus indica* como fuente exclusiva de este mineral en la dieta de ratas Wistar macho durante el periodo de crecimiento.

6.1.4 Conocer el efecto del consumo de *O. ficus indica* en diferentes fases de desarrollo como fuente exclusiva de calcio en la dieta sobre marcadores bioquímicos del remodelado óseo.

6.1.5 Analizar el efecto del consumo de *O. ficus indica* en diferentes períodos de desarrollo como única fuente de calcio sobre las propiedades densitométricas, biomecánicas, microestructurales y cristalinas, así como en el contenido de minerales (Ca, P, Mg y K) del fémur de ratas Wistar macho en etapa de crecimiento.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material vegetal

Las pencas de nopal *Opuntia ficus Indica* variedad Milpa Alta se obtuvieron durante el ciclo primavera-verano del 2014 -2015 en el campo experimental del rancho “Los Lores” en Silao, Guanajuato, el cual es un cultivo con fertilización de tipo orgánico. Las pencas se cosecharon en diferentes etapas de maduración hasta alcanzar un peso de 60, 200, 400 y 600 g, las cuales corresponden a una edad de 25, 60, 100 y 135 días, respectivamente después del brote.

7.1.1 Preparación de muestras

Los cladodios se limpiaron para eliminar las espinas, lavaron y desinfectaron. Posteriormente, se retiró la corona del nopal con un cuchillo evitando cortar pulpa. Los nopales limpios y sin espinas se cortaron en cubos homogéneos de 2x2cm. Los cubos de nopal se colocaron en charolas de acero inoxidable dentro de una estufa de aire forzado Marca BG Didacta Italia Modelo E 102 para ser deshidratados a 50 °C. El nopal deshidratado se trituró en un molino de martillos estriado (PULVEX 200) con una velocidad de alimentación de 10g/s. Finalmente, el granulado se hizo pasar por un tamiz malla 60 USA. En la Figura 9 se muestra el procedimiento para la obtención del granulado (polvo de nopal) empleado en la elaboración de las dietas experimentales.

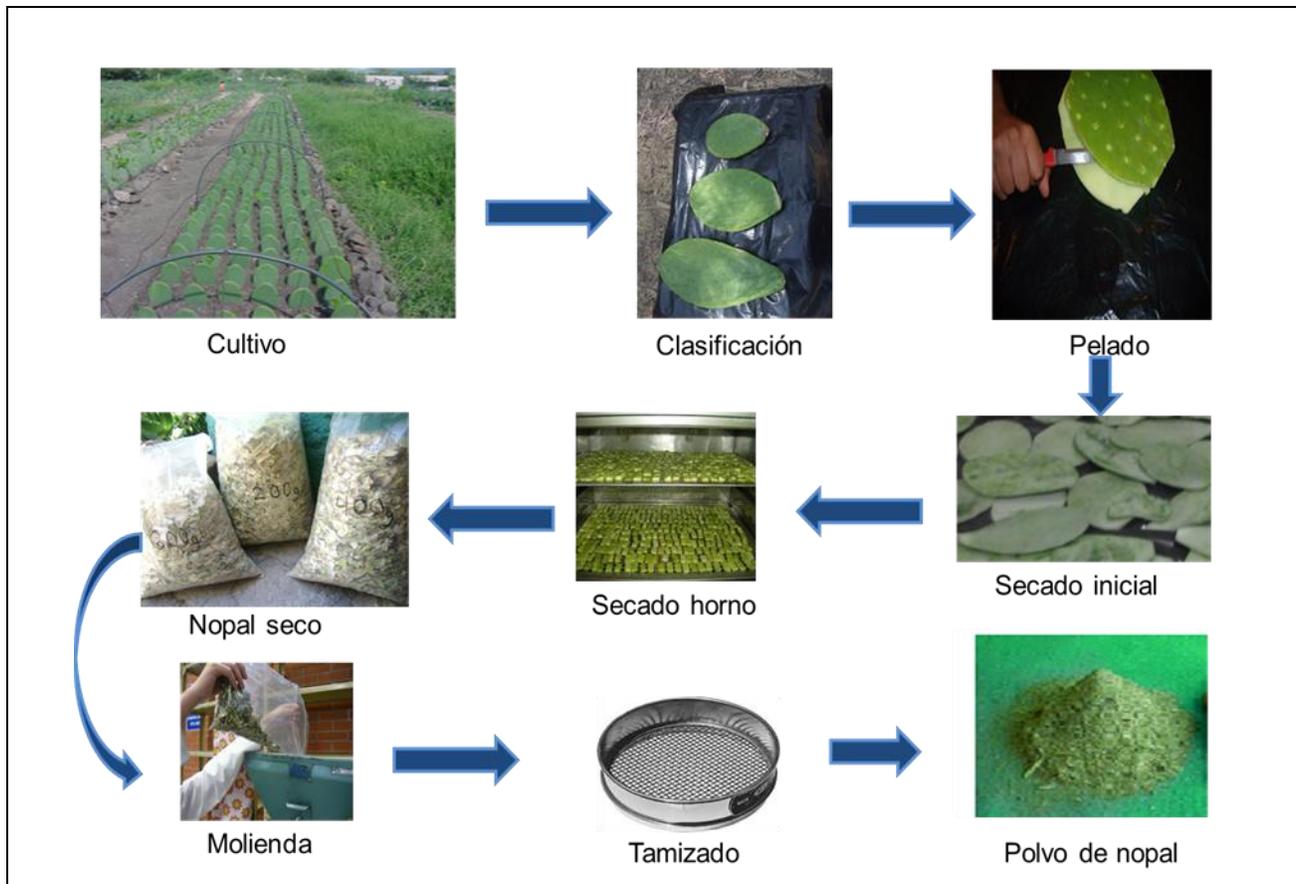


Figura 9. Preparación del nopal *Opuntia ficus indica* y elaboración del granulado para el análisis químico proximal y elaboración de las dietas experimentales.

7.1.2 Análisis del contenido de minerales

La concentración de minerales en las muestras de nopal se realizó mediante espectrometría de absorción atómica (Perkin Elmer, Mod. Analyst 300, USA) con detector de flama, utilizando una mezcla de gases (aire-acetileno), equipado con un corrector de respaldo y una lámpara de cátodo hueco de deuterio. Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes: 12 psi de aire seco, 70 psi de acetileno, una flama a 422.7 nm, lámpara con 10 mA de corriente y con una apertura de 0.7 nm. Los minerales que se cuantificaron fueron calcio, magnesio, potasio acorde con el método oficial (968.08). Así mismo, el contenido de fósforo se determinó con el método 965.17 (AOAC, 2000).

7.2 Elaboración de las dietas experimentales

La formulación de las dietas experimentales, se realizó considerando el contenido de calcio en el polvo de nopal y ajustándose a la dieta estándar recomendada por el American Institute of Nutrition AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993) para ratas en crecimiento. La Tabla 1 muestra los ingredientes utilizados en la elaboración de las dietas.

Tabla 1. Ingredientes de las dietas experimentales elaboradas a base de nopal como única fuente de calcio

Ingredientes	Control (g/kg)	N-60 (g/kg)	N-200 (g/kg)	N-400 (g/kg)	N-600 (g/kg)
Almidón de maíz	530	517	519	520	521
Sacarosa	100	100	100	100	100
Caseína ^a	200	177	193	195.6	195
Aceite vegetal	70	63.9	66	68	67.5
Fibra cruda ^b	50	30	36.8	37	38
MixMin ^c	49	34	42	44	43
MixVit ^d	10	10	10	10	10
L-Cistina ^e	3	3	3	3	3
Colina ^f	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
CaCO ₃ ^g	12.5	-	-	-	-
Nopal ^h	-	280	168	140	132

^aCaseina Sigma-Aldrich (C7078) 92.5 % (n=6.25), ^b α -Cell Fiber solft zolca MPbiomedical, ^cMezcla mineral sin calcio AIN-93G (Harlan, 04374), ^dMezcla de vitaminas AIN-93-VX (Harlan, 94047), ^eL-Cistina(Sigma-Aldrich SGC8755-500)^f,Bitartrato de colina (Sigma-Aldrich SGC1926-500), ^gCarbonato de calcio (Merck, 2066), ^hPolvo de nopal= 5g de calcio /kg dieta

7.3 Absorción aparente de minerales del nopal en ratas Wistar

Después de una semana de aclimatación, los animales se colocaron en jaulas individuales de acero inoxidable bajo condiciones controladas de luz (ciclos de luz-oscuridad 12:12 h) y temperatura. Se emplearon 5 grupos experimentales de 7 ratas cada uno asignadas en forma aleatoria como sigue: Dieta control con carbonato de calcio como fuente de calcio (DC), dieta con nopal de 60 g (N-60), dieta con nopal de 200 g (N-200), dieta con nopal de 400 g (N-400) y dieta con nopal de 600 g (N-600). Los animales tuvieron libre acceso (*ad libitum*) a las dietas experimentales y agua desionizada. El consumo de alimento se registró diariamente. La ingesta de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y P se calculó con base en el consumo de alimento. Las heces fueron recolectadas por periodos de 3 días en las semanas 2, 4 y 6 del experimento que corresponden a las semanas 7, 9 y 11 de edad de las ratas. La absorción aparente de Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ fue calculada de acuerdo a la ecuación (1) reportada previamente (Lobo *et al.*, 2006).

$$\text{Absorción mineral aparente (\%)} = \frac{\text{Consumo mineral} - \text{excreción mineral}}{\text{consumo mineral}} \times 100 \quad (1)$$

7.3.1 Determinación de minerales en heces de rata

La concentración de calcio, magnesio, potasio y fósforo se determinó en las heces de los animales experimentales mediante espectrometría de masas acoplado a inducción de plasma (ICP-MS) con un equipo ICP-EOS Variant 730 (Kyoto, Japón). Se colocaron 0.5 g de muestra molida y calcinada a 600 °C por 5 horas. En seguida, las cenizas fueron disueltas con 5 mL de HCl y 5 mL de HNO_3 para su digestión. Posteriormente, las muestras se aforaron a 45 mL con agua desionizada. Finalmente, las muestras diluidas se colocaron para su lectura en el equipo, en donde la concentración de cada mineral se obtuvo en unidades de mg/L para ser transformados a mg/kg heces y aplicando el factor de dilución correspondiente aplicando la ecuación (2):

$$mg/kg \text{ heces} = \frac{\left(\frac{mg}{L}\right) (F.D.) (Volumen \text{ del aforo})}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

(2)

7.4 Determinación de marcadores bioquímicos de formación ósea

Al inicio del experimento, es decir, a la semana 5 correspondiente a la etapa de la infancia de los sujetos experimentales, se obtuvo una muestra de sangre *in vivo* por punción caudal para conocer los valores basales de los marcadores bioquímicos del metabolismo óseo. Este procedimiento se repitió durante el experimento en las semanas 7, 9 y 11 de edad de las ratas correspondientes a las etapas puberal, adolescencia y adultez temprana de los animales experimentales (Sengupta, 2013). El sujeto de estudio se inmovilizó con una bolsa de poli papel con terminación en forma de embudo como se muestra en la Figura 10. Se utilizó un foco colocado cerca de la cola de la rata (15-20 cm) para inducir una dilatación en la vena caudal por calor y facilitar su identificación e introducir una aguja fina para la recolección de 0.5 mL de sangre por gravedad. Una vez obtenida la muestra se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos y se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos para separar el suero donde se determinó la concentración de OC y PINP.

Es importante señalar que este procedimiento permitió obtener muestras sanguíneas en el mismo sujeto experimental en diferentes periodos, a fin de dar seguimiento al mismo sujeto disminuyendo el número de sujetos de estudio.

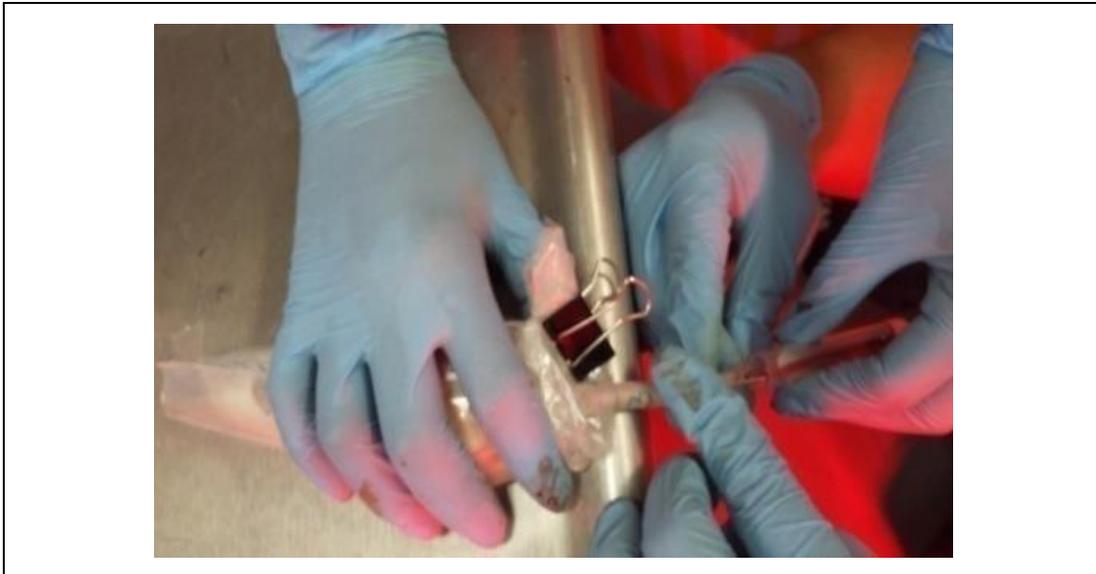


Figura 10. Obtención de muestra sanguínea vía vena caudal en ratas alimentadas con nopal (*Opuntia ficus indica*) como fuente de calcio durante la etapa de crecimiento.

7.4.1 Análisis de osteocalcina en suero

La determinación de este biomarcador en las muestras sanguíneas de los animales experimentales se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con pruebas de inmunoensayo utilizando el kit comercial Osteocalcin bioassay™ Elisa Kit Rat (Catalogo No. 27243) USB. Se adicionaron 100 μ L del reactivo estándar o de la muestra en cada pozo y se incubó por 2 h a 37 °C. Una vez transcurrido este periodo, se adicionaron 100 μ L del reactivo A (anticuerpo monoclonal A) y se incubó por 1 h a 37 °C; enseguida se aspiró la muestra y se lavó 3 veces y se adicionaron 100 μ L del reactivo B; se incubó por 30 minutos a 37 °C, al término se aspiró y lavó 5 veces. Posteriormente, se adicionan 90 μ L de sustrato y se incubó nuevamente entre 15 y 25 minutos a 37 °C. Finalmente, se adicionó la solución *stop* y se realiza la lectura inmediatamente en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

7.4.2 Análisis del pro-péptido amino terminal del pro-colágeno tipo I (PINP)

La cuantificación del pro-péptido amino terminal del pro-colágeno tipo I (PINP) se llevó a cabo mediante inmunoensayo empleando un kit comercial 1-N Terminal propeptide bioassay™ Elisa kit rat (No de catálogo 254324) USB.

El procedimiento consistió en adicionar 50 µL del blanco, estándar y muestra a cada pozo, después se agregaron 50 µL del reactivo A y la placa se agitó suavemente sellándola e incubándola durante 1 hora a 37 °C. Al final, se retiró la solución por inversión de la placa contra papel absorbente, se lavó 2 veces con la solución de lavado durante 1-2 minutos, se removiendo el exceso de líquido con papel absorbente. Posteriormente, se adicionaron 100 µL del reactivo B. Se selló e incubó la placa durante 30 minutos a 37 °C, en seguida se aspiró la muestra y se lavó 5 veces. Se adicionaron 90 µL del sustrato y las muestras se incubaron durante 15 – 25 minutos a 37°C protegiéndolas de la luz hasta la aparición de un color azul. Finalmente, se adicionaron 50 µL de solución *stop* y se llevó a cabo la lectura a una absorbancia de 450 nm en el espectrofotómetro.

7.4.3 Determinación del índice calcio/creatinina urinario (Ca/CrU)

El Ca/CrU se determinó en muestras aisladas de orina para medir hipercalciuria en lugar del método tradicional (recolección urinaria de 24 horas) debido a las pérdidas por evaporación, el tiempo de recolecta y riesgos de contaminación entre otros. El índice Ca/CrU urinario se calculó con la fórmula (3). La cuantificación de calcio en las muestras de orina aislada son confiables cuando se relacionan con la excreción de creatinina.

$$\frac{Ca}{Cr} \text{ urinario} = \frac{(Ca \text{ urinario } / PMCa)}{(Cr \text{ urinario } / PMCr)} \quad (3)$$

El análisis para la determinación de calcio urinario se realizó con un kit para la determinación cuantitativa por colorimetría Quanti-Chrom™ Calciumassay kit (DICA-500 bioassay systems). Previo a la determinación se elaboró una curva de calibración con los reactivos de trabajo y mezclándolos en volúmenes iguales. Posteriormente, se colocaron 5µL de muestra de orina en el pozo de la placa con 200µL de la mezcla de los reactivos de trabajo y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente para llevar a cabo la lectura de la densidad óptica entre 570 y 650 nm en el

espectrofotómetro. Los cálculos para determinar la concentración de calcio en la muestra se realizaron con la ecuación 4.

$$mg/dL = \frac{OD\ muestra - OD\ blanco}{valor\ de\ la\ pendiente}$$

(4)

La determinación de Cr en orina se realizó utilizando un kit comercial (Quantichrom™ Creatinine Assay Kit No. de catálogo DICT.500 bioassay systems). Se transfirieron 5 µL de del estándar y las muestras de orina en pozos separados, se agregaron 50 µL de cada uno de los reactivos A y B; así como 200 µL del reactivo de trabajo en cada uno de los pozos. La densidad óptica se midió inmediatamente y después de 5 minutos la absorbancia a 510 nm. Los cálculos para determinar la concentración de creatinina en la muestra se realizaron con la ecuación 4.

