

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

**ESTUDIO DE LA DENSIDAD MINERAL
OSEA EN RATAS MANTENIDAS CON
UNA DIETA PLURICARENAL.**

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta

Anaid Cadena Estrada

Noviembre 30 de 2011

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

Estudio De La Densidad Mineral Ósea En Ratas Mantenidas Con Una Dieta Pluricarencial

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

Anaid Cadena Estrada

Dirigido por:

Dra. Esther Pérez Torrero

Co-dirigido por:

Carlos Isaac Silva Barrón

SINODALES

Nombre del Sinodal
Presidente

Firma

Nombre del Sinodal
Secretario

Firma

Nombre del Sinodal
Vocal

Firma

Nombre del Sinodal
Suplente

Firma

Nombre del Sinodal
Suplente

Firma

Nombre y Firma
Director de la Facultad

Nombre y Firma
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario Querétaro,
Qro. 30 de noviembre de 2011
México

Resumen

La deficiencia de Ca en la dieta es un factor determinante de la osteoporosis, enfermedad caracterizada por presentar masa ósea baja, lo que produce deterioro microarquitético del hueso, en consecuencia un aumento de la fragilidad ósea asociada al riesgo de presentar fracturas. Uno de los problemas actuales a los que se enfrenta el profesional de la salud es realizar un diagnóstico correcto tanto para su determinación como para el seguimiento de la respuesta al tratamiento administrado. En el siguiente trabajo se propone el uso de los rayos X como método alternativo para la evaluación de la densidad mineral ósea, en ratas wistar, usando un modelo de desnutrición, ya que actualmente en la bibliografía no se cuenta con éstas curvas de comportamiento normal y de desnutrición de la densidad mineral ósea de huesos en ratas Wistar, se formularon dos grupos de ratas; grupo control con agua y alimento at libitum y el grupo experimental con una dieta deficiente en todos los nutrimentos al 40%, registrando el peso y la densidad óptica mediante la transmisión de rayos X's, hasta la semana 12. Se observó en el grupo experimental una disminución paulatina de la densidad mineral ósea a partir de la semana 9 a diferencia del grupo control en el cual la densidad mineral ósea siguió en aumento hasta la semana 12 de edad. Los resultados obtenidos sentarán las bases para la generación de otros modelos para inducir disminución de la densidad mineral ósea (osteopenia) a base de dietas deficientes en Ca.

Palabras clave: osteoporosis, calcio, fémur, rayos X's

Summary

Ca deficiency in the diet is an important determinant of osteoporosis, a disease characterized by low bone mass present, resulting in deterioration of the bone, resulted in increased bone fragility associated with the risk of fractures. One of the current problems facing the health professional is to make a correct diagnosis both for its determination as to monitor response to treatment administered. In this paper we propose the use of X-rays as an alternative method for assessing bone mineral density in Wistar rats, using a model of malnutrition, as currently in the literature do not have the curves of normal behavior and of malnutrition in bone mineral density of bones in Wistar rats were made in two groups of rats, control group with water and food at libitum and the experimental group with a diet deficient in all nutrients at 40%, recording the weight and density optical transmission using X-ray's, until week 12. Was observed in the experimental group a gradual decrease in bone mineral density from week 9 unlike the control group in which bone mineral density continued to increase up to 12 weeks old. The results obtained provide the basis for the generation of models to induce reduced bone mineral density based diets deficient in Ca-

Words Key: osteoporosis, calcium, femur, X-ray's

Agradecimientos

Esta tesis representa un parteaguas entre una etapa muy enriquecedora y el camino que el tiempo obliga, En toda la experiencia universitaria y la conclusión del trabajo de tesis, hay habido personas que merecen las gracias porque sin su valiosa aportación no hubiera sido posible este trabajo y también hay a quienes las merecen por haber plasmado huella en mi camino

Agradezco a la Facultad de de Ingeniería, así como a la Facultad de medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro y también al Centro de Investigación de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México, por los espacios y facilidades prestadas a la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Esther Pérez Torrero por haber confiado en mi persona, por su apoyo durante todo el proceso de elaboración de esta Tesis, por la paciencia ante mi inconsistencia y por la dirección de este trabajo

Gracias también a mis queridos compañeros, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos casi cinco años de convivir dentro y fuera del salón de clase.

Y principalmente a mi familia, mis padres, Rosario Estrada e Isaac Cadena, así como a mi hermana Michell Cadena, les agradezco por acompañarme en esta aventura, por su apoyo, su guía y su confianza en la realización de mis sueños, soy afortunada por contar siempre con su amor, comprensión y ejemplo, los amo. Esta tesis es suya.

Índice

	pagina
Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos	iii
Índice	iv
Índice de tablas	v
Índice de graficas	vi
Índice de figuras	vii
1.- INTRODUCCIÓN.....	9
2.- JUSTIFICACIÓN.....	13
3.- REVISION DE LITERATURA.....	14
3.1.- <i>Calcio</i>	14
3.1.1.- Biodisponibilidad del Calcio.....	15
3.1.2.- Absorción del calcio	15
3.1.3.- Fisiología del calcio	16
3.2.- <i>Fósforo</i>	17
3.2.1.- Absorción del fosforo.....	17
3.2.2.- Metabolismo de fósforo y calcio.....	18
3.2.3.- Biomecánica del hueso.....	18
3.3.- <i>Hueso</i>	20
3.3.1.- <i>Función y Constitución del hueso</i>	20
3.3.2.- Tejido óseo.....	21
3.3.3.- <i>Característica del hueso</i>	21
3.3.4.- <i>Fémur</i>	22
3.4.- Enfermedades Óseas.....	23
3.4.1.- <i>Osteoporosis</i>	24
3.4.2.- Clasificación clínica de Osteoporosis.....	25
3.4.3.- <i>Osteopenia</i>	28
3.5.- <i>Densidad mineral ósea (DMO)</i>	28

3.6. - Absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA).....	29
3.7.- Rayos X.....	31
3.7.1.- Difracción de RX.....	31
3.8.- Dieta AIN-93.....	33
4.- Hipótesis.....	37
5.- OBJETIVO.....	38
5.1.- Objetivos particulares.....	38
6.-METODOLOGÍA.....	39
6.1.- Generar un método alternativo para la determinación de la densidad mineral ósea, mediante la detección digital de rayos X.	39
6.1.1.- Calculo de densidad óptica en radiografías.....	42
6.2.- Elaborar una curva de crecimiento normal del femur en ratas de la cepa wistar	46
6.3.- Formular una dieta que genere una disminución en la densidad mineral ósea.	47
6.4.- Generar un modelo de osteopenia a partir de las curvas desarrolladas de densidad mineral ósea, a través de dietas deficientes en el contenido de calcio.	47
7.- RESULTADOS.....	49
7.1.- Calibración del equipo.....	49
7.2- Peso corporal	50
7.3.- Formulación de una dieta que genere una disminución en la densidad mineral ósea.	51
7.4.- Curva de densidad mineral ósea del grupo control y grupo experimental..	52
8.- Discusión y conclusiones.....	55
9.- REFERENCIAS CITADAS.....	57

Índice de tablas y gráficos

Tabla 1. Tiempo de exposición predeterminado 1.....	41
Tabla 2. RDI seleccionada de una imagen 1.....	42
Tabla 3. Histograma de la sección RDI 1.....	42
Tabla 4. 1 Cálculo de los minerales a agregar en las dietas experimentales (mg/kg dieta AIN-936).	52
Grafica 1. 1 Registro de la densidad óptica en 3 distancias a diferentes tiempos de exposición.	50
Grafica 2. 1 Comparación de pesos entre el grupo control y el grupo experimental.	51
Grafica 3. 1 Comparación densidad óptica entre el grupo control y el grupo experimental.....	54

Índice de figuras

Figura 1. Dieta AIN-93 1	35
Figura 2. Fuente de rayos X dental 1	40
Figura 3. Sensor de imagen de rayos X 1	40
Figura 4. 1 Imágenes digitalizadas de la radiografía de fémur de rata in vivo, Hembra de tres semanas de edad.	45
Figura 5. Toma radiográfica de fémur de ratas del grupo control 1	46
Figura 6. Ratas del grupo control 1	47
Figura 7. 1 Correspondencia de la edad humana con la edad de la rata	53

1.- INTRODUCCIÓN

El calcio es el mineral más abundante en el cuerpo, cuyo contenido promedio es de 1.2 kg; es decir, aproximadamente el 2% del peso corporal. Casi todo el calcio (98%) se encuentra en el esqueleto (los huesos) el principal reservorio, y los dientes representan un 0.5% del total. El 1.5% restante se encuentra en los tejidos suaves y en los fluidos corporales, y aunque está presente en pequeñas cantidades, juega un rol vital en el metabolismo celular. El calcio está involucrado en muchos procesos fisiológicos, incluyendo la contracción muscular, la transmisión de impulsos nerviosos, los mecanismos de coagulación y la activación de enzimas.

El calcio es un nutriente esencial que no puede ser producido por el cuerpo y, por ende, necesitamos obtenerlo de los alimentos que consumimos. Como ya se ha dicho el hueso es el principal reservorio de calcio, y la regulación de la densidad ósea es un proceso considerablemente complejo. El hueso es un tejido de recambio, está formado por células; los osteoblastos, que secretan el colágeno y otras fibrillas en los cuales se cristalizan compuestos de calcio. Sin embargo otras células los osteoclastos, reabsorben el hueso disolviendo los compuestos cristalinos y liberando el calcio hacia la sangre. (Collin-Osdoby 2003).

El mantenimiento de la masa ósea depende de un balance entre las actividades de estos dos tipos de células, la pérdida clave de calcio del hueso consiste en la mayor actividad de los osteoclastos en comparación con los osteoblastos. (Zheng 2006). Dicho en otras palabras, en una situación ideal, la dieta suple las cantidades adecuadas de calcio para mantener los procesos fisiológicos. Sin embargo, cuando las fuentes dietéticas son insuficientes, el cuerpo extrae del tejido óseo el calcio que necesita para los procesos fisiológicos vitales, ocasionando que se desmineralice progresivamente.

La ingesta inadecuada de calcio ya sea en exceso o en carencia, tiene repercusiones importantes a nivel funcional y metabólico, con efectos nocivos para la salud y está asociada no sólo con un incremento del riesgo de padecer osteoporosis, sino también con la hipertensión, la pre-eclampsia en el embarazo y el cáncer de colon, alteraciones neurológicas como convulsiones y, cardiovasculares como taquicardia (Cashman y Flynn 1999) depresión psicosis, cálculos renales, náusea anorexia entre otros. (Bourges et al., 2005).