7.5 Determinación in vivo de la densidad mineral ósea mediante absorciometría simple de rayos X (SXA)

Este método es muy confiable y menos costoso que el la absorciometría dual de rayos X (DEXA) para determinar la densidad mineral ósea en hueso. Este técnica consistió en utilizar una fuente simple de rayos X de tipo dental peri-apical marca Satelec X-mind®, un sensor de rayos X (Hamamatsu® S10835) y un software especialmente diseñado en lenguaje desarrollado en C++ Builder permitiendo que la imagen captada en el sensor de rayos X sea transformada a una imagen digital sobre la cual se calcula la DMO utilizando la ecuación modificada de la ley de Lambert-Beer. En dicha ecuación se establece la relación entre la energía de rayos X transferida en el sensor y la energía absorbida en la muestra, tomando en consideración el grosor de la muestra a cierta longitud de onda. Modificando la ecuación es posible relacionar los pixeles en la radiografía obtenida en la computadora con la DMO en el fémur de la rata. En la Figura 13 se muestra un esquema del densitómetro utilizado en este trabajo.

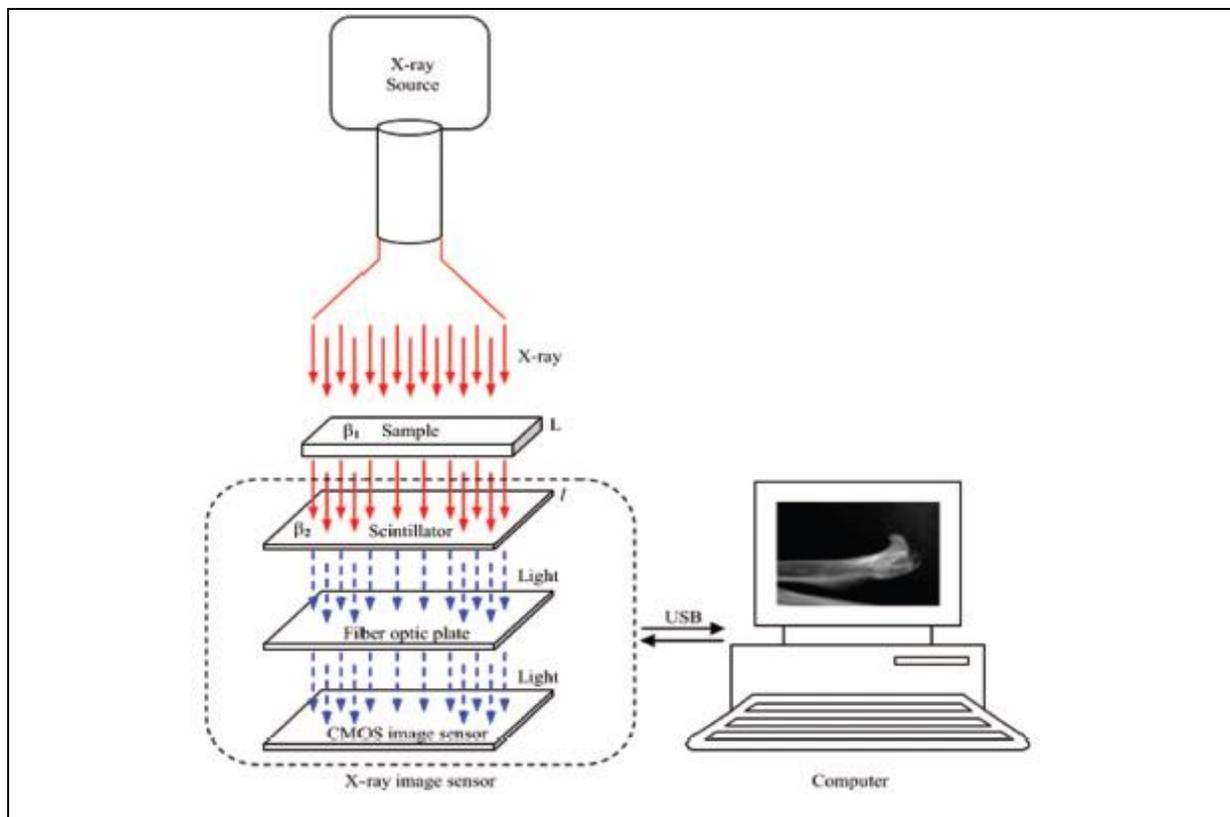


Figura 11. Diagrama esquemático para la obtención de la imagen electrónica sobre la cual se calcula la DMO modificando la ecuación de Lambert-Beer (Jimenez-Mendoza *et al.* 2011).

7.5.1 Procedimiento para la obtención de la radiografía en el sistema SXA

La técnica de medición de rayos X es un método no invasivo que permite dar seguimiento al crecimiento de huesos y dientes por tiempo indefinido. Para la obtención de las radiografías digitales de rayos X, los animales de experimentación se sometieron a un ayuno de 12 h previo al análisis. Los sujetos se anestesiaron colocándolos en una cámara saturada con éter etílico como se observa en la Figura 12 a). En seguida, el animal se posicionó cuidando que el fémur no excediera los límites del sensor de rayos X (Figura 12b). Posteriormente, la imagen obtenida del fémur se digitalizó para su análisis posterior (Figura 12c). Durante el análisis de las imágenes, se utilizó un balín de acero de diámetro conocido como patrón de calibración para el cálculo de la densidad mineral ósea.

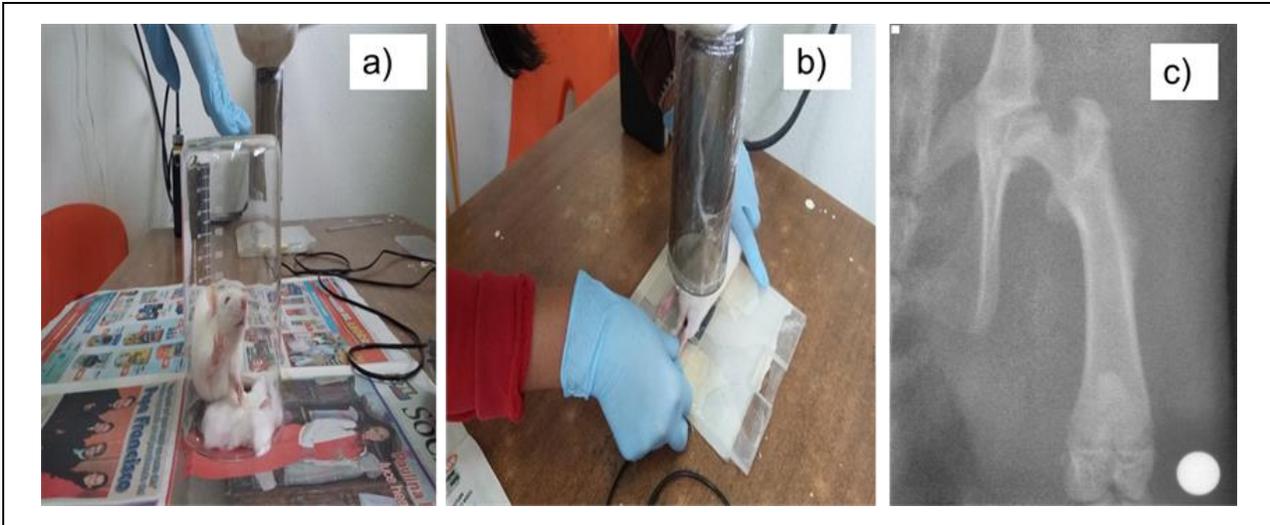


Figura 12. Procedimiento para la obtención de las radiografías digitales para la determinación de la densidad mineral ósea en los sujetos de experimentación con el sistema SXA a) Sedación del sujeto experimental, b) ubicación del sujeto en el sensor de rayos X y c) imagen representativa obtenida del fémur en forma digitalizada.

7.5.2 Cálculo de la DMO

El cálculo de la DMO en el fémur de la rata se realizó sobre la imagen digital obtenida en SRD_V1.exe. (Figura.12c) permite seleccionar una región de interés (0.01 cm²), sobre la cual, se analiza el histograma acumulado que establece la relación entre la cantidad de pixeles y el nivel de gris de esos pixeles obteniendo la intensidad transmitida después de pasar por la muestra con la fórmula siguiente donde I es la intensidad transmitida, HA es la cantidad de pixeles y A es el área.

$$I = HA/A \tag{5}$$

Posteriormente, modificando ecuación de Lambert-Beer adicionando un segundo coeficiente de absorción que corresponde al coeficiente de absorción del cintilador β_2 se establece la ecuación que relaciona pixeles en cm² con la DMO en g/cm².

$$I = I_0 \exp - (\beta_1 * L + \beta_2 * l) \tag{6}$$

El cálculo de la DMO es generalmente expresada en unidades de masa por unidad de volumen (g/cm³), si el volumen es expresado como producto del área por el grosor de la muestra (A*L) la DMO se expresaría de la siguiente forma ($\rho = g/A*L$) donde la L es el grosor de la muestra. Sustituyendo g/A por σ en la ecuación anterior la DMO quedaría de la siguiente forma se expresaría ($\rho = \sigma/L$) si despejo L entonces ($\sigma/\rho = L$), y sustituyo L en la ecuación modificada;

$$I = I_0 \exp - \left(\beta_1 * \frac{\sigma}{\rho} + \beta_2 * l \right) \tag{7}$$

Puedo despejar σ en la ecuación 7 para obtener la DMO.

$$\sigma = -\frac{\rho}{\beta_1} \left[\ln \left(\frac{I}{I_0} \right) + \beta_2 * l \right] \tag{8}$$

7.6 Pruebas mecánicas en fémur de ratas alimentadas con nopal *O. ficus indica*

El estudio mecánico del hueso ha sido empleado como una evaluación real de la resistencia que opone el hueso a la fractura en modelos experimentales. En personas de edad avanzada y aquellas que cursan con diversas patologías, estas pruebas no pueden desarrollarse debido al carácter invasivo y destructivo de las mismas. La aplicación de pruebas mecánicas en el hueso son totalmente destructivas y permiten observar el comportamiento de un sistema complejo como es el hueso, el cual está constituido por minerales y de una matriz orgánica, la cual le confiere cierta flexibilidad al material cuando es sometido a diferentes cargas en distintas direcciones (Zhang *et al.*, 2006).

7.6.1 Prueba de flexión en tres puntos

Al término del experimento los animales fueron sacrificados por decapitación y se separaron los fémures derechos de la cadera y rodilla. El tejido suave adherido al hueso se eliminó manualmente. Los huesos limpios se cubrieron con una gaza saturada con solución fisiológica Ringer para evitar la deshidratación y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su conservación hasta el momento de llevar a cabo las pruebas mecánicas. En la prueba de flexión en tres puntos el fémur se coloca horizontalmente con sus extremos encima de dos soportes ubicados a la misma distancia del punto medio del hueso. En el punto medio del fémur se aplica una fuerza o carga a velocidad constante hasta que ocurre la falla mecánica del material. Al momento en que se llevaron a cabo las pruebas mecánicas se descongelaron los huesos y se colocaron sobre dos soportes con 2.4 cm de separación entre sí como se observa en la Figura 13a y se utilizó una célula de carga de 5000 N a una velocidad constante de 5 mm/min (Bozzini *et al.*, 2012). Las pruebas mecánicas se desarrollaron en un equipo Testing machine (Zwick / RoellMod Z005) y con un software para el análisis de los datos (Test Xpert intelligent testing versión 12.0).

7.6.2 Prueba de compresión

En esta prueba se utilizó el mismo equipo y célula de carga empleado en la sección anterior, la velocidad de aplicación de la fuerza de carga fue de 1 mm/min (Guede *et al.*, 2013). El ensayo de compresión consistió en aplicar una carga vertical en relación al eje longitudinal del hueso. En esta prueba la muestra debe adaptarse a una forma cilíndrica y presentar una relación grosor/longitud 2:1. Para lo anterior, se asignó como referencia el punto medio del fémur izquierdo (diáfisis), a partir del cual se miden 3 mm aproximadamente hacia ambos lados del punto medio. El material se corta por ambos lados tratando de dejar los bordes paralelos para que la sonda de carga se pueda apoyar sobre el hueso como se observa en la Figura 13 b (Guede *et al.*, 2013).

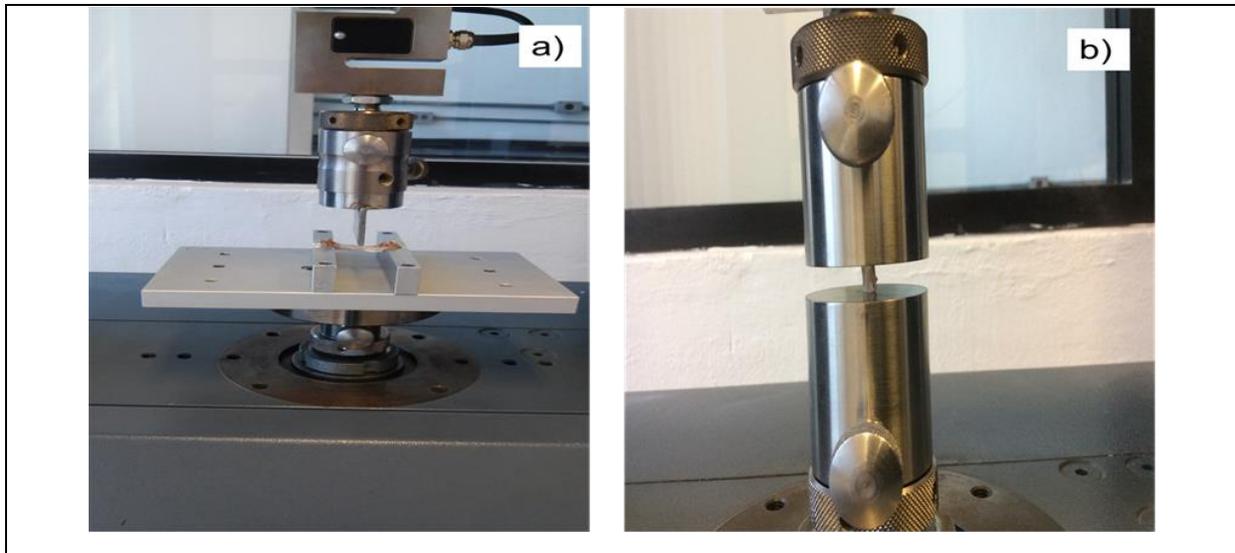


Figura 13. a) Prueba flexión en tres puntos en el fémur de rata alimentada con *O. ficus indica* como fuente de calcio en la dieta. b) Prueba de compresión en la diáfisis femoral.

7.7 Análisis micro estructural del fémur por microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis de la micro arquitectura ósea se llevó a cabo en la parte distal del fémur izquierdo, el cual fue seccionado sobre su eje longitudinal desde la línea intercondilar hasta la diáfisis femoral atravesando la región de la metáfisis. La selección de esta zona para el análisis microestructural obedece al hecho de que en ésta área se localiza el hueso trabecular y hueso compacto que fueron las áreas de interés. Previo al análisis, el fémur fue sometido a 130 °C en un reactor Papin (Cinsa, 6 L) durante 1 hora. En seguida, los huesos se secaron a peso constante en una estufa (Felisa, FE-295A) a 60°C. La remoción de los componentes orgánicos del hueso se llevó a cabo con una digestión durante 24 horas a 37 °C con la enzima proteasa Type XIV (Sigma-Aldrich chemical Co., St. Louis, MO, USA, P-6911) al 1 % (p/v). Posteriormente, se realizó una segunda digestión con amino-peptidasa (Sigma chemical Co., P-6887) al 0.4 % (p/v) durante 18 horas a 37 °C. Los lípidos se eliminaron con éter etílico (J.T. Baker 9240-03) y con acetona (J.T. Baker 9006-03) en agitación constante (Diagger® AR-100) durante 12 h. Los huesos se secaron a 60 °C hasta peso constante. Finalmente, los huesos se colocaron en un porta muestras y se cubrieron con un baño de oro para su observación

en un microscopio electrónico de barrido (Joel JSM 6060LV Tokio, Japón). Los parámetros de medición fueron la separación de las trabéculas, grosor de las trabéculas y grosor cortical en la parte interna del fémur.

7.8 Análisis de cristalinidad del fémur mediante difracción de rayos X

Previo al análisis, los huesos fueron sometidos a un proceso enzimático para eliminar la presencia de proteínas como se describe en el párrafo anterior. En seguida, los huesos se desgrasaron y posteriormente, se pulverizaron con un mortero y se hicieron pasar a través de una criba 100 USA. El material pulverizado se empacó densamente sobre un soporte de aluminio. El análisis cristalográfico se llevó a cabo utilizando un equipo de difracción de rayos X (Rigaku Miniflex modelo MDI) empleando una longitud de onda ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). El equipo fue operado a 35 kV y 15 mA. Las mediciones se realizaron desde 10 hasta 70 ° en una escala de 2θ con un tamaño de paso de 0.02°. El porcentaje de cristalinidad del material y la calidad cristalina se calculó con un software (Giraldo-Betancourt *et al.*, 2013).

7.9 Contenido mineral en fémur de ratas alimentadas con nopal *O. ficus indica*

La determinación del contenido de calcio, magnesio, potasio y fósforo en los fémures de los animales experimentales se determinó como se indicó en la sección 7.3.1.

7.10 Análisis estadísticos

El promedio y la desviación estándar de los datos obtenidos en cada una de las determinaciones fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Se realizó un análisis de comparación de medias con el estadístico de Tukey ($p \leq 0.05$) para detectar diferencias significativas entre grupos. Finalmente, se aplicó un análisis de correlación de Pearson bivariado para determinar la asociación entre variables. El programa estadístico para el análisis de los datos fue el SPSS versión 9.0.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Contenido mineral en el nopal en diferentes etapas de desarrollo

Como puede observarse en la Tabla 2, es claro que el contenido de calcio aumenta con la edad del nopal, las pencas de 200, 400 y 600 g presentaron 70, 94 y 127 % más calcio que el nopal 60 g con diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Estos resultados coinciden con lo reportado previamente por Rodríguez-García *et al.*, 2007. Por el contrario, el contenido de potasio disminuyó con la edad del nopal. Esta disminución puede ser atribuida a la etapa fisiológica de la planta, ya que durante las etapas tardías las pencas de nopal generan nuevos brotes (Kafkafi y Xu, 1999; Waraich *et al.*, 2011). Por otro lado, el contenido de magnesio no presentó cambios importantes como el caso del calcio en relación a la madurez del nopal. El elevado contenido de magnesio es atribuido a su alta actividad fotosintética (Fardous *et al.*, 2010). Por otra parte, el contenido de fósforo no mostró una tendencia clara en relación a su estado de madurez. Estos resultados están acorde con lo reportado por Hernández-Urbiola *et al.* (2010).

Tabla 2. Contenido de minerales en el nopal *Opuntia ficus indica* en diferentes etapas de madurez

Nopal	Calcio (mg/g)	Fósforo (mg/g)	Potasio (mg/g)	Magnesio (mg/g)
N-60	17.2 ± 0.05 ^a	2.9 ± 0.01 ^a	46.3 ± 0.14 ^a	7.2 ± 0.31 ^a
N-200	29.3 ± 0.04 ^b	2.2 ± 0.01 ^b	39.2 ± 0.15 ^c	7.4 ± 0.21 ^b
N-400	33.5 ± 0.06 ^c	1.7 ± 0.01 ^c	33.1 ± 0.14 ^b	7.7 ± 0.11 ^c
N-600	39.2 ± 0.06 ^c	2.2 ± 0.02 ^b	34.2 ± 0.13 ^b	7.6 ± 0.12 ^c

Los resultados son el valor promedio ± desviación estándar (n=3), letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

No obstante que el calcio y el fósforo son los minerales más estudiados en relación a la salud ósea, el magnesio y el potasio han ganado importancia en los últimos años, en

virtud de que se ha reportado que un incremento en la dieta de estos minerales en adultos mayores fue asociada a una disminución de la pérdida de masa ósea (Tucker *et al.*, 1999; Ryder *et al.*, 2005).

8.2 Composición nutrimental de las dietas elaboradas con nopal como fuente de exclusiva de calcio

La composición nutrimental de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 3. Con base en el contenido de calcio que presentó el nopal en diferentes etapas de madurez se determinó la porción de nopal a utilizar en la elaboración de las dietas experimentales. El equilibrio calórico de las dietas se distribuyó de la siguiente manera: 63, 20 y 17 % aproximadamente para carbohidratos, proteínas y lípidos, respectivamente. La densidad energética de las dietas se encontró en un rango de 3600 a 3700 kcal / kg de dieta. Esto cumple con las recomendaciones dietéticas establecidas para roedores en crecimiento (Reeves *et al.*, 1993). La relación Ca/P más baja se presentó en la dieta N-60 (0.93) mientras que la más alta en la dieta N-400 (1.23). De acuerdo con estudio previos, los animales alimentados con dietas que contienen una relación molar entre 1–1.4 no muestran efectos negativos en las propiedades mecánicas y micro estructurales del hueso debido a que no se compromete la absorción intestinal del calcio (Martínez-Flores *et al.*, 2002; Hunt *et al.*, 2008).

Tabla 3. Contenido nutrimental de las dietas elaboradas con *O. ficus indica*

Contenido Nutrimental	Control	N-60	N-200	N-400	N-600
Macro nutrimentos^a					
Carbohidratos %	63.9	63.2	63.4	63.5	62.7
Proteínas %	19.5	19.9	19.8	19.8	20.2
Lípidos %	16.5	16.7	16.6	16.6	17.0
$\Delta\Sigma$ (Kcal/g dieta) ^d	3.67	3.06	3.27	3.33	3.35
Micro nutrimentos^{b(*)}					
Magnesio %	0.050	0.252	0.175	0.158	0.151
Potasio %	0.360	1.656	1.018	0.823	0.812
Calcio %	0.474	0.448	0.445	0.503	0.476
Fósforo* %	0.299	0.368	0.336	0.324	0.330
Relación molar Ca/P	1.22	0.93	1.02	1.19	1.11

^aAnálisis químico proximal (métodos AOAC), ^bContenido mineral calcio, potasio y magnesio (método AOAC 968.08) *Contenido de fósforo (método AOAC 985.35), ^cAporte calórico calculado con valores fisiológicos estándar carbohidratos, proteínas y lípidos (4, 4 y 9 Kcal, respectivamente) ^dDensidad energética de las dietas (Kcal totales/Kg dieta).

8.3 Eficiencia dietética y ganancia de peso en las ratas alimentadas con nopal como fuente de calcio durante la etapa de crecimiento

El consumo de alimento en todos los grupos experimentales fue menor comparado con el del grupo control como se muestra en la Tabla 4. El grupo alimentado con la dieta N-600 consumió la menor cantidad de alimento durante el periodo experimental (926 ± 21 g), mientras que el grupo control presentó el mayor consumo de alimento por rata (1075 ± 53 g).

Tabla 4. Estado nutricional de las ratas alimentadas con nopal como fuente de calcio durante la etapa de crecimiento

Parámetros	Control	N-60	N-200	N-400	N-600
Peso inicial (g)	124.8±18 ^a	124±15 ^a	124.7±15 ^a	124.7±15 ^a	124.8±15 ^a
Peso final (g)	334.4±22 ^a	316.7±20 ^a	341.4±21 ^a	322.8±21 ^a	346.0±34 ^a
Ganancia de peso (g)	209.5±22 ^a	192.7±22 ^a	216.7±16 ^a	198.1±19 ^a	221.2±30 ^a
Consumo de alimento (g)	1075.0±53 ^a	938±24 ^b	933±23 ^b	975±34 ^b	926.0±21 ^b
Eficiencia dietética*	0.19±.01 ^a	0.2±.02 ^{abc}	0.23±.01 ^{bc}	0.2±.01 ^{ab}	0.23±.03 ^c

Los valores expresan el promedio ± desviación estándar de los grupos experimentales (n=7), letras diferentes en la misma línea o renglón indican diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.*Eficiencia dietética = ganancia de peso (g)/ alimento consumido (g).

El promedio de ganancia de peso corporal al final del experimento no mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre todos los grupos experimentales. El grupo alimentado con la dieta N-60 mostró el promedio más bajo de ganancia de peso (192.7 ± 22.2 g), en tanto que el grupo alimentado con la dieta N-600 presentó los valores más altos (221 ± 30 g). La máxima eficiencia dietaria fue observada en los grupos N-200 y N-600. Los grupos alimentados con nopal como fuente de calcio consumieron menos alimento que el grupo control. Lo anterior puede ser atribuido al efecto saciante que produce la fibra dietética (Slavin, 2005). En este estudio los grupos alimentados con las dieta N-200 y N-600 mostraron mayor eficiencia dietética comparado con el grupo control. Se encuentra documentado que tanto en humanos como en roedores la fibra no puede ser digerida por enzimas propias del tracto digestivo; pero, en el intestino grueso principalmente a nivel del colon, la fibra puede ser fermentada por bacterias intestinales produciéndose ácidos grasos de cadena corta que pueden ser absorbidos y transportados a la sangre e incrementar el aporte calórico de las dietas (Frost *et al.*, 2014). La eficiencia dietética fue calculada relacionando el consumo de alimentos y la

ganancia de peso al final del experimento. Los valores encontrados son similares a los reportados por Lobo *et al.* (2006) para animales experimentales de la misma edad. Sin embargo, cuando se alcanza la edad adulta, la eficiencia dietética puede disminuir hasta en un 50 % por la reducción en el índice de crecimiento relacionado con la madurez sexual, mientras que el consumo de alimentos se mantiene (Takakura *et al.*, 2014).

8.4 Absorción aparente de minerales durante la etapa de crecimiento

En la Tabla 5 se presentan los resultados relativos a la absorción aparente de calcio, magnesio y potasio en los grupos experimentales. En los grupos control y N-60 la absorción aparente de calcio se incrementó con la edad de los animales experimentales. En los grupos N-400 y N-600 este incremento se observó únicamente cuando los animales alcanzaron la etapa adulta; en tanto que en el grupo N-200, el porcentaje de absorción aparente de calcio se mantuvo constante durante todas las etapas de crecimiento de los animales. El incremento en la absorción aparente de calcio en los grupos experimentales se atribuye a un aumento en los requerimientos de este mineral durante la etapa de crecimiento. No obstante que el grupo alimentado con la dieta N-60 en la edad adulta mostró un incremento en la absorción aparente de calcio del 70 % aproximadamente con respecto a la pubertad, su absorción continuó siendo la más baja en todas las etapas evaluadas, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) comparada con el grupo control. El incremento en la absorción aparente de calcio en el grupo N-60 a través de las diferentes etapas de crecimiento de los sujetos experimentales se puede explicar por el alto contenido de fibra soluble en las pencas de nopal en etapa temprana de desarrollo, la cual se reduce en las pencas en etapa tardía de crecimiento (Hernández-Urbiola *et al.*, 2010). La fibra soluble es un polisacárido que no puede ser digerido en la parte alta del tracto digestivo; sin embargo, en el intestino grueso puede ser fermentada por la microflora bacteriana intestinal dando lugar a la formación de ácidos grasos de cadena corta (Lobo *et al.*, 2006). Esto promueve una caída permanente en el pH intestinal que facilita la absorción del calcio (Fine *et al.*, 1991; Miyazato *et al.*, 2010; Ramasamy, 2014). El hecho de que la absorción aparente de calcio en el grupo N-60 resultara menor en todas las etapas de desarrollo de los animales en comparación con el resto de los grupos experimentales puede atribuirse al

contenido de oxalatos, el cual es más alto en las etapas tempranas de desarrollo del nopal con respecto a las etapas tardías de desarrollo de esta cactácea (Contreras-Padilla *et al.*, 2011) y a la relación molar Ca/P mas baja de los grupos experimentales.

Tabla 5. Absorción aparente de minerales en ratas alimentadas con nopal *O. ficus indica* durante la etapa de crecimiento

Grupo Experimental	% Absorción Ca	% Absorción Mg	% Absorción K
Pubertad			
Control	71.82±2.10 ^{bc}	24.73±1.43 ^a	65.46±3.06 ^a
N-60	33.51 ±3.87 ^a	24.96 ±2.95 ^a	27.20±1.2 ^b
N-200	75.46 ±2.14 ^c	43.95 ±5.1 ^b	31.86±1.7 ^b
N-400	66.34±2.20 ^b	42.16 ±3.38 ^b	29.19±3.7 ^b
N-600	63.09 ±7.1 ^{bc}	38.77 ±8.22 ^b	30.03±1.7 ^b
Adolescencia			
Control	74.87 ±2.10 ^c	19.01±5.72 ^a	62.70±2.40 ^a
N-60	57.71 ±2.46 ^a	35.22±3.34 ^b	21.94±4.11 ^c
N-200	76.75 ±1.90 ^c	35.17 ±4.41 ^b	31.53±5.10 ^b
N-400	66.15 ±2.28 ^b	31.63 ±4.19 ^b	28.61±4.51 ^{bc}
N-600	63.62 ±5.91 ^{ab}	31.68±2.26 ^b	28.02±3.14 ^{bc}
Adultez			
Control	86.28±1.68 ^c	20.11±6.0 ^{ab}	71.38 ±2.57 ^a
N-60	59.83±2.56 ^a	25.19±6.8 ^a	36.27±4.30 ^b
N-200	75.91 ±3.33 ^b	27.52 ±3.2 ^a	30.68±1.48 ^b
N-400	79.35 ±1.35 ^{bc}	16.05 ±3.9 ^b	30.68±1.48 ^b
N-600	81.49 ±4.47 ^{bc}	17.31±2.8 ^b	31.70±3.87 ^b

Los valores son el promedio ± desviación estándar (n=7), diferentes súper-índices en la misma columna en el mismo periodo indican diferencias significativas con la prueba de Tukey.

Otro aspecto importante a considerar es que, si bien es cierto que las dietas de los grupos N-400 y N-600 contienen menos fibra soluble en comparación con la dieta N-60, el calcio presente en nopal en las etapas tardías de desarrollo se encuentra en forma de carbonato de calcio (CaCO_3), el cual es utilizado como suplemento para pacientes con dietas deficientes en calcio debido a su alta biodisponibilidad (Straub, 2007).

En virtud de que se utilizaron diferentes porciones de nopal *O. ficus indica* para ajustar los requerimientos de calcio en las dietas (Tabla 1), la suplementación de magnesio y potasio en las mismas se incrementó aproximadamente entre un 300 y 400 % de cada mineral en comparación con el grupo control (Tabla 3). Debido a ello, durante la etapa puberal la absorción aparente de magnesio en los grupos experimentales a excepción del grupo N-60 fue mayor que en el grupo control y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

Durante la adolescencia todos los grupos experimentales mostraron una absorción aparente de magnesio mayor al grupo control, aunque dicha absorción resultó menor con respecto a la observada en la etapa puberal. Probablemente, la absorción de magnesio disminuye debido a un proceso de saturación del transporte pasivo intestinal mediado por gradientes electroquímicos principalmente en el duodeno (Toba *et al.*, 1999 y 2000).

En la etapa adulta los grupos alimentados con las dietas elaboradas con nopal en etapa temprana mostraron una absorción de magnesio significativamente mayor ($P \leq 0.05$) con respecto a la que presentaron los grupos alimentados con las pencas de nopal en etapa tardía de desarrollo, en tanto que ninguno de los grupos mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control. La disminución en la absorción aparente de magnesio en los grupos experimentales en la etapa adulta coincide con el incremento en la absorción de calcio evidenciando que ambos iones divalentes compiten por algunos sitios de absorción a nivel intestinal dependientes de vitamina D como por ejemplo, algunos receptores transitorios, entre los que se pueden mencionar a los TRPV6 (Fine *et al.*, 1991; Bae y Kim, 2013).

En lo que respecta al potasio, el consumo de este mineral en la dieta se ha relacionado con la disminución de la carga ácida de la dieta occidental y con efectos

positivos en la salud del hueso (Tucker *et al.*, 1999; Hughes *et al.*, 2015). Como se puede observar en la Tabla 5, todos los grupos experimentales mostraron un porcentaje de absorción aparente de potasio significativamente menor ($P \leq 0.05$) en comparación con el grupo control ($P \leq 0.05$) durante todas las etapas de crecimiento de los animales. No obstante, cabe destacar que debido a que el contenido de potasio en las dietas elaboradas a base de nopal es mayor (Tabla 3), la absorción neta de potasio en dichos grupos fue mayor que en el grupo control. La absorción aparente de potasio se mantuvo constante en todas las etapas de crecimiento de los grupos experimentales a excepción del grupo N-60. Si bien el efecto del potasio en la salud ósea no está claramente definido, este mineral se ha relacionado con efectos benéficos en el hueso disminuyendo la resorción e incrementando la DMO (Dawson y Hedges, 2009).

8.5 Marcadores bioquímicos

Durante todas las etapas de la vida, el esqueleto se encuentra bajo un proceso denominado remodelado óseo en función de las necesidades metabólicas y de recambio óseo para mantener la homeostasis calcio/fósforo en la sangre. Las células responsables de este proceso son los osteoclastos y osteoblastos, los cuales, mediante actividades coordinadas en tiempo y espacio cambian hueso nuevo por hueso viejo o dañado (Rucci, 2008). Los marcadores bioquímicos del remodelado óseo representan un producto obtenido del recambio óseo que se libera a torrente sanguíneo o urinario, estos compuestos pueden cuantificarse y relacionarse con las actividades del metabolismo óseo (Eastell y Hannon, 2008). Los marcadores evaluados en este trabajo fueron Ca/Cr en orina y suero OC y el PINP, los resultados se presentan en la Tabla 6.