La osteoporosis ha sido definida como “una enfermedad sistémica del esqueleto que se caracteriza por una baja masa ósea y el deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, con un consecuente aumento en la fragilidad y susceptibilidad a las fracturas”. Los huesos pierden grandes cantidades de calcio, se vuelven livianos y frágiles, las vertebras de contraen y se produce una pérdida de peso. (Collin-Osdoby 2000).

La osteoporosis se produce como consecuencia del desequilibrio entre la formación y la resorción ósea. El volumen de hueso preexistente, que es sustituido por otro nuevo por unidad de tiempo, se conoce como recambio o *turnover óseo*. La diferencia entre el hueso formado y el hueso resorbido por unidad de tiempo se conoce como *balance óseo* (Serra et al, 2006).

Uno de los problemas actuales a los que se enfrenta el profesional de la salud es realizar un diagnóstico correcto tanto para su determinación como para el seguimiento de la respuesta al tratamiento administrado. La OMS (World Health Organization 1994), ha categorizado el diagnóstico en base a la cuantificación de la Densidad Mineral Ósea

La densitometría dual por rayos “X” (DEXA) es muy utilizada para evaluar la integridad ósea en pacientes humanos con antecedentes de osteopatías. Estudios experimentales con animales se han encontrado correlaciones muy significativas de este método con lesiones histológicas, histomorfométricas y con análisis

químicos respecto al contenido mineral del hueso o cenizas. La absorciometría de rayos X de doble energía realizado mediante un software especial para pequeños animales es una excelente técnica para medir la densidad ósea en ratas (Brem *et al*, 2003).

2.- JUSTIFICACIÓN

En la actualidad no se cuenta con datos de referencia de la densidad mineral ósea de huesos en ratas de la cepa Wistar, para ser utilizados como un patrón de referencia, para inducir disminución de la densidad mineral ósea y generar las bases que expliquen los cambios en el almacenamiento de Ca en la rata. Mediante un equipo dental de difracción y el acople de un sensor digital para especies pequeñas, podemos obtener curvas de calibración para registrar la densidad óptica de huesos de rata a lo largo de la edad, con el fin de obtener indicadores equivalentes a la obtenida por DEXA en humanos, el cual no es funcional para especies pequeñas. Esto permitirá reducir tiempo y costos para la obtención de los resultados, así como eliminar el sacrificio de los animales estudiando in vivo la densidad óptica utilizando el sistema radiológico. Esto reviste importancia debido a que no existe un estudio experimental similar, que sirva como referencia.

3.- REVISION DE LITERATURA

3.1.- Calcio

El calcio, es un nutrimento indispensable que desempeña diversos papeles biológicos, es fundamental para procesos tales como: transmisión de impulsos, vasodilatación, reacciones enzimáticas y de diversas hormonas, contracción muscular, adherencia de la célula y permeabilidad de las membranas, mitosis, coagulación de la sangre, secreción glandular y estructura del esqueleto. Actúa también como segundo mensajero en procesos transmembrana citoplasmática (Guéguen y Pointillart, 2000).

Como resultado del papel que desempeña, se ha demostrado que un consumo adecuado de calcio reduce el riesgo de padecer diversas enfermedades entre las cuales se encuentran: la osteoporosis, la hipertensión, el cáncer de colon (Guéguen y Pointillart, 2000), cálculos en el riñón e intoxicación por plomo (Brynt *et al*, 1999), lo que trae como consecuencia una reducción en las tasas de morbilidad y mortalidad

El promedio recomendado (RDA) para un consumo adecuado de calcio va de 800 a 1200 mg por día, éste valor depende del tipo de población, ya que existe discrepancia de consumo entre cada una, para proteger al organismo contra un balance negativo de calcio que provocaría daño o pérdida de masa ósea (Guéguen y Pointillart, 2000).

Los requerimientos del calcio a través de la vida no son uniformes debido a los cambios en el crecimiento esquelético, absorción y excreción (Bryant *et al*, 1999).

La retención de calcio aumenta durante el crecimiento e idealmente está en equilibrio en la edad adulta; pero llega a ser negativa cuando el consumo de calcio es inadecuado, puesto que el esqueleto sirve como depósito mineral primario para el mantenimiento del calcio a nivel del plasma, por ello la necesidad de éste

mineral, a través de la niñez y de la adolescencia aumenta para maximizar su retención en el hueso , ya que en este periodo es donde existe un crecimiento esquelético rápido y es importante obtener una masa máxima de hueso para protegerla contra el riesgo futuro de osteoporosis (Teegarden *et al*, 1995).

3.1.1.- Biodisponibilidad del Calcio

La biodisponibilidad del calcio de los alimentos, abarca no sólo la absorción intestinal, sino también su utilización. El calcio debe ser soluble en el medio ácido del estómago antes de que pueda ser absorbido. La buena solubilidad en agua es una ventaja, pero no es absolutamente necesaria.

El potencial de absorción de calcio (la absorción bajo las condiciones fisiológicas favorables) depende de varios factores: el alimento consumido, la capacidad de los intestinos (la cuál es afectada por: las reservas de calcio, la regulación hormonal o las fuentes dietéticas del mismo), la excreción urinaria y la pérdida fecal de calcio endógeno.

En la absorción intestinal los factores fisiológicos, particularmente hormonales, desempeñan un papel importante en la incorporación de calcio en el hueso (Guéguen y Pointillart, 2000).

La biodisponibilidad del calcio, por lo tanto, puede ser definida como la fracción de calcio dietético que es potencialmente absorbible por el intestino y que puede ser utilizado para las funciones fisiológicas, particularmente mineralización del hueso o para limitar su pérdida.

3.1.2.- Absorción del calcio

La absorción es el resultado de dos procesos: transporte activo a través de las células intestinales y difusión pasiva a través de las células. El primero ocurre principalmente en el duodeno y yeyuno, el cual precisa de la intervención de proteínas (calbindinas 9 kD y 28 kD que fijan el calcio y cuya síntesis está regulada por la vitamina D), fosfatasa alcalina y ATP para Ca-Mg ; todo ello modulado por las necesidades de Ca y de P mediante la síntesis de 1,25 hidroxivitamina D. Si los aportes de Ca y P son escasos se estimula la síntesis de calcitriol (1,25 hidroxivitamina D) y aumenta la absorción intestinal activa hasta un 70% con una reducción en la eliminación por las heces. Este mecanismo sí es saturable, sobre todo cuando el aporte de calcio es mayor se pierde entonces por las heces. El transporte pasivo, ocurre en el íleon y muy poco en el intestino grueso (Pansu y Bronner, 1999).

El calcio, debe estar en forma soluble generalmente ionizado (Ca^{2+}) antes de que pueda cruzar la pared del intestino (Guéguen y Pointillart, 2000).

3.1.3.- Fisiología del calcio

La homeostasis fosfocálcica tiene por objeto el mantenimiento de la concentración extracelular de calcio ionizado en unos límites estrechos y estables. Este proceso tiene lugar gracias a un complejo control iónico y hormonal que regula estrechamente a la vez la entrada intestinal y la salida renal del calcio y fósforo. Además existen reservas importantes de Ca y P en el esqueleto mineralizado, que pueden ser rápidamente liberadas según las necesidades. El esqueleto tiene por su parte como función especial permitir la sedestación y la locomoción. Por ello la homeostasis fosfocálcica debe tener como objeto primordial el garantizar la mineralización óptima del esqueleto. Estos mecanismos deben funcionar de forma precisa sobre todo en la infancia de modo que esta garantizado el crecimiento y el aumento de masa ósea (Garabédian *et al*, 1993).

3.2.- Fósforo

El contenido de fósforo de un adulto varón es de aproximadamente 500g, de los cuales el 85% se encuentra como minerales en los huesos, fosfato de calcio e hidroxiapatita. El resto se encuentra en las células y en el líquido extracelular como iones de fosfato inorgánico, fosfolípidos, fosfoproteínas y ésteres fosfóricos orgánicos. La mayoría del fósforo está presente como fosfato; no existe fósforo elemental presente como tal en el organismo. El fosfato es un constituyente de los ácidos nucleicos y de las membranas celulares, y es un factor esencial en todas las reacciones que producen energía en las células; este mineral desempeña un papel importante en la alteración de las concentraciones de calcio en los tejidos, en el mantenimiento del equilibrio ácido-base y en la excreción renal de iones hidrógeno (Morgan y Weinsier, 1999).

3.2.1.- Absorción del fosforo

El fosfato se absorbe únicamente en el intestino delgado, mediante un proceso de transporte activo que requiere sodio y, en mayor medida, mediante difusión pasiva. La vitamina D estimula la absorción de fosfato a través de un mecanismo aparentemente independiente de su acción sobre el transporte de calcio. Por lo tanto, en la deficiencia de vitamina D, con una reducción de la disponibilidad de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, la absorción de fósforo y de calcio está reducida. Durante el período de lactancia materna, los lactantes absorben entre el 85 y el 90% del fósforo presente. Cuando los lactantes reciben leche de vaca, que es siete veces más rica en fósforo que la leche humana, la absorción intestinal de fósforo se reduce hasta el 65 al 70%. En niños de más edad y en adultos, con una ingesta de 1.000-1.500 mg de fósforo, la eficacia de la absorción es aproximadamente del 50 al 60%. La ingesta de antiácidos que contienen aluminio reduce su absorción.

3.2.2.- Metabolismo de fósforo y calcio

El metabolismo del calcio (Ca) y el fósforo son tan interdependientes que hay que estudiarlos juntos, hay tres hormonas que regulan los niveles plasmáticos del calcio y el fósforo inorgánico (P_i): los metabolitos activos de la vitamina D (ahora considerada hormona en lugar de vitamina), la hormona paratiroidea (PTH) y la calcitonina, Los tejidos metabólicamente activos donde actúan son hueso, riñón e intestino. Como órgano fisiológico, el hueso es el reservorio del 99% del calcio total del organismo (1.000 g) y el 90% del fósforo total, estando el fosfato y el calcio óseo unido como hidroxiapatita: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Así, sólo el 1% (1.000 mg) de calcio está en el líquido extracelular y sólo una minúscula parte (50mg), es intracelular, principalmente en mitocondrias (Salter, 2000).

Para que se lleve a cabo el proceso de fijación óptimo del Ca en el tejido óseo debe de existir una relación 1:1 en la concentración del Ca y el P presentes en la sangre, ya que el P tiene un efecto directo en las funciones fisiológicas del Ca. Esto es lo que se conoce como la relación Ca/P que es un factor importante para la formación de hueso. La relación Ca/P es importante en el control y prevención de enfermedades asociadas con anomalías en la estructura ósea (Guéguen et al, 2000).