8.5.1 Calcio/Creatinina urinaria (Ca/Cr U) para evaluar la hipercalciuria

La determinación de marcadores bioquímicos del modelado óseo en modelos animales es una herramienta de diagnóstico muy importante, ya que permite evaluar la respuesta de un tratamiento enfocado a evitar la pérdida de masa ósea. Por lo anterior, es necesario establecer parámetros de referencia para animales de diferentes cepas, especies, género y edad en virtud de que la información que se tiene al respecto es muy escasa (Caridad *et al.*, 2011; Santos y George, 2011; Melo *et al.*, 2012). La

determinación del calcio total en orina recolectada de 24 horas representa limitaciones por la pérdida de muestra por evaporación, riesgo de contaminación de la muestra y tiempos prolongados de recolecta (Kurien *et al.*, 2004). Una prueba de orina en ayuno ajustada a la excreción de creatinina es una buena herramienta para evaluar la hipercalciuria. En el presente estudio, un valor de referencia normal de índice Ca/Cr fue el grupo control. La relación Ca/Cr urinario en la pubertad y adolescencia fue más baja en los grupos control y N-400. En todos los grupos se observó un incremento de la relación Ca/Cr en orina en la adolescencia con respecto a la pubertad; no obstante, en la etapa adulta este valor disminuyó en los grupos experimentales excepto en el grupo control. Una reducción de la relación Ca/Cr en la etapa adulta en los grupos experimentales alimentados con nopal puede atribuirse a un incremento en la reabsorción renal de calcio debido a la adquisición de DMO durante esta etapa como se señala en la siguiente sección (Figura 14) (Arrabal *et al.*, 2014). Por otra parte, es muy probable que el potasio presente en las dietas elaboradas con *O. ficus indica* contribuyera a reducir los niveles de calcio en orina en los sujetos experimentales. En este sentido, algunos autores han reportado una reducción en la excreción de calcio urinario en humanos adultos sanos a los que se les administró KHCO_3 (60 mmol/d), el cual promovió un balance de calcio más positivo. Ésta reducción se atribuye a que el potasio induce la retención de fosfatos que forman parte de los iones que constituyen la hidroxiapatita en el hueso (Lemann *et al.*, 1995). Los valores más altos de Ca/Cr U en todas las etapas de crecimiento de las ratas se observaron en el grupo N-60, principalmente durante la pubertad. Esto puede estar relacionado con la presencia de oxalatos, los cuales como ya se señaló con anterioridad, se encuentran en mayor cantidad en los cladodios en etapa temprana con que se elaboró la dieta del grupo N-60 y que a su vez limita la disponibilidad del calcio dietario; por lo que es muy probable que se haya incrementado la resorción ósea y la reabsorción renal de calcio para mantener la homeostasis sanguínea de este mineral (Mehrotra *et al.*, 2006).

Tabla 6. Efecto del consumo de nopal como fuente de calcio sobre el índice Ca/Cr en orina, OC y PINP en suero durante la etapa de crecimiento

Grupo Experimental	Ca/Cr en orina mg/mg	OC en suero ng/mL	PINP en suero ng/mL
Pubertad			
Control	0.05±0.00 ^a	2.52±0.13 ^a	30.74±1.9 ^a
N-60	0.14±0.02 ^c	3.98±0.04 ^c	33.87±3.2 ^{ab}
N-200	0.08±0.01 ^b	2.48±0.02 ^a	40.30±0.9 ^c
N-400	0.05±0.00 ^a	3.01±0.18 ^b	36.86±3.0 ^{bc}
N-600	0.07±0.01 ^{ab}	2.54±0.06 ^a	32.59±0.8 ^{ab}
Adolescencia			
Control	0.10±0.01 ^a	1.63±0.07 ^a	28.93±3.3 ^a
N-60	0.28±0.03 ^c	2.16±0.06 ^b	34.50±2.5 ^{ab}
N-200	0.22±0.01 ^b	2.60±0.06 ^c	36.52±4.6 ^b
N-400	0.10±0.01 ^a	3.15±0.10 ^d	37.26±3.4 ^b
N-600	0.27±0.04 ^{bc}	2.53±0.04 ^c	40.58±2.8 ^b
Adultez			
Control	0.16±0.01 ^a	2.09±0.15 ^{cd}	38.66±2.2 ^b
N-60	0.06±0.01 ^b	1.99±0.03 ^c	28.22±1.93 ^a
N-200	0.05±0.01 ^b	1.38±0.06 ^a	31.60±0.7 ^a
N-400	0.03±0.00 ^b	2.31±0.03 ^d	35.92±1.3 ^b
N-600	0.04±0.00 ^b	1.63±0.15 ^b	42.97±2.2 ^c

Ca/Cr (calcio/creatinina en orina), OC (osteocalcina) y PINP (pro péptido amino terminal del procolágeno tipo I). Los valores son el promedio ± desviación estándar (n=7), diferentes súper-índices en la misma columna en el mismo periodo indican diferencias significativas con la prueba de Tukey.

8.5.2 Osteocalcina (OC)

La OC es la principal proteína no colágeno que constituye la matriz orgánica. Está bien establecido que el 30 % de la OC sintetizada viaja a la sangre a través de vasos

sanguíneos que fluyen dentro de los canales de Harvers, el resto (70 % aproximadamente) constituye la matriz orgánica del hueso. Su determinación en suero es usada como un marcador bioquímico de formación ósea (modelado). Sin embargo; la degradación de la matriz orgánica durante el proceso de resorción ósea puede contribuir al incremento de OC en suero (Zhang *et al.*, 2006).

Durante la pubertad, el grupo N-60 y N-400 mostraron los valores más altos de OC en suero (3.98 ± 0.04 y 3.01 ± 0.18 ng/mL, respectivamente) con diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos N-200, N-600 y control (2.48 ± 0.02 , 2.54 ± 0.06 y 2.52 ± 0.13 ng/mL, respectivamente). Durante la adolescencia todos los grupos alimentados con las dietas a base de nopal presentaron una concentración de OC significativamente mayor comparada con el grupo control ($p \leq 0.05$). Los factores que pudieron contribuir a este comportamiento son: por un lado, la suplementación de Mg en las dietas experimentales que contenían hasta un 350 % más de Mg con respecto al nivel diario recomendado, lo que pudo estimular a los osteoblastos a sintetizar OC (Toba *et al.*, 2000), además estudios previos han asociado la deficiencia de Mg con niveles bajos de OC en suero (Gruber *et al.*, 2003; Matsuzaki *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha señalado la importancia de los esteroides para estimular a los osteoblastos a sintetizar OC (Srivastava *et al.*, 2013). En este sentido, se ha reportado que el nopal *O. ficus indica* contiene fitoquímicos entre los que se destacan flavonoides y fitoesteroides, los cuales pueden favorecer la síntesis de OC (Ko *et al.*, 2014; Figueroa-Pérez *et al.*, 2016). Comparando la etapa puberal con la etapa adulta se observa una disminución en los niveles séricos de OC en todos los grupos evaluados. Lo anterior puede estar relacionado con el fin del crecimiento acelerado, ya que esta misma tendencia fue observada en ratas Sprague-Dawley (Lee *et al.*, 2009), donde la tendencia en la variación en los niveles de OC en suero disminuyó con la edad.

8.5.3 Pro-péptido amino terminal del pro-colágeno tipo I (PINP)

El PINP es sintetizado por los osteoblastos, constituye la matriz orgánica que a su vez, se mineraliza y es constantemente regenerada durante la vida. En la etapa puberal el grupo control presentó el nivel más reducido de PINP (30.74 ± 1.0 ng/mL), en tanto que el grupo N-200 presentó el nivel más elevado (40.30 ± 0.9 ng/mL), siendo este grupo

y el N-400 los que mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto al control (Tabla 6). Durante la etapa de la adolescencia el grupo control continuó presentando la menor concentración de PINP sérico observándose valores más elevados de este biomarcador en los grupos suplementados con nopal, en donde los grupos N-200, N-400 y N-600 presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con el grupo control. En el presente estudio, los niveles de PINP fueron más elevados en los grupos alimentados con nopal en la pubertad y adolescencia. Finalmente, en la etapa adulta los grupos alimentados con nopal en etapa tardía de desarrollo mostraron los valores más altos de PINP en comparación con los grupos alimentados con nopal en etapa temprana de madurez con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre ambos estadios. Durante esta etapa el grupo N-600 presentó la concentración más alta de PINP (42.97 ± 2.2 ng/mL). Los niveles elevados de PINP en el suero de los grupos suplementados con nopal en las etapas puberal y adolescencia indican una mayor síntesis de colágeno en estas etapas de crecimiento de los animales experimentales (Singer y Eyre, 2008). Por otra parte, como ya se mencionó anteriormente, es muy probable que la presencia de algunos fitoquímicos en *O. ficus indica* como por ejemplo los fitoesteroles, que al presentar una estructura química similar a los estrógenos, inhiban la diferenciación de los osteoclastos y promuevan la activación de los osteoblastos (Hale *et al.*, 2007) y en consecuencia, se incremente la síntesis de PINP (Weaver *et al.*, 2012).

8.6 Propiedades densitométricas del fémur de ratas alimentadas con *O. ficus indica* como fuente de calcio durante la etapa de crecimiento

La evaluación de la DMO es un criterio ampliamente aceptado para diagnosticar la salud del hueso y evaluar la efectividad de los tratamientos para las enfermedades esqueléticas (Lorente-Ramos *et al.*, 2007). En la Figura 14 se observa que los grupos control y N-600 mostraron los valores más altos de la DMO en todas las etapas de crecimiento evaluadas. Durante la pubertad el valor promedio de DMO de los grupos control y N-600 fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$) en comparación con los grupos N-60, N-200 y N-400. Este comportamiento puede estar relacionado con el contenido de oxalatos (McConn y Nakata, 2004; Contreras-Padilla *et al.*, 2015) y la presencia de fitoquímicos como por ejemplo isoflavonas y fito-esteroles (Figueroa-Pérez *et al.*, 2016),

los cuales pueden modular actividades de las células óseas, ya que poseen una estructura química parecida a los estrógenos capaz de estimular receptores nucleares en las células óseas y promover la síntesis de OPG una proteína que evita la diferenciación de las células osteoclastos disminuyendo así actividades de resorción ósea (Weaver *et al.*, 2012). No obstante que en la adolescencia los grupos N-60, N-200 y N-400 mostraron un incremento importante en la DMO, los grupos control y N-600 mantuvieron los valores de DMO más elevados. El incremento abrupto en la DMO observado en los grupos N-60, N-200 y N-400 en la etapa adolescente puede explicarse por un proceso de adaptación de los animales experimentales al alto contenido de fibra en la dieta. La fermentación de este polisacárido por la microflora del intestino promueve una disminución permanente del pH intestinal facilitando la disolución de complejos minerales presentes en el nopal y mejorando su absorción (Den-Besten *et al.*, 2013). Es importante aclarar que la DMO calcula la cantidad de minerales presentes en la unidad de área pero no distingue entre los minerales presentes en el hueso. De acuerdo con los resultados del contenido nutricional de las dietas (Tabla 3) la suplementación con Mg^{2+} y K^{+} en las dietas experimentales contribuyeron en la ganancia de la DMO en los grupos N-60, N-200 y N-400 en la adolescencia y adultez. Así mismo, es importante destacar que en estas etapas de crecimiento no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los grupos N-600 y control. Por el contrario, la DMO en la etapa adulta en los grupos N-60 y N-200 fue significativamente más baja comparada con los grupos control y N-600. En esta misma etapa la ganancia de DMO en los grupos N-600 y control sugiere que estos grupos han alcanzado el pico máximo de DMO.

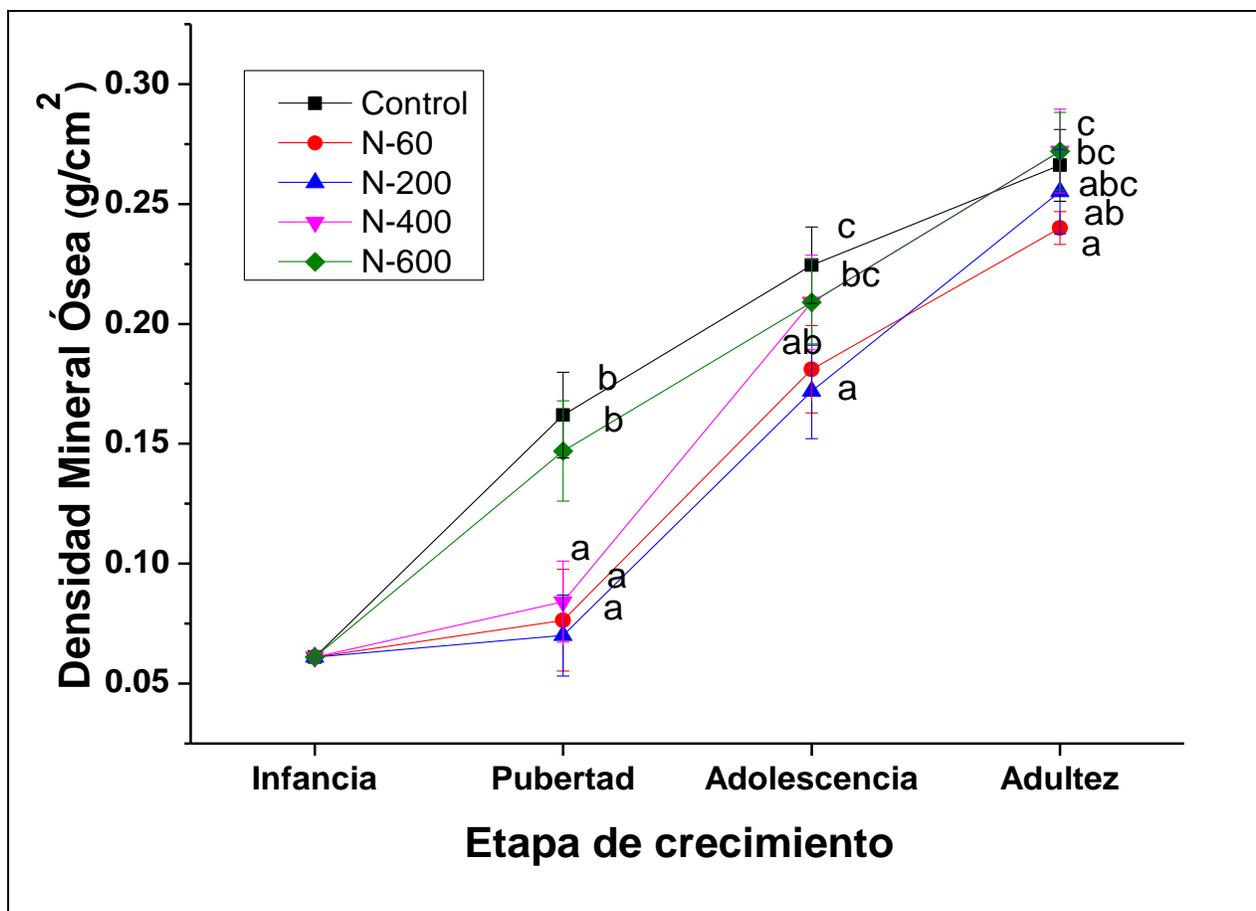


Figura 14. Densidad mineral ósea del fémur de ratas Wistar macho durante la etapa de crecimiento, alimentadas con nopal *O. ficus indica* como fuente de calcio. Los datos son el valor promedio \pm desviación estándar ($n=7$), letras diferentes en el mismo periodo experimental indican diferencia con Tukey ($p=0.05$).

8.7 Evaluación física y propiedades mecánicas del fémur de ratas alimentadas con nopal como fuente de calcio

Las propiedades físicas y mecánicas del fémur de ratas alimentadas con las dietas experimentales se muestran en la Tabla 7. No se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los valores promedio de longitud y anchura del fémur. Sin embargo, los fémures de las ratas que consumieron las dietas experimentales con nopal en etapa tardía de madurez (N-400 y N-600) mostraron fémures más gruesos y con mayor peso en comparación con los fémures de las ratas N-60 y N-200. De la misma manera, se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el peso y grosor del fémur en las ratas

alimentadas entre los grupos N-60 y N-600. Estas diferencias pueden ser debido a las variaciones en el contenido mineral del nopal, especialmente Mg^{2+} y K^+ , los cuales han sido relacionados con la formación ósea (Tucker *et al.*, 1999; Ryder *et al.*, 2005). Además, la identificación de compuestos cristalinos que se utilizan como fuente de Ca^{2+} y Mg^{2+} biodisponible para los humanos como carbonatos y bicarbonatos de calcio, bicarbonatos calcio-magnesio y óxido de magnesio en cladodios en etapa tardía de desarrollo apoyan estos resultados (Contreras-Padilla *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha señalado que un alto contenido de oxalatos en los cladodios en etapa temprana de madurez puede influir en la disponibilidad intestinal del calcio y otros minerales (McConn y Nakata, 2004).

Tabla 7. Propiedades físicas y biomecánicas del fémur de ratas alimentadas con nopal como fuente de calcio

Parámetro	Control	N-60	N-200	N-400	N-600
Longitud (cm)	3.65±0.09 ^a	3.61±0.04 ^a	3.69±0.07 ^a	3.65±0.04 ^a	3.66±0.09 ^a
Peso(g)	1.03±0.08 ^{ab}	0.95±0.06 ^a	1.02±0.06 ^{ab}	1±0.07 ^{ab}	1.1±0.15 ^b
Ancho (mm)	4.31±0.12 ^a	4.38±0.23 ^a	4.22±0.11 ^a	4.27±0.14 ^a	4.5±0.29 ^a
Grosor(mm)	3.18±0.10 ^{ab}	3.05±0.05 ^b	3.17±0.09 ^{ab}	3.21±0.10 ^{ab}	3.30±0.15 ^a
Fmax (N)	98.63±5.20 ^c	78.58±2.30 ^a	90.78±1.70 ^b	98.78±4.00 ^c	99.34±2.50 ^c
Pmax(N)	610.3±40.6 ^b	466.4±29.7 ^a	497.5±46 ^a	571.2±18.5 ^b	747.9±97 ^c
Módulo de Young	825 ±78 ^a	2554 ±283 ^b	1304 ±230 ^a	21760±367 ^b	2700±194 ^b

Fmax (prueba de flexión 3 puntos) Pmax (prueba de compresión) Los valores expresan el promedio ± desviación estándar de los grupos experimentales (n=7), letras diferentes en la misma línea indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

8.8 Propiedades mecánicas del hueso

En trabajos previos se ha reportado una correlación significativa entre las propiedades mecánicas del hueso y la DMO (Teo *et al.*, 2007). Los valores más reducidos en las pruebas de compresión (Fmax) y flexión en tres puntos (Pmax) se observaron en los grupos N-60 y N-200 en comparación con los grupos N-400 y N-600. No se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en dichas pruebas entre los grupos N-600 y control. Con respecto a la prueba de compresión, los datos muestran la misma tendencia que la prueba de flexión en tres puntos. Los valores promedio más altos de Fmax fueron detectados en los grupos N-400 y N-600 en comparación con los grupos N-60 y N-200, cuyos valores disminuyeron 23.6 y 18.5 % con respecto a los grupos N-400 y N-600. Como era de esperarse, considerando las dimensiones más grandes (peso y grosor) de los fémures, las propiedades mecánicas (Fmax y Pmax) de los grupos alimentados con nopal en etapa tardía (N-400 y N-600) fueron mejores que en los grupos alimentados con nopal en etapa temprana de madurez (N-60 y N-200). Estos hallazgos pueden ser explicados por una elevada concentración de oxalatos en el nopal en etapa temprana los cuales interfieren con la disponibilidad del calcio. La inclusión de minerales como el potasio y magnesio en el hueso (Tabla 8) también pudo influir en la resistencia mecánica del hueso, incorporándose como compuestos amorfos probablemente carbonatos de potasio o magnesio, o como parte de la red cristalina de la hidroxiapatita incrementando la resistencia del hueso a la fractura (Matsunaga y Murata, 2009).