El exceso de fósforo en la dieta puede alterar el remodelado óseo al estimular la secreción de hormona paratiroidea, responsable de la movilización del calcio de los huesos, especialmente si la ingesta de calcio es baja (Ortega *et al*, 2000).

3.2.3.- Biomecánica del hueso

Los huesos responden a las fuerzas aplicadas sobre su superficie siguiendo un patrón característico. La primera fase es elástica y depende de la rigidez del hueso. En esta la deformación es temporal y se mantiene solo durante un determinado tiempo, tras lo cual, recupera su forma original. Si la fuerza aumenta,

se entra en una fase plástica y el hueso, aunque se recupere parcialmente, queda deformado.

Cuando la fuerza aplicada es superior a la resistencia del tejido se produce la fractura. La respuesta de tejido óseo frente a las fuerzas que se aplican sobre su superficie dependerá del tipo de fuerza, del tipo de hueso, así como de la densidad, arquitectura y composición del tejido óseo.

Las fuerzas que pueden actuar sobre el tejido óseo son de tres tipos tensión compresión y torsión. Además pueden ser aplicadas de forma perpendicular a la superficie ósea (fuerza normal) o de forma oblicua (fuerza de corte). Los huesos largos, son elásticos y poco plásticos, donde la resistencia será mayor cuando la fuerza se aplica de forma vertical al sentido de la carga.

Cuando la fuerza se aplica de forma oblicua, la fase plástica se acorta y el hueso se fractura con más rapidez. En los huesos integrados por tejido óseo esponjoso, la resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica a lo largo del eje vertical de las trabéculas vertebrales y también cuando es paralela a los sistemas trabeculares del cuello femoral.

Estos huesos, al ser menos densos, son menos elásticos y más plásticos, por lo que pueden presentar deformaciones mayores. Así, mientras que en los huesos integrados por tejido esponjoso, las fracturas se producen cuando existen variaciones del 7% de su longitud, en los integrados por tejido compacto, las fracturas se producen con variaciones del 2% (Serrano, 1998).

3.3.- Hueso

3.3.1.- Función y Constitución del hueso

El hueso es un tejido conectivo, profusamente vascularizado e innervado y sometido a un proceso de remodelado continuo a lo largo de toda la vida. El esqueleto, por un lado, proporciona soporte estructural para el movimiento; y por otro, además de proteger el encéfalo, medula espinal y el contenido del tórax y pelvis, la médula ósea constituye el soporte y matriz de la hematopoyesis. Para desempeñar tales funciones, el hueso posee una organización anatómica funcional que lo hace ser un tejido muy activo, contrariamente a su apariencia, junto con todo lo anterior, el hueso contiene el 99% del calcio, 85% de fósforo, 60% del magnesio y 35% del sodio (tres Guerras *et al*, 2005).

El tejido óseo puede ser considerado desde dos puntos de vista totalmente diferentes a) los huesos, como unidades, son estructuras anatómicas y b) el hueso de todo esqueleto, como conjunto, es un órgano fisiológico metabólicamente activo (Salter *et al*, 2000).

El ser humano adulto está formado por 206 huesos que son los órganos del sistema esquelético. Además sirve como medio de inserción para los músculos esqueléticos. También protege estructuras delicadas como cerebro, corazón y pulmones. La médula o tejido blando interno presente en algunos huesos es el sitio de la eritropoyesis, o formación de glóbulos rojos, así como de ciertos tipos de leucocitos. La médula eritropoyética se encuentra sólo en los huesos del cráneo, vértebras, esternón, iliaco, y extremos superiores de los huesos del brazo y muslo. Los huesos también actúan como almacén de calcio y fósforo, minerales que son liberados a la sangre cuando se necesitan (Dienhart, 1981).

El hueso está sujeto a presiones, tensiones, torsiones e inclinaciones, y se opone a éstas gracias a su resistencia y elasticidad. En edades avanzadas y en algunas enfermedades, esta resistencia está alterada, produciéndose fracturas (Le Vay *et al*, 2004).

3.3.2.- Tejido óseo

En el estroma de la cavidad medular de los huesos se halla un tejido conectivo en el que asientan diversas estirpes celulares esenciales tanto para la hematopoyesis como para la fisiología ósea. Así en él se encuentran células progenitoras, adipocitos, macrófagos, mastocitos, células endoteliales y células puramente óseas, como osteoblastos y osteoclastos y sus células precursoras (Tres Guerras JAF *et al*, 2005).

Todos los huesos se encuentran en un equilibrio dinámico, es decir, el depósito (formación) y la reabsorción de hueso están equilibrados, y esto permite, al mismo tiempo, un remodelado del esqueleto según las necesidades mecánicas. Las células responsables de la formación de nuevo hueso se conocen como osteoblastos, y las responsables de la reabsorción del hueso son grandes células multinucleadas llamadas osteoclastos (las células destructoras de hueso). Los osteoblastos secretan los componentes orgánicos del hueso (osteóide) que posteriormente, siempre que exista una cantidad suficiente de calcio y fosfato en el líquido extracelular, se mineralizan (Pocock *et al*, 2005).

3.3.3.- Característica del hueso

Huesos largos: la longitud es mayor que su anchura y el espesor; su cuerpo o diáfisis presenta forma tubular, su textura es compacta y en su eje se encuentra la cavidad medular; los dos extremos o epífisis presentan estructura esponjosa. Ejemplo: el fémur.

Huesos planos: las dimensiones que predominan son longitud y anchura; su textura reporta dos láminas compactas que encierran una capa esponjosa llamada diploe. Ejemplo: el parietal.

Huesos cortos: presentan sus tres dimensiones prácticamente iguales, su interior es de textura esponjosa. Ejemplo: Los huesos del carpo (Gutiérrez, 2005).

Huesos irregulares: son los de formas mixtas por ejemplo: los huesos faciales, la columna vertebral se llaman huesos sesamoides. Los huesos wormianos son accesorios y se encuentran entre los huesos de cráneos, donde los boedes se unen (Dienhart, 1981).

El hueso es un tejido conectivo mineralizado que adopta dos variedades morfológicas: la cortical y la trabecular.

Cada hueso está conformado por uno o ambos tipos de estructura. El hueso cortical es un hueso denso o compacto (presente en la diáfisis de los huesos largos, lamina externa e interna de los planos y periferias de los cortos) compuesto por conductos de Havers, vasos sanguíneos y linfáticos y fibras nerviosas.

En contraste, el hueso trabecular o esponjoso (localizado en la parte central de los huesos cortos, epífisis y metáfisis de los largos, y díploe de los planos) posee cavidades irregulares ocupadas por la médula ósea y sus laminillas se disponen alrededor de esas cavidades y carece de conductos de Havers (Tres Guerras *et al*, 2005).

3.3.4.- *Fémur*

El Fémur hueso más grande y fuerte del cuerpo. El cuerpo es casi cilíndrico, pero sus dos extremos son irregulares. La cabeza, redondeada y lisa, es recibida en el acetábulo del hueso coxal para formar la articulación de la cadera. Los trocánteres mayor y menor son prominencias, en el extremo superior del cuerpo, en las que se insertan músculos (Drake *et al*, 2005).

El extremo inferior del hueso está ensanchado para articularse con la tibia a nivel de la rodilla. Los epicóndilos dan inserción a los ligamentos y tendones. En la superficie anterior del extremo inferior, situada entre los dos cóndilos (apófisis

redondeadas que se ven en la cara posterior del fémur), está la superficie de contacto para la rótula (Dienhart *et al*, 1981).

La diáfisis del fémur está arqueada hacia delante y tiene un trayecto oblicuo desde el cuello del fémur hasta el extremo distal. Como consecuencia de esta orientación oblicua, la rodilla está cerca de la línea media por debajo del centro de gravedad del cuerpo (Drake *et al*, 2005).

La parte media de la diáfisis del fémur presenta una sección triangular. En la parte media de la diáfisis, el fémur tiene unas superficies medial (posteromedial), lateral (posterolateral) y anterior, así como unos bordes medial, lateral y posterior (Dienhart *et al*, 1981).

Los bordes medial y lateral son redondeados, mientras que el posterior forma una cresta rugosa ancha, la línea áspera. En las regiones proximal y distal del fémur, la línea áspera se ensancha hasta formar una superficie posterior adicional. En el extremo distal del fémur, esta superficie posterior forma el suelo de la fosa poplíteica y sus bordes, que se continúan con la línea áspera por encima, dan lugar a las líneas supracondíleas medial y lateral (Drake *et al*, 2005).

La línea supracondílea medial termina en un tubérculo prominente (el tubérculo aductor) sobre la cara superior del cóndilo medial del extremo distal. Justo lateral al extremo inferior de la línea supracondílea medial existe un área rugosa alargada de hueso para la inserción proximal de la cabeza medial del músculo gastrocnemio (Drake *et al*, 2005).

3.4.- Enfermedades Óseas

Las enfermedades producidas por las anomalías selectivas de las células ilustran la interpretación de los factores los cuales conservan la función ósea normal (Ganong *et al*, 2000).

Varias mutaciones en los genes codificantes de la colágena dan lugar a huesos frágiles, con lo que producen la osteogénesis imperfecta (enfermedad de los huesos frágiles). Otras mutaciones en los genes de la colágena generan las diversas condrodisplasias y al menos una variante del síndrome de Ehler-Danlos. Es posible que algunos casos de osteoporosis, osteoartritis y aneurisma aórtico también tengan origen en las mutaciones de los genes de la colágena (Ganong *et al*, 2000).

El trastorno en el que la acreción del calcio por unidad de matriz ósea que resulta insuficiente se denomina raquitismo en los niños y osteomalacia en los adultos (Ganong *et al*, 2000).

3.4.1.- Osteoporosis

La osteoporosis tal como la define la OMS, es una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por una disminución de la masa ósea, así como el deterioro microarquitectural del hueso, con un aumento de fragilidad y susceptibilidad a las fracturas (Barret-Connor, 1995).

La osteoporosis es una enfermedad que mientras se desarrolla no duele ni causa ninguna discapacidad, el dolor aparece con las fracturas osteoporóticas y la discapacidad, en algunos casos, persiste luego del accidente que provocó la quebradura de un hueso, sin embargo la consecuencia más importante es la movilidad limitada del individuo, perdiendo independencia personal y disminuyendo la calidad de vida. Las fracturas más comunes que sufren las personas son las de muñeca, cadera, vértebras y fémures. También se producen fracturas en otros huesos, como la pelvis y el húmero, aunque son menos comunes (American College of Sports medicine, 1993).

La osteoporosis es a enfermedad muy frecuente en la gente, especialmente en mujeres posmenopáusicas, resultando en una disminución patológica de la masa ósea (Knight *et al*, 2004).