8.9 Análisis micro estructural del fémur de ratas alimentadas con nopal como fuente de calcio mediante imágenes SEM

La Figura 15 muestra las micrográficas de la metáfisis femoral distal de las ratas alimentadas con las dietas experimentales. Esta fue la región de interés empleada para el análisis de las propiedades micro estructurales del tejido cortical y trabecular. Las flechas blancas señalan la zona utilizada para medir el grosor cortical (Gr.Cr), en tanto que los cuadrados indican el área usada para determinar el grosor de las trabéculas (Gr.Tb) mostradas en las Figuras 15 (D-F). Finalmente, los óvalos muestran la región de la línea de crecimiento epifisiario donde se evaluó la separación trabecular (Sp.Tb) como

se muestra en las Figuras 15 (G-I). Es importante mencionar que el hueso cortical contribuye notablemente a la resistencia mecánica del hueso y que en el caso del tejido trabecular, ubicado en las extremidades del fémur, permiten distribuir el peso de la carga aplicada a lo largo del fémur (Lafita, 2003).

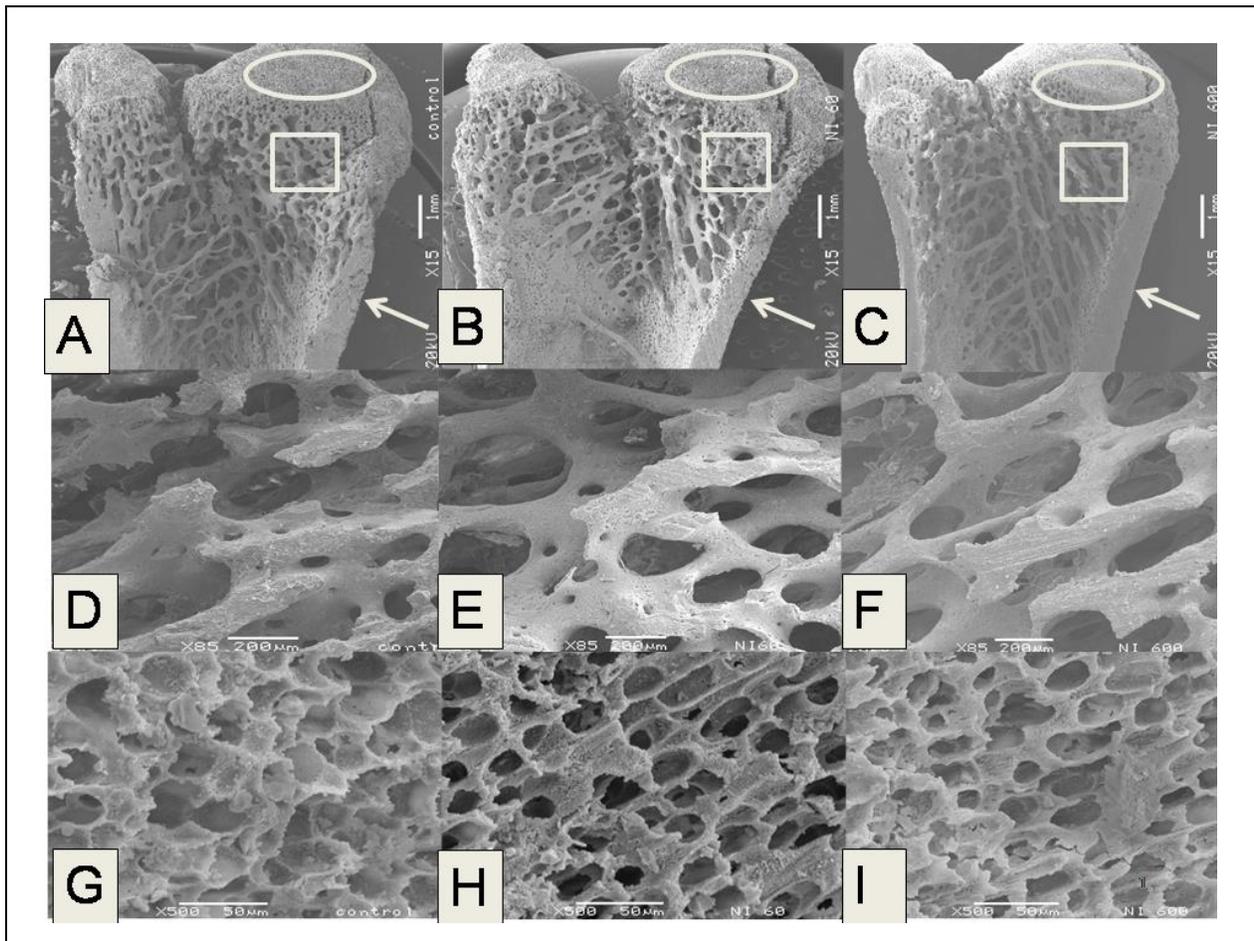


Figura 15. Imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la parte interna del fémur de las ratas alimentadas con *O. ficus indica* como fuente de calcio en la dieta. En las columnas de derecha a izquierda se muestran el grupo control, N-60 y N-600. Micrografías A-C (15X) corresponden a la parte interna del fémur. En las figuras D-F (85X) se presenta un análisis detallado de la metáfisis del fémur. Figuras G-I (500X) pertenecen a un segmento de la línea del crecimiento epifisiario.

Por esta razón, la calidad del hueso trabecular ha sido relacionada con riesgo de fractura (Finney *et al.*, 2004). El tejido trabecular es altamente sensible a cambios

metabólicos a corto plazo relacionado con la homeostasis del calcio en la sangre (Kim y Park, 2013). Los cambios en el tejido trabecular y cortical están estrechamente relacionados con las propiedades mecánicas (Jiang *et al.*, 2008). Las micrografías (A-C) evidencian que el hueso cortical del fémur del grupo N-60 es más delgado comparado con los grupos N-600 y control (zonas señaladas con flechas).

Con respecto al área trabecular del fémur en el grupo N-60, se puede observar que ésta se redujo significativamente comparado con los grupos control y N-600. En las Figuras 15 (D – F), es posible observar que la microestructura secundaria (dentro de las trabéculas) en el grupo N-60 es más porosa comparada con los fémures de los grupos N-600 y control. Finalmente, las figuras 15 (G – I) muestran un segmento de la línea de crecimiento epifisiario de los huesos de las ratas alimentadas con nopal. En estas figuras es evidente que el fémur del grupo N-60 se encuentra menos mineralizado en comparación con el grupo control y N-600, lo cual se corroboró en el análisis de contenido mineral óseo que se presenta en la siguiente sección.

8.10 Parámetros microestructurales del fémur de ratas alimentadas con nopal

La Figura 16a muestra las variaciones en el grosor del hueso cortical. Todos los grupos alimentados con *O. ficus indica* presentaron un hueso cortical más delgado con respecto al grupo control. Entre los grupos experimentales, el grupo N-600 registró el valor más alto mientras que el grupo N-200 el valor más bajo. La Figura 16b muestra el grosor de las trabéculas de la zona metafisiaria, en donde las trabéculas más gruesas se observaron en el grupo N-600 y el control, no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre ambos grupos. Por el contrario, los grupos N-60 y N-200 presentaron los valores más reducidos, estas diferencias fueron significativas en comparación con el grupo control y N-600. La Figura 16c, presenta la separación trabecular en la región epifisiaria. Los grupos alimentados con *O. ficus indica* en etapa temprana de madurez (N-60 y N-200) muestran las trabéculas más separadas en comparación con los grupos alimentados con la dieta control y el nopal en etapa tardía de desarrollo (N-400 y N-600) detectándose diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los grupos alimentados con nopal en las diferentes etapas de desarrollo.

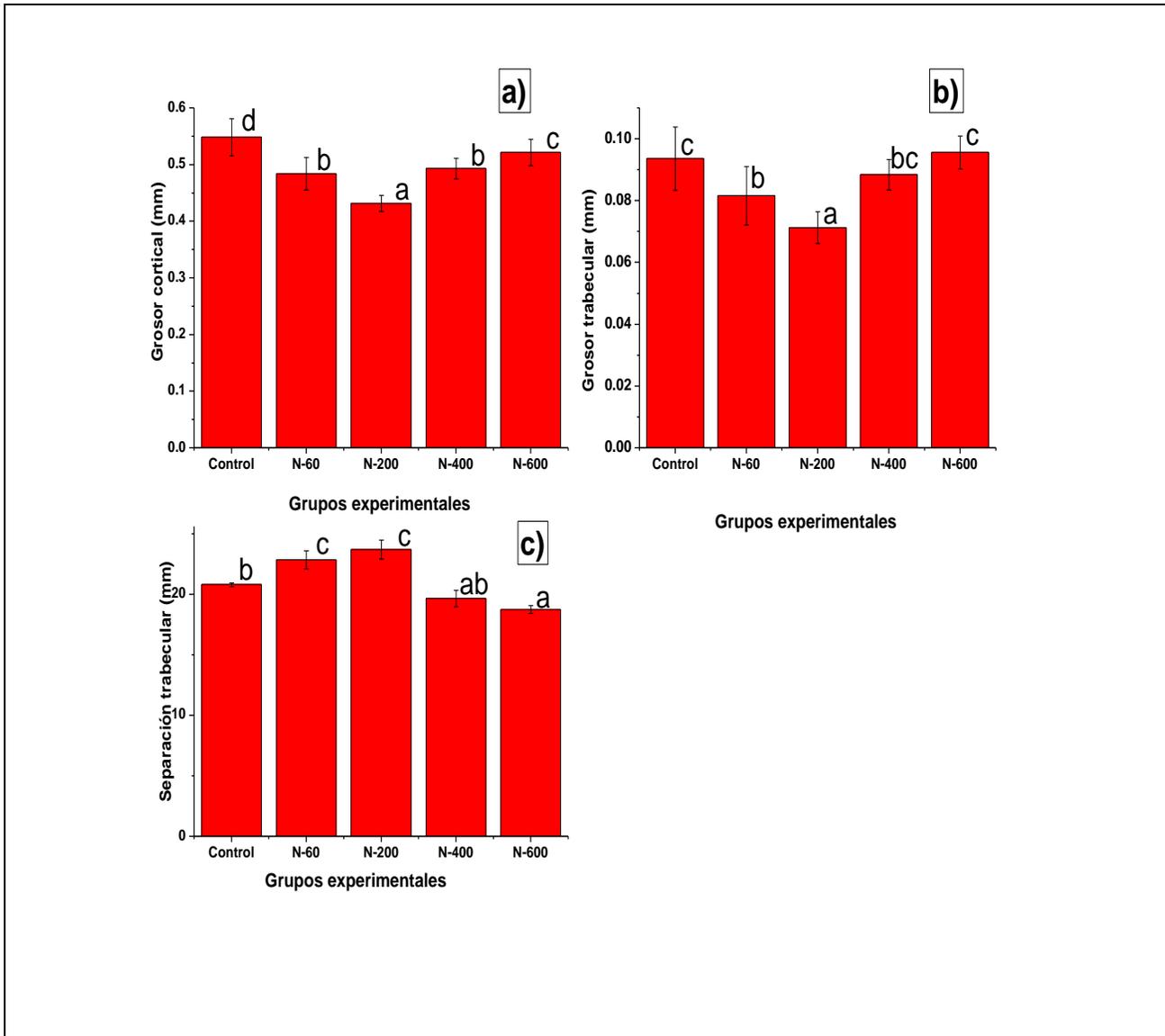


Figura 16. Parámetros microestructurales del fémur de ratas Wistar macho alimentadas con nopal como fuente de calcio en la dieta durante el periodo de crecimiento. a) Grosor del hueso cortical del fémur (Gr.Cr); b) Grosor de las trabéculas (Gr.Tb) y c) Separación trabecular en la línea de crecimiento epifisiario (Sp.Tb). Los valores son el promedio \pm desviación estándar ($n=7$). Diferentes letras sobre las barras indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Los cambios más significativos que comprometen la microestructura del hueso se observaron en los grupos N-60 y N-200. Lo anterior puede ser debido a una combinación de varios factores entre los que se pueden mencionar las variaciones en el contenido de

fibra, variaciones en la disponibilidad intestinal del calcio, la presencia de otros minerales tales como Mg^{2+} y K^+ (Contreras-Padilla *et al.*, 2015); así como la presencia de fitoquímicos en el nopal, los cuales pudieron modular las actividades de los osteoblastos y osteoclastos así como, la remodelación y resorción ósea (Dudaric *et al.*, 2015; Figueroa-Pérez *et al.*, 2016).

Evidentemente, las modificaciones en los componentes de *O. ficus indica* (oxalatos, polifenoles, flavonoides, minerales y fibras) pueden determinar las diferencias en la biodisponibilidad del calcio y en consecuencia en las propiedades del fémur. Las características microestructurales de los fémures se relacionaron de manera positiva con las propiedades mecánicas. Estos hallazgos coinciden con reportes previos sobre la importancia de la morfología del osteón en las propiedades mecánicas en el hueso cortical (Wachter *et al.*, 2002).

8.11 Análisis del contenido mineral óseo (CMO)

La Tabla 14 muestra el CMO en los fémures de las ratas alimentadas con *O. ficus indica* durante la etapa de crecimiento. Se observaron diferencias significativas en el contenido de calcio entre los grupos experimentales ($p \leq 0.05$). El grupo control mostró el contenido de calcio más alto, en tanto que el contenido de calcio en los huesos de las ratas alimentadas con N-60, N-200, N-400 y N-600 disminuyó un 50, 25, 13 y 7.5 %, respectivamente comparado con el grupo control. Con relación al contenido de fósforo, los grupos alimentados con la dieta control y N-60 mostraron los valores más altos; sin embargo, la diferencia entre ambos grupos no fue significativa ($p \leq 0.05$). En contraste, los grupos N-200, N-400 y N-600 mostraron los valores más bajos de fósforo. Como resultado de estos datos, la relación Ca/P en los fémures de los grupos experimentales resultó afectada por la madurez del nopal utilizado en la elaboración de las dietas. La máxima relación molar Ca/P en el hueso se observó en los grupos alimentados con nopal en etapa tardía (N-400 y N-600) y el grupo control, mientras que los valores más bajos se encontraron en los grupos alimentados con nopal en etapa temprana de desarrollo (N-60 y N-200). La relación Ca/P en la dieta y el fémur mostró un buen coeficiente de correlación ($r = 0.82$). En este mismo sentido, la relación Ca/P en el hueso

con las pruebas mecánicas presentaron una correlación de $r = 0.91$ para P_{max} y $r = 0.75$ para F_{max} ($p \leq 0.001$).

El contenido de calcio y fósforo constituyen un criterio ampliamente aceptado para evaluar la salud del hueso (Hunt *et al.*, 2008). De acuerdo con la Tabla 8, los huesos de las ratas alimentadas con nopal en etapa tardía presentaron mayor contenido de calcio que los huesos de las ratas alimentadas con nopal en etapa temprana. Considerando que las dietas se elaboraron con el mismo aporte de calcio (5 g de Ca^{2+} /Kg de dieta), las diferencias encontradas en la composición mineral entre los grupos alimentados con nopal como fuente de calcio en etapa tardía de desarrollo pueden ser explicados por diferencias en la composición química del nopal, específicamente en lo que respecta a una menor concentración de compuestos anti nutricionales como los oxalatos (Weaver *et al.*, 2012; Contreras-Padilla *et al.*, 2011). La presencia de otros minerales como Mg^{2+} y K^+ , carbonatos de calcio y bicarbonatos de calcio-magnesio pudieron afectar la calidad del hueso (Contreras-Padilla *et al.*, 2015; Rojas-Molina *et al.*, 2015); ya que estos compuestos han sido asociados con efecto benéficos en la salud ósea (Ryder *et al.*, 2005; Orchard *et al.*, 2014). Las variaciones en el contenido y tipo de fibra dietética de igual forma pudieron influir en los resultados. Estudios previos indican que la capacidad fermentativa de la fibra depende de la constitución de la misma; en consecuencia, la producción de diferentes ácidos grasos de cadena corta puede modificar la absorción de minerales en el intestino grueso. El mecanismo propuesto para este proceso es la reducción del pH intestinal y disociación de complejos de minerales que una vez en estado iónico pueden difundir a torrente sanguíneo (Kruger *et al.*, 2003; Zafar *et al.*, 2004; Kruger *et al.*, 2010; Slevin *et al.*, 2014). La fuerte asociación observada entre la relación Ca/P en la dieta y en el hueso sugiere que este parámetro puede ayudar a detectar en forma temprana cambios en la salud ósea (Morris *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014).

Se observaron cambios significativos ($p \leq 0.05$) en los niveles de Mg^{2+} y K^+ en los huesos de los grupos alimentados con nopal al término de la etapa de crecimiento comparados con el grupo control. Los grupos experimentales N-60 y N-400 mostraron los niveles más altos de Mg^{2+} en hueso.