En la osteoporosis se pierde la matriz y además se presenta una pérdida de masa y fuerza ósea junto con un incremento de la incidencia de fracturas. La osteoporosis se ha transformado en una de las causas más comunes de la discapacidad de las personas mayores, y ha determinado la calidad de vida de las mujeres de más de cincuenta años de edad (AMMOM, 2004). La osteoporosis constituye una enfermedad común y en los EUA y Europa se ha convertido en un problema de salud pública muy importante (Ganong *et al*, 2000).

Las encuestas dietéticas muestran que el 34 al 47% de la población de más de 60 años de edad consume menos de la mitad de la RDA de calcio. Es éste el grupo de edad con mayor riesgo de desarrollar osteoporosis, Las causas de la osteoporosis son multifactoriales y en gran medida desconocidas, pero parece probable que parte del problema esté relacionado con el metabolismo del calcio (Devlin, 2000).

3.4.2.- Clasificación clínica de Osteoporosis

La osteoporosis puede ser localizada o generalizada y se puede clasificar en primaria o secundaria.

- La primaria se produce en ancianos y en mujeres posmenopáusicas.
- La segunda se produce como consecuencia de endocrinopatías, malabsorción intestinal y neoplasias (Knight *et al*, 2004).

Existen varias causas que provocan la osteoporosis, lo que permite su clasificación en primaria y secundaria. La primaria se observa en asociación con menopausia o envejecimiento. Tradicionalmente se divide en tipos I y II. El tipo I es la osteoporosis posmenopáusica debida a la deficiencia de estrógenos que

llevan un incremento de osteoclastos con el subsecuente estado de recambio elevado. No se entiende exactamente el mecanismo por el cual la insuficiencia de estrógenos tiene estos efectos; sin embargo, se ha visto que con niveles bajos de éstos hay una regulación positiva de citocinas, especialmente de IL-6 y M-CSF que favorecen la formación y activación de osteoclastos. La osteoporosis primaria tipo II, llamada también involutiva, se asocia al envejecimiento. En comparación con el tipo I, existe una disminución en el recambio óseo con un defecto primario en la actividad osteoblástica y reducción en la formación de hueso. En cambio, la osteoporosis secundaria resulta de factores distintos al envejecimiento o la menopausia. Todos los pacientes con pérdidas óseas inexplicables se deben considerar candidatos para la evaluación de causas secundarias que se pueden sobreponer a una carencia ósea primaria (Knight *et al*, 2004).

Para excluir las causas secundarias más frecuentes, se realizan exámenes de laboratorio básicos, pruebas de función tiroidea, electroforesis de inmunoproteína (IPEP), 25(OH), vitamina D3, cortisol libre en orina de 24 horas, testosterona y/o estrógenos, calcio urinario de 24 horas y PTH intacta. Si los estos estudios resultan son negativos o si se requieren más estudios, se realizará una biopsia de hueso (OMS, 2004).

Varios autores han desarrollado diferentes instrumentos para la detección rápida y barata de los pacientes que deberían ir a DEXA, las cuales se caracterizan por una alta sensibilidad, pero por una baja especificidad. Estas herramientas consisten en la aplicación de un cuestionario que contiene preguntas acerca de la presencia de factores de riesgo relacionados con osteoporosis. Cada instrumento selecciona unos factores de riesgo y le asigna un puntaje a cada uno, el cual luego se suma, siendo el riesgo máximo de osteoporosis el puntaje máximo posible. Una herramienta de tamización óptima debería tener un punto de corte en el que se pueda seleccionar correctamente a los sujetos que deben ir a DEXA y en el que no haya falsos positivos ni falsos negativos. Cada una de estas encuestas establece un punto de corte del puntaje

adecuado a partir del cual la sensibilidad y especificidad tienen el mayor rendimiento diagnóstico y así se decide solicitar o no el examen DEXA.

Las validaciones previas de las escalas 18-30 han utilizado puntos de corte para lograr una sensibilidad mayor al 90%. Solamente un estudio¹⁸ ha buscado un punto de corte que sea aquel en el cual está el mejor balance entre sensibilidad y especificidad.

Los cuestionarios más conocidos que han sido validados son: ORAI (Osteoporosis Risk Assessment Instrument) 19, SCORE (Simple Calculated Osteoporosis Risk Estimation tool) 20, NOF (National Osteoporosis Foundation) 21, ABONE (Age, Body Size, No Estrogen) 22, OST (Osteoporosis Self-Assessment Tool) 23, 24 y OSIRIS (Osteoporosis Index of Risk) 25. Todas estas herramientas tienen en común el utilizar como parámetros la edad y el peso.

El ORAI además utiliza el uso actual de terapia de reemplazo hormonal, tiene una sensibilidad descrita entre el 71% y el 94% y una especificidad del 39% al 67%^{18, 19, 26, 27}.

El SCORE tiene en cuenta la raza, antecedentes de fracturas, antecedente de artritis reumatoide y uso de terapia estrogénica, cuya sensibilidad es del 56% al 91% y especificidad del 30% al 84%^{18-20, 26, 28, 29}.

El NOF utiliza adicionalmente la historia personal y familiar de fracturas y el uso actual de cigarrillo, con sensibilidad entre 87% y 96% y especificidad entre 17% y 25%^{21, 26}.

El ABONE da puntajes por edad, peso y uso de estrógenos; su sensibilidad oscila entre 64% y 83% y su especificidad entre 47% y 64%^{22, 26} (Calvo *et al*, 2007).

El OST utiliza únicamente peso y edad como criterios y han descrito una sensibilidad entre 72% y 94%, con una especificidad entre 25% y 64% 18, 23, 24, 27.

OSIRIS es la herramienta descrita más recientemente; aparte del peso y la edad da puntos por terapia de reemplazo estrogénico y por historia de fracturas; su sensibilidad varía entre 70% y el 90% y su especificidad entre 38% y 70% 18, 25, 30.

Los detalles de cómo se utilizan estos instrumentos y los puntos de corte sugeridos por sus autores. La variación de sensibilidad y especificidad de cada herramienta varía según el punto de corte utilizado y el T-Score del DEXA con el que se han comparado. Aunque estos instrumentos se han validado en otras partes, su validación no se ha hecho en nuestro país y así establecer su utilidad en la práctica clínica en nuestra población (Calvo *et al*, 2007).

3.4.3.- Osteopenia

La osteopenia, se refiere a la disminución de la densidad mineral ósea, está condición es el escalón previo a la osteoporosis pero es menos frecuente que esta, en los países en vías de desarrollo como México, la ingesta de calcio a partir de la leche y sus derivados está limitada en mayor medida por el alto costo que representan estos productos, lo que se refleja en el hecho de que más de 24.5 millones de personas presenten osteopenia (Murillo *et al.*, 1999; Bocanegra *et al.*, 2006).

3.5.- Densidad mineral ósea (DMO)

La densidad mineral ósea es un indicador para el riesgo de fractura en cualquier edad, cuando más baja es la densidad esquelética del hueso, mayor es el riesgo de fractura (Bryan *et al*, 1999), esto es debido a que está bien

establecida que la densidad y la fuerza del hueso están altamente correlacionadas (Pocock *et al*, 1987)

3.6. - Absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA).

La densitometría dual por rayos “X” DEXA es muy utilizada para evaluar la integridad ósea en pacientes humanos con antecedentes de osteopatías. Estudios experimentales con animales se han encontrado correlaciones muy significativas de este método con lesiones histológicas, histomorfométricas y con análisis químicos respecto al contenido mineral del hueso o cenizas (Brem *et al*, 2003).

Con esta técnica, dos haces son emitidos de una fuente de rayos X, estos haces de distinta energía pueden corregir la atenuación producida por los tejidos blandos. Es el método más extendido en la actualidad, por su baja radiación, su precisión y capacidad de medir tanto el esqueleto axial como el apendicular. Los densitómetros DEXA, exploran la cadera, la columna lumbar, el antebrazo y en muchos casos el esqueleto total. Algunos DEXA son capaces de dar imágenes laterales, que tiene la ventaja de poder medir exclusivamente el cuerpo vertebral, excluyendo los arcos posteriores y los osteofitos anteriores. De esta manera, la artrosis vertebral no interfiere en la medida. No obstante, la proyección lateral tiene la desventaja de una menor reproductibilidad comparada con la anteroposterior (Ibáñez, 2003).

Los más usuales analizan cadera y columna lumbar, dando valores por separado de la DMO en L2,L3 y L4, así como en distintas localizaciones de la cadera: cuello femoral, trocánter y región intertrocantérea. También proporciona los valores del fémur total y del triángulo de Ward. Esta última representa una zona variable, no anatómica, definida por el software de la máquina, correspondiente al área de menor DMO de la cadera (Ibáñez, 2003).

El aparato representa los valores de masa ósea en g/cm^2 (BMD), contenido mineral ósea en g (BMC), área (cm^2), altura (cm) y grosor (cm) del área explorada. A continuación suministra los valores de referencia, BMD, en función de la edad, en una gráfica de líneas: 1) la de referencia, 2) desviación estándar (± 1). (Brem *et al*, 2003).

En otra tabla proporciona los valores T-score y Z-score en cada una de las localizaciones exploradas así como los porcentajes respecto a los valores del adulto joven y respecto al grupo de edad y sexo. Este densitómetro tiene una alta precisión y han demostrado tener valor predictivo de fractura. Son ampliamente usados. Tienen la desventaja del alto coste y gran tamaño. Requiere espacio y necesitan personal especializado para su manejo (Ibáñez, 2003).

Los resultados del DEXA son interpretados por un radiólogo, como médico especializado en el diagnóstico por la imagen de las distintas enfermedades. El radiólogo emitirá un informe y lo enviará al médico solicitante, que realiza el plan de tratamiento (Brem *et al*, 2003).

Como ya se menciona antes el método diagnóstico de absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA, por sus siglas en inglés), ha tenido gran aceptación debido a su precisión, mínima radiación y rapidez del estudio, sin embargo, es un método muy costoso, en México existen alrededor de 400 escáneres de DXA de los cuales solo el 15% se encuentran en hospitales públicos, el resto se encuentran en la salud privada, que atiende a la minoría de la población. (Clark P. 2010).

La Sociedad Mexicana de Metabolismo Óseo y Mineral AC (AMMOM), que ofrece curso y certificación en densitometría ósea informo que de estos 400 escáneres solo 300 están en uso en centros médicos y no todos han alcanzado la certificación por la Sociedad Internacional de Densitometría u otros exámenes. El costo de un examen DEXA en México varía entre los \$250.00 a \$1500.00 en

servicios públicos y privados respectivamente, además de que no existe en México una política de reembolso para exámenes DEXA. (Clark P. 2010).