Tabla 8. Contenido mineral y relación molar Ca/P en el fémur de ratas alimentadas con nopal como fuente de calcio

Grupo	Calcio (mg/g)	Fósforo (mg/g)	Magnesio (mg/g)	Potasio (mg/g)	Relación Ca/P
Control	385.1±2.2 ^e	92.8±1.17 ^c	1.88±0.01 ^b	0.387±0.03 ^b	3.2 ^a
N-60	196.6±3.4 ^a	90.4±0.37 ^{bc}	1.84±0.02 ^{ab}	0.355±0.01 ^a	1.7 ^d
N-200	291.9±8.6 ^b	87.6±0.40 ^a	1.81±0.02 ^a	0.512±0.01 ^{bc}	2.5 ^c
N-400	333.6±2.3 ^c	89.8±1.39 ^{ab}	1.87±0.01 ^b	0.405±0.01 ^b	2.8 ^b
N-600	356.1±6.8 ^d	88.5±0.72 ^{ab}	1.82±0.01 ^a	0.682±0.01 ^c	3.1 ^a

Los valores son el promedio ± desviación estándar (n = 3), letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Con respecto al potasio, los fémures del grupo N-60 mostraron los valores más reducidos de K⁺ en el hueso, inclusive más bajo que el grupo control. Los grupos alimentados con N-200 y N-600 incorporaron el mayor contenido de K⁺ en el hueso en comparación con el grupo control. Los minerales encontrados en cantidades trazas en el esqueleto como el Mg²⁺ y K⁺, desempeñan un papel muy importante en la salud ósea (Tucker *et al.*, 1999; Ryder *et al.*, 2005). Respecto al contenido de Mg²⁺ en el hueso es importante resaltar que a pesar de que el contenido de Mg²⁺ en las dietas elaboradas con nopal se incrementó de (2.3 – 3.5) veces comparado con el grupo control, el contenido de Mg²⁺ en los huesos es igual o menor que el grupo control, esto coincide con reportes previos, en donde un alto consumo de Mg²⁺ (5 veces más del requerimiento) no tiene efecto sobre el contenido de este mineral en la tibia en estudios de corto plazo (4 semanas) (Takeda y Nakamura, 2008). Por el contrario, se han observado modificaciones en parámetros macro-estructurales en los huesos de ratas que fueron alimentadas con dietas cuyo contenido de magnesio fue de 4 veces mayor al nivel recomendado en la dieta de roedores durante 7 meses de tratamiento (Riond *et al.*, 2000). El efecto del Mg²⁺ en el hueso no está claramente definido, algunos investigadores reportan que inhibe la absorción de calcio en el intestino y promueve la secreción de calcio endógeno (Fine *et al.*, 1991); mientras que otros sugieren un efecto

positivo en la formación ósea, al prevenir la resorción (Toba *et al.*, 1999). La suplementación K⁺ (2.3 – 4.9 veces) en las dietas elaboradas con nopal comparado con el control incrementó el contenido de potasio en el hueso. El contenido de K⁺ en la dieta no se correlaciona con el contenido de K⁺ en el hueso. Estudios a largo plazo con altos consumos de K⁺ en la dieta mostraron una asociación positiva con la DMO en mujeres adultas, lo cual sugiere que el consumo de K⁺ en los alimentos puede jugar un papel importante en la prevención de osteoporosis (Zhu *et al.*, 2012). La suplementación con sales de potasio como bicarbonatos potasio, citrato de potasio y cloruro de potasio reducen la resorción ósea y la excreción renal de calcio mediante la generación de un ambiente alcalino (Palacios, 2006). Un hallazgo significativo derivado del presente trabajo es que el contenido de Ca²⁺ y K⁺ en el hueso correlacionaron de manera importante con la DMO.

8.12 Análisis cristalográfico del fémur mediante difracción de rayos X

La fase inorgánica del hueso está formada por compuestos amorfos y compuestos cristalinos. En el hueso, la hidroxiapatita es el principal componente cristalino. La relación molar Ca/P de la hidroxiapatita pura sintética es de 1.67, en tanto que en el hueso de bovino es en promedio de 3.1 (Giraldo-Betancourt *et al.*, 2013). Esto es debido a que la hidroxiapatita en el hueso es mucho más compleja porque no contiene únicamente iones y radicales de la hidroxiapatita, sino también trazas de CO₃²⁻, Mg²⁺, Na⁺, F⁻ y Cl⁻. Estas cantidades varían de acuerdo con el tipo de tejido óseo y están relacionadas con sus propiedades y su bioactividad (Rivera-Muñoz, 2011). En este punto es importante destacar que las diferencias entre la relación molar Ca/P entre los grupos N-60, N-200 y N-400 fueron significativas comparadas con el control (ver Tabla 8). El grupo N-60 mostró la relación molar Ca/P más baja (1.7) y muy cercana a la hidroxiapatita pura (Giraldo-Betancourt *et al.*, 2013). En un estudio en conejos se observó una disminución significativa ($P < 0.01$) en la relación Ca/P en la tibia trasera en animales con osteoporosis en comparación con la relación Ca/P en los animales sanos (Kounadi *et al.*, 1998). Se ha sugerido que las alteraciones en la relación Ca/P pueden ser indicativas de los cambios en la matriz orgánica del hueso, principalmente en colágeno (Kounadi *et al.*, 1998). Estos cambios en la composición mineral ósea

demuestran que los huesos de los sujetos de estudio experimentaron modificaciones en su fase amorfa y cristalina como se refleja en los resultados obtenidos en el análisis de difracción de rayos X que se señalan a continuación.

El porcentaje de cristalinidad de los huesos de los grupos experimentales se presenta en la Figura 17a, en donde se puede observar que el grupo N-60 presentó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto al resto de los tratamientos y el control. El porcentaje de cristalinidad de los huesos de los animales alimentados con las dietas elaboradas con nopal se incrementó con la etapa de desarrollo del nopal utilizado. Se ha reportado que un incremento en el contenido de CO_3^{2-} en biomateriales inorgánicos derivados de hueso de bovino conlleva a una reducción en la cristalinidad de los compuestos de apatita (Desterro *et al.*, 2014). El PO_4^{3-} puede ser sustituido por CO_3^{2-} *in vivo*, en tanto que el OH^- puede ser reemplazado por el F^- . La proporción en la que estos sustituyentes se encuentran en el hueso en un sistema biológico modifican los patrones de difracción de rayos X, los cuales están relacionados con el tamaño, orientación y simetría del cristal. La resolución de los picos obtenidos en los patrones de difracción de rayos X en el hueso cortical es variable entre diferentes especies y se incrementa con la incorporación del F^- (Eliaz y Metoki, 2017). Un menor porcentaje de cristalinidad y mayor contenido de carbonato en biomateriales inorgánicos empleados en la fabricación de implantes se ha relacionado con una mayor velocidad de liberación de calcio en pruebas de disolución usando un medio ácido, lo que puede asociarse a una menor estabilidad del material y por lo tanto, a una mayor susceptibilidad de recambio de calcio en un sistema biológico (Desterro *et al.*, 2014) como se presume que pudo ocurrir en los huesos del grupo N-60, ya que su contenido de calcio fue menor comparado con el resto de los grupos experimentales.

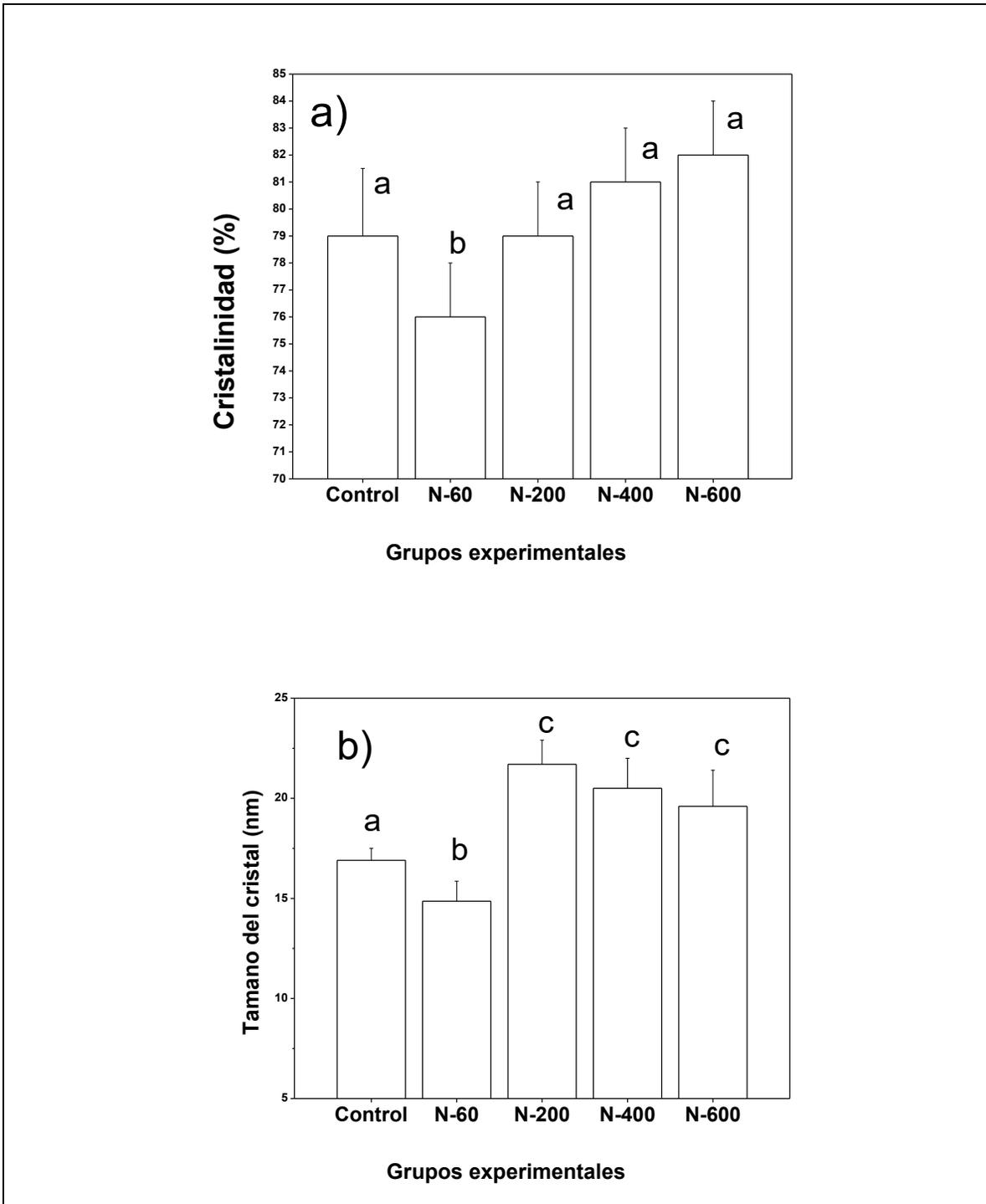


Figura 17. Análisis cristalográficos en los fémures de ratas alimentadas con nopal *O. ficus indica* como fuente de calcio al final del periodo experimental. a) % de cristalinidad y b) tamaño del cristal. Los valores son el valor promedio \pm desviación estándar (n=3).

En la Figura 17b se muestran los resultados obtenidos para el tamaño del cristal del hueso del fémur de los sujetos de estudio. El tamaño de los cristales en el fémur de los animales del grupo N-60 fue significativamente menor ($P \leq 0.05$) en comparación con el resto de los grupos experimentales. Como se ha señalado el tamaño de un cristal de compuestos de apatita como la hidroxiapatita, se puede modificar debido a la sustitución del Ca^{2+} por iones como el Mn^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Na^+ , K^+ entre otros (Campa *et al.*, 2007). Acorde con los resultados presentados en la Tabla 8, el contenido de potasio en los huesos de los grupos N-200, N-400 y N-600 fue significativamente mayor comparado con el grupo N-60 y control. Esto significa que es muy probable que el potasio sustituyera parte del calcio en los cristales de hidroxiapatita formando parte de su estructura y modificando los patrones de difracción de rayos X obtenidos, lo que a su vez se refleja en el tamaño del cristal (Rey *et al.*, 1995; Matsunaga y Murata, 2009). En este sentido, se sugiere que el tamaño de los cristales en los huesos de los grupos N-200, N-400 y N-600 es más grande en comparación con los cristales de los huesos del grupo N-60 debido a que el radio atómico del potasio es mayor que el del calcio.

8.13 Análisis de correlación entre la DMO con las propiedades del fémur

En la Tabla 9, se muestra el resumen de los valores de correlación de Pearson r entre la DMO, propiedades mecánicas, microestructurales, contenido mineral y porcentaje de cristalinidad en los fémures de todos los grupos ($n = 35$). Previo a los análisis de correlación los datos se sometieron a un análisis de dispersión. Se detectaron fuertes correlaciones entre P_{max} , F_{max} , Ca^{2+} y K^+ , la relación Ca/P y la DMO ($r \geq 0.5$). Correlaciones moderadas fueron observadas entre propiedades microestructurales, porcentaje de cristalinidad y la DMO ($r \leq 0.5$). Estos resultados coinciden con reportes previos que indican que la DMO del hueso esponjoso predice razonablemente la rigidez y la fuerza del hueso (Teo *et al.*, 2007). Los resultados de este estudio también demostraron que en conjunto con las propiedades mecánicas, los parámetros microestructurales (Gr.Cr, An.Tb, y Sp.Tb) correlacionaron con la DMO (Watcher *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2008).

Un hallazgo significativo en esta investigación es que el Ca^{2+} y K^+ en el hueso correlacionaron con la DMO. La ingesta de calcio en la dieta o suplementos incrementa

la DMO y retarda la pérdida de hueso. Con respecto al potasio, algunos autores sugieren que la suplementación con potasio tiene efectos benéficos en la masa ósea de adultos jóvenes y mujeres peri menopáusicas (Zhang *et al.*, 2006). Esto probablemente se debe a un efecto independiente del ión potasio (Mac Donald *et al.*, 2005). Las modificaciones en el porcentaje de cristalinidad y tamaño del cristal de la fase cristalina en los fémures de los grupos experimentales se han asociado con el proceso de remodelado óseo, el cual está estrechamente relacionado con la morfología y composición de la fase mineral (cristalina) del hueso (Peters *et al.*, 2000).

Tabla 9. Coeficiente de correlación entre densidad mineral ósea con propiedades mecánicas, estructurales, cristalográficas y contenido mineral del fémur de ratas

Todos los grupos (n = 35)	R	p
Propiedades mecánicas		
Fmax	0.667	<0.01
Pmax	0.603	<0.01
Propiedades microestructurales		
Cr.Wi	0.460	<0.05
Tb.Th	0.466	<0.01
Tb. Sp	-0.558	<0.01
CMO		
Ca ⁺⁺	0.544	<0.05
P ⁺	NS	NS
K ⁺	0.654	<0.05
Mg ⁺⁺	NS	NS
Relación Ca/P	0.583	<0.01
Cristalinidad %	0.407	<0.01

^AFmax: fuerza de ruptura en la prueba de compresión, ^BP-max: Fuerza de ruptura prueba de flexión en 3 puntos), NS: no significativo.

9. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran evidencia de que el nopal *Opuntia ficus indica* tiene diferentes efectos en las propiedades densitométricas, biomecánicas, microestructurales y cristalinas del hueso en ratas macho en crecimiento. Los cladodios en etapa de madurez temprana no constituyen una buena fuente de calcio dietario, como se demostró con los resultados poco favorecedores en las propiedades del hueso de las ratas suplementadas con *O. ficus indica* con un peso de 60 y 200 g. Por el contrario, las dietas elaboradas con cladodios de 400 y 600 g muestran un mayor potencial como fuente de calcio, en virtud de que son capaces de mejorar las propiedades físicas, mecánicas, microestructurales, densitométricas, contenido mineral y la relación Ca/P en el hueso del fémur de ratas en crecimiento. Estos resultados se confirman con la determinación de la absorción aparente del calcio, la cual resultó menor en los grupos alimentados con los cladodios en etapa temprana de desarrollo (60 g) en todas las etapas de crecimiento de los sujetos de estudio. Así mismo, las variaciones en los niveles de los marcadores bioquímicos de modelado óseo en los animales experimentales demuestran que la biodisponibilidad del calcio en el nopal se modifica dependiendo de la etapa de madurez de los cladodios utilizados en las dietas experimentales. Las modificaciones en las propiedades cristalinas del fémur de los sujetos de estudio en cuanto al porcentaje de cristalinidad y tamaño de cristal evidencian cambios en la mineralización del hueso que se refleja en sus propiedades mecánicas, estructurales y densitométricas.

Los resultados derivados de esta investigación demuestran, por primera vez, que el calcio presente en los cladodios de *O. ficus indica* es biodisponible y capaz de promover la densidad mineral, las propiedades mecánicas y microestructurales de los huesos en ratas. Estos hallazgos sugieren que el consumo de cladodios en etapa tardía de madurez en la dieta podría tener un impacto benéfico en la salud ósea. Una perspectiva de este trabajo consiste en evaluar los efectos del consumo de *O. ficus indica* en la salud ósea en estudios clínicos con diferentes grupos etarios.