Para la calibración de un DEXA se necesita un patrón o phantom hecho de hidroxiapatita o aluminio. El sistema automáticamente ajusta los valores obtenidos en las radiografías y corrige los tonos acorde a la base de datos de densidad mineral ósea de las personas en función de su género, edad y nacionalidad (Brem *et al*, 2003).

3.7.- Rayos X

3.7.1.- Difracción de RX

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

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

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen}\theta$$

Donde:

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

λ = es la longitud de onda de los rayos X

d = es la distancia interplanar del cristal

θ = ángulo de Bragg o ángulo de incidencia.

El valor λ es una constante del tubo de rayos X, utilizado, que es más definido con el empleo de filtros o monocromadores.

El ángulo θ es variado continuamente durante el análisis, pero es un valor medible registrado por el instrumento.

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

La difracción de los rayos X es una herramienta útil durante el desarrollo de la caracterización de minerales, permite la identificación de especies minerales cristalinas que debido a su complejidad es difícil de identificar por otras técnicas.

Toda sustancia cristalina dispersa los rayos X en su propio patrón de difracción único, produciendo una “huella” de su estructura atómica y molecular. La intensidad de cada reflexión constituye la información básica requerida en el análisis de la estructura del cristal.

Debido a que átomos diferentes tienen diversos números de electrones, su dispersión relativa varía. Como consecuencia, la estructura del cristal determina la intensidad y posición del haz difractado. Aún cuando dos cristales tengan redes idénticas, el tipo de átomos que los forman puede ser diferente. Por lo tanto, cada especie de cristal difracta los rayos X en una forma característica distinta.

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

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

La ley de Beer, “Cuando un rayo de luz monocromática pasa a través de un medio absorbente, su intensidad disminuye exponencialmente a medida que

aumenta la concentración de la sustancia absorbente en el medio”, es la herramienta principal de esta aplicación, se emplea para calcular la atenuación en los tonos de gris de las radiografías en función del coeficiente de absorción de la muestra, su grosor y la energía del haz de rayos x aplicada. Esta ley es fundamental para encontrar el coeficiente de absorción de las muestras a analizar, de tal manera que se pueda encontrar una curva que relacione la intensidad de los píxeles de la radiografía en la región de interés con el grosor de la muestra, y así dar una valoración de la cantidad mineral ósea de la misma (Maikala, 2009).

3.8.- Dieta AIN-93

La dieta AIN-93, es una actualización de la dieta AIN-76^a, propuesta por The American Institute of Nutrition (AIN), realizada por The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), Forrest Nielsen y Philip Reeves. La meta de esta dieta es establecer una guía que pueda ayudar a los científicos que trabajan con nutrición experimental. Este intento de estandarizar una dieta prueba para animales de laboratorio, tiene como objetivo reducir la variación en los resultados y facilitar la interpretación de los mismos entre experimentos y laboratorios.

Las nuevas dietas fueron formuladas para el crecimiento, preñez, lactancia y mantenimiento de ratas y ratones. Las formulaciones fueron hechas bajo los siguientes criterios: pueden ser elaboradas con ingredientes purificados; con las formulaciones se puede conformar dietas normales o excedidas en algún nutrimento; pueden ser elaboradas fácilmente con ingredientes disponibles y a bajo costo, la composición de las mismas es consistente y reproducible.

La dieta AIN-93 está recomendada para animales en crecimiento, preñez y lactancia (tabla 1); en tanto que la dieta AIN-93M está recomendada para el mantenimiento de animales adultos (tabla 6). Esta última es más baja en el

contenido de proteína y grasa. La tabla 2 muestra el contenido de minerales en base al requerimiento

A continuación se muestra las formulaciones de las dietas:

Figura 1. Se presentan las tablas con la composición de las dietas AIN-93 G (tabla 1) y AIN-93 M (tabla 6), así como su contenido mineral (table 2).

TABLE 1

AIN-93G diet formulated for the growth, pregnancy and lactational phases of rodents

Ingredient	<i>g/kg diet</i>
Cornstarch	397.486
Casein (≥85% protein)	200.000
Dextrinized cornstarch (90–94% tetrasaccharides) ¹	132.000
Sucrose	100.000
Soybean oil (no additives)	70.000
Fiber ²	50.000
Mineral mix (AIN-93G-MX)	35.000
Vitamin mix (AIN-93-VX)	10.000
L-Cystine	3.000
Choline bitartrate (41.1% choline) ³	2.500
Tert-butylhydroquinone	0.014

¹Dyetrose (Dyets, Bethlehem, PA) and Lo-Dex 10 (American Maize, Hammond, IN) meet these specifications. An equivalent product may also be used.

²Solka-Floc[®], 200 FCC (FS&D, St. Louis, MO) or its equivalent is recommended.

³Based on the molecular weight of the free base.

TABLE 6

AIN-93M diet formulated for maintenance of adult rodents

Ingredient	<i>g/kg diet</i>
Cornstarch	465.692
Casein (≥85% protein)	140.000
Dextrinized cornstarch (90-94% tetrasaccharides) ¹	155.000
Sucrose	100.000
Soybean oil (no additives)	40.000
Fiber ²	50.000
Mineral mix (AIN-93M-MX)	35.000
Vitamin mix (AIN-93-VX)	10.000
L-Cystine	1.800
Choline bitartrate (41.1% choline) ³	2.500
Tert-butylhydroquinone	0.008

¹Dyetrose (Dyets, Bethlehem, PA) and Lo-Dex 10 (American Maize, Hammond, IN) meet these specifications. An equivalent product may also be used.

²Solka-Floc[®], 200 FCC (FS&D, St. Louis, MO) or its equivalent is recommended.

³Based on the molecular weight of the free base.

TABLE 2

Contribution of mineral elements to the AIN-93G and AIN-93M diets when the recommended mineral mixes AIN-93G-MX and AIN-93M-MX, respectively, are fed at 35 g/kg of the diet

	Diet	
	AIN-93G	AIN-93M
	<i>mg/kg diet</i>	
Essential mineral element		
Calcium	5000.0	5000.0
Phosphorus ¹	1561.0	1992.0
Potassium	3600.0	3600.0
Sulfur	300.0	300.0
Sodium	1019.0	1019.0
Chloride	1571.0	1571.0
Magnesium	507.0	507.0
Iron	35.0	35.0
Zinc	30.0	30.0
Manganese	10.0	10.0
Copper	6.0	6.0
Iodine	0.2	0.2
Molybdenum	0.15	0.15
Selenium	0.15	0.15
Potentially beneficial mineral element		
Silicon	5.0	5.0
Chromium	1.0	1.0
Fluoride	1.0	1.0
Nickel	0.5	0.5
Boron	0.5	0.5
Lithium	0.1	0.1
Vanadium	0.1	0.1

¹A total of 3000 mg P/kg diet is recommended for each diet. The difference between the contribution of the mix and the recommended dietary amount is made up from the contribution of phosphorus from casein.

Figura 1. Dieta AIN-93 1

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

Es bien sabido que en humanos, la dieta influye en el bienestar del organismo. Cuando hay carencia o exceso de algunos nutrimentos, sobrevienen enfermedades. Específicamente, hablando del calcio, su carencia o limitación en la dieta, afecta la densidad mineral ósea. En el caso de las ratas, existen modelos de osteopenia después de haber tenido una ooforectomía, pero no existe una referencia en la cual se haya afectado la densidad mineral ósea a través de dieta. Es por eso que proponemos una dieta deficiente en calcio que induzca osteopenia

4.- Hipótesis

La dieta con una disminución del 40% en todos los nutrimentos administrada al grupo experimental provocará una desnutrición que nos permita observar una descalcificación ósea, formando una curva que permita comparar el comportamiento normal y desnutrido de éste parámetro y que posteriormente sirva de referencia para estudios biológicos experimentales.

5.- OBJETIVO

Estudiar la densidad mineral ósea en ratas mediante una dieta de desnutrición, que nos permita obtener una curva de densidad mineral ósea, que sirva como patrón de comparación entre un grupo de ratas normal y un grupo de ratas desnutridas, a través de un método alternativo por transmisión de rayos X; y que sirva de referencia para estudios biológicos experimentales relacionados con el tema.

5.1.- Objetivos particulares

1. Generar un método alternativo para la determinación de la densidad mineral ósea, mediante la detección digital de rayos X.
2. Elaborar una curva de crecimiento normal del fémur en ratas de la cepa wistar
3. Formular una dieta que genere una disminución en la densidad mineral ósea.
4. Generar un modelo de osteopenia a partir de las curvas desarrolladas de densidad mineral ósea, a través de dietas deficientes en el contenido de calcio.

6.-METODOLOGÍA

6.1.- Generar un método alternativo para la determinación de la densidad mineral ósea, mediante la detección digital de rayos X.

Se generó un método alternativo para la determinación de la densidad mineral ósea, mediante la transmisión de rayos X, esto para evaluar el estado de la densidad mineral ósea de los animales alimentados con las dietas experimentales. Esto se hace necesario, debido a que actualmente no se cuenta con el equipo (densitómetro) para medir la densidad mineral ósea en especies pequeñas y el costo del mismo es elevado. El evaluar el estado mineral de los huesos de los animales experimentales por otros medios, implica un elevado costo, demasiado tiempo, son técnicas en donde se tienen que sacrificar los animales y los resultados que estos animales pudieran arrojar, serían semicuantitativos con respecto al resto de los animales del grupo experimental.

Como se explicó anteriormente, para determinar la densidad mineral ósea se está construyendo un sistema de transmisión de rayos X basado en un equipo dental, al que se le ha incorporado un detector digital de imagen que permite obtener las radiografías. Este sistema tiene ventajas sobre la radiografía convencional por que no tienen influencia los procesos de revelado.

El equipo consta de una fuente de rayos X de tipo dental (figura 2) , el sensor de rayos X (figura 3) y el software de captura. La calibración del conjunto fuente de rayos X y sensor se hizo tomando en cuenta distancia y tiempo de exposición, las cuales se corrieron al mismo tiempo. La primera de ellas se enfoca en determinar la distancia óptima para la toma de la radiografía y la segunda es para analizar el tiempo de exposición adecuado para que la radiografía no se sature (se vea muy oscura). Esta prueba se realizó usando hueso de pollo.



Figura 2. Fuente de rayos X dental 1

.



Figura 3. Sensor de imagen de rayos X 1

Tiempo de exposición (Seg)	
T1	0.800
T2	0.100
T3	0.125
T4	0.160
T5	0.200

Tabla 1. Tiempo de exposición predeterminado 1

Obtención de la distancia y tiempo de exposición óptimo

La muestra analizada en esta prueba es el fémur de pollo descarnado al cual se le tomaron radiografías bajo el siguiente procedimiento.

- 1.- Se ajustó el cilindro colimador de la fuente de rayos X frente al sensor dejando una distancia entre ellos de 2.5, 4 y 8 cm.
- 2.- Se tomaron radiografías con cada tiempo de exposición en cada una de las distancias descritas anteriormente.
- 3.- Se procesaron las radiográficas en computadora tomando una región de interés (RDI) de 0.25cm² que equivale a un pequeño cuadrado de 83 x 83 píxeles, posteriormente se analizaron sus histogramas correspondientes con el objetivo de cuantificar los niveles de gris y la cantidad de píxeles en la RDI.
- 4.- Se graficaron los datos obtenidos tomando en cuenta la media \pm EE

Una vez establecidos la distancia y tiempo de exposición a utilizar, procedemos a tomar radiografías del grupo control.

6.1.1.- Calculo de densidad óptica en radiografías

Densidad óptica.

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

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

1	2	1
1	2	3
2	4	0

Tabla 2. RDI seleccionada de una imagen 1

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

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

Tabla 3. Histograma de la sección RDI 1

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

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

El área en píxeles de la RDI es: 3×3 Píxeles = 9 Píxeles².

Es decir, se cuenta la cantidad de píxeles que tiene la sección RDI para determinar su área.

La densidad óptica es:

DO = Suma total de intensidades en RDI / Área en píxeles de RDI.

DO = $16 \text{ Píxeles} / 9 \text{ Píxeles}^2 = 1.77/\text{Píxeles}$, pero como solo usamos valores enteros, redondeamos éste valor al número más cercano, es decir 2/Píxel

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

El análisis de cada densidad óptica ha sido graficado en el software Origin 7.5, la gráfica de densidades ópticas para machos y hembras muestra la variación existente entre un género y otro, tal como sucede en los humanos.

Las pruebas densitométricas de rayos X dental se realizaron en el animal in vivo sobre ambos fémures.

El registro de la densidad óptica por medio de la transmisión de rayos X está basado en la ley de Beer (Maikala R. V., 2009).

Del análisis de los histogramas se toman los valores de intensidad en píxeles que representan la mayor cantidad de niveles claros en la imagen, los

cuales se grafican y se encuentra la curva de calibración para ese tipo de hueso en análisis.

En el siguiente paso se uso la ecuación de la ley de Beer para interpolar el valor de densidad en la imagen (Maikala R. V., 2009).

$$I=I_0 e^{(-\beta \cdot x)} \quad (1)$$

I= Intensidad medida

I₀= Intensidad inicial

β= coeficiente de absorción del material

X= grosor de la muestra

Si tenemos que:

$$p=m/v \quad (2)$$

$$v=A \cdot X \quad (3)$$

Sustituyendo la ecuación 3 en la 2, tenemos

$$p=m/A \cdot V \quad (4)$$

Despejando "X" de la ecuación 4 y sustituyendo en la ecuación 1, se tiene:

$$I=I_0 e^{(-\beta \cdot m/A \cdot p)} \quad (5)$$

Esta ley es fundamental para encontrar el coeficiente de absorción de las muestras a analizar, de tal manera que se pueda encontrar una curva que relacione la intensidad de los píxeles de la radiografía en la región de interés con

el grosor de la muestra, y así dar una valoración de la cantidad mineral ósea de la misma. (Figura 4)



Figura 4. 1 Imágenes digitalizadas de la radiografía de fémur de rata in vivo, Hembra de tres semanas de edad.

El presente estudio se realizó en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, trabajando con un total de 220 ratas hembras (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar de tres semanas de edad, recién destetadas, registrando semanalmente peso, y edad de cada animal. Los animales fueron mantenidos en condiciones de bioterio, siguiendo los lineamiento para el manejo de animales de la National Research Council (2003), ciclo de Luz/Oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 07:00 h), humedad aproximada de 45-55% y temperatura $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, evitando factores de alteración como ruidos, manejo excesivo y lesiones en los animales.

El experimento se llevo a cabo en un lapso de cuatro meses y medio y los animales que se utilizaron fueron adquiridos en el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla, Querétaro, México.

Para el trabajo con ratas en el laboratorio es importante el uso de una dieta balanceada, para facilitar la interpretación de resultados entre laboratorios y experimentos. Tras varias pruebas con diferentes dietas, el resultado de las deliberaciones del American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee es la dieta AIN-93, utilizada en este trabajo.

Se formaron dos grupos de ratas de la cepa winstar: el grupo control y el grupo experimental.

6.2.- Elaborar una curva de crecimiento normal del fémur en ratas de la cepa wistar

El grupo control (bioterio: INB-UNAM (certificado)), sin ningún tratamiento, en condiciones controladas y consumo de agua y alimento (dieta AIN- 93G), ad libitum. Los parámetros a medir fueron: peso, y la densidad mineral ósea mediante el análisis digital de rayos X (figura 5, 6)



Figura 5. Toma radiográfica de fémur de ratas del grupo control 1



Figura 6. Ratas del grupo control 1

6.3.- Formular una dieta que genere una disminución en la densidad mineral ósea.

6.4.- Generar un modelo de osteopenia a partir de las curvas desarrolladas de densidad mineral ósea, a través de dietas deficientes en el contenido de calcio.

La ingesta diaria según la OMS (2007) es de 1000 -1200 mg de calcio, la ingesta promedio en E.U. es de 800 mg de calcio, (Braunwald et al, 2005) y consumir menos de 400 mg de calcio empieza a afectar el esqueleto, en base a esto, para el grupo experimental se decidió disminuir la dieta normal AIN- 93G, al 40 % en todos los nutrientes, se tomó el pellet normal y se molió para obtener el alimento en polvo y poder realizar la dieta. Se realizó el cálculo y se elaboraron 30

kg de dieta, donde: 18 kg fueron de pellet y 12 kg de alfamel (Alphacel Non nutritive bulk MP Biomedicals LLC).

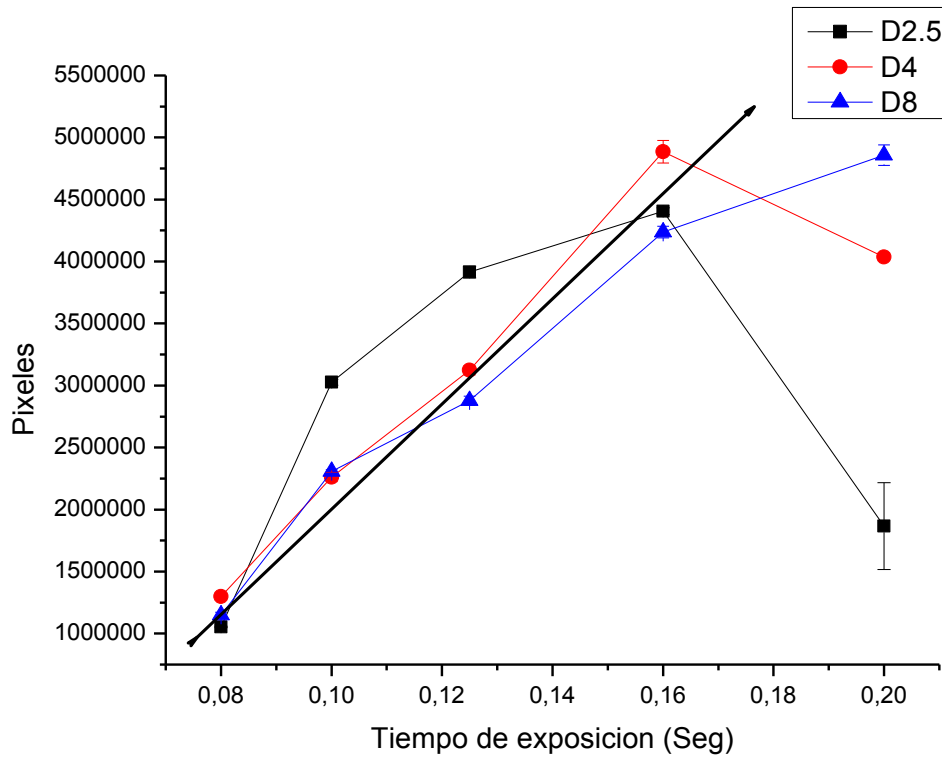
El grupo experimental fueron ratas de la cepa winstar a las cuales se les administro la nueva dieta durante 40 días. Los parámetros a medir fueron: peso, y la densidad mineral ósea mediante el análisis digital de rayos X

7.- RESULTADOS

7.1.- Calibración del equipo

En la grafica 1, observamos que el sensor responde sin saturarse en una relación casi lineal desde el tiempo de exposición 0.8 hasta 0.160 s., después de este tiempo, existe una variación grande en la cantidad de píxeles que cae súbitamente tanto para la distancia de 4 (D4 cm) como para la distancia 2.5 (D2.5 cm) a 0.2 s.; mientras que la distancia de 8 (D8 cm) a 0.2 s. baja ligeramente. Estos datos indican que para una toma radiográfica, el tiempo de exposición de 0.160 s., se ajusta bien a cualquiera de las 3 distancias, por lo que se decidió utilizar este tiempo de exposición como el óptimo

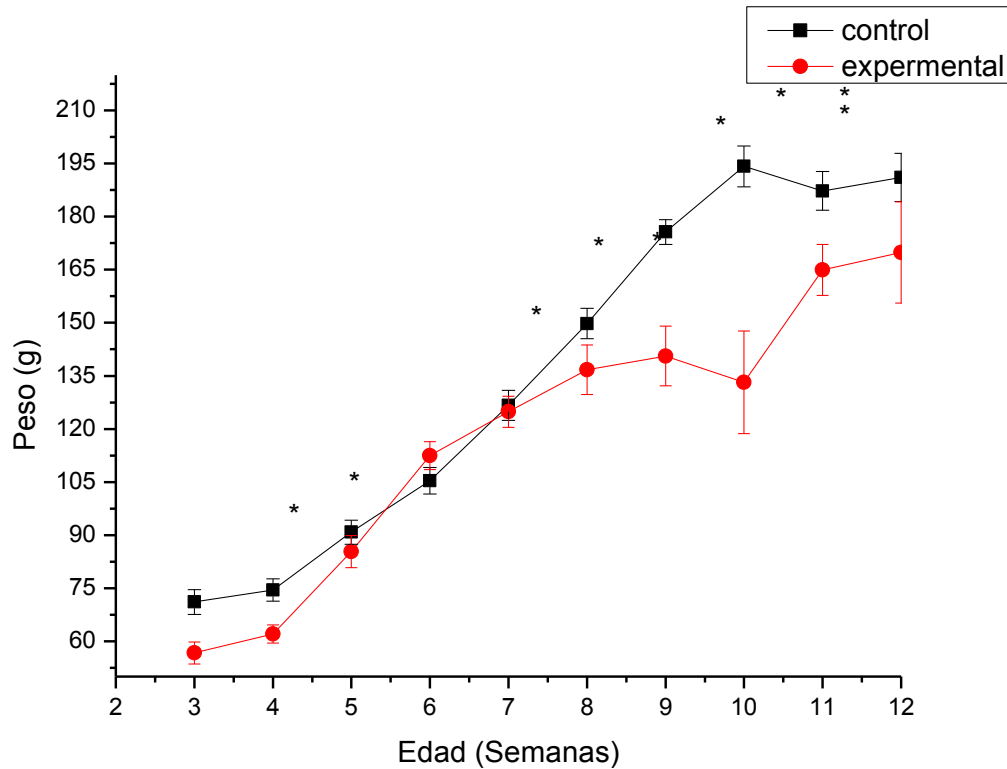
La mejor distancia en el tiempo de exposición de 0.08 s. fue a la distancia de 4 (D4 cm), ya que las pruebas realizadas en la distancia de 2.5 (D2.5 cm) y de 8 (D8 cm) carecían de calidad.