10. REFERENCIAS

- Abrams, S.A. (2010). Calcium absorption in infants and small children: Methods of determination and recent findings. *Nutrients*. 2:474-480.
- Aguilera-Barreiro, M.A., Rivera Márquez, J.A., Trujillo-Arriaga, H.M., Alfredo-Tamayo, A., Barreira-Mercado, E. y Rodríguez-García, M.E. (2013). Intake of dehydrated nopal (*Opuntia ficus indica*) improves bone mineral density and calciuria in adult Mexican women. *Food and Nutrition Research*: 57:191-106.
- Aguilera-Barreiro, M.D.L., Micheeline-Cazares, R., Rangel-Peniche, DB., y Rodríguez-García, ME. (2017). Efecto de los estilos de vida en jóvenes universitarios Mexicanos sobre la densidad mineral ósea. *Rev. Esp. Nutr. Com.* 23(1):1-12.
- Amalraj, A., Pius, A. (2015). Bioavailability of calcium and its absorption inhibitors in raw and cooked green leafy vegetables commonly consumed in India - An in vitro study. *Food Chem.* 170:430-436.
- Anderson, J.B. (1996). Calcium, phosphorus and human bone development. *J Nutr.* 126: 1153S-1158S.
- Anderson, J.B. (2007). Functional foods and minerals: calcium. *Handb Food Prod Manuf.* 2:201-214.
- AOAC.(2000). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 17th ed. Methods 920.10. 920.86. association; Gaithersburg MD, USA.
- Arrabal-Polo, M.C., Cano-García, M., Canales, B.K., Arrabal-Martín, M. (2014.) Calcium nephrolithiasis and bone demineralization: pathophysiology, diagnosis, and medical management. *Curr Opin Urol.* 24(6):633-638.
- Astrup, A., Dyerberg, J., Selleck, M., Stender, S. (2008). Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obes Rev.* 9(1): 48-52.

Bae, Y.J. y Kim, M.H. (2013). The effects of Mg supplementation in diets with different calcium levels on the bone status and bone metabolism in growing female rats. *Biol Trace Elem Res.* 155(3):431-438.

Baroncelli, G.I., Federico, G. Bertelloni, S., Sodini, F., De-Terlizzi, F., Cadossi, R. y Saggese, G. (2003). Assessment of bone quality by quantitative ultrasound of proximal phalanges of the hand and fracture rate in children and adolescents with mineral disorders. *Pediatr Res.* 54(1):125-136.

Baroncelli, G.I., Bertelloni, S., Sodini, F. y Saggese, G. (2005). Osteoporosis in children and adolescents: etiology and management. *Pediatric drugs.* 7(5):295–323.

Barquera, S., Hernández, B.L., Campos, N.I., Espinosa, J., Flores, M., Barriguete, A.R., Juan, A. (2009). Energy and nutrient consumption in adults: Analysis of the Mexican national health and nutrition survey. *Salud Pub Mex.* 51: (Suppl. 4):S562-73.

Barrera, M.P., Lancheros, L. y Vargas, M. (2012). Consumo de calcio: evolución y situación actual. *Rev Fac Med.* 60:S50-61.

Bex, M. y Bouillon, R. (2003). Growth hormone and bone health. *Horm Res.* 60:80-86.

Bilbao, J.I. y Gil, N.B.P. (2011). Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 3(2):105-112.

Bonjour, J.P., Chevalley, T., Ferrari, S., Rizzoli, R. (2009). The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis. *Salud Pub Mex.* 51 (Suppl. 1): S5-17.

Boskey, A.L. (2013). Bone composition: relationship to bone fragility and anti-osteoporotic drug effects. *Bone key Rep.* 2:447.

Boyce, B.F. y Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG system. *Arch Biochem Biophys.* 473:139-146.

Bozzini, C., Picasso, E.O., Champin, G.M., Alippi, R.M., Bozzini, C.E. (2012). Biomechanical properties of the mid-shaft femur in middle-aged hypophysectomized rats as assessed by bending test. *Endocrine.* 42:411-418.

Bronner, F. y Pansu, D. (1999). Nutritional aspects of calcium absorption. *J Nutr.* 129:9-12.

Bronner, F. (2003). Mechanisms of intestinal calcium absorption. *J Cell Biochem.* 88(2): 387-393.

Brown, J.E., Zeng, L. y Wilson, C. (2014). Bone biomarkers in research and clinical practice. *Cancer Metastasis - Biol Treat.* 21(1):95-124.

Calvo, A.L., Muñoz, E.Y., Messing, B. (2006). Deficiencia de lactasa, intolerancia a la lactosa y pico de masa ósea en adultos jóvenes colombianos. *Rev Colomb Reumatol.* 13(4):271-286.

Campa, J., Ulloa, G., Bucio, L., Belío, T., Velazquez, R., Rivera, E. (2007). Tejido óseo y esmalte dental. Cap. 2. En: Biomateriales fundamentos, técnicas y aplicaciones. Ed. Universidad de Guadalajara, México. 46-48.

Caridad, L.G.A., Diuris, B., y Amelia, P. (2011). Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD. *Rev Electron Vet.* 12(11):1-10.

Cencic, A. y Chingwaru, W. (2010). The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients.* 2(6):611-625.

Chaudhary, DP., Sharma, R. y Bansal, DD. (2010). Implications of Magnesium deficiency in type 2 diabetes: A review. *Biol Trace Elem Res.* 134(2):119-129.

Chen, H., Hayakawa, D., Emura, S., Ozawa, Y., Okumura, T. y Shoumura, S. (2002). Effect of low or high dietary calcium on the morphology of the rat femur. *Histol Histopathol.* 17(4):1129–1135.

Choi, I.S., Jung, E.S., Choi, Y.E., Cho, Y.K., Yang, E.M. y Kim, C.J. (2013). Random urinary calcium/creatinine ratio for screening hypercalciuria in children with hematuria. *Ann Lab Med.* 33(6):401-405.

Christakos, S., Dhawan, P., Porta, A., Mady, L.J. y Seth, T. (2011). Vitamin D and intestinal calcium absorption. *Mol Cell Endocrinol.* 347:25-29.

Contreras-Padilla, M., Pérez-Torrero, E., Hernández-Urbiola, M.I., Hernández-Quevedo, G., Del Real, A., Rivera-Muñoz, EM. y Rodríguez-García, M.E. (2011). Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. redonda) at different maturity stages. *J Food Compos Anal.* 24(1):38-43.

Contreras-Padilla, M., Rivera-Muñoz, E.M., Gutiérrez-Cortez, E., Del Real-López, A. y Rodríguez-García, M.E. (2015). Characterization of crystalline structures in *Opuntia ficus-indica*. *J Biol Phys.* 41(1):99-112.

Dawson-Hughes, B., Harris, S.S., Palermo, N.J., Castaneda-Sceppa, C., Rasmussen, H.M. y Dallal, G.E. (2009). Treatment with potassium bicarbonate lowers calcium excretion and bone resorption in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 94(1):96-102.

Den-Besten, G., Van-Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.J. y Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res.* 54(9):2325-40.

Desterro, F.P., Soares-Sader, M., Almeida-Soares, G.D., Vaciél-Vidigal, G. (2014). Can inorganic bovine bone grafts present distinct properties? *Brazilian Dental J.* 25(4):282-288.

Dudarić, L., Fužinac-Smojver, A., Muhvić, D. y Giacometti, J. (2015). The role of polyphenols on bone metabolism in osteoporosis. *Food Res Int.* 77:290-298.

Eastell, R. y Hannon, R.A. (2008). Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proc Nutr Soc.* 67:157-162.

Eliaz, N. y Metoki, N. (2017). Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials.* 10(334):2-104.

Farbod, K., Nejadnik, M.R., Jansen, J.A., Leeuwenburgh, S.C.G. (2014). Interactions between inorganic and organic phases in bone tissue as a source of inspiration for design of novel nanocomposites. *Tissue Eng Part B Rev.* 20(2):173-188.

Fardous, A., Gondal, S. y Shah, Z.A. (2010). Sodium, potassium and magnesium dynamics in soil-plant- animal continuum. *Pakistan J Bot.* 42:2411-2421.

Fernández-Ortega, M. (2008) Consumo y Fuentes de calcio en mujeres adolescentes de Panamá. *Arch Latinoam Nutr.* 58:286-291.

Figueroa-Pérez, M.G., Pérez-Ramírez, I.F., Paredes-López, O., Mondragón-Jacobo, C., Reynoso-Camacho, R. (2016). Phytochemical composition and *in vitro* analysis of nopal (*O. ficus-indica*) cladodes at different stages of maturity. *Int J Food Prop.* 1203-1226.

Fine, K.D., Santa-Ana, C.A., Porter, J.L. y Fordtran, J.S. (1991). Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. *J Clin Invest.* 88(2): 96-402.

Finney, W.F., Morris, M.D., Wallace, J.M. y Kohn, DH. (2004). Ultrastructural elastic deformation of cortical bone tissue probed by NIR Raman spectroscopy. *Biomedical Optics*. 5321:233-241.

Fournier, C., Rizzoli, R., Ammann, P. (2014). Low calcium-phosphate intakes modulate the low-protein diet-related effect on peak bone mass acquisition: A hormonal and bone strength determinants study in female growing rats. *Endocrinology*. 155(11):4305-4315.

Frati, A., Altamirano, E., Rodriguez, N., Ariza, R., Lopez, R. (1989). Hypoglycemic action of *Opuntia Streptacantha* Lemaire: study using raw extracts. *Arch Invest Med* 20(4):321-325.

Frost, G., Sleeth, M.L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J.R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Louise, T.E. y Bell, J.D. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun*. 5:3611.

Gao, X., Wilde, P.E., Linchtenstein, A.H. y Tucker, K.L. (2006). Meeting adequate intake for dietary calcium without dairy foods in adolescents aged 9 to 18 years. *J Am Diet Assoc*. 106(11):1759-1765.

García-Garduño, M.V. y Reyes-Gasca, J. (2006). La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 9 (2):90-95.

Giraldo-Betancur, A.L., Espinosa-Arbelaez, D.G., Del Real-López, A. y Rodriguez-García M.E. (2013). Comparison of physicochemical properties of bio and commercial hydroxyapatite. *Curr Appl Phys*. 13(7):1383-1390.

Golub, E.E. y Boesze, B.K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop*. 18(5):444-448.

Greer, F.R. y Krebs, N.F. (2006). Optimizing bone health and calcium intakes of infants, children, and adolescents. *Pediatrics*, 117:578–585.

Gruber, H.E., Rude, R.K., Wei, L., Frausto, A., Mills, B.G. y Norton, H.J. (2003). Magnesium deficiency: effect on bone mineral density in the mouse appendicular skeleton. *BMC Musculo Skeletal Disorders*. 4(7):1-5.

Guede, D., González, P., Caeiro, J.R. (2013). Biomecánica y hueso (I): Conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos. *Rev Osteoporos y Metab Miner*. 5(1):43-50.

Hale, L.V., Galvin, J.S. y Risteli, J. (2007). PINP: A serum biomarker of bone formation in the rat. *Bone*. 40:1103-1109.

Hamed, E.A, Abu-Faddan, N.H, Adb-Elhafeez, H.A. y Sayed, D. (2011). Parathormone - 25(OH)-vitamin D axis and bone status in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*. 12(6):536-546.

Hernández-Becerra, E., Gutiérrez-Cortez, E., Del Real, A., Rojas-Molina, A., Rodríguez-García, M.E., Rubio, E., Quintero-García, M. y Rojas-Molina I. (2017). Bone mineral density, mechanical, microstructural properties and mineral content of the femur in growing rats fed with cactus *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae) cladodes as calcium source in diet. *Nutrients*. 9(2): 1-17.

Hernández-Urbiola, M.I., Contreras-Padilla, M., Pérez-Torrero, E., Hernández-Quevedo, G., Rojas-Molina, J.I., Cortez, M.E. y Rodríguez-García, M.E. (2010). Study of nutritional composition of nopal (*Opuntia ficus indica* cv. Redonda) at different maturity stages. *Bentham open*.4:11-16.

Huang, C.L. y Kuo, E. (2007). Mechanism of hypokalemia in Magnesium deficiency. *J. Am. Soc. Nephrol*. 18(10):2649-2652.

Hughes, D.B., Harris, S.S., Palermo, N.J. (2015). Potassium bicarbonate supplementation lowers bone turnover and calcium excretion in older men and women: A randomized dose-finding trial. *J Bone Miner Res.* 30(11):2103-2111.

Hunt, J.R., Hunt, C.D., Zito, C.A., Idso, J.P. y Johnson, L.K. (2008). Calcium requirements of growing rats based on bone mass, structure, or biomechanical strength are similar. *J Nutr.* 138:1462-1468.

Ito, S., Ishida, H., Uenishi, K., Murakami, K. y Sasaki, S. (2011). The relationship between habitual dietary phosphorus and calcium intake, and bone mineral density in young Japanese women: A cross-sectional study. *Asia Pac J Clin Nutr.* 20(3):411-417.

Jagtap, V.R. y Ganu, J.V. (2012). Effect of antiresorptive therapy on urinary hydroxyproline in postmenopausal osteoporosis. *Indian J Clin Biochem.* 27(1):90-93.

Jiang, G.Z., Matsumoto, H., Hori, M., Gunji, A., Hakozaiki, K., Akimoto, Y., Fijii, A. (2008). Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. *J. Bone Miner Metab.* 26:130–137.

Jimenez-Mendoza, D., Espinosa-Arbelaez, D.G., Giraldo-Betancur, A.L., Hernandez-Urbiola, M.I., Vargas-Vazquez, D. y Rodriguez-Garcia, M.E. (2011). Single X-ray transmission system for bone mineral density determination. *Rev Sci Instrum.* 82:125105.

Kafkafi, U. y Xu, G.H. (1999). Potassium nutrition for high crop yields. Cap. 6. En: Frontiers in potassium nutrition: new perspectives on the effects of Potassium on physiology of plants. D.M. Oosterhuis, G. Berkowitz. (Eds.). Ed. PPI/PPIC, Georgia, USA. 133–142.

Kang, J., Park, J., Choi, S.H., Igawa, S. y Song, Y. (2012). *Opuntia humifusa* supplementation increased bone density by regulating parathyroid hormone and osteocalcin in male growing rats. *Int J mol Sci.* 6747-6756.

Kemi, V.E., Kärkkäinen, M.U.M. y Lamberg-Allardt, C.J.E. (2006). High phosphorus intakes acutely and negatively affect Ca and bone metabolism in a dose-dependent manner in healthy young females. *Br J Nutr.* 96(3):545-552.

Khundimiri, S.J., O'Brien, C.A. y Lederer, E. (2016). PTH and Vitamin D. *Compr Physiol.* 6(2):561.601.

Kim, C. y Park, D. (2013). The effect of restriction of dietary calcium on trabecular and cortical bone mineral density in the rats. *J Exerc Nutr Biochem.* 17(4):123-131.

Ko, B.S., Won-Lee, H., Kim, D.S., Kang, S., Ah-Ryuk, J. y Park, S. (2014). Supplementing with *Opuntia ficus-indica* Mill and *Dioscorea nipponica* Makino extracts synergistically attenuates menopausal symptoms in estrogen-deficient rats. *J Ethnopharmacol.* 155(1):267-276.

Koivula, M.K., Risteli, L. y Risteli, J. (2012). Measurement of amino terminal propeptide of type I procollagen (PINP) in serum. *Clin Biochem.* 45(12):920-927.

Konstantinos, K., Malvina, O. y Christos., K. (2012). Analysis of bone composition with Raman spectroscopy. *J Biomed Opt.* 1-6.

Koshihara, M., Masuyama, R., Uehara, M. y Suzuki, K. (2004). Effect of dietary calcium:phosphorus ratio on bone mineralization and intestinal calcium absorption in ovariectomized rats. *Biofactors.* 22(1-4):39-42.

Kounadi, E., Fountos, G. y Tzaphlidou, M. (1998). The influence of inflammation-mediated osteopenia (IMO) on the structure of rabbit bone and skin collagen fibrils. *Connect. Tissue Res.* 37:69–76.

Kruger, M.C., Brown, K.E., Collett, G., Layton, L. y Schollum, L.M. (2003). The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Exp Biol Med (Maywood).* 228:683-688.

Kruger, M.C., Coetzee, M., Haag, M. y Weiler, H. (2010). Long-chain polyunsaturated fatty acids: selected mechanisms of action on bone. *Prog Lipid Res.* 49:438-449.

Kurien, B.T., Everds, N.E. y Scofield, R.H. (2004). Recolección experimental de orina en animales. *Lab Anim.* 38:333-361.

Lafita, J. (2003). Fisiología y Fisiopatología del Hueso. *An. Sist. Sanit. Navar.* (Supl. 3):7-15.

Lambert, H., Frassetto, L. y Moore, J.B. (2015). The effect of supplementation with alkaline potassium salts on bone metabolism: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 26(4):1311-1318.

Lanou, A.J., Berkow, S.E. y Bernard, N.D. (2005). Calcium dairy products, and bone health in children and young adults: a reevaluation of the evidence. *Pediatrics* 115:736-743.

Lee, K., Kim, K., Kim, H. y Seo, J.S.S. (2014). Association between dietary calcium and phosphorus intakes dietary calcium/phosphorus ratio and bone mass in the Korean populations. *Nutr J.* 13:114-121.

Lee, Y.S., Choi, C.W., Kim, J.J., Ganapathi, A., Udayakumar, R.K. y Kim, S.C. (2009). Determination of mineral content in methanolic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed extract and its effect on osteoblast markers. *Int J Mol Sci.* 10:292-305.

Lemann, J., Pleuss, J.A. y Gray, R.W. (1995). Potassium causes calcium retention in healthy adults. *J Nutr.* 123:1623–1626.

Li, Z.Y., Lam, W.M., Yang, C., Xu, B., Ni, G.X., Abba, S.A., Cheung, K.M.C., Luk, K.D.K. y Lu, W.W. (2007). Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials.* 28(7):1452-1460.

Licata, A. (2009). Bone density vs bone quality: what's a clinician to do? *Cleveland Clin J Med.* 76:331-336.