Grafica 1. 1 Registro de la densidad óptica en 3 distancias a diferentes tiempos de exposición.

7.2- Peso corporal

En la Grafica 2 se observa el incremento del peso en ambos grupos de ratas: el grupo control y el grupo experimental, el cual es uniforme hasta la semana 8, a esta edad las ratas alcanzan su madurez sexual (Gutiérrez, 2009). A partir de la semana 8 la diferencia de peso entre ambos grupos es significativa,



Grafica 2.1 Comparación de pesos entre el grupo control y el grupo experimental.

7.3.- Formulación de una dieta que genere una disminución en la densidad mineral ósea.

Se realizó el cálculo para la elaboración de la dieta que esta siendo utilizada para originar la descalcificación del hueso en las ratas Wistar. El cálculo se realizó haciendo una disminución del 40% menos del requerimiento en todo, esto para evitar una carencia drástica de nutrimentos que pudiera poner en riesgo la adaptación y la vida de los animales experimentales. Para hacer esta dieta, se partió del pellet LabDiet (5001 rodent diet). Este pellet es similar a la dieta AIN-93 G (gestación y crecimiento) (Lab diet, 2010). La dieta se realizó agregando 60% del pellet de Lab Diet y 40% de alfahcel, para obtener una dieta con una reducción el 40% menos en todo.

Elemento	100%	40%
Calcio	5000.0	3000.0
Fósforo	1561.0	1789.7
Potasio	3600.0	4127.5
Sulfuro	300.0	343.9
Sodio	1019.0	1168.3
Cloruro	1571.0	1801.2
Magnesio	507.0	581.2
Hierro	35.0	40.12
Zinc	30.0	34.39
Manganeso	10.0	11.46
Cobre	6.0	6.8
Iodo	0.2	0.22
Molibdeno	0.15	0.17
Selenio	0.15	0.17
Silicón	5.0	5.73
Cromo	1.0	1.14
Flúor	1.0	1.14
Níquel	0.5	0.57
Boro	0.5	0.57
Litio	0.1	0.11
Valaquia o Varaquium?	0.1	0.11

Tabla 4. 1 Cálculo de los minerales a agregar en las dietas experimentales (mg/kg dieta AIN-936).

(Reeves *et al*, 1993)

7.4.- Curva de densidad mineral ósea del grupo control y grupo experimental

En base al registro de las radiografías, se obtuvo una curva de densidad mineral óptica tomando en cuenta las densidades ópticas de cada radiografía de ambos fémur; sacando el promedio de ambos fémur, tanto del grupo control como del grupo experimental, con un tiempo de exposición de 0.160 s; el cual varía en un 5% debido a las fluctuaciones de la línea de alimentación eléctrica (Durant y Díaz, 1995).

Para el grupo control en la gráfica 3 se observa una densidad mineral con comportamiento sigmoideo, lo cual corresponde a lo esperado, donde la densidad se incrementa conforme se incrementa la edad de los animales, se observa también una tendencia a estabilizarse a partir de la décimo segunda semana de edad. Esto se asemeja con el patrón de densidad mineral ósea de los humanos (figura 7), donde también se observa una densidad mineral con comportamiento sigmoideo en la fase de crecimiento acelerado y una estabilización en la fase adulta.

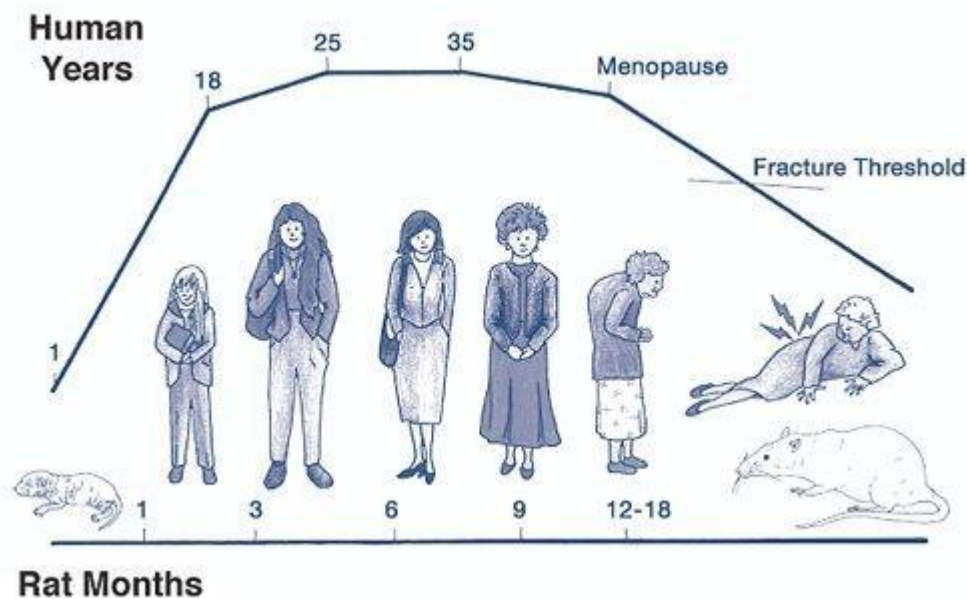
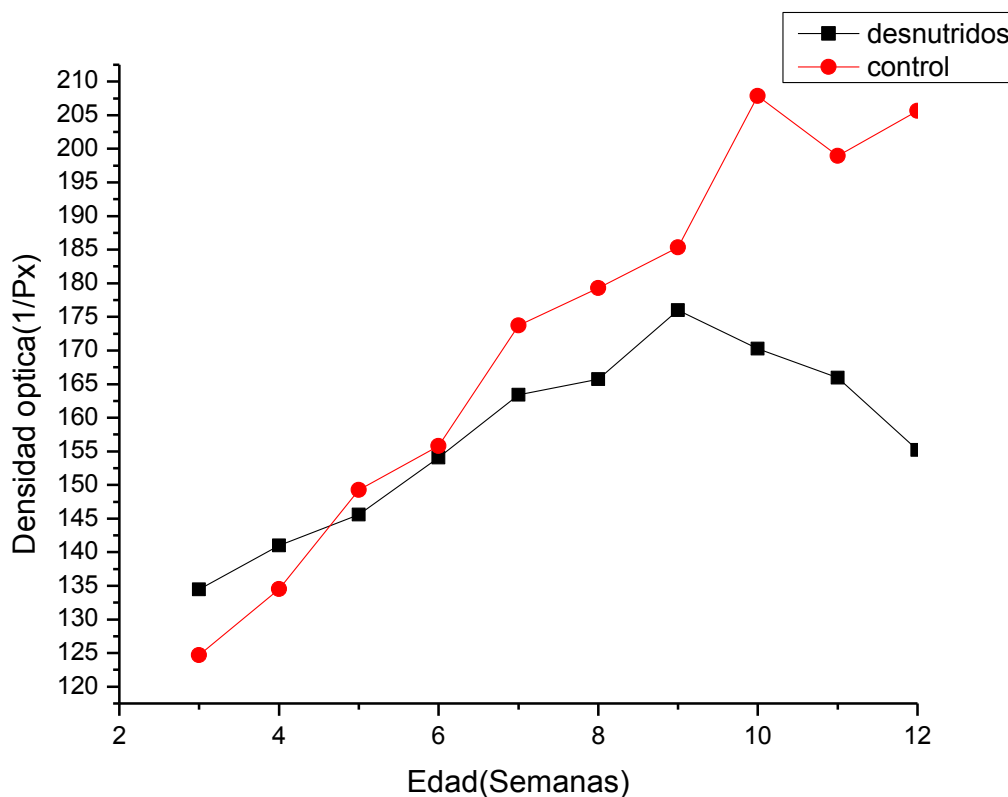


Figura 7. 1 Correspondencia de la edad humana con la edad de la rata

H. Wayne Sampson. Alcohol and other factors affecting osteoporosis risk in women. Alcohol research & health. Vol 26 No. 4 2002.

Para el caso del grupo experimental se observa en la grafica 3 un incremento en la densidad mineral ósea a partir de la semana 1 y hasta la semana 9, donde el crecimiento se observa de forma similar al crecimiento del grupo control, después de la semana 9 la densidad mineral ósea comienza a disminuir paulatinamente, el grupo se comporto de forma esperada, logrando una desnutrición con la dieta pluricarencial al 40 % en todos los nutrimentos.



Grafica 3. 1 Comparación densidad óptica entre el grupo control y el grupo experimental.

8.- Discusión y conclusiones

Para el estudio de la densidad mineral óptica, Se utilizó un equipo dental de difracción en conjunto con un sensor digital, y mediante la calibración del equipo con huesos planos de pollo, pudimos establecer curvas de calibración para obtener las densidades minerales ópticas de huesos de rata en función de la edad, para obtener la curva normal equivalente a la obtenida por DEXA en humanos (Bronner, 1994).

Se necesita conocer el comportamiento tanto normal como deficiente de la densidad mineral de los huesos de ratas a distintas edades, formando así un patrón de comportamiento con el fin de contar con una referencia para realizar comparaciones de la densidad mineral ósea de animales de estudios biológicos.

La comparación de la densidad óptica entre el fémur derecho e izquierdo no representan diferencia significativa ya que se observa el mismo fenómeno por lo que se tomaron los datos del fémur derecho e izquierdo en conjunto.

A la 8^a semana de edad es cuando las ratas alcanzan su madurez sexual (Gutiérrez, 2009). Se puede observar en las gráficas de peso que a partir de la 8^a semana se detiene el crecimiento acelerado para ir aumentando a menor velocidad lo que coincide con lo reportado por Tamaki y Uchiyama en 1995.

La importancia del proyecto radica en que la información disponible, acerca de las modificaciones asociadas a la carencia de Ca con relación a la edad en un modelo experimental es escasa.

Los resultados obtenidos sentarán las bases para la generación de otros modelos para inducir disminución de la densidad mineral ósea (osteopenia) a base de dietas deficientes en Ca, adicionando los demás nutrientes relacionados con su absorción y fijación.

Debido que es recomendable que los requerimientos nutrimentales, se incluyan en la dieta habitual, para favorecer su absorción. De este modo sugerir las necesidades de ingesta de acuerdo a la edad y prevenir y evitar enfermedades relacionadas a la carencia nutricional.

De igual forma será de gran importancia desarrollar una nueva metodología para poder determinar la densidad mineral ósea, de una forma económica para estudios viables y sin requerir de tecnología de alto costo y esto permitiría trazar nuevas metas y perspectivas dentro de la investigación clínica aplicada.

9.- REFERENCIAS CITADAS

Angeles Aguilera M. et al, Efecto del calcio dietético versus el citrato de calcio sobre marcadores bioquímicos convencionales en mujeres perimenopáusicas, *Salud Pública de México*. Vol 47 Nro. 4. 2005.

Barret-Connor E., 1995, The economics and human cost of osteoporotic fracture, *Am. J. Med.*, 98:3-8p.

Bourges-Rodríguez H, Casanueva E y Rosado JL (eds.). Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases fisiológicas Tomo I. Editorial Médica Panamericana, México 391 pp, 2005.

Brem J.J., Trulls H.E., Ortiz de Rus M. L., Picot J. A., Brem J. C., 2005, Concentración de minerales en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos y progesterona, Cátedra de Biofísica y Laboratorio de Análisis Físicoquímicos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Nordeste Comunicaciones Ciencias y Tecnología, Resumen V-019.

Bryant R.J., Cadogan J., Weaver C.M., 1999, The new dietary reference intakes for calcium: implications for osteoporosis, *J. Am. Coll. Nutr.*18, 5:406-412p.

Calvo E., Chalem M., Ángel L. A., Yesid M., 2007, Validación de encuestas de tamización para decisión de densitometría ósea en mujeres colombianas, *Revista Colombiana de reumatología*, Vol. 14, Num. 1, 32-43p.

Cashman KD, Flynn A: Optimal nutrition: calcium, magnesium and phosphorus. *Proc Nut Soc*, 58:477-487, 1999.

- Clark P, Vázquez E. Epidemiology, costs and burden of osteoporosis in Mexico (2010), International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation , Arch Osteoporos, DOI 10.1007/s11657-010-0042-8, 16pp
- Collin-Osdoby P, X Yu, H Zheng, Osdoby P. (2003) mediada por osteoclastos formación-RANKL de murinos RAW 264.7. *En Métodos en Medicina Molecular. Hueso Protocolos de Investigación. Ralston S, Helfrich M, eds. Pulse Humanos, Totowa, Nueva Jersey. Pgs 153-166.*
- Collin-Osdoby, P., Rothe, L. Becker, S. Anderson, F., Osdoby, P. (2000) Disminución de los niveles de óxido nítrico promover la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea en la médula del hueso de pollo y los osteoclastos culturas aisladas *in vitro* como así como *en vivo* en la membrana corioalantoidea de pollo junto con neoangiogénesis. *J. Min hueso. Res.: 15. 474 a 488.*
- Devlin T. (2000). Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas. 3ra edición, Editorial: Reverte, 1110-1115.
- Devlin T., 2000, Bioquímica, Libro de texto con aplicaciones clínicas, 3ra edición, Editorial: Reverte, 1110-1115p.
- Dienhart C., 1981, Anatomía y fisiología humanas, 3ra edición, Editorial: interamericana, México D.F., 30-55p.
- Drake R., Vogl W., Mitchell M., 2005, Gray anatomía para estudiantes, Edition: illustrated, Editorial: Elsevier, España, 513-515p.
- Durant P. y Díaz A., 1995, Informaciones Ecológicas de la población de ratas Casiraguas en área adyacentes a la presa “Las cuevas” complejo

hidroeléctrico de los Andes, Rev. Ecol. Lat. Am., Vol. 3 N°(1-3) Art. 7:39-50p.

Equipo especialistas medicinas alternativas, (2007), Osteoporosis, Editorial LEA.

Feugang JM, Konarski P, Zou D, Stintzing FC, Zou C. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front Biosci* 11: 2574-2589, 2006.

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

Ganong W. F., Gómez J. E, Ramírez J. A., Fernández N. E., 2000, *Fisiología Médica*, 17ª edición, Editorial: El Manual Moderno S.A. de C.V., México D.F., 423-438p.

Garabédian M., David L., Dumas R., Mallet E., 1993, *Métabolisme phosphocalcique normal et pathologique chez L'enfant*, Flammarion Médecine, Editorial: Sciences Paris, 14-21p.

Gebremariam T, Melaku S, Yami A. Effect of different levels of cactus (*Opuntia ficus-indica*) inclusion on feed intake, digestibility and body weight gain in tef (*Eragrostis tef*) straw-based feeding of sheep. *An Feed sci Tech*, 131: 42-51, 2006.

Guéguen *et al*, The Bioavailability of Dietary Calcium, *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 19, No. 90002, 119S-136S, 2000.

Guéguen L., Pointillar A., 2000, The bioavailability of dietary calcium, *Journal of the American Collage of Nutr* 19, 2: 119-136p.

- Gutiérrez A., Gámez R., Pardo B., Marrero G., 2009, Longitud del ciclo estral en ratas Sprague Dawley tratadas in útero con extracto de *Roystonea regia*, Rev. Cubana Farm, Vol. 43, No. 3, Ciudad de la Habana, 1-7p.
- Gutiérrez G., 2005, Principios de Anatomía, Fisiología e higiene, Educación para la salud Publicado, Editorial: Limusa, 26-28p.
- Ibáñez R., 2003, Bone mineral density measurement techniques, An. Sist. Sanit. Navar, Vol. 26, Suplemento 3, 19-26p.
- Knight, Biswas S., Iqbal, 2004, Lo esencial en sistema musculoesquelético y piel, 2nda Edición, España: Elsevier 504-510.
- Knight, Biswas S., Iqbal, 2004, Lo esencial en sistema musculoesquelético y piel, 2nda Edición, Editorial: Elsevier, España 504-510p.
- Lago Acosta, M. Gerardo Parada Tapia, Prevalencia de osteoporosis en población abierta de la Ciudad de México, Ginecol Obstet Mex 2008;76 (5):261-6
- Le Vay D., Diéguez F., Casals N., Giron, 2004, Anatomía y fisiología humana, 2nda edición, Editorial: Paidotribo 37-51p.
- Maikala R. V., 2009, Modified Beer's Law: historical perspectives and relevance in near-infrared monitoring of optical properties of human tissue, International Journal of Industrial Ergonomics 40, Elsevier.
- McDowell LR, Conrad JH, Ellis GL and Loosli JK. Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales. Ed. Cooperative Extension Service, University of Florida Inst Food Agric Sciences 92 pp, 1984.

- Mendoza et. al. Osteoporosis en mexicanas mayores de 40 años. Determinación por densitometría periférica, Rev Med IMSS, 41 (3): 193-202, 2003.
- Morgan S., Weinsier R., 1999, Nutrición clínica, 2nda Edición, Editorial: Elsevier, España,156-168p
- Murillo-Uribe A., Deleze-Hinojosa M., Aguirre E., Villa A., Calva J., 1999, Osteoporosis en la mujer posmenopausica mexicana, Magnitud del problema, Estudio multicéntrico, Ginecol. Obstet. Mex. 67, 5: 227-233p.
- Nutrition and Development of Peak Bone Mass - Weaver, C.M., Peacock, M., Johnston, C. Adolescent Nutrition in the Prevention of Postmenopausal Osteoporosis. J. Clin. Endocrin. Metab., 84(6):1839-1843, 1999.
- Ortega R., Requejo A., 2000, Nutriguía: Manual de nutrición clínica en atención primaria, Edicion illustrated, Editorial: Complutense, 124-126p.
- Pansu D., Bronner F., 1999, Nutritional Aspects of calcium absorption, J. Nutr. 129: 9-12p.
- Pocock G., Richards C., 2005, Fisiología Humana: La base de la Medicina, 2nda Edición, Editorial: Elsevier, España, 243-244p.
- Rojas Molina I.; M. Cornejos; M. E. Rodríguez, Cambios Morfológicos y Estructurales en Pericarpio de Maíz y su Influencie en la Difusión de Calcio Durante el Proceso de Nixtamalización, 2007.
- Salter R., Alvarez F., Goenaga, Faig M., 2000, Trastornos y lesiones del sistema musculoesquelético: Introducción a la ortopedia, fracturas y lesiones articulares, Reumatología, osteopatía metabólica y rehabilitación, 3era edición, Editorial: Elsevier, España 698-710p.

Segura Correa VM, Castellanos Ruelas AF. Efecto de la suplementación fosforada sobre la ganancia de peso de bovinos en pastoreo en Yucatán México. *Vet Mex* 30: 257-261, 1999.

Serrano S., 1998, II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patología, Estructura y función del hueso normal, [Http://www.conganat.org/IIcongreso/conf/018/biomec.htm](http://www.conganat.org/IIcongreso/conf/018/biomec.htm).

Tamaki Tetsuro and Uchiyama Shuichi. Absolute and Relative Growth of rat Skeletal Muscle. *Physiology & Behavior*. 57(5):913-919, 1995.

Teegarden D., Proulx W. R., Martin B. R., Zhao J., McCabe G. P., Lyle R.M., Peacock M., Slemenda C., Johnston C. C., Weaver C. M., 1995, Peak bone mass in young women, *J Bone Miner Res* 10:711-715p.

Tresguerras J.A.F., Ariznavarreteta C., Cachoteiro V., Cardinali D., Escrich E. Gil Loyzaga P., Laera J.V., Mora F., Romano M., Tamago J., 2005, *Fisiología Humana: Control del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio*, 3 era. Edición, Editorial: Mac Graw Hill, España, 965-983p.

Zheng, H. Yu, H., Collin Osdoby, P. Osdoby, P. (2006) RANKL estimula la iNOS y la producción de NO en el Desarrollo de osteoclastos a través de NF- κ B: autocrina de factores negativos de Mecanismo Regular osteoclastogénesis y hueso. *Resorción Un J Biol química*; 281 (23) :15809-20