Li, J.J., Huang, Z.W. y Wang, R.Q. (2013). Fruit and vegetable intake and bone mass in Chinese adolescents, young and postmenopausal women. *Public Health Nutr.* 16(1):78-86.

Lobo, A.R., Colli, C. y Filisetti, T.M.C. (2006). Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. *Nutr Res.* 26:413-420.

Lomer, M.C.E., Parkes, G.C. y Sanderson, J.D. (2008) Review article: Lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. *Aliment Pharmacol Ther.* 27(2):93-103.

Lorente-Ramos, R.M., Azpeitia-Armán, J., Arévalo-Galeano, N., Muñoz-Hernández, A., García-Gómez, J.M. y Gredilla-Moliner, J. (2012). Dual energy X-ray absorptimetry: fundamentals, methodology, and clinical applications. *Radiología.* 54(5):410-423.

MacDonald, H.M., New, S.A., Fraser, W.D., Campbell, M.K. y Reid, D.M. (2005). Low dietary potassium intakes and high dietary estimates of net endogenous acid production are associated with low bone mineral density in premenopausal women and increased markers of bone resorption in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:923–933.

Manolagas, S.C., O'Brient, C.A. y Almeida, M. (2013). The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 9(12):699-712.

Martínez-Flores, H.E., Figueroa, J.D.C., Martínez-Bustos, F., Gonzalez-Hernández, J., Rodríguez-García, M.E., Baños-López, A.M.L. y Garnica-Romo, M.G. (2002). Physical properties and composition of femurs of rat fed with diets based on corn tortillas made from different processes. *Int J Food Sci Nutr.* 53(2):155-162.

Matsunaga, K. y Murata, H. (2009). Formation energies of substitutional sodium and potassium in hydroxyapatite. *Mater Trans.* 50(5):1041-1045.

Matsuzaki, H., Katsumata, E., Uehara, M., Suzuki, K. y Nakamura, K. (2005). Effects of high calcium intake on bone metabolism in magnesium-deficient rats. *Magnes Res.* 18(2):97-102.

McConn, M. y Nakata, PA. (2004). Oxalate reduces calcium availability in the pads of the prickly pear cactus through formation of calcium oxalate crystals. *J Agric Food Chem.* 52(5):1371-1374.

Melo, M.G.D., Doria, G.A.A., Serafini, M.R. y Araújo, A.A.S. (2012). Valores de referencia hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidad de Federal de Sergipe. *Sci plena.* 8(4):1-6.

Mercado, G., Duarte, N., Álvarez, E., De la Rosa, L. y Wall, A. (2012). Fosfatasa alcalina (E.C.3.1.3.1): bioquímica y aplicaciones en las ciencias biomédicas, ecológicas y alimentarias. *Tecnociencia.* VI (2):112-122.

Mehrotra, M., Gupta, K.S., Kumar, K., Awasthi, K. y Duner P.M. (2006). Calcium deficiency induced secondary hyperparathyroidism and osteopenia are rapidly reversible with calcium supplementation in growing rabbits pups Godbole M. *Br J Nutr.* 95:582-590.

Miller, G.D., Jarvis, J.K. y McBean, L.D. (2001). The importance of meeting calcium needs with foods. *J Am Coll Nutr.* 20(2 Suppl.):168S-185S.

Miyazato, S., Nakagawa, C., Kishimoto, Y., Tagami, H. y Hara, H. (2010). Promotive effects of resistant maltodextrin on apparent absorption of calcium, magnesium, iron and zinc in rats. *Eur J Nutr.* 49(3):165-171.

Mondaca R. (2006). ¿Por qué reducir las dosis de radiación en pediatría?. *Rev Chil Radiol.* 12(1):28-32.

Moran, S., Mina. A., Duque, J., Anaya, S., San-Martin, U., Yañez, P. y Leal, R.G. (2013). Prevalence of lactose malabsorption in Mexican children: importance of measuring methane in expired air. *Arch Med Res.* 44(4):291-295.

Morris, H.A., O'Loughlin, P.D. y Anderson, P.H. (2010). Experimental evidence for the effects of calcium and vitamin D on bone: A review. *Nutrients.* 2(9):1026-1035.

Morth, J.P., Pedersen, B.P. y Buch-Pedersen, M.J. (2011). A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(1):60-70.

Nair, A.K., Gautieri, A., Chang, S.W. y Buehler, M.J. (2013). Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. *Nat Commun.* 4:1724.

Nora, B., Llanos, I. y Rodriguez, A. (2012). Regulación hormonal del balance fosfocálcico. *Univ Nac Nord.* 20: 0-16.

Núñez-López, M.A., Paredes-López, O. y Reynoso-Camacho, R. (2013). Functional and hypoglycemic properties of Nopal cladodes (*O. ficus-indica*) at different maturity stages using *in vitro* and *in vivo* tests. *J Agric Food Chem.* 61(46):10981-10986.

Olney, R.C. (2003). Regulation of bone mass by growth hormone. *Medical and Pediatric Oncology.* 41:228-234.

Orchard, T., Larson, J.C. y Alghothani, N. (2014). Magnesium intake, bone mineral density, and fractures: Results from the women's health initiative observational study. *Am J Clin Nutr.* 99:926-933.

Ortega-Anta, A.R.M., González-Rodríguez, L.G., Lombán, B.N., Perea-Sánchez, J.M., Vizuete, A.A. y López-Sobaler, A.M. (2013). Ingesta de calcio y vitamina D en una muestra representativa de mujeres españolas; Problemática específica en menopausia. *Nutr Hosp.* 28(2):306-313.

Palacios, C. (2006). The role of nutrients in bone health, from A to Z. *Crit Rev Food Sci Nutr*.46:621–628.

Parnis, J.M. y Oldham, K.B. (2013). Beyond the Beer-Lambert law: The dependence of absorbance on time in photochemistry. *J Photochem Photobiol A Chem*. 267:6-10.

Payne, J.B., Stoner, J.A., Lee, H.M., Nummikoski, P.V., Reinhardt, R. y Golub, L.M. (2011). Serum bone biomarkers and oral/systemic bone loss in humans. *J Dent Res*. 90(6):747-751.

Peterlik, M., Kállay, E. y Cross, H.S. (2013). Calcium nutrition and extracellular calcium sensing: relevance for the pathogenesis of osteoporosis, cancer and cardiovascular diseases. *Nutrients*. 5:302-327.

Peters, F., Schwarz, D., Epple, M. (2000). The structure of bone studied with synchrotron X-ray diffraction, X-ray absorption spectroscopy and thermal analysis. *Thermochimica Acta*. 361(1-2):131-138.

Prescha, A., Krzysik, M., Zabłocka-Słowińskam, K. y Grajeta, H. (2014). Effects of exposure to dietary chromium on tissue mineral contents in rats fed diets with fiber. *Biol Trace Elem Res*. 159(1-3):325-331.

Pu, F., Chen, N. y Xue, S. (2016). Calcium intake, calcium homeostasis and health. *Food Sci Hum Wellness*. 5(1):8-16.

Ramasamy, U.S., Venema, K., Schols, H.A. y Gruppen, H. (2014). The role of soluble and insoluble fibers during fermentation of chicory root pulp. *J Agric Food Chem*. 32:454-459.

Rahnama, M., Jastrzebska, I., Jamrogiewicz, R., Lobacz, M., Kuczyński, M. y Rudzki, M. (2010). Osteocalcine concentration in saliva and blood serum conducted on

postmenopausal patients. *Ann Univ Mariae Curie-Sklodowska, Sect DDD Pharm.* 23(4):167-176.

Ramesh, K.C. y Nemere, I. (2008). Regulation of intestinal calcium transport. *Annu Rev Nutr.* 28(1):179-196.

Reeves. P.C., Nielsen, V.H. y Fahey, G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123:1941.

Rey, C., Miquel, J.L., Facchini, L., Legrand, A.P. y Glimcher, M.J. (1995). Hydroxyl groups in bone mineral. *Bone.* 16(5):583-586.

Rey, C., Combes, C., Drouet, C. y Glimcher, M. (2009). Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporos Int.* 20:1013-1021.

Riond, J.L., Hartmann, P., Steiner, P. (2000). Long-term excessive magnesium supplementation is deleterious whereas suboptimal supply is beneficial for bones in rats. *Magnes Res.* 13(4):249-264.

Rivera, J.A., Barquera, S., González-Cossío, T., Olaiz, G. y Sepúlveda, J. (2004). Nutrition transition in Mexico and in other Latin American countries. *Nutr Rev.* 62:S149--S157.

Rivera-Muñoz E.M. (2011). Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization. Cap 4. En: Biomedical Engineering Frontiers and Challengers. Ed. Reza Fasel Rezai. Rijeka, Croatia. 75 – 104.

Roczniak, W., Brodziak-Dopierała, B., Cipora, E., Jakóbiak-Kolon, A., Kluczka, J. y Babuńska-Roczniak, M. (2017). Factors that affect the content of Cadmium, Nickel, Copper and Zinc in tissues of the knee joint. *Biol Trace Elem Res.* 178 (2):201-209.

Rodríguez-García, M.E., Hernández-Becerra, E., Cornejo-Villegas, M.A., Palacios-Fonseca; A.J., Rojas-Molina, I., Reynoso, R., Quintero, L.C., Del-Real, A., Zepeda, T.A. y C. Muñoz-Torres. (2007). Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum nopal powders. *Plant Foods Hum Nutr.* 62:107-112.

Rojas-Molina, I., Gutiérrez-Cortez, E., Bah, M., Rojas-Molina, A., Ibarra-Alvarado, C., Rivera-Muñoz, E., Del Real, A., Aguilera-Barreiro, M.D.L.A. (2015). Characterization of calcium compounds in *Opuntia ficus indica* as a source of calcium for human diet. *J Chem.* 1-8.

Rollo, J.M.D.A., Boffa, R.S., Cesar, R., Schwab, D.C. y Leivas, T.P. (2015). Assessment of trabecular bones microarchitectures and crystal structure of hydroxyapatite in bone osteoporosis with application of the Rietveld method. *Procedia Eng.* 110:8-14.

Román, S., Ojeda-Granados, C. y Panduro A. (2013). Genética y evolución de la alimentación de la población en México. *Rev Endocrinol y Nutr.* 21(1):42-51.

Ross, F.P. (2009). Osteoclast Biology and Bone Resorption. Cap. 3. En: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. C.J. Rosen, Ed. American Society for Bone and Mineral Research. Washington, D.C. USA. 1-42.

Roy, M.E., Nishimoto, S.K., Rho, J.Y., Bhattacharya, S.K., Lin, J.S. y Pharr, G.M. (2001). Correlations between osteocalcin content, degree of mineralization, and mechanical properties of C. Carpio rib bone. *J Biomed Mater Res.* 54(4):547-553.

Rucci, N. (2008). Molecular biology of bone remodelling. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 5:49-56.

Ryder, K.M., Shorr, R.I., Bush, A.J., Kritchevsky, S.B., Harris, T., Stone, K., Cauley, J. y Tyllavsky, F.A. (2005). Magnesium intake from food and supplements is associated with

bone mineral density in healthy older white subjects. *J Am Geriatr Soc.* 53(11):1875-1880.

Santos, G.T., George, H.B. (2011). Parâmetros Bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos swiss do biotério. *R Bras Si Saude.* 15 (2):209-214.

Sargent, J.D., Stukel, T.A., Kresel, J. y Klein, R.Z. (1993). Normal values for random urinary calcium to creatinine ratios in infancy. *J Pediatr.* 123:393-397.

Schreiber, J.J., Anderson, P.A., Rosas, H.G., Buchholz, A.L. y Au, A.G. (2011). Hounsfield units for assessing bone mineral density and strength: a tool for osteoporosis management. *The Journal of Bone and Joint Surgery.* 93:1057–1063.

Sengupta, P. (2013). The laboratory rat: Relating its age with human's. Lab rat relate its age with human's. *Int J Prev Med.* 4:624-630.

Singer, F.R. y Eyre, D.R. (2008). Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Cleve Clin J Med.* 75:739-750.

Slavin, J.L. (2005). Dietary fiber and body weight. *Nutrition.* 21(3):411-418.

Slevin, M.M., Allsopp, P.J. y Magee, P.J. (2014). Supplementation with calcium and short-chain fructo-oligosaccharides affects markers of bone turnover but not bone mineral density in postmenopausal women. *J Nutr.* 144(3):297-304

Srivastava, S., Bankar. R. y Roy, P. (2013). Assessment of the role of flavonoids for inducing osteoblast differentiation in isolated mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Phytomedicine.* 20(8-9):683-690.

Straub, D.A. (2007). Calcium supplementatio in clinical practice: a rewiev of froms doses, and indications. *Nutr. Clin. Pract.* 22:286-296.

Szulc, P., Seeman, E. y Delmas, P.D. (2000). Biochemical measurements of bone turnover in children and adolescents. *Osteoporosis Int.* 11:281–294.

Takakura, I., Creasy, D.M. y Yokoi, R. (2014). Effects of male sexual maturity of reproductive endpoints relevant to DART studies in Wistar Hannover rats. *J Toxicol Sci.* 39(2):269-279.

Takeda, R. y Nakamura T. (2008). Effects of high Magnesium intake on bone mineral status and lipid metabolism in rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* 54(1):66-75.

Taylor, J.G. y Bushinsky, D.A. (2009). Calcium and phosphorus homeostasis. *Blood Purif.* 27(4):387-394.

Teo, J.C.M., Si-Hoe, K.M., Keh, J.E.L. y Teoh, S.H. (2007). Correlation of cancellous bone microarchitectural parameters from microCT to CT number and bone mechanical properties. *Mater Sci Eng C.* 27(2):333-339.

Toba, Y., Masuyama, R., Kato, K., Takada, Y., Aoe, S. y Suzuki, K. (1999). Effects of dietary magnesium level on calcium absorption in growing male rats. *Nutr Res.* 19(5):783-793.

Toba, Y., Kajita, Y., Masuyama, R. y Takada, Y. (2000). Dietary Magnesium supplementation affects bone metabolism and dynamic strength of bone in ovariectomized rats. *J Nutr.* 130(2):216-220.

Trejo-González, A., Ortiz-Gabriel, G., Puebla-Pérez, A., Guisar-Contreras, D., Munguia-Mazariegos, R., Mejía-Arreguín, S. y Edmundo, C. (1996). A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induces diabetes in rats. *J Ethnopharmacol.* 55(1):27-33.

Tucker, K, Hannan, M.T., Chen, H., Cupples, L.A., Wilson, PW. y Kiel, D.P. (1999). Potassium, magnesium, and fruit and vegetable intakes are associated with greater bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr.* 69(4):727-736.

Uribarri, J. (2007). Phosphorus homeostasis in normal health and in chronic kidney disease patients with special emphasis on dietary phosphorus intake. *Semin Dial.* 20(4):295-301.

Vaccaro, C., Busetto, R., Bernardini, D., Anselmi, C. y Zotti, A. (2012). Accuracy and precision of computer-assisted analysis of bone density via conventional and digital radiography in relation to dual-energy x-ray absorptiometry. *Am J Vet Res.* 73(3):381-384.

Valencia-Sandoval, K., Brambila-Paz, J.J. y Mora-Flores, J.S. (2010). Evaluación del nopal verdura como alimento funcional mediante opciones reales. *Agrociencia.* 44(8):955-963.

Viguet-Carrin, S., Hoppler, M., Membrez-Scalfo, F., Vuichoud, J., Vigo, M., Offord, E.A., Ammann, P., Scalfo, FM., Vuichoud, J., Vigo, M. y Offord, E.A. (2014). Peak bone strength is influenced by calcium intake in growing rats. *Bone.* 68:85-91.

Wachter, N., Krischak, G. y Mentzel, M. (2002). Correlation of bone mineral density with strength and microstructural parameters of cortical bone in vitro. *Bone.* 31(1):90-95.

Wang, X., Bank, R.A., TeKoppele, J.M. y Mauli-Agrawal, C. (2001). The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J Orthop Res.* 19(6):1021-1026.

Waraich, E.A., Ahmad, R., Saifullah, P, Ashraf, M.Y. y Ehsanullah, M. (2011). Role of mineral nutrition in alleviation of drought stress in plants. *Aust J Crop Sci.* 5:764-777.

Weaver, C.M., Janle, E. y Martin, B. (2009). Dairy versus calcium carbonate in promoting peak bone mass and bone maintenance during subsequent calcium deficiency. *J Bone Min Res.* 24(8):1411-1419.

Weaver, C.M., Alekel, D.L., Ward, W.E. y Ronis, M.J. (2012). Flavonoid Intake and Bone Health. *J Nutr Gerontol Geriatr.* 31(3) 239-253.

Whiting, S.J., Vatanparast, H., Baxter-Jones, A., Faulkner, RA., Mirwald, R. y Bailey, D.A. (2004). Factors that affect bone mineral accrual in the adolescent growth spurt. *J Nutr.* 134(3):696S-700S.

Wyatt, C.J., Hernández-Lozano, M.E., Méndez, R.O. y Valencia, M.E. (2000). Effect of different calcium and phosphorus content in Mexican diets on rat femur bone growth and composition. *Nutr Res.* 20(3):427-437.

Zafar, T.A., Weaver, C.M., Zhao, Y.D., Martin, B.R. y Wastney, M.E. (2004). Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats. *J Nutr.* 134(2):399-402.

Zhang, Y., Lai, W.P., Leung, P.C., Wu, C.F., Yao, X.S. y Wong, M.S. (2006). Effects of Fructus Ligustri Lucidi extract on bone turnover and calcium balance in ovariectomized rats. *Biol Pharm Bull.* 29(2):291-296.

Zhu, K., Devine, A. y Prince, R.L. (2012). The effects of high potassium consumption on bone mineral density in a prospective cohort study of elderly postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 20:335-340